

dr hab. Magdalena Kowalik
Zakład Fizjologii i Toksykologii Rozrodu
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk
ul. Tuwima 10, 10-748 Olsztyn

Olsztyn, 08.12.2022

Recenzja pracy doktorskiej mgr Patrycji Witek

pt. "Molekularne aspekty funkcjonowania jajnika dojrzałej płciowo świni po neonatalnej ekspozycji na związki o aktywności endokrynnej"

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Witek zatytułowana "Molekularne aspekty funkcjonowania jajnika dojrzałej płciowo świni po neonatalnej ekspozycji na związki o aktywności endokrynnej" została wykonana w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod opieką Promotora naukowego Pani dr hab. Katarzyny Knapczyk-Stwora, prof. UJ. Badania do pracy doktorskiej były realizowane ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu badawczego OPUS nr 2015/19/B/NZ9/00420.

Podstawą ocenianej dysertacji jest spójny tematycznie cykl czterech oryginalnych publikacji naukowych oraz poprzedzające je polskojęzyczne opracowanie. Przedstawione do oceny publikacje naukowe, wymienione poniżej, ukazały się w latach 2020- 2022 w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach, indeksowanych w bazie JCR (*Journal Citation Reports*) oraz umieszczonych w wykazie czasopism naukowych Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN):

1. **Witek P**, Grzesiak M, Kozirowski M, Słomczyńska M, Knapczyk-Stwora K. Effect of neonatal exposure to endocrine-active compounds on plasma lipid and steroid concentrations, and morphology of luteal tissue in the adult pig. *Domestic Animal Endocrinology* 2020;70:106381 (IF =2,290; pkt. MEiN = 70)

2. **Witek P**, Grzesiak M, Kotula-Balak M, Kozirowski M, Słomczyńska M, Knapczyk-Stwora K. Effect of neonatal exposure to endocrine-active compounds on epigenetic regulation of gene expression in corpus luteum of gilts. *Theriogenology* 2021;159: 45–52 (IF = 2,74; pkt. MEiN = 140)

3. **Witek P**, Enguita FJ, Grzesiak M, Costa MC, Gabriel A, Kozirowski M, Słomczyńska M, Knapczyk-Stwora K. Effects of neonatal exposure to methoxychlor on corpus luteum in gilts: A transcriptomic analysis. *Molecular Reproduction Development* 2021;88(3):238-248 (IF = 2,609; pkt. MEiN = 100)

4. **Witek P**, Grzesiak M, Kozirowski M, Słomczyńska M, Knapczyk-Stwora K. Long-term changes in ovarian follicles of gilts exposed neonatally to methoxychlor: effects on oocyte-derived factors, anti-müllerian hormone, follicle-stimulating hormone, and cognate receptors. *International Journal of Molecular Sciences* 2022;23(5):2780. (IF = 5,923; pkt. MEiN = 140)



Łączny współczynnik oddziaływania (IF) czasopism, w których opublikowano prace będące podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora wynosi 13,562, a suma punktów Ministerstwa Edukacji i Nauki to 450.

Należy podkreślić, że Pani mgr Patrycja Witek jest pierwszym autorem we wszystkich czterech publikacjach, w tym w jednej z nich jest również autorem korespondencyjnym. Zgodnie z dołączonymi do rozprawy doktorskiej oświadczeniami wszystkich współautorów publikacji, udział Doktorantki w każdej z prac był wiodący, wynosił od 50 do 60% i polegał na przygotowaniu materiału do badań, wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu i udzielaniu odpowiedzi na pytania recenzentów podczas procesu publikacyjnego. W związku z tym, znaczący wkład Doktorantki w powstanie każdej z prac nie budzi żadnych wątpliwości.

Przedłożone do oceny publikacje są tematycznie spójne i skupiają się wokół wyraźnie wyodrębnionego problemu, który dotyczy określenia wpływu narażenia/ ekspozycji na wybrane związki o aktywności endokrynnej (EACs) w okresie neonatalnym na funkcjonowanie ciała żółtego (CL) oraz wybrane czynniki zaangażowane w regulację folikulogeny u dojrzałej płciowo świni. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badawcza jest w pełni uzasadniona i jest po części kontynuacją naukowych zainteresowań Zespołu badawczego, w którym Doktorantka realizowała badania do pracy doktorskiej

Związki o aktywności endokrynnej zaliczane są do trwałych zanieczyszczeń środowiska, które budzą duże zainteresowanie i są tematem licznych badań naukowych. Związki te powstają głównie jako produkt uboczny przemysłowej działalności człowieka. Ich wysoka lipofilność i duża odporność na biodegradację, pozwala na ich łatwe rozprzestrzenianie się w środowisku oraz bioakumulację w tkankach organizmów żywych, gdzie zakłócają prawidłowe funkcjonowanie układu endokrynnego. Związki te, naśladując lub hamując działanie endokrynnych hormonów, destabilizują homeostazę organizmu i prowadzą do zaburzenia równowagi hormonalnej, co w konsekwencji prowadzi do upośledzenia funkcji wielu układów, w tym układu rozrodczego. Dotychczas wykazano, że w układzie rodnym samicy, EACs mogą zaburzać proces folikulogenezy, steroidogenezy, przebieg owulacji, implantację oraz rozwój zarodka. Mechanizm działania tych związków u ludzi i zwierząt związany jest najczęściej z zaburzeniami sygnalizacji estrogenowej i androgenowej, które są przedmiotem badań w niniejszej pracy. Wcześniejsze badania Zespołu, w którym Doktorantka realizowała pracę doktorską wykazały, że ekspozycja prosiąt w okresie neonatalnym na wybrane EACs zaburza formowanie oraz funkcjonowanie pęcherzyków jajnikowych świni, co może skutkować dysfunkcją jajników. Najnowsze badania wskazują, że zaburzenie gospodarki hormonalnej przez związki endokrynnie aktywne, w krytycznym dla rozwoju jajnika okresie prenatalnym i neonatalnym może spowodować długotrwałe skutki, które mogą negatywnie wpływać na funkcje rozrodcze w okresie dojrzałości płciowej. Długotrwałe efekty oddziaływania EACs na organizm są prawdopodobnie związane ze zmianami w mechanizmach epigenetycznych, jednak molekularny mechanizm tego działania na poziomie



jajnika, nie jest w pełni wyjaśniony. Prawidłowe funkcjonowanie jajników warunkuje prawidłowy przebieg cyklu oraz zapoczątkowanie i utrzymanie ciąży dlatego też, określenie wpływu EACs na jajnik oraz wybrane procesy zaangażowane w funkcjonowanie tego narządu, których podjęła się Doktorantka należy uznać za nowatorskie i istotne. Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Witek wpisuje się w przedstawione zagadnienia. Ma ona na celu pełniejsze poznanie roli i mechanizmu wpływu związków o aktywności endokrynnej na rozwój i funkcjonowanie układu rozrodczego. Zagadnienia poruszane przez Doktorantkę są aktualne i godne uwagi.

Ze względu na fakt, że zarówno strona merytoryczna, jak i wartość naukowa przedstawionych do oceny publikacji została potwierdzona przez Recenzentów i Edytorów czasopism, którzy zaakceptowali prace do druku, oceniam je jedynie w aspekcie poznawczym i jako wkład w rozwój dyscypliny.

Badania do pracy doktorskiej przeprowadzono na jajnikach sów dojrziałych płciowo, które tuż po urodzeniu poddano 10-dniowej ekspozycji na: propionian testosteronu (TP, androgen), flutamid (FLU, antyandrogen), 4-tert-oktylofenol (OP, związek o aktywności estrogennej), ICI 182,780 (ICI, antyestrogen) lub metoksychlor (MXC, związek o aktywności estrogennej, antyestrogennej i antyandrogennej). Od zwierząt po osiągnięciu dojrzałości płciowej pobrano osocze, ciała żółte oraz pęcherzyki jajnikowe, które przeznaczono do dalszych analiz.

W pierwszej publikacji składającej się na rozprawę doktorską, opublikowanej w *Domestic Animal Endocrinology*, Pani mgr Patrycja Witek podjęła się oceny wpływu narażenia prosiąt na TP, FLU, OP, ICI i MXC w okresie neonatalnym, na morfologię CL, profil lipidowy oraz stężenie hormonów steroidowych (progesteronu, androstendionu, testosteronu, estronu i estradiolu) w osoczu dojrzałej płciowo świni. Doktorantka wykazała, że badane związki modulują stężenie lipidów oraz steroidów w osoczu. Ponadto, zaobserwowała hipertrofię i wakuolizację komórek lutealnych oraz wzrost liczby kropli lipidowych po ekspozycji prosiąt na TP, FLU i ICI. Uzyskane wyniki wskazują, że narażenie zwierząt na EACs w okresie neonatalnym może zmieniać równowagę hormonalną i w ten sposób zaburzać morfologię oraz funkcje CL u dojrzałych sów. Ponadto, związki endokrynnie aktywne mogą wpływać na profil lipidowy osocza i tą drogą przyczyniać się do rozwoju długotrwałych zmian, które w konsekwencji prowadzą do zakłócenia procesu steroidogenezy u sów.

Celem pracy opublikowanej w *Theriogenology* było określenie neonatalnego wpływu badanych związków o aktywności endokrynnej na globalną metylację DNA oraz ekspresję metylotransferaz DNA, w tym DNMT1, DNMT3A i DNMT3B, a także białek zaangażowanych w biogenezę miRNA (DROSHA, DICER1, XPO5, AGO2) w ciałkach żółtych dojrzałej płciowo świni. Doktorantka wykazała, że ICI i MXC zwiększyły globalną metylację DNA oraz poziom białka DNMT1 w CL. Wskazuje to, że zwiększony poziom metylacji DNA związany jest ze wzrostem poziomu enzymu DNMT1 odpowiadającego za metylację



DNA *de novo*, co może prowadzić do supresji genów w CL i zaburzenia funkcji tkanki lutealnej. Stwierdzono również, że ekspozycja na FLU, OP i ICI zaburza ekspresję białek zaangażowanych w biogenezę miRNA. Uzyskane wyniki sugerują, że zmiany epigenetyczne, w tym zaburzona metylacja DNA oraz biogeneza miRNA, mogą być częścią sieci regulacyjnej, która pośredniczy w długoterminowym wpływie związków o aktywności endokrynej na funkcję ciała żółtego u świni.

Kolejna publikacja zamieszczona w *Molecular Reproduction and Development*, miała na celu określenie neonatalnego wpływu metoksychloru na: (a) profil ekspresji miRNA oraz mRNA w CL świni oraz (b) poziom hormonów steroidowych oraz prostaglandyn PGF2 i PGE2 w tkance lutealnej dojrzałych świń. Doktorantka wykazała, że neonatalna ekspozycja na MXC spowodowała zmiany w stężeniu androstendionu i estronu oraz PGE2 w CL. Ponadto, przy zastosowaniu metody sekwencjonowania nowej generacji oraz wielostopniowego algorytmu bioinformatycznego, zidentyfikowała 53 miRNA oraz 359 genów o zmienionej ekspresji w CL w odpowiedzi na neonatalne działanie MXC. Analizy funkcjonalne wskazały, że działanie metoksychloru zaburza funkcjonowanie CL poprzez wpływ na ekspresję genów związanych z lipogenezą, steroidogenezą, transportem błonowym, odpowiedzią immunologiczną, sygnalizacją komórkową oraz adhezją. Należy zaznaczyć, że Doktorantka wykazała również wzrost ekspresji genów związanych z luteolizą, co wskazuje, że neonatalna ekspozycja na MXC może prowadzić do przedwczesnej luteolizy strukturalnej u świń dojrzałych płciowo. Dodatkowo, Pani mgr Patrycja Witek wykazała zmiany w profilu ekspresji miRNA, co sugeruje, że cząsteczki te mogą być mediatorami długotrwałego efektu działania MXC w CL. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę o możliwych drogach działania metoksychloru w jajniku świni.

Czwarta praca zgłoszona do oceny ukazała się w *International Journal of Molecular Sciences* i miała na celu określenie wpływu narażenia na MXC w okresie neonatalnym na poziom hormonu antymullerowskiego (AMH) i hormonu folikulotropowego (FSH) w osoczu oraz ekspresję i lokalizację czynników mających znaczenie w folikulogenezie, takich jak: czynnik wzrostu i różnicowania 9 (GDF9), białko morfogenetyczne kości 15 (BMP15), hormon AMH i ich receptorów (ACVR1, AMHR2, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, TGFBR1), oraz hormon folikulotropowy (FSH) i jego receptor (FSHR) w pęcherzykach przedantralnych i małych antralnych dojrzałej płciowo świni. Doktorantka stosując testy immunoenzymatyczne oraz analizy real-time PCR, western blot i immunohistochemiczne wykazała, że neonatalna ekspozycja na MXC zmienia profil ekspresji czynników GDF9, BMP15, AMH oraz ich receptorów, a także zmienia poziom FSH i jej receptora w pęcherzykach przedantralnych i antralnych. Zaburzenie sygnalizacji GDF9, BMP 15, AMH i FSH w jajniku dojrzałej płciowo świni może prowadzić do przyspieszenia wstępnej, jak i zakłócenia cyklicznej rekrutacji pęcherzyków jajnikowych u świń dojrzałych płciowo. Obserwowane zmiany mogą prowadzić w konsekwencji do nieprawidłowości w procesie owulacji.

Mk

Lektura publikacji była dla mnie satysfakcjonująca i nie mam żadnych uwag merytorycznych. Dane przedstawione w publikacjach mają charakter nowatorski, a informacje w nich zawarte wzbogacają wiedzę na temat roli związków o aktywności endokrynej w rozwoju i funkcjonowaniu układu rozrodczego samicy. Ich wartość poznawcza jest bardzo wysoka, o czym świadczy fakt ich opublikowania w renomowanych czasopismach naukowych o tematyce obejmującej biologię i endokrynologię rozrodu.

Jak wspomniałam, oryginalne prace badawcze, które składają się na rozprawę, opatrzone są obszernym, 107-stronicowym, opracowaniem w języku polskim, w skład którego wchodzi: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji, wstęp, hipoteza naukowa i zadania badawcze, model badawczy, publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej wraz z podsumowaniem każdej publikacji, kopią publikacji oraz oświadczeniami współautorów, dyskusja, podsumowanie i wnioski oraz wykaz wybranych pozycji bibliografii (86). Chciałabym podkreślić, że ta część pracy została przygotowana z niezwykłą dbałością o szczegóły, bardzo starannie i estetycznie pod względem językowym i edytorskim. Świadczy to o ogromnej pracy jaką Doktorantka wykonała w czasie przygotowania tego opracowania oraz zdolnością poprawnego i przejrzystego posługiwania się językiem polskim.

We *Wstępie* będący syntetycznym przeglądem literatury, Doktorantka wyczerpująco przedstawiła dotychczasowy stan wiedzy w zakresie omawianego zagadnienia. Szczegółowo opisała funkcję jajnika, proces folikulogenezy i owulacji oraz czynniki regulujące omawiane procesy. Ponadto, przedstawiła powstawanie i rolę ciała żółtego, czynniki oraz mechanizmy epigenetyczne zaangażowane w regulację funkcjonowania CL, z uwzględnieniem procesu metylacji DNA oraz biogenezy miRNA. Opisała również EACs oraz ich wpływ na procesy rozrodcze. Doktorantka zwróciła uwagę na brak danych dotyczących określenia wpływu neonatalnego narażenia na EACs na funkcjonowanie jajników świni domowej u osobników dojrzałych płciowo. Rozdział ten jest napisany dojrzałe i doskonale prowadzi do postawionej hipotezy badawczej oraz celu pracy, co świadczy o pełnym zrozumieniu tematu przez Doktorantkę. *Hipoteza naukowa* oraz cel pracy zostały poprawnie sformułowane. Wyróżnione zostały cztery zadania badawcze, które następnie były konsekwentnie realizowane. Opis *Materiału badawczego* wykorzystanego w doświadczeniach jest przejrzysty, jednak zabrakło wg mnie chociaż skondensowanego przedstawienia zastosowanych metod badawczych. Szczegółowe opisy metod znajdują się w załączonych publikacjach, ale uważam, że informacje te powinny się znaleźć w opracowaniu polskojęzycznym rozprawy. Należy podkreślić różnorodność wykonanych analiz, co świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę nowoczesnego i żmudnego warsztatu badawczego. Stosowane metody to m.in.: analiza ekspresji genów metodą real-time PCR, analiza ekspresji białek metodą Western-blot, sekwencjonowanie nowej generacji wraz z bioinformatyczną analizą danych, barwienia histologiczne i immunohistochemiczne, analizy kolorymetryczne, immunoenzymatyczne i radioimmunologiczne do oznaczenia koncentracji hormonów. W rozdziale *Dyskusja* Doktorantka opisała

MU

w skondensowanej formie najważniejsze wyniki zawarte w poszczególnych pracach stanowiących rozprawę doktorską oraz analizowała je odnosząc do badań innych Autorów, co wskazuje na bardzo dobrą znajomość problematyki związanej z tematem przedstawionej dysertacji. Opracowanie zamyka podsumowanie oraz cztery wnioski, które w jednoznaczny sposób pokazują na zrealizowanie postawionych celów pracy i stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę na temat wpływu narażenia na EACs w okresie neonatalnym na funkcjonowanie CL oraz wybrane czynniki zaangażowane w regulację folikulogenezy u dojrzałych płciowo świń. Po przeczytaniu opracowania nasunęły mi się następujące pytania dotyczące pracy:

1. W *Podsumowaniu* na stronie 98. pojawia się sugestia, że „długotrwałe skutki narażenia na MXC mogą wynikać z nieprawidłowego profilu ekspresji miRNA”. Jakie badania zaplanowałaby Pani, żeby potwierdzić tę sugestię?
2. Jaki problem badawczy, który wyłonił się trakcie realizacji badań, uważa Pani za najbardziej interesujący i wymagający dalszych analiz?

Za najważniejsze osiągnięcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Witek uznaję:

(1) wykazanie, że neonatalna ekspozycja na związki o aktywności endokrynej ma długotrwałe skutki prowadzące do: (a) zmian w morfologii oraz funkcjonowaniu CL, których przyczyną mogą być nieprawidłowości w profilu lipidowym osocza, oraz zmiany epigenetyczne w CL, w tym zaburzona metylacja DNA i biogeneza miRNA; (b) zaburzeń poziomu prostaglandyn oraz funkcji steroidogennej CL, co może powodować przedwczesną luteolizę; oraz (c) przyspieszonej wstępnej rekrutacji i zaburzonej cyklicznej rekrutacji pęcherzyków jajnikowych u dojrzałych płciowo świń;

(2) potwierdzenie, że okres neonatalny jest krytyczny dla prawidłowego funkcjonowania jajników po uzyskaniu dojrzałości płciowej; oraz

(3) wykazanie że zaburzenie równowagi hormonalnej w okresie neonatalnym, poprzez obecne w środowisku związki o aktywności endokrynej ma długotrwałe konsekwencje, mogące prowadzić do nieprawidłowości w procesie folikulogenezy i funkcjonowaniu ciała żółtego świni.

Podsumowując, rozprawę Pani mgr Patrycji Witek oceniam bardzo wysoko. Stanowi ona oryginalne, interesujące i kompleksowe opracowanie dostarczające nowych informacji na temat działania związków endokrynie czynnych w regulacji funkcji jajnika świni. Podjęta tematyka jest aktualna i nowatorska, a uzyskane wyniki wzbogacają w znaczący sposób dotychczasową wiedzę z zakresu biologii rozrodu. Uzyskane wyniki badań stanowią nie tylko wartość poznawczą, ale są również podstawą do planowania i prowadzenia kolejnych interesujących eksperymentów. Należy podkreślić, że przeprowadzone badania wymagały od Doktorantki zastosowania złożonych, czasochłonnych procedur doświadczalnych *in vivo* oraz *in vitro* oraz dużego zaangażowania. Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą z zakresu tematyki



prowadzonych badań oraz nowatorskim warsztatem badawczym.

WNIOSEK KOŃCOWY

Z pełnym przekonaniem uznaję, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Patrycji Witek pt: *"Molekularne aspekty funkcjonowania jajnika dojrzałej płciowo świni po neonatalnej ekspozycji na związki o aktywności endokrynej"* spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2018, r. poz.1668 z późn. zm.) stawiane kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora. Dlatego też, zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Witek oraz dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną dysertacji oraz oryginalność uzyskanych wyników, co znajduje odzwierciedlenie w opublikowaniu ich w czasopismach o światowym zasięgu, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Magdalena Kowalik
dr hab. Magdalena Kowalik