



Prof. dr hab. Nina Smolińska
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
10-718 Olsztyn
Ul. Oczapowskiego 1A

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Witek
pt. „Molekularne aspekty funkcjonowania jajnika dojrzałej płciowo świni po
neonatalnej ekspozycji na związki o aktywności endokrynej”
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Katarzyny Knapczyk-Stwora, prof. UJ
w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana na wniosek Rady
Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA

Oceniana rozprawa doktorska składa się z czterech oryginalnych publikacji – niżej
wyszczególnionych – opublikowanych w języku angielskim w renomowanych czasopismach
z listy *Journal Citation Reports*, których wskaźniki naukometryczne są wysokie: łączny
wskaźnik *IF* z roku opublikowania wynosi **14,233** a liczba punktów *MEiN* wynosi **450**.

1. **Witek P**, Grzesiak M, Koziorowski M, Słomczynska 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. doi: 10.1016/j.domaniend.2019.07.009. (**IF – 2,290; pkt. MEiN – 70**)
2. **Witek P**, Grzesiak M, Kotula-Balak M, Koziorowski M, Słomczynska 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. doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.10.010. (**IF – 2,923; pkt. MEiN – 140**)

3. **Witek P**, Enguita FJ, Grzesiak M, Costa MC, Gabriel A, Koziorowski M, Slomczynska M, Knapczyk-Stwora K. Effects of neonatal exposure to methoxychlor on corpus luteum in gilts: A transcriptomic analysis. *Molecular Reproduction and Development* 2021; 88(3):238-248. doi: 10.1002/mrd.23463. (IF – 2,812; pkt. MEiN – 100)
4. **Witek P**, Grzesiak M, Koziorowski M, Slomczynska 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 Science* 2022; 23(5):2780. doi: 10.3390/ijms23052780. (IF – 6,208; pkt. MEiN – 140)

Publikacje są współautorskie (od 5 do 8 autorów) i Doktorantka jest w nich pierwszym autorem. Autorem korespondencyjnym w trzech publikacjach jest Pani Promotor, dr hab. Katarzyna Knapczyk-Stwora, prof. UJ. W publikacji czwartej autorami korespondencyjnymi są Pani Promotor i Doktoranta. Z przedłożonych oświadczeń współautorów wynika, że Pani mgr Patrycja Witek pełniła wiodącą rolę w powstawaniu tych publikacji. Jej indywidualny udział w powstaniu poszczególnych publikacji jest szacowany na 50-60% i nie budzi wątpliwości. Chciałabym, jednakże zwrócić uwagę na pewne nieścisłości, które pojawiły się pomiędzy oświadczeniami dołączonymi do rozprawy, a oświadczeniami umieszczonymi w pracach oryginalnych (publikacja nr 1, 2, 4, w publikacji nr 3 nie znalazłam oświadczeń) w rozdziałach „Author Contributions”. Wskażę tylko niektóre z nich. W odniesieniu do publikacji nr 1, w oświadczeniu dołączonym do rozprawy, Doktorantka wskazuje, że brała udział w napisaniu manuskryptu, niestety brakuje tej informacji w oświadczeniu umieszczonym w pracy oryginalnej. W publikacji nr 2, Doktorantka w oświadczeniu dołączonym do rozprawy nie wskazała udziału w zdobywaniu środków finansowych, pomimo iż ta informacja widnieje w oświadczeniu umieszczonym w pracy oryginalnej. Podobnie w publikacji nr 4, Doktoranta w oświadczeniu dołączonym do rozprawy nie wskazała udziału w opracowaniu koncepcji badań, inaczej niż ma to miejsce w pracy oryginalnej. Muszę przyznać, że brakuje mi udziału Doktorantki w opracowaniu koncepcji badań w odniesieniu do trzech pozostałych prac, chociażby w zakresie metodycznym. Dodatkowo, niektórzy współautorzy wskazują w oświadczeniach dołączonych do rozprawy, że brali udział w opracowaniu koncepcji badań, co jednak nie znajduje odzwierciedlenia w oświadczeniach zawartych w pracach oryginalnych.

Zbiór publikacji stanowiących zasadniczą część rozprawy doktorskiej uzupełniony jest polskojęzycznym opracowaniem, w skład którego wchodzi: spis treści, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wstęp, hipoteza badawcza i zadania badawcze rozprawy, model badawczy podsumowanie każdej załączonej anglojęzycznej publikacji, oświadczenia współautorów, dyskusja, podsumowanie i wnioski, literatura (86 pozycji). W moim odczuciu w opracowaniu zabrakło schematów dotyczących realizowanych zadań badawczych oraz rozdziału „Wykaz stosownych skrótów”,

które byłyby bardzo pomocne podczas lektury rozprawy doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że część prezentowanych wyników badań uzyskano dzięki realizacji projektu badawczego, którego kierownikiem jest Pani Promotor dr hab. Katarzyna Knapczyk-Stwora, prof. UJ (OPUS 10, 2015/19/B/NZ9/00420), finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Pod względem formalnym oceniana rozprawa spełnia wszystkie wymogi stawiane tego typu opracowaniom.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY

Tematyka badawcza ocenianej rozprawy doktorskiej dotyczy określenia efektów ekspozycji w okresie neonatalnym na związki aktywne endokrynnie (ang. *endocrine-active-chemicals*, EACs), które antagonizują lub naśladują działanie androgenów lub estrogenów, na dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych i funkcjonowanie ciałek żółtych dojrziałych płciowo świń.

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania naukowców i lekarzy aktywnymi hormonalnie substancjami, zwanymi także dysruptorami i biomimetykami hormonów, które wpływają niekorzystnie na układ rozrodczy. Strukturalne podobieństwo do endogennych hormonów steroidowych powoduje, że związki te zdolne są do łączenia z receptorami hormonów steroidowych, w tym estrogenów, androgenów i progesteronu. Wiele tego typu związków, to syntetyczne substancje pochodzenia antropogenicznego, wykorzystywane w przemyśle rolniczym, chemicznym i farmaceutycznym lub stanowiące jego produkty uboczne, ale także substancje naturalnie występujące w środowisku. Związki te zidentyfikowano niemal we wszystkich środowiskach przyrodniczych, łącznie z wodami powierzchniowymi, glebą oraz powietrzem atmosferycznym. Tego typu substancje cechuje znaczna oporność na procesy biodegradacji oraz charakter lipofilowy (skłonność do rozpuszczania się w tłuszczach), co oznacza, że w danym ekosystemie mogą ulegać bioakumulacji i sorpcji. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), EACs to substancje egzogenne lub mieszaniny substancji, które wpływają na zmianę funkcjonowania układu hormonalnego wywołując niekorzystne skutki w organizmie człowieka, jego potomstwie lub subpopulacji. Prawidłowa regulacja hormonalna zapewnia homeostazę organizmu. W okresie prenatalnym hormony wpływają na proces organogenezy, natomiast w okresie neonatalnym i postnatalnym wpływają m.in. na wzrost, rozwój, dojrzewanie płciowe, procesy poznawcze i rozrodczość. Liczne doniesienia naukowe potwierdzają, że zdolności rozrodcze człowieka i zwierząt gospodarskich ulegają osłabieniu. W związku z tym faktem, prowadzenie badań dotyczących EACs, których nawet śladowa obecność w środowisku może przyczyniać się do zaburzenia równowagi hormonalnej, a tym samym wywierać negatywny wpływ na funkcje rozrodcze, uważam za niezwykle pożądane, aktualne i interesujące. O tym, że badania są ważne i nowatorskie może również świadczyć fakt uzyskania bardzo wysokiej ich oceny i co z tym jest związane – finansowania przez NCN na ich prowadzenie w ramach wymienionego wcześniej projektu. Zadania badawcze, które wspólnie z Zespołem zrealizowała Doktorantka,

są kontynuacją badań prowadzonych od wielu lat przez Zespół Pani Promotor. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktoranta w polskojęzycznym opracowaniu bardzo rzetelnie i precyzyjnie wskazała co już zostało zrobione, a co jest nowością w prezentowanej rozprawie doktorskiej.

Hipoteza badawcza rozprawy doktorskiej zakładała, że równowaga między poziomem androgenów i estrogenów w okresie neonatalnym, która jest istotna dla prawidłowego funkcjonowania jajników w okresie dojrzałości płciowej, może zostać zaburzona przez występujące w środowisku związki o aktywności endokrynej. W celu weryfikacji hipotezy określono wpływ ekspozycji na propionian testosteronu (TP, androgen), flutamid (FLU, antyandrogen), 4-*tert*-oktylofenol (OP, związek o aktywności estrogennej), ICI 182,780 (ICI, antyestrogen) i metoksychlor (MXC, związek o aktywności estrogennej, antyestrogennej i antyandrogennej) w okresie neonatalnym na morfologię ciałek żółtych, profil lipidowy oraz stężenie hormonów steroidowych w osoczu dojrzałych płciowo świń oraz na globalną metylację DNA, ekspresję metylotransferaz DNA oraz białek zaangażowanych w biogenezę miRNA w ciałkach żółtych świń. Istotnym uzupełnieniem rozprawy doktorskiej są badania dotyczące analizy profilu ekspresji miRNA oraz mRNA uzupełnione analizą *in silico* interakcji pomiędzy miRNA o zmienionej ekspresji, a regulowanymi przez nie mRNA oraz analiza poziomu hormonów steroidowych i prostaglandyn w tkance lutealnej świń po neonatalnej ekspozycji na MXC. Dodatkowo, określono wpływ ekspozycji na MXC w okresie neonatalnym na ekspresję i lokalizację czynników z nadrodziny transformującego czynnika wzrostu beta (TGF β) oraz ich receptorów i receptora FSH w pęcherzykach przedantralnych i małych antralnych oraz zbadano poziom hormonu anty-Müllerowskiego (AMH) i hormonu folikulotropowego (FSH) w osoczu świń.

Należy podkreślić, że oceniane prace są spójne pod względem tematycznym i metodycznym oraz wartościowe pod względem poznawczym. Pozytywnie oceniam uzasadnienie podjęcia badań, postawioną hipotezę badawczą i sformułowany cel badań. W mojej opinii cel został w pełni zrealizowany. Zakres stosowanych metod i analiz laboratoryjnych jest bardzo szeroki, co wskazuje na duże umiejętności Doktorantki i bogaty warsztat eksperymentalny. Wykorzystano w niej wiele technik m.in. lokalizację kropli lipidowych, barwienia histologiczne, immunohistochemię, testy kolorymetryczne, testy radioimmunologiczne, testy immunoenzymatyczne, real-time PCR, a także elektroforezę SDS-PAGE i Western blot. Do analizy profilu ekspresji miRNA i mRNA wykorzystano nowoczesne, wysokoprzepustowe metody sekwencjonowania nowej generacji (NGS), metody mi-RNAseq i mRNAseq używając platformę Illumina HiSeq 2500. Ponadto, funkcjonalną analizę transkryptomu przeprowadzono w oparciu o bazę danych Ontologii Genów (ang. Gene Ontology, GO). W celu analizy profilu miRNA użyto bazy danych miRBase (Sus scrofa 10.2) oraz oprogramowanie Oasis 2. Do analizy powiązań między miRNA o zwiększonej ekspresji a ich docelowymi mRNA o obniżonej ekspresji wykorzystano algorytm miRWalk2. Wyniki uzyskane tymi metodami potwierdzono za pomocą techniki real-time PCR. Wysoko oceniam umiejętność wykorzystania



metod wysokoprzepustowych i analizy wyników dzięki nim uzyskanych. Zastosowane w badaniach analizy laboratoryjne są właściwie dobrane do założonego celu badawczego. Chciałabym zaznaczyć, że powyższe techniki wymagały ogromnego nakładu pracy, co zasługuje na uznanie.

W swojej pracy Doktorantka wykazała, że ekspozycja na TP, FLU, OP, ICI i MXC przyczynia się do zmian poziomów hormonów steroidowych i profilu lipidowego w osoczu świń dojrzałych płciowo, zmian poziomów hormonów steroidowych i prostaglandyn w homogenatach tkanki lutealnej oraz do hipertrofii i wakuolizacji komórek lutealnych. Uzyskane wyniki wskazują, że nieprawidłowy poziom hormonów w okresie neonatalnym może zaburzać nie tylko morfologię, ale również funkcję ciała żółtego. Bardzo interesujące i cenne wydaje się również wykazanie, że neonatalna ekspozycja na EACs zaburza globalną metylację oraz biogenezę miRNA w ciałkach żółtych, co może być przyczyną długotrwałych skutków neonatalnego narażenia na te związki. Stwierdzono, że zaburzenia funkcji ciałek żółtych świń, wykazane po neonatalnej ekspozycji na EACs, mogą być częściowo związane ze zmianami na poziomie epigenetycznym. Za szczególnie istotne należy uznać wyniki uzyskane metodami sekwencjonowania nowej generacji. Analiza funkcjonalna wykazała powiązanie genów o zmienionej pod wpływem MXC ekspresji z lipogenezą, steroidogenezą, transportem przez błony, odpowiedzią immunologiczną oraz sygnalizacją komórkową. Ponadto, zaobserwowano wzrost ekspresji genów, których produkty są kluczowe w procesie luteolizy oraz obniżenie ekspresji genów, których produkty zaangażowane są w adhezję komórkową, co może sugerować wystąpienie przedwczesnej luteolizy strukturalnej ciałek żółtych. Dodatkowo stwierdzono, że długotrwałe efekty narażenia na MXC mogą wynikać z nieprawidłowych profili miRNA. Wykazano również, że narażenie w okresie neonatalnym na MXC przyczynia się do zmian ekspresji czynników należących do nadrodziny TGF β oraz ich receptorów, a także do zmian poziomu FSH i jego receptora w pęcherzykach przedantralnych i małych antralnych, co może zaburzać wstępną jak i cykliczną rekrutację oraz dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych świń. Uzyskane wyniki potwierdzają, że okres neonatalny jest krytyczny dla prawidłowego funkcjonowania jajników, a narażenie na kontakt w tym okresie z EACs skutkuje zaburzeniami równowagi hormonalnej, procesu folikulogenezy i funkcjonowania ciałek żółtych. Doktorantka, pomimo uzyskania licznych wyników, zaprezentowała je bardzo starannie i logicznie. Dokumentacja graficzna wyników w postaci rycin, zdjęć i tabel jest czytelna i przejrzysta. Doktorantka wykazała się również umiejętnością wnikliwej analizy i interpretacji prezentowanych wyników w świetle aktualnej literatury. Moim zdaniem dyskusje w pracach oryginalnych i polskojęzycznym opracowaniu są wszechstronne i wyczerpujące. W pracach oryginalnych i polskojęzycznym opracowaniu Doktorantka trafnie i syntetycznie podsumowuje uzyskane wyniki. Po analizie tej części rozprawy stwierdzam, że wyniki uzyskane przez Doktorantkę są oryginalne, interesujące i mają dużą wartość naukową. Oceniana rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne.

Problem dotyczący narażenia na EACs jest powszechny. Potencjalne ryzyko negatywnego wpływu na zdrowie po ekspozycji na te związki rodzi potrzebę prowadzenia kolejnych badań oraz podjęcia działań zmierzających do minimalizacji zagrożeń powodowanych przez EACs.

SUGESTIE, UWAGI I PYTANIA

Po analizie ocenianej rozprawy doktorskiej nasunęły mi się następujące uwagi, sugestie i pytania:

1. W pracy doktorskiej w rozdziale „Model badawczy” podano, że badania przeprowadzono w obrębie pięciu grup badawczych i w każdej grupie było pięć osobników ($n=5$). Ponadto wskazano, że z jajników wycięto ciała żółte ($n=3$ od każdego zwierzęcia), wyizolowano enzymatycznie pęcherzyki przedantralne oraz wycięto małe pęcherzyki antralne ($n=3$ od każdego zwierzęcia). W publikacji nr 1, w przypadku analizy morfologicznej komórek lutealnych podano, że badania prowadzono na trzech niezależnych skrawkach pochodzących z każdego ciała żółtego i wskazano, że n było równe 15, natomiast w przypadku analizy kropli lipidowych badania prowadzono na jednym skrawku pochodzącym z różnych ciałek żółtych na zwierzę i tutaj również podano, że n równa się 15. W publikacji nr 2 wskazano, że badania prowadzono na ciałkach żółtych i n było równe 3 na każde zwierzę. Natomiast przy analizie Western blot podano informację, że analizę ilościową prowadzono dla trzech oddzielnie powtarzanych eksperymentów. Zatem, proszę o doprecyzowanie jaka była liczba n w tym eksperymencie. W publikacji nr 3 wskazano, że liczba n w analizie NGS wynosiła 3 dla każdej grupy, ale już przy walidacji uzyskanych wyników wskazano $n=15$. Tutaj również proszę o komentarz. Proszę również o wyjaśnienie, co Doktorantka rozumie pod pojęciem liczby n .
2. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego w publikacji nr 1 i 2 wybrano zwierzęta będące w 8-11 dniu cyklu rujowego, a w publikacji nr 3 i 4 użyto zwierzęta będące w 9-10 dniu cyklu. Ponadto, w rozprawie doktorskiej brakuje mi wyjaśnienia, dlaczego wybrano akurat te dni cyklu rujowego.
3. W publikacji nr 1 i 2, Doktorantka opisuje statystyczne tendencje zaobserwowane w poziomach estronu i estradiolu, lipoprotein o wysokiej gęstości, stosunku lipoprotein o niskiej gęstości do lipoprotein o wysokiej gęstości, zawartości białek metylotransferaz i eksportyny 5. Chciałabym zwrócić uwagę, że nie należy opisywać, a tym bardziej dyskutować, nieistotnych statystycznie wzrostów lub spadków jakichkolwiek parametrów (pomimo podania wartości $p>0,05$) – w takim przypadku należy uznać brak wpływu lub brak różnic.
4. W publikacji nr 2 i 4, opisy metody Western blot należałoby uzupełnić o informacje dotyczące kontroli negatywnych. W publikacji nr 1, na rycinie 2H oraz w publikacji nr 4, na rycinach 1a'-c', 2a'-d', 4c, e i 5c brakuje wzorca masy molekularnej białek. Dołączenie markera masy molekularnej na prezentowanych blotach znacznie ułatwiłoby analizę



wielkości uzyskanych produktów i prawidłową interpretację wyników. Moje wątpliwości budzi blot zamieszczony na rycinie 1c' w publikacji 4 dotyczący masy molekularnej białka aktywny po ekspozycji na MXC.

5. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego do analizy uzyskanych wyników zastosowano test nieparametryczny U Manna-Withneya. Tego typu komentarza zabrakło w publikacjach nr 1, 2 i 3. W publikacji nr 4, pojawia się komentarz, że test ten został zastosowany ze względu na brak rozkładu normalnego, ale zabrakło informacji jakim testem statystycznym to wykazano. W publikacji nr 2, przy analizie wyników brano pod uwagę wartość mediany w grupach, w publikacji nr 3 i 4 podano, że wzięto pod uwagę błąd standardowy średniej \pm SEM, natomiast w publikacji nr 1 takiej informacji brakuje. Proszę o uzupełnienie tych informacji i wyjaśnienie, dlaczego przy analizie wyników zastosowano odmienne podejścia.
6. W dyskusji publikacji nr 2, pojawiła się sugestia, że chociaż nie stwierdzono wpływu EACs na zawartość białek eksportyny 5 i Argonaute 2 w ciałkach żółtych świń po neonatalnej ekspozycji, to nie można wykluczyć zmian w modyfikacjach potranslacyjnych. Prosiłabym Doktorantkę o sprecyzowanie jakie konkretnie zmiany miała na myśli.
7. Proszę o wyjaśnienie, na jakiej podstawie przy analizach profili mRNA i miRNA zastosowano krotność zmian (\log_2FC) odpowiednio na poziomie \geq lub \leq 1 i 0,5. W publikacji nr 3, w podrozdziale 2.4 błędnie podano krotność zmian (\log_2FC) dla profili miRNA na poziomie 0,05. Ponadto, na rycinie nr 1b, brakuje wskazania wartości p i krotności zmian (\log_2FC).
8. W publikacji nr 3, na rycinie 3 podano wyniki analizy ontologicznej genów. W odniesieniu do procesów biologicznych, na rycinie 3a wskazano pozytywną regulację aktywności kinaz białkowych i pozytywną regulację aktywności kinaz, a na rycinie 3b podano pozytywną regulację angiogenezy i regulację angiogenezy. Prosiłabym o wyjaśnienie, dlaczego te procesy pojawiają się dwukrotnie.
9. Czy Doktorantka brała udział w wykonywaniu analiz bioinformatycznych?
10. W publikacji nr 3 i 4, do normalizacji wyników real-time PCR użyto gen referencyjny dehydrogenazę aldehydu-3-fosfoglicerynowego (*GAPDH*) i miRNA ssc-let-7a. Proszę o wskazanie w jaki sposób przeprowadzono ich walidację. Prosiłabym również o wyjaśnienie, dlaczego analizę ekspresji genu receptora aktywiny typu I (*ACVRI*) przeprowadzono przy użyciu metody real-time PCR opartej na fluorescencji barwnika SYBR Green a do analizy pozostałych genów zastosowano sondy TaqMan.
11. Z przeprowadzonych badań wynika, że neonatalna ekspozycja na MXC obniża poziom progesteronu w osoczu dojrzałej płciowo świni, natomiast poziom progesteronu w tkance lutealnej nie zmienił się. Prosiłabym o sugestię z czego może to wynikać.
12. W prezentowanej pracy wykazano, że ekspozycja na EACs przyczynia się do zmian poziomów hormonów steroidowych w osoczu świń dojrzałych płciowo oraz zmian



poziomów hormonów steroidowych i prostaglandyn w homogenatach tkanki lutealnej. Cennym uzupełnieniem wyników prezentowanej pracy byłoby określenie aktywności/ekspresji białek enzymów zaangażowanych w procesy steroidogenezy i syntezy prostaglandyn. Bardzo interesujące byłoby również zbadanie wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych. Ponadto, należałoby zbadać poziom aktywności enzymów zaangażowanych w biogenezę miRNA. Czy tego typu badania są planowane?

13. Prosiłabym o odpowiedź w jaki sposób EACs mogą wpływać na proces proliferacji, apoptozy czy angiogenezy w jajniku.
14. W rozdziale „Podsumowanie i wnioski” cztery wnioski wskazane przez Doktorantkę są raczej podsumowaniem uzyskanych wyników, a wniosek znajduje się na końcu tego rozdziału.
15. W tytule rozprawy trafniejsze byłoby użycie słowa „jajnik” w liczbie mnogiej. Zatem, tytuł rozprawy powinien brzmieć: „*Molekularne aspekty funkcjonowania jajników dojrzałych płciowo świń po neonatalnej ekspozycji na związki o aktywności endokrynej*”.
16. Chciałabym także zwrócić uwagę na kilka niefortunnych stwierdzeń w polskojęzycznym opracowaniu: „czynnikami luteotropowymi, mającymi stymulujący efekt na rozwój” (str. 14), „zaburzona przez nieprawidłową równowagę hormonalną” (str. 22), „udział miRNA w mediowaniu efektów MXC” (str. 45, 46).

PODSUMOWANIE

Reasumując, rozprawę doktorską Pani mgr Patrycji Witek oceniam bardzo wysoko. Pragnę stwierdzić z pełnym przekonaniem, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a uzyskane przez Doktorantkę wyniki nie tylko dostarczają nowych danych, które stanowią cenne uzupełnienie badań zmierzających do minimalizacji zagrożeń powodowanych ekspozycją organizmu na EACs, ale mogą stanowić podstawę do prowadzenia kolejnych eksperymentów. Cztery oryginalne prace, będące podstawą rozprawy doktorskiej, są rzetelnie przygotowane, zawierają jasno określony cel uzupełniony starannym opisem przeprowadzonych doświadczeń i uzyskanych wyników oraz wnikliwą i dojrzałą dyskusją. Na podkreślenie zasługuje również bardzo istotna tematyka rozprawy doktorskiej, szeroki zakres prowadzonych badań naukowych oraz kompleksowe podejście do rozpatrywanego problemu. Doktorantka wykazała się doskonałym przygotowaniem merytorycznym z zakresu tematyki prowadzonych badań oraz umiejętnościami w posługiwaniu się licznymi metodami. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można sądzić, że Doktorantka zdobyła niezbędne doświadczenie i umiejętności przydatne w przyszłej pracy badawczej. Należy również zauważyć, że Doktorantka w całym swoim dorobku naukowym posiada jedenaście publikacji (wg bazy *Web of Science* ilość cytowań wynosi 40 a indeks $h = 4$). Muszę podkreślić, że sformułowane w mojej



recenzji uwagi, sugestie czy pytania nie dyskredytują wysokiej wartości zaprezentowanych wyników, lecz są przyczynkiem do naukowej dyskusji. Mam również nadzieję, że zostaną wykorzystane w przygotowaniu kolejnych publikacji oraz w przyszłej pracy naukowej.

WNIOSEK KOŃCOWY

W moim przekonaniu, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. *„Molekularne aspekty funkcjonowania jajnika dojrzałej płciowo świni po neonatalnej ekspozycji na związki o aktywności endokrynnej”* stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wszystkie wymagania – określone w Ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.) stawiane rozprawom doktorskim. Na tej podstawie zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny *Nauki Biologiczne* Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Witek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy zaprezentowanych wyników badań oraz ich oryginalny charakter, co znajduje odzwierciedlenie w opublikowaniu ich w czasopismach o światowym zasięgu, pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie niniejszej pracy.

Olsztyn, 10 stycznia 2023 r.

Z poważaniem

