Kraków, dnia 11.08.2025 r.

Prof. dr hab. Agnieszka Rak
Pracownia Fizjologii i Toksykologii Rozrodu
Tel. 012 664 50 03
agnieszka.rak@uj.edu.pl

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel.: +48 12 664 50 06
+48 12 664 50 07
fax: +48 12 664 51 01
sekretariat.izibb@uj.edu.pl
www.izibb.wb.uj.edu.pl

R E C E N Z J A PRACY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. PAWŁA WYDORSKIEGO

pt. **„Konsekwencje oddziaływania pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości na epigenetyczną regulację ekspresji genów, apoptozę i stres oksydacyjny w błonie śluzowej macicy świni domowej *(Sus scrofa domestica L.)* w okresie około-implantacyjnym”**

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod opieką naukową Pani promotor Prof. dr hab. Anity Franczak i promotor pomocniczej dr hab. Agaty Żmijewskiej, prof. UWM. Rozprawę doktorską przygotowano w oparciu o trzy oryginalne publikacje naukowe przygotowane w języku angielskim, które ukazały się w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach z listy *Journal Citation Reports*: *Reproduction, Fertility and Development* (IF 1.9), *Theriogenology* (IF 2.8), *International of Molecular Science* (IF 5.6) w latach 2023 i 2024. Czasopisma te znajdują się również w wykazie czasopism naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego z punktacją 140 każda. Łączny współczynnik *Impact Factor* czasopism stanowiących podstawę do ubiegania się o nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne wynosi 10.3, a liczba punktów MNiSW to 420.

Publikacje są współautorskie (3 - 5 autorów) i we wszystkich pracach Pan mgr inż. Paweł Wydorski jest pierwszym autorem, a Jego wkład w ich powstanie jest znaczący i obejmuje m.in. opracowanie koncepcji badań i metodyki, wykonanie części eksperymentalnej, otrzymanie wyników i selekcji danych, opracowanie i interpretacja wyników do publikacji, przygotowanie grafik, wnioskowanie, przygotowanie ostatecznej wersji publikacji do druku oraz pozyskiwanie funduszy i materiału. Badania do pracy doktorskiej wykonano w oparciu o środki finansowe Narodowego Centrum Nauki (NCN), projektu OPUS 13 (2017/25/B/NZ9/00090) kierownictwa prof. dr hab. inż. Anity Franczak oraz PRELUDIUM 20 (2021/41/N/NZ9/0163821) kierownictwa Doktoranta. Na uwagę i moje duże uznanie zasługuje fakt, że Doktorant pełnił funkcję kierownika w projekcie

finansowanym ze środków NCN, co świadczy o Jego skuteczności w zdobywaniu funduszy na własne badania.

Ocena merytoryczna

Celem rozprawy doktorskiej było określenie wpływu oddziaływania pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości – ELF-EMF (50 Hz, 8 mT, 2 h) na epigenetyczną regulację ekspresji genów, proces apoptozy i stres oksydacyjny w błonie śluzowej macicy świni domowej w okresie około-implantacyjnym (15–16 dzień ciąży). Przesłanką do podjęcia tych badań były dane w których udokumentowano, że ELF-EMF może powodować zmiany w procesach komórkowych, takich, jak: apoptoza, proliferacja komórek, szlaki transdukcji sygnału, wiązaniu ligandów do receptorów, sekrecji hormonów, czy powstawaniu wolnych rodników. Poza tym, wcześniejsze badania zespołu Profesor Anity Franczak wskazują, że ELF-EMF wpływa znacząco na zmiany profili transkryptomicznych błony śluzowej i błony mięśniowej macicy oraz zarodków świni domowej w okresie około-implantacyjnym. U świń okres około-implantacyjny jest niezwykle ważny ponieważ pomyślny przebieg implantacji związany jest z prawidłowym molekularnym dialogiem pomiędzy zarodkiem a ścianą macicy, ale również z kształtowaniem odpowiedniego środowiska wewnątrzmacicznego. Stąd, pozytywnie oceniam wybór tematyki pracy doktorskiej, jest on logiczną konsekwencją wcześniejszych obserwacji, zmierzającą do pełnego zrozumienia mechanizmów wpływu oddziaływania ELF-EMF na epigenetyczną regulację procesów zachodzących w błonie śluzowej macicy świni domowej w okresie około-implantacyjnym. W mojej ocenie, kolejnym ważnym aspektem potwierdzającym bardzo istotny i nowatorski charakter badań prowadzonych przez Pana mgr inż. Pawła Wydorskiego jest fakt, że jego doktorat sfinansowany został z dwóch projektów badawczych, które zostały poddane wnikliwej recenzji i uzyskały finansowanie przez NCN.

Przedstawione do analizy opracowanie polskojęzyczne zostało przygotowane z największą starannością i dbałością o szczegóły i obejmuje 66 stron a jego układ jest standardowy dla tego typu prac dyplomowych i zawiera: wykaz publikacji będących podstawą rozprawy doktorskiej, wykaz skrótów używanych w pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz słowa kluczowe. Następnie, Wstęp liczący 6 stron stanowi wprowadzenie do zagadnień poruszanych w rozprawie doktorskiej i opisuje: ELF-EMF, mechanizmy epigenetycznej kontroli ekspresji genów, czy wpływ ekspozycji *in vitro* tkanek układu rozrodczego samicy na ELF-EMF. Ta część rozprawy doktorskiej mogła być dodatkowo wzbogacona graficznie, co dopełniło by tekst dysertacji.

Następny rozdział obejmuje Hipotezę badawczą i Cele pracy. Doktorant postawił hipotezę badawczą, które zakłada, że ELF-EMF wpływa na epigenetyczną regulację ekspresji genów, apoptozę i stres oksydacyjny w błonie śluzowej macicy świni domowej w okresie około-implantacyjnym. Adekwatnie do założeń pracy jasno sformułował 4 główne cele badawcze: *1).* Analiza metylacji DNA poprzez zbadanie wpływu ELF-EMF na poziom metylacji DNA wybranych genów o zmienionej ekspresji (DEGs) w błonie śluzowej macicy; *2).* Analiza potencjału do

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel.: +48 12 664 50 06
+48 12 664 50 07
fax: +48 12 664 51 01
sekretariat.izibb@uj.edu.pl
www.izibb.wb.uj.edu.pl

metylacji DNA i acetylacji histonów poprzez określenie wpływu ELF-EMF na poziom ekspresji mRNA DNMT1, DNMT3a, EZH2, EED, SUZ12, UHRF1 oraz MBD1, koncentrację białek DNMT1, DNMT3a, EZH2, UHRF1, MBD1, poziom globalnej metylacji DNA i aktywność deacetylaz histonów (HDACs) w błonie śluzowej macicy; *3).* Analiza biogenezy microRNA poprzez zbadanie wpływu ELF-EMF na poziom ekspresji mRNA i białka DGCR8 i DICER1 w błonie śluzowej macicy; *4).* Analiza potencjału do apoptozy i generowania stresu oksydacyjnego poprzez określenie wpływu ELF-EMF na poziom ekspresji mRNA CASP3, CASP7, GADD45G, CIDEB i NOS1, NOS2, NOS3, TP53I3, koncentrację białek CASP3 i CASP7 oraz eNOS, aktywność CASP3 i CASP7, koncentrację azotanów i azotynów w błonie śluzowej macicy.

W rozdziale Materiał i Metody Doktorant w 7 podrozdziałach opisuje: zwierzęta doświadczalne oraz izolację skrawków błony śluzowej macicy, inkubację *in vitro* oraz opisuje system ekspozycji na ELF-EMF, badania poziomu metylacji DNA regionów promotorowych wybranych genów za pomocą metylo-specyficznej łańcuchowej reakcji polimerazy (MS-PCR), analizę poziomu ekspresji mRNA za pomocą metody real-time PCR, badania koncentracji białka metodą Western blot, analizę aktywności kaspazy 3 i 7 przy użyciu cytometrii przepływowej, oznaczenie poziomu globalnej metylacji DNA metoda kolorymetryczną, określenie koncentracji białka endotelialnej syntazy tlenku azotu metodą ELISA, badanie aktywności deacetylaz histonów metodą fluorescencyjną oraz mierzenie koncentracji produktów syntaz tlenku azotu metodą kolorymetryczną. Moim zdanie rozdział Analiza statystyczna powinien być kolejnym podrozdziałem (1.8) rozdziału Materiał i metody. Zastosowane w badaniach metody i techniki biologii molekularnej zostały prawidłowo dobrane do założonych celów badawczych i wymagały ogromnego nakładu pracy Doktoranta, co zasługuje na wyróżnienie. Jestem również pod ogromnym wrażeniem opanowania bardzo szerokiego wachlarza technik badawczych, tj. hodowle *in vitro*, metylacyjny PCR, real time PCR, Western blot, ELISA, testy fluorymetryczny, kolorymetryczny, cytometria przepływowa i testy statystyczne. Tę cześć dysertacji Doktorant urozmaica graficznie wzbogacając samodzielnie wykonaną ryciną i tabelami.

Kolejny rozdział to Opis wyników, który powstał na bazie przeprowadzonych licznych eksperymentów. Doktorant przedstawił otrzymane wyniki na podstawie zadań badawczych i opublikowanych prac; I tak w pierwszej publikacji *Reproduction, Fertility and Development* przedstawił wpływ ELF-EMF na poziom metylacji DNA w promotorach wybranych genów o zmienionej ekspresji tj. EGR2, HSD17B2, ID2, IL1RAP, MRAP2, NOS3, PTGER4, SERPINE1, VDR oraz ZFP57 w błonie śluzowej macicy. W publikacji *Theriogenology* przedstawił wyniki ekspresji mRNA DNMT1, DNMT3a, EZH2, EED, SUZ12, UHRF1, MBD1 i DGCR8 i DICER1 koncentracji białek DNMT1, DNMT3a, EZH2, UHRF1, MBD1, DGCR8 i DICER1 oraz aktywność HDACs i poziom globalnej metylacji DNA w błonie śluzowej macicy eksponowanej na ELF-EMF. Natomiast w ostatniej publikacji *International Journal of Molecular Sciences* umieścił dane wpływu ELF-EMF na poziom ekspresji mRNA CASP3, CASP7, GADD45G, CIDEB oraz TP53I3, NOS1, NOS2, NOS3, koncentrację białek CASP3, CASP7, eNOS, aktywność CASP3 i CASP7 oraz analizę koncentracji azotanów i azotynów w błonie śluzowej macicy. Na uznanie zasługuje zbiorczy

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel.: +48 12 664 50 06
+48 12 664 50 07
fax: +48 12 664 51 01
sekretariat.izibb@uj.edu.pl
www.izibb.wb.uj.edu.pl

schemat otrzymanych wyników, natomiast cała dokumentacja wyników rozprawy doktorskiej jest szczegółowo zawarta w trzech załączonych publikacjach oryginalnych. W mojej opinii wszystkie zadania badawcze zostały znakomicie i rzetelnie zrealizowane a postawiona hipoteza poprawnie zweryfikowana.

Na podstawie przeprowadzonych badań Pan dr inż. Paweł Wydorski uzyskał dużo ciekawych, wartościowych i oryginalnych wyników badań. Pozwalam sobie przytoczyć tylko najważniejsze wnioski płynące z pracy:

- w wyniku ekspozycji błony śluzowej macicy świni na ELF-EMF poziom globalnej metylacji DNA wzrasta i generowane są zmiany w mechanizmach epigenetycznych przyczyniające się przede wszystkim do obniżenia poziomu ekspresji genów;

- ELF-EMF wpływa na zmiany poziomu ekspresji mRNA i koncentracji białek związanych z mechanizmami epigenetycznej regulacji ekspresji genów zaangażowanych w metylację DNA, modyfikację histonów i biogenezę microRNA w błonie śluzowej macicy świń w okresie około-implantacyjnym;

- ekspozycja błony śluzowej macicy świni na ELF-EMF powoduje wzrost poziomu metylacji w regionach promotorowych genów kodujących syntezę białek zaangażowanych w proliferację, migrację, regulację różnicowania i proliferację komórek, utrzymanie ciałka żółtego, stymulację angiogenezy i rozpoczęcie implantacji, co może mieć negatywny wpływ na ten proces;

- ELF-EMF wpływa na przebieg procesu apoptozy i stres oksydacyjny w błonie śluzowej macicy świni w okresie około-implantacyjnym.

Ostatnią część rozprawy doktorskiej stanowi 6 stronicowy rozdział Podsumowanie, następnie Autor opisuje Wnioski, które zostały sformułowane w sposób jasny i logiczny, oraz spis literatury, spis tabel i rycin, regulacje prawne dotyczące doświadczeń na zwierzętach, kopie trzech oryginalnych publikacji oraz oświadczenia współautorów.

Wartość poznawczą wyników otrzymanych przez Pana mgr inż. Pawła Wydorskiego oceniam bardzo wysoko, o czym świadczy fakt opublikowania trzech artykułów w czasopismach o zasięgu międzynarodowym o współczynniku IF w granicach 1.9 – 5.6. Wszystkie prace są spójne tematycznie i metodycznie, a jako całość dostarczają istotnej wiedzy o wpływie ELF-EMF na mechanizmy epigenetycznej regulacji ekspresji genów, apoptozę i stres oksydacyjny w błonie śluzowej macicy. Prace napisane są zrozumiale, z jasno sprecyzowanymi celami i prawidłowo przeprowadzoną dyskusją. Dokumentacja wyników w postaci tabel oraz figur jest jasna, czytelna i nie budzi zastrzeżeń. W mojej opinii cała rozprawa doktorska jest przemyślanym, konsekwentnie realizowanym pomysłem badawczym o dużej wartości poznawczej.

Uwagi i pytania

Podczas analizy rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka pytań i z obowiązku recenzenta chciałabym się nimi podzielić:

- podkreśla Pan konieczność przeprowadzenia badań *in vivo*, proszę bardziej przybliżyć ten temat i zaproponować schemat takiego eksperymentu.

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel.: +48 12 664 50 06

+48 12 664 50 07

fax: +48 12 664 51 01

sekretariat.izibb@uj.edu.pl

www.izibb.wb.uj.edu.pl

- czy ma Pan wiedzę na temat wpływu ELF-EMF na procesy rozrodcze u ludzi czy gryzoni? Czy istnieją dane epidemiologiczne lub środowiskowe sugerujące, że ekspozycja na ELF-EMF może być problemem klinicznie istotnym u ludzi?
- proszę o doprecyzowanie liczby użytych zwierząt i powtórzeń w eksperymentach; w opracowaniu Autor napisał, że do badań użył macice pobrane od 5 świń (n=5), a liczba powtórzeń to 9 (n=9), natomiast w publikacji 1 widnieje informacja, że liczba samic to 4, a powtórzeń 8, z kolei w publikacji 2 i 3 liczba samic i powtórzeń to 5.
- czy w hodowlanych *in vitro* skrawkach endometrium macicy świni sprawdzał Pan ich żywotność podczas inkubacji?
- czy możliwe jest, że zmiany w ekspresji niektórych genów są wynikiem stresu oksydacyjnego, a nie bezpośrednim efektem ELF-EMF?
- w jakim stopniu zmiany epigenetyczne zaobserwowane po 2h ekspozycji mogą być odwracalne po zakończeniu działania ELF-EMF?
- czy rozważał Pan analizę profilu cytokin i stan zapalny jako możliwy efekt ekspozycji ELF-EMF?
- jakie testy funkcjonalne mógłby Pan zaproponować bazując na wynikach eksperymentów zmian w ekspresji badanych genów i białek?
- w mojej opinii w opracowaniu dysertacji powinny znaleźć się również suplementy do załączonych publikacji.
- czy może Pan wskazać ograniczenia lub największe wyzwania podczas prowadzenia swoich badań?
- w jaki sposób, uzyskane na świńskim modelu wyniki, mogą być wykorzystane w przyszłości w badaniach rozrodu kobiet? Proszę o krótki komentarz o translacji wyników badań uzyskanych w ramach pracy doktorskiej.
- gdyby Pan uzyskał wysokobudżetowy projekt naukowy, to jaki problem badawczy chciałaby Pan rozwiązać w przyszłości i dlaczego?

Podsumowanie

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Pawła Wydorskiego jest wartościowym, oryginalnym dziełem naukowym zawierającym nowatorskie wyniki, które poszerzają wiedzę z zakresu wpływu ELF-EMF na mechanizmy epigenetycznej regulacji ekspresji genów, apoptozę i stres oksydacyjny w błonie śluzowej macicy. Autor wykazał się doskonałymi umiejętnościami w planowaniu i prowadzeniu badań, wnioskowaniu w oparciu o uzyskane wyniki oraz dużą wiedzą pozwalającą na rzeczową dyskusję z recenzentami publikacji. Przeprowadzone badania wymagały znakomitego przygotowania merytorycznego i warsztatowego. Opublikowane prace, a także opracowanie, będące podstawą rozprawy doktorskiej, zostały bardzo dobrze przemyślane, rzetelnie zrealizowane i wyjątkowo starannie przygotowane. Na uwagę i pochwały zasługuje mnogość metod badawczych oraz kompleksowe podejście do rozwiązania problemu badawczego. Zawarte w niniejszej recenzji pytania czy komentarze nie umniejszają wartości merytorycznej ocenianej wysoko pracy doktorskiej, lecz są zachętą do naukowej dyskusji.

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel.: +48 12 664 50 06
+48 12 664 50 07
fax: +48 12 664 51 01
sekretariat.izibb@uj.edu.pl
www.izibb.wb.uj.edu.pl

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

Wniosek końcowy

Reasumując stwierdzam, że oceniona praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim i spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024.0.1571 tj.) stawianym kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora. **W związku z powyższym przekładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Pawła Wydorskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.**

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową pracy doktorskiej, poziom przeprowadzonych analiz, nowatorskie wyniki i ich publikację w postaci trzech oryginalnych prac naukowych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, bardzo starannie i rzetelnie przegotowane opracowanie, a także zaangażowanie i pracowitość Doktoranta wnoszę o wyróżnienie dysertacji.

Kraków, 11 sierpnia 2025 roku

prof. dr hab. Agnieszka Rak

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel.: +48 12 664 50 06
+48 12 664 50 07
fax: +48 12 664 51 01
sekretariat.izibb@uj.edu.pl
www.izibb.wb.uj.edu.pl