



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

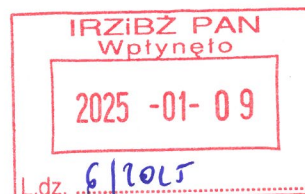
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Katedra Rozrodu, Anatomii
i Genomiki Zwierząt

Prof. dr hab. Monika Bugno-Poniewierska

Kraków 23.12.2024

Katedra Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie



Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Mileny Traut pt. „Analiza transkryptomu oraz ekspresja markerów funkcji mitochondriów w blastocystach wyhodowanych *in vitro* z komórek jajowych pobranych od jałówek niedojrzałych płciowo”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Mileny Traut została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Izabeli Wocławek-Potockiej – promotor pracy oraz dr inż. Ilony Kowalczyk – Zięby – promotor pomocniczej w Zakładzie Biologii Gamet i Zarodka Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie. Badania sfinansowano ze środków projektu badawczego NCN OPUS 16.

Problematyka przedstawionej do oceny pracy doktorskiej dotyczy zbadania współczynników rozwojowych oraz jakości blastocyst wyhodowanych *in vitro* z oocytów pobranych od jałówek dojrzałych i niedojrzałych płciowo. Doktorantka podjęła się przeprowadzenia serii doświadczeń mających na celu weryfikację sformułowanej przez Nią hipotezy zakładającej, że profil transkryptomiczny, ze szczególnym uwzględnieniem szlaku fosforylacji oksydacyjnej, blastocyst wyhodowanych *in vitro*, ekspresja molekularnych markerów związanych z funkcją mitochondriów w blastocystach oraz liczba kopii mtDNA, odzwierciedlają jakość komórek jajowych oraz kompetencję rozwojową zarodków. W związku z tym Pani mgr Milena Traut postawiła sobie za cele swoich badań:

- określenie współczynników rozwojowych blastocyst wyhodowanych *in vitro* z oocytów pobranych od jałówek dojrziałych i niedojrziałych płciowo;
- porównanie profili transkryptomicznych blastocyst bydlęcych wyhodowanych *in vitro* z oocytów pobranych od jałówek dojrziałych i niedojrziałych płciowo;
- porównanie ekspresji molekularnych markerów związanych z funkcją mitochondriów w blastocystach bydlęcych wyhodowanych *in vitro* z oocytów pobranych od jałówek dojrziałych i niedojrziałych płciowo;
- porównanie liczby kopii mtDNA w blastocystach bydlęcych wyhodowanych *in vitro* z oocytów pobranych od jałówek dojrziałych i niedojrziałych płciowo;
- określenie liczby komórek apoptotycznych w blastocystach bydlęcych wyhodowanych *in vitro* z oocytów pobranych od jałówek dojrziałych i niedojrziałych płciowo.

Oceniana rozprawa doktorska ma formę jednotematycznego cyklu dwóch publikacji pod wspólnym tytułem „Analiza transkryptomu oraz ekspresja markerów funkcji mitochondriów w blastocystach wyhodowanych *in vitro* z komórek jajowych pobranych od jałówek niedojrziałych płciowo”, uzupełnionego 54 stronicowym autoreferatem. Prace powyższego cyklu zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych: w czasopiśmie *Theriogenology* (MEiN = 140; IF = 2,923) oraz *BMC Genomics* (MEiN = 140; IF = 3,5). Publikacje te są wieloautorskie, przy czym udział Doktorantki w każdej z nich jest wiodący, jest ona pierwszym autorem we wszystkich pracach, a indywidualny wkład pracy w publikację określony został na znacznie przekraczający 50%.

Towarzyszące publikacjom opracowanie, stanowi podsumowanie prowadzonych badań i zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp będący wprowadzeniem w badaną problematykę, zaprezentowanie hipotezy i celów badawczych, opisu materiału i metod, omówienie wyników wraz z dyskusją konfrontującą uzyskane wyniki z wynikami innych autorów, którą zwieńcza rozdział podsumowanie i wnioski oraz bibliografia. Uważam, że rozprawa doktorska w opisanym kształcie wraz z dokumentacją jest bardzo dobrze przygotowana i zgodna z aktualnymi wymaganiami ustawowymi.

Jednotematyczny cykl publikacji jest wartościowym zbiorem kompleksowych badań, których następstwo było efektem uzyskanych wyników oraz stawiania kolejnych celów badawczych, pozwalających w konsekwencji na poszerzenie wiedzy w zakresie badanej tematyki. W wyniku badań uzyskano porównywalną średnią liczbę pobranych oocytów od jałówek dojrziałych i niedojrziałych płciowo, jednakże współczynnik rozwoju blastocyst wyhodowanych *in vitro* z oocytów dojrziałych jałówek był wyższy niż z oocytów jałówek niedojrziałych płciowo przy braku statystycznych różnic w morfologicznej ocenie jakości

uzyskanych blastocyst w obydwu badanych grupach. Wynikiem badań jest wykazanie, iż morfologicznie prawidłowe blastocysty wyhodowane *in vitro* z oocytów niedojrzałych jałówek miały wyższą koncentrację reaktywnych form tlenu i glutationu, przy mniejszej liczbie komórek apoptotycznych. Wykazano również, że zmiany ekspresji markerów molekularnych związanych z funkcją mitochondriów w blastocystach wyhodowanych *in vitro* z oocytów pobranych od jałówek niedojrzałych płciowo, skutkują wyższą liczbą kopii mtDNA w tych zarodkach. Efektem dalszych badań, opartych o wyniki z analizy profilu transkryptomicznego było zidentyfikowanie 436 genów różniących się poziomem ekspresji, w tym 247 genów o niższej i 189 genów o wyższej ekspresji w blastocystach wyhodowanych *in vitro* z oocytów pobranych od jałówek dojrzałych płciowo w porównaniu do blastocyst od jałówek niedojrzałych. Po zastosowaniu narzędzi bioinformatycznych, stwierdzono iż powyższe geny uczestniczą w 38 procesach biologicznych, 23 procesach związanych ze składnikiem komórkowym i 26 odnoszących się do funkcji molekularnych. Zauważono również, że największa grupa genów (52 geny) różniących się poziomem ekspresji zakwalifikowana została do szlaków metabolicznych a najmniej genów (4 geny) różniących się poziomem ekspresji należało do szlaku metabolizmu glicyny, seryny i treoniny. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż analiza profilu transkryptomicznego wyhodowanych *in vitro* blastocyst bydlęcych po raz pierwszy pozwoliła na wykazanie różnic poziomu ekspresji genów biorących udział w szlaku OXPHOS, w zależności od wieku dawczyń oocytów.

Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki pozwoliły na zweryfikowanie postawionej hipotezy i podsumowujące stwierdzenie, iż profil transkryptomiczny, ze szczególnym uwzględnieniem różnic przebiegu szlaku fosforylacji oksydacyjnej blastocyst wyhodowanych *in vitro*, ekspresja molekularnych markerów związanych z funkcją mitochondriów w blastocystach oraz liczba kopii mtDNA, odzwierciedlają niższe kompetencje rozwojowe zarodków pochodzących od zwierząt niedojrzałych płciowo. Nie bez znaczenia pozostaje fakt utworzenia bazy danych profili transkryptomicznych blastocyst uzyskanych od dojrzałych i niedojrzałych płciowo jałówek, co umożliwi prowadzenie dalszych analiz bioinformatycznych w celu poszukiwania markerów molekularnych blastocyst. Bardzo istotne jest stwierdzenie Autorki, iż w celu jednoznacznego potwierdzenia znaczenia biologicznego uzyskanego w ramach rozprawy wniosku, potrzebna jest próba biologiczna polegająca na przeprowadzeniu transferu wyhodowanych *in vitro* zarodków, analizę ich implementacji oraz określenie liczby żywo urodzonego potomstwa.

Podkreślić należy, że prace oryginalne stanowiące podstawę cyklu, w trakcie ich publikacji w renomowanych czasopismach, były poddane wnikliwym recenzjom

wydawniczym. Fakt ten pozwala mi co prawda na pominięcie szczegółowego opisu i oceny tych eksperymentów, podsumowując je jako wartościowe i atrakcyjne opracowania naukowe, do których jednakże odniosę się poprzez podkreślenie najważniejszych w moim odczuciu walorów do których zaliczyć należy:

- dobór tematyki badawczej oraz uzyskane wyniki cechujące się dużą oryginalnością naukową i wypełniające lukę w dotychczasowej literaturze światowej;

- złożoność i odpowiedni dobór zaawansowanych technik badawczych, niezbędnych do uzyskania założonych celów badawczych;

- kompleksowość przeprowadzonych badań, pozwalająca na uzyskanie jednoznacznych wyników;

- głębokie, naukowe znaczenie tych badań i wykazanie, że (i) istnieją zależne od wieku dawczyń oocytów, różnice w poziomie ekspresji genów biorących udział w szlaku OXPHOS, (ii) udowodnienie, że zarodki bydlęce pozyskane od zwierząt niedojrzałych płciowo posiadają mniejsze możliwości efektywnego transportu elektronów¹⁾ podczas OXPHOS oraz znacznie mniej efektywną produkcję ATP, prowadzącą do wyższego poziomu ROS, iii) ponadto wykazanie, że zmiany ekspresji TFAM oraz innych markerów molekularnych związanych z funkcją mitochondriów w blastocystach wyhodowanych in vitro z oocytów pobranych od jałówek niedojrzałych płciowo, skutkują wyższą liczbą kopii mtDNA w tych zarodkach oraz (iv) stwierdzenie, że wyższy poziom glutationu w blastocystach wyhodowanych in vitro z oocytów uzyskanych niedojrzałych płciowo jałówek może chronić te zarodki przed nadmierną akumulacją ROS w komórkach, kompensując występujące zaburzenia wewnątrzkomórkowej równowagi redoks, prowadząc do obniżenia liczby komórek apoptotycznych w tych zarodkach;

- poprawnie i zwięźle napisany autoreferat uzupełniający załączone publikacje, dobrze odzwierciedlający umiejętność i swobodne poruszanie się Doktorantki w obrębie badanej problematyki naukowej z uwzględnieniem badań własnych oraz dotychczas opublikowanych prac,

- wspomniane wcześniej, opublikowanie wyników badań własnych w dobrych czasopismach naukowych, dopełnia ogólnego dobrego wrażenia i wysokiej oceny rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, oceniana rozprawa doktorska bez wątpienia spełnia wymogi merytoryczne i formalne, stawiane tego typu opracowaniom. Stanowi bowiem oryginalny i istotny wkład do nauki, poszerzając wiedzę o profilu transkryptomycznym oraz ekspresji markerów funkcji mitochondriów w blastocystach wyhodowanych in vitro z oocytów

pobranym od dojrzałych i niedojrzałych płciowo jałówek. Rozprawa ta charakteryzuje się ciekawą i pionierską tematyką naukową, metodyką opartą o liczne metody badawcze, łącząc biotechniki rozrodu z technikami z zakresu biologii molekularnej wraz z interpretacją bioinformatyczną, poprawną realizacją, a także ciekawymi wynikami. Podkreślić należy, że w pracy dominują wątki poznawcze wnoszące nowe informacje naukowe o różnicach poziomu ekspresji genów biorących udział w szlaku OXPHOS, w zależności od wieku dawczyń oocytów.

Do przedstawionych wyników pragnę wnieść uwagę redakcyjną oraz zadać kilka pytań na które nie znalazłam odpowiedzi w przedstawionym autoreferacie i załączonych publikacjach:

- W mojej opinii w tytule dysertacji niewłaściwie użyto określenia „komórka jajowa” w miejsce której powinno być użyte określenia „oocyt”, gdyż według definicji komórka jajowa jest to komórka dojrzała, po przejściu przez jajowód, a z jajnika pozyskiwane są niedojrzałe komórki - oocyty w kompleksie oocyt–cumulus (COC).

- czy w badanej grupie zwierząt były jałowki spokrewnione (wspólny ojciec i/lub wspólna matka)? Jeśli tak, czy przeanalizowano odrębnie wyniki dla tej grupy? Jeśli nie, proszę o komentarz, jakie dodatkowe informacje można byłoby uzyskać prowadząc analogiczne badania w grupie spokrewnionej?

- jak była wydajność uzyskiwania zarodków, uwzględniając liczbę pozyskanych COCs, ich morfologiczną selekcję, efektywność zapłodnienia oraz rozwój do stadium blastocysty (w odniesieniu do grupy jałówek dojrzałych i niedojrzałych płciowo)?

Podsumowując całość, uważam, że oceniana rozprawa doktorska mgr Mileny Traut, oparta o jednotematyczny cykl publikacji w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora, w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie o dopuszczenie mgr Mileny Traut do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek dodatkowy

Biorąc pod uwagę ponadprzeciętny poziom badań opisanych w rozprawie, aktualność problematyki badawczej, zastosowane metody badawcze i kompleksowość opracowania oraz

ponadprzeciętny charakter rozprawy, składałam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Mileny Traut stosowną nagrodą.

Miroslawa Dugno-Taniewicz