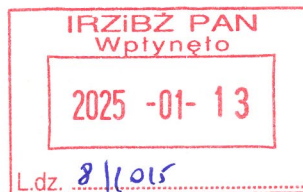


dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ  
Zakład Endokrynologii  
Katedra Fizjologii Zwierząt  
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Kraków, 6 styczeń 2025 r.



UNIwersYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE



## OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Mileny Traut

pt. *"Analiza transkryptomu oraz ekspresja markerów funkcji mitochondriów w blastocystach wyhodowanych in vitro z komórek jajowych pobranych od jałówek niedojrzałych płciowo"*

Wydział Biologii

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Mileny Traut, zatytułowana *"Analiza transkryptomu oraz ekspresja markerów funkcji mitochondriów w blastocystach wyhodowanych in vitro z komórek jajowych pobranych od jałówek niedojrzałych płciowo"*, została wykonana w Zakładzie Biologii Gamet i Zarodka Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie pod kierunkiem promotor prof. dr hab. n. wet. Izabeli Moniki Wocławek-Potockiej oraz promotora pomocniczego dr inż. Ilony Patrycji Kowalczyk-Zięba. Na rozprawę składają się dwie oryginalne publikacje naukowe o bardzo spójnej tematyce, obejmującej porównanie współczynników rozwojowych, profilu transkryptomicznego, ekspresji markerów molekularnych związanych z funkcją mitochondriów oraz liczby kopii mtDNA w blastocystach bydłęcych wyhodowanych *in vitro* z oocytów pobranych od jałówek niedojrzałych i dojrzałych płciowo. Badania zostały zrealizowane w ramach projektu badawczego OPUS 16 (2018/31/B/NZ9/03412), kierowanego przez Panią promotor. Obie prace zostały opublikowane w specjalistycznych czasopismach o międzynarodowym zasięgu, indeksowanych w bazie Journal Citation Reports, tj. *Theriogenology* oraz *BMC Genomics*. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, *imapt factor*) czasopism wynosi 6.423, a suma punktów wg. aktualnego komunikatu Ministra Edukacji i Nauki to 280. Do drugiej publikacji dołączono również obszerne *Materiały dodatkowe*. Prace są opracowaniami wieloautorskimi, liczącymi odpowiednio 6-ciu i 10-ciu współautorów, co jest uzasadnione szerokim zakresem badań molekularnych i transkryptomicznych oraz wymagającą procedurą pobierania materiału

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel./fax: +48 12 664 50 98

badawczego. W każdym z artykułów Doktorantka jest pierwszym autorem, a Jej indywidualny wkład w ich powstanie potwierdzają dołączone oświadczenia wszystkich autorów. Wynika z nich, że Pani mgr Milena Traut brała udział w opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu doświadczeń *in vitro* oraz *in vivo*, wykonaniu analiz molekularnych, barwień immunofluorescencyjnych, opracowaniu oraz interpretacji wyników badań oraz przygotowaniu i edycji manuskryptów do druku. Na podstawie przedłożonych deklaracji stwierdzam, że zaangażowanie i wkład Doktorantki w prowadzenie badań oraz przygotowanie oryginalnych publikacji jest wiodący i nie budzi wątpliwości.

Do publikacji oraz oświadczeń współautorów dołączono opracowanie w języku polskim o typowym układzie. Na 54 stronach znajdują się kolejno streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, spis publikacji stanowiących rozprawę doktorską, wprowadzenie do tematyki pracy, hipoteza i cel pracy, opis materiałów i metod, omówienie uzyskanych wyników wraz z dyskusją, podsumowanie i wnioski, bibliografia oraz spis rycin. Ta część pracy została przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim i merytorycznym, uzasadniając w sposób jasny i klarowny podjętą przez Doktorantkę tematykę badań. Wstęp opracowania polskojęzycznego jest zwięzły i czytelny, prowadzi do prawidłowo sformułowanej hipotezy badawczej i wyjaśnia cele szczegółowe realizowanych badań. Rozdział „Materiały i metody” został przygotowany rzetelnie i skrupulatnie, dodatkowo obrazuje go samodzielnie przygotowana rycina 2. Opis przeprowadzonych doświadczeń oraz zastosowanych technik badawczych został przygotowany z należytą skrupulatnością, co umożliwia ich dokładne prześledzenie. Zastosowane metody badawcze są nowoczesne i zostały dobrane prawidłowo, umożliwiając weryfikację hipotezy badawczej i osiągnięcie zdefiniowanych przez Doktorantkę celów badawczych. Omówienie i dyskusja otrzymanych wyników badań zostały przygotowane rzetelnie i dojrzałe, w sposób niezwykle uporządkowany, konfrontując otrzymane rezultaty z opublikowanymi już wynikami badań. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wyciągnęła pięć dobrze sformułowanych wniosków, które opatrzyła krótkim omówieniem oraz wzbogaciła schematem podsumowującym. Nadają one pracy wspólny charakter i pokazują jej ważny cel jakim było zbadanie kompetencji rozwojowych zarodków otrzymanych od jałówek niedojrzałych płciowo oraz ich markerów molekularnych. **Po zapoznaniu się z przedłożonymi materiałami stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom doktorskim**

w rozumieniu zapisu art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

W niniejszej pracy Doktorantka podjęła się weryfikacji hipotezy badawczej zakładającej różnice w profilu transkryptomicznym blastocyst wyhodowanych *in vitro* z oocytów pobranych od jałówek dojrzałych i niedojrzałych płciowo. Ponadto koncepcja pracy zakłada, że ekspresja w tych blastocystach molekularnych markerów związanych z funkcją mitochondriów oraz liczba kopii mtDNA różni się i odzwierciedla jakość komórek jajowych oraz kompetencję rozwojową zarodków. Cel pracy został określony jednoznacznie i znajduje uzasadnienie w dotychczasowym stanie wiedzy. Doktorantka sprecyzowała również pięć celów szczegółowych, służących weryfikacji postawionych hipotez badawczych. **Podsumowując powyższe stwierdzam, że realizacja celu naukowego postawionego w dysertacji Pani mgr Mileny Traut istotnie prowadzi do poszerzenia dotychczasowego stanu wiedzy oraz stanowi przyczynek do rozwiązania oryginalnego problemu badawczego, polegającego na ocenie skuteczności wykorzystania oocytów uzyskanych od jałówek niedojrzałych płciowo do produkcji blastocyst w warunkach *in vitro*, spełniając tym samym wymóg ustawy stawiany pracom doktorskim.**

Pracę doktorską stanowią koncepcyjnie spójne, dwa opublikowane artykuły naukowe, których wartość merytoryczną oceniam bardzo wysoko, z zaznaczeniem potencjału aplikacyjnego w hodowli bydła. W pierwszej publikacji, która ukazała się w czasopiśmie *Theriogenology*, wykazano niższy odsetek blastocyst uzyskanych w warunkach *in vitro* z oocytów pobranych od zwierząt niedojrzałych płciowo w porównaniu do odsetka blastocyst wyhodowanych z oocytów pobranych od zwierząt dojrzałych. Nie zaobserwowano natomiast różnic morfologicznych w blastocystach pomiędzy badanymi grupami. Blastocysty od niedojrzałych płciowo jałówek wykazywały zaburzoną wewnątrzkomórkową równowagę redoks, która manifestowała się wyższym poziomem reaktywnych form tlenu i glutationu oraz zwiększoną liczbą kopii mtDNA, która korelowała z wyższą ekspresją transkryptu dla mitochondrialnego czynnika transkrypcyjnego A (*TFMA*). Może to być bezpośrednim wskaźnikiem jakości zarodków uzyskanych od jałówek niedojrzałych płciowo. W drugiej publikacji, która została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *BMC Genomics*, przedstawiono po raz pierwszy profil transkryptomiczny blastocyst wyhodowanych *in vitro* z oocytów pobranych od jałówek niedojrzałych i dojrzałych, wykazując obniżony poziom ekspresji genów szlaku fosforylacji oksydacyjnej, szczególnie tych wpływających na produkcję ATP i transport elektronów (*ATP5MF*, *ATP5PD*,

*ATP12A*, *NDUFS3*, *NDUFA13*, *NDUFA3*, *COX17*, *CYCS* i *UQCRC1*), w blastocystach uzyskanych od jałówek niedojrzałych. Otrzymane wyniki mogą wyjaśniać wyższy poziom reaktywnych form tlenu obserwowany wcześniej w tych zarodkach. Z drugiej strony wykazano w nich także niższą liczbę komórek apoptotycznych w porównaniu do zarodków od zwierząt dojrzałych płciowo. Uzyskana baza profili transkryptomicznych stanowi doskonały punkt wyjścia do poszukiwania kolejnych markerów molekularnych kompetencji rozwojowych zarodków otrzymanych od jałówek niedojrzałych płciowo. Wyniki badań zaprezentowane w obu publikacjach wskazują na niższe kompetencje rozwojowe zarodków otrzymanych *in vitro* z oocytów od zwierząt niedojrzałych płciowo, co powinno znaleźć kontynuację praktyczną w postaci wykorzystania tychże zarodków do embriotransferu. **W związku z tym stwierdzam, że w/w prace stanowią koncepcyjnie spójny cykl artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, co spełnia warunek ustawy określający wymogi stawiane pracom doktorskim.**

W podsumowaniu stwierdzam, że Doktorantka wykazała się umiejętnościami planowania i prowadzenia badań naukowych, potrafi rozwiązać sformułowany problem naukowy, czego dowodem są krytyczne dyskusje prowadzone w przedłożonych publikacjach. Ponadto Doktorantka wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem teoretycznym w zakresie podjętej tematyki badawczej, doskonałym warsztatem laboratoryjnym obejmującym technikę zapłodnienia *in vitro*, metody biologii molekularnej, analizę transkryptomiczną i bioinformatyczną. **Wskazuje to na spełnienie ustawowych kryteriów jakimi powinien charakteryzować się kandydat do stopnia doktora.**

Wartość merytoryczną i metodyczną recenzowanej pracy doktorskiej, jej założenia oraz szeroki zakres otrzymanych wyników oceniam bardzo pozytywnie. Podczas lektury publikacji oraz opracowania polskojęzycznego nasunęły mi się pytania/uwagi, którymi chciałabym się podzielić:

1. W obu publikacjach Doktorantka przedstawiła wyniki badań w zakresie ekspresji genów, co oczywiście wynika z tematu rozprawy doktorskiej i postawionych celów. Bardzo ciekawe jest jednak, szczególnie mając na uwadze aspekt aplikacyjny przedłożonych badań, czy obserwowane zmiany w ekspresji genów potwierdzają się na poziomie białka. Czy były prowadzone tego typu badania lub czy są one planowane?
2. Wyróżniającym się osiągnięciem rozprawy doktorskiej jest stworzenie bazy profili transkryptomicznych blastocyst otrzymanych od

zwierząt niedojrzałych i dojrzałych płciowo. Zidentyfikowano 436 genów o zróżnicowanej ekspresji, wśród których wyróżniono te zaangażowane w fosforylację oksydacyjną. Czy Doktorantka mogłaby zasugerować jeszcze inne geny z przeprowadzonej analizy transkryptomicznej, które mogą być ważne jako potencjalne markery kompetencji rozwojowych zarodków bydła?

3. W pierwszej publikacji opisano sposób wyboru genu referencyjnego (*GAPDH*) do analizy real-time PCR z wykorzystaniem programu NormFinder. Czy w drugiej publikacji również przeprowadzono jeszcze raz taką samą normalizację, czy opierano się na tej wcześniejszej? Jaka była stabilność *GAPDH* w analizowanych układach eksperymentalnych?

4. W podsumowaniu opracowania polskojęzycznego (strona 36) Doktorantka wspomniała, że dla potwierdzenia znaczenia aplikacyjnego przedstawionych badań w hodowli bydła konieczne są dalsze prace z wykorzystaniem wyhodowanych zarodków do embriotransefu. Jak Doktorantka widzi możliwość przeprowadzenia takich doświadczeń? Na co szczególnie należałoby zwrócić w nich uwagę?

5. Na stronie 35 w drugim punkcie rozdziału „Podsumowanie i wnioski” zamiast „... w zależności od wieku dawczyń komórek jajowych” powinno być „... w zależności od dojrzałości płciowej dawczyń komórek jajowych”.

6. W opracowaniu polskojęzycznym pojawiają się pojedyncze błędy stylistyczne, np. „statycznie niższy” (strona 13) oraz interpunkcyjne.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska 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”* stanowi niezwykle wartościowe i oryginalne dzieło naukowe o znaczącym wkładzie w poszerzenie dotychczasowego stanu wiedzy z zakresu rozrodu zwierząt, szczególnie w kontekście wykorzystania metod wspomaganego rozrodu u zwierząt hodowlanych, a uzyskane wyniki wnoszą nowe informacje do dyscypliny zootechniki i rybactwo. Przedłożona dysertacja spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023.742 ze zm.) stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym **zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie mgr**

**Mileny Traut do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.**

Mając na uwadze wysoką wartość naukową dysertacji i nowatorstwo uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej, co uzasadniam w osobnym wniosku.

Z wyrazami szacunku,

Podpisany elektronicznie przez  
Małgorzata Ewa Grzesiak  
06.01.2025  
15:57:50 +01'00'

*dr hab. Małgorzata Grzesiak, prof. UJ*