



Jacek Z. Kubiak

Rennes, 3 lutego 2022 r.

Directeur de Recherche au CNRS

IGDR, UMR 6290 CNRS/Université Rennes 1

Rennes

France

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Analiza wpływu wybranych związków endokrynnie czynnych na metabolizm i zdolność rozwojową oocytów świni podczas dojrzewania *in vitro*” autorstwa pani mgr Gabrieli Gorczycy.

Jakość oocytów - żeńskich komórek rozrodczych - ma kapitalne znaczenie dla sukcesu reprodukcyjnego w trakcie rozmnażania płciowego. Dotyczy to zarówno oocytów owulowanych przez samice ssaków, w tym kobiet jako reprezentantek gatunku *Homo sapiens*, jak i oocytów dojrzewających *in vitro* używanych w procedurze zapłodnienia *in vitro*, tak u kobiet jak i zwierząt gospodarskich.

W przedstawionej do mojej oceny rozprawie doktorskiej autorka zaprezentowała i przedyskutowała wyniki kompleksowych badań zmierzających do wyjaśnienia wpływu wybranych związków chemicznych endokrynnie czynnych na oocyty świni w trakcie procesu ich dojrzewania mejotycznego *in vitro*. Doktorantka skupiła swoją uwagę na działaniu trzech związków: pestycydu winklozolinu, sterydu anabolicznego nandrolonu i immunosupresanta Cyklosporyny A .

Poznanie mechanizmów molekularnych powodujących obniżenie jakości komórek rozrodczych jest ogromnym wyzwaniem współczesności ze względu na ciągle obniżające się zdolności rozrodcze ludzi. Wynikają one między innymi z działania stresorów chemicznych, które człowiek sam wprowadza do środowiska. Z oczywistych względów badania tego typu muszą być prowadzone najpierw na modelach zwierzęcych. Trzeba zaznaczyć, że bezpośrednie przeniesienie wyników uzyskanych na tych modelach na ludzi nie jest możliwe. Po wykryciu i opisanie pewnych mechanizmów na przykładzie oocytów świni, co czyni w swoim doktoracie mgr Gorczyca, trzeba będzie w przyszłości wykonać podobne obserwacje i doświadczenia na oocytach ludzkich. Tylko w ten sposób można będzie stwierdzić czy te same, lub inne mechanizmy działają w ludzkich żeńskich komórkach rozrodczych. W mojej opinii, mgr Gorczyca wykonała właśnie tę część wspomnianego wyżej zadania uzyskując interesujące wyniki.

Pierwsza część badań doktoratu skupia się na opisie i doświadczalnym wykorzystaniu nowoczesnych metod hodowli oocytów świni w trakcie ich dojrzewania mejotycznego *in vitro*. Ta część badań ma charakter metodologiczny. Pozwoliła ona na wykazanie u doktorantki prawdziwego zacięcia naukowego w prowadzeniu badań i udoskonaleniu metod hodowli kompleksów oocyt-komórki wzgórka (COCs) zachowujących trójwymiarowy charakter tych struktur. Opisano szczegółowo metodologię hodowli COCs w kilku wariantach i wybrano jako optymalną metodę hodowli w kapsułach fibrynowo-alginianowych. Za podstawę tego wyboru posłużyła ocena wzrostu oocytów w trakcie hodowli, analiza ich ultrastruktury i żywotności komórek wzgórka.

W drugim etapie prac, ten typ hodowli COCs został wykorzystany do badań wpływu wymienionych na wstępie czynników chemicznych na dojrzewanie *in vitro* oocytów i COCs świni. Pewnym utrudnieniem w analizie doktoratu jest zupełny brak informacji na temat tych badań metodologicznych w tytule pracy. Przykładowo, tytuł „Analiza wpływu wybranych związków endokrynnie czynnych na metabolizm i zdolność rozwojową oocytów świni podczas dojrzewania *in vitro* w kapsułach fibrynowo-alginianowych” byłby tylko nieco dłuższy, ale oddawałby w pełni zawartość doktoratu i podkreślałby wagę dokonań metodologicznych doktorantki.

Na tym drugim etapie badań doktorantka przeanalizowała morfologię COCs w hodowlach kontrolnych i w obecności trzech badanych związków chemicznych. Dokonała ona pomiarów średnicy oocytów, zbadala strukturę mikroskopową COCs, w tym ich ultrastrukturę, przeprowadziła badania żywotności komórek wzgórka, przebiegu procesu apoptozy wraz z analizą ilościową białek zaangażowanych w ten proces, rolę autofagii, metabolizmu COCs - ze szczególnym uwzględnieniem metabolizmu lipidów i wybranych genów zaangażowanych w te procesy. Doktorantka skupiła się na ocenie jakości i rozmieszczeniu kropli lipidowych i mitochondrii, aktywności tych ostatnich i aktywności genów wpływających na produkcję ATP. Następnie przeprowadziła analizę genów regulujących proces dojrzewania mejotycznego oocytów na poziomie ekspresji mRNA i zbadala stężenia cAMP - ważnego czynnika kontrolującego przebieg dojrzewania mejotycznego oocytów.

Innymi słowy, doktorantka zastosowała bardzo szeroką gamę technik i metod badawczych dla scharakteryzowania przebiegu dojrzewania COCs w wybranych warunkach hodowli *in vitro* i poznania efektów działania winklozoliny, nandrolonu i Cyklosporyny A na przebieg dojrzewania oocytów *in vitro*. Takie podejście pozwoliło na zebranie bardzo dużej ilości obserwacji, lecz równocześnie spowodowało, że badania tych procesów nie były zbyt dogłębne. Ich wynikiem jest ogólny obraz wybranych cech COCs i oocytów świni w hodowli *in vitro* bez możliwości wyprowadzenia dogłębnych wniosków co do regulacji poszczególnych funkcji oocytów i COCs i szlaków metabolicznych, czy kontrolnych związanych z aktywnością badanych genów i białek. Rozumiem, że taki był zamiar doktorantki, ale szkoda, że nie sformułowała tego w wyraźny sposób we wstępie do doktoratu.

Doktorat jest napisany dobrą polszczyzną, łatwy w czytaniu i wykazuje kompetencje doktorantki. Skupię się teraz na wymienieniu pewnych niedociągnięć, które rzucają się w oczy podczas lektury.

1. Schematy przedstawione we Wstępie są oryginalną pracą doktorantki. Należy się jej za to uznanie. Jednak występują w nich bardzo istotne niedociągnięcia. W rycinie 1 (str.22) wielkość oocytów została przedstawiona w sposób przypadkowy. Wzrost oocyty jest

najbardziej istotną cechą morfologiczną w procesie oogenezy. Doktorantka pisze o tym we Wstępie. Jednak na schemacie oocyt maleje wraz z upływem czasu. Proszę porównać średnicę trzeciego oocytu na schemacie z czwartym i piątym. Jest to zupełnie niezrozumiałe. Poza tym oznaczona na niebiesko otoczka przejrzysta, choć wzmianka o niej znajduje się w tekście, nie jest oznaczona na schemacie. Schemat ma ułatwiać lekturę. W tym wypadku ją raczej utrudnia.

2. Na rycinie 9 (str. 35) znów nie jest oznaczona otoczka przejrzysta.
3. Str. 45, linijka 3 od góry: termin „pojedynczy oocyt” jest mylący. Chodzi bowiem o oocyt izolowany od komórek follicularnych, tzw. w żargonie naukowym „nagi oocyt”.
4. Str. 49, linijka 18 od góry: „prowadziła do wirylizmu spowodowanej” – powinno być: „prowadziła do wirylizmu spowodowanego” (słowo „wirylizm” jest rodzaju męskiego).
5. Ryc.12, str. 53: brak Fas Ligand (FasL) na schemacie, nie ma też wzmianki na temat kas10 w tekście pomimo tego, że widnieje ona na schemacie. Co oznaczają pionowe linie przerywane? Domyślam się, że mają odgraniczać zewnętrzny i wewnętrzny szlak sygnalizacyjny apoptozy. Ale w takim razie do której kategorii należą elementy umieszczone po środku pomiędzy obiema liniami?
6. Str. 96: linijka 7 od góry: opis ultrastruktury mitochondrii: co ma oznaczać termin "intensywność barwy"? Zapewne chodzi o gęstość elektronową?
7. Ryc. 24, str. 99: w legendzie „żółta strzałka”, a na rycinie są tylko strzałki zielone.
8. Str. 116: linijka 4 od góry: „barwienie immunofluorescencyjne MitoTracker Orange” - MitoTracker Orange jest barwnikiem fluorescencyjnym, ale nie uzyskuje się jego lokalizacji w reakcji immunologicznej.
9. Dalej na tej samej stronie powtarzany jest kilkakrotnie błędny skrót „IF” jako immunofluorescencja w odniesieniu do barwienia MitoTracker Orange. Ale pojawia się też prawidłowe określenie „sygnał fluorescencyjny dla MtOR”.
10. Na tej samej stronie: „około jądrowo” pisze się razem - „okołojądrowo”
11. Rycina 36, str. 118: brak schematu dla kontroli. Poza tym z opisu wynika, że badania te były prowadzone na oocytach dojrzewających *in vitro*, a na ilustracjach i na schemacie są oocyty z jądrem komórkowym. Z tego wynika, że obserwacje prowadzono przed wejściem oocytów w proces dojrzewania mejotycznego. To jest zupełnie niezrozumiałe i wymaga wyjaśnienia.
12. Str. 119, linijka 3 od góry: COCs hodowano „w klasycznym modelu hodowli adherentnej (2D)”. Proszę wyjaśnić dlaczego. Przecież wszystkie pozostałe hodowle były prowadzone w kapsułach.
13. Str. 125: gen *CCNB* – nie ma takiego genu w genomie człowieka i, jak sądzę, również świni. Są natomiast geny *CCNB1*, *CCNB2* i *CCNB3*. Nie ma informacji w jakim czasie dojrzewania były prowadzone te badania. Szczególnie w przypadku cyklin ma to ogromne znaczenie ponieważ są to białka, których ilość oscyluje w trakcie cyklu komórkowego.
14. Str. 126: jak doktorantka tłumaczy tak duże różnice w poziomie mRNA genu *CDC2* skoro jest on w minimalnym stopniu regulowany transkrypcyjnie, a regulacja białka *CDC2* następuje przez fosforylację i defosforylację kilku ewolucyjnie konserwowanych jego aminokwasów, jak również przyłączanie i odłączanie cykliny – regulatorowej jednostki MPF (kompleks *CDC2*-cyklina).
15. Dyskusja, str. 133: „obniżona produkcja jaj w ikrze” – ikra to są właśnie jaja, a dokładniej owulowane oocyty, lub komórki jajowe. Dlatego nie można mówić o

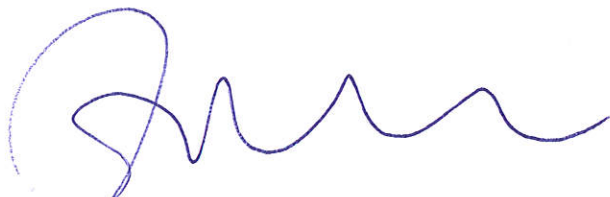
produkcji jaj w ikrze, a doktorantce chodzi chyba o liczbę produkowanych jaj przez samice.

16. *ibid.*: „układu rozrodczego w embrionach” – nie w embrionach tylko w płodach. To samo o „feminizacji embrionów męskich” – nie embrionów tylko płodów.
17. Str.138: ref. Lavranos i wsp., 1994 dotyczy krów, a nie ludzi.
18. *ibid.*: ref. Riva i wsp., 2014 dotyczy mezenchymalnych komórek progenitorowych, a nie komórek ziarnistych.
19. Str. 139, po środku tekstu: „w takcie” zamiast „w trakcie”.

Pomimo tych drobnych uchybień i pomyłek praca doktorska mgr Gabrieli Gorzycy jest istotnym osiągnięciem naukowym.

W przedstawionej tutaj ocenie skupiłem się na formalnej stronie rozprawy ze szczególnym uwzględnieniem merytorycznej i technicznej jakości przedstawionych badań, wykazaniem się umiejętnościami doświadczalnymi przez autorkę, jak również zdolnościami przekazania informacji naukowej w formie pisemnej. Wszystkie te aspekty rozprawy oceniam dobrze.

Podsumowując, pracę przedstawioną do mojej oceny uważam za wartościową i spełniającą wymogi stawiane przed rozprawami doktorskimi. Jest ona na wysokim poziomie naukowym. Sądzę, że obserwacje mgr Gorzycy będą kontynuowane i uzupełnione w trakcie dalszych badań prowadzonych w zakładzie. Dlatego wnioskuję o dopuszczenie mgr Gabrieli Gorzycy do dalszych etapów przewodu doktorskiego i gratuluję jej dobrze wykonanej i zaprezentowanej rozprawy doktorskiej.



Jacek Kubiak