

Prof. dr hab. Andrzej Sechman
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Al. Mickiewicza 24/28
e-mail: andrzej.sechman@urk.edu.pl

Kraków, 14 stycznia 2022r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Gabrieli Gorczycy

pt. „**Analiza wpływu wybranych związków endokrynnie czynnych na metabolizm i zdolność rozwojową oocytów świni podczas dojrzewania *in vitro***”

wykonanej w Zakładzie Endokrynologii
Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Dudy, prof. UJ

W ciągu ostatniego ćwierćwiecza, dzięki postępowi badań w obszarze biologii rozrodu, biotechnologii i bioinżynierii zwierząt dokonał się znaczący rozwój technik wspomaganego rozrodu (ART). Są one powszechnie wykorzystywane w hodowli zwierząt, w procedurach prowadzących do uzyskiwania zwierząt transgenicznych, często wykorzystywanych w badaniach naukowych, jak również w procedurach medycznych, których celem jest uzyskiwanie zarodków i leczenie niepłodności. Jedną z technik ART jest pozaustrojowe dojrzewanie oocytów (IVM), w której niedojrzałe oocyty pozyskiwane z pęcherzyków jajnikowych samicy hoduje się w odpowiednio dobranych pożywkach, w których mogą one uzyskać pełną dojrzałość i być wykorzystane do zapłodnienia *in vitro*. Określenie optymalnych warunków dojrzewania oocytów *in vitro* jest niezbędnym elementem skutecznego wspomaganego rozrodu. Jednak dojrzewanie oocytów poza organizmem samicy prowadzi do zmniejszenia ich zdolności rozwojowych w porównaniu z oocytami dojrzewającymi *in vivo*, co obserwuje się zarówno u ludzi jak i u zwierząt. Dlatego optymalny skład pożywek hodowlanych, jak również stworzenie odpowiedniego modelu hodowli *in vitro*, zapewniającego optymalny wzrost i rozwój oocyta, są ciągle przedmiotem prac badawczych. W ostatnich latach coraz częściej wykorzystuje się modele hodowli przestrzennej 3D, które zapewniają rozwój niedojrzałych oocytów lub całych kompleksów oocyt-komórki wzgórka. Modele takie wydają się być najbardziej pożądane, gdyż podczas długotrwałej hodowli naśladują warunki występujące w pęcherzykach jajnikowych, zapewniając prawidłowy rozwój oocyta. Doktorantka w swoich badaniach postanowiła najpierw zająć się opracowaniem takiego właśnie modelu hodowli przestrzennej kompleksów oocyt-komórki wzgórka, izolowanych z pęcherzyków antralnych niedojrzałych płciowo świń, by następnie w drugiej części badań, zastosować go do oceny wpływu wybranych środowiskowych związków o aktywności endokrynniej na kompetencje rozwojowe oocyta i funkcje komórek wzgórka. Wybór tematyki badań uważam za w pełni uzasadniony, a uzyskane wyniki mogą przyczynić się do rozwoju technik wspomaganego rozrodu i uzyskiwania większej liczby kompetentnych gamet.

Oceniana rozprawa obejmuje w sumie 169 stron i jest podzielona na 6 rozdziałów: „Wstęp” (36 stron), „Hipotezy, cele i zadania badawcze” (2 strony), Materiały i Metody (30 stron), Wyniki (36 stron), Dyskusja (14 stron), Podsumowanie (1 strona). Po ostatnim

numerowanym rozdziale zamieszczona została Bibliografia obejmująca aż 26 stron oraz Załącznik nr 1 zawierający dwie tabele z listą badanych genów oraz starterów flankujących wykorzystanych w metodzie RT-qPCR. Główne rozdziały pracy zostały poprzedzone: (i) informacją o współpracy z innymi jednostkami UJ i instytucjami zewnętrznymi, (ii) danymi dotyczącymi źródeł finansowania badań (grant NCN: PRELUDIUM 15 oraz grant DSC 2018 na zadania służące rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich na Wydziale Biologii UJ – kierownikiem obu grantów była Doktorantka), (iii) informacją o tym, że część prezentowanych w pracy doktorskiej wyników badań została opublikowana w Journal of Visualized Experiments w 2020 roku (doi: 10.3791/61325, 70 pkt MNiE, IF=1,163; pierwszym autorem tej publikacji jest Doktorantka), (iv) pięciostronicowym wykazem skrótów, oraz (v) streszczeniami, polsko- i angielskim.

Jak już wcześniej wspomniałem, badania przedstawione w rozprawie doktorskiej Pani mgr Gabrieli Gorczycy dotyczą w zasadzie dwóch aspektów:

1. opracowania metody hodowli 3D całych kompleksów oocyt-komórki wzgórka izolowanych z pęcherzyków antralnych niedojrzałych płciowo świń. W tej części pracy, Autorka zastosowała dwa modele hodowli 3D: (i) z wykorzystaniem super-hydrofobowych mikrobioreaktorów z fluorowanego etylenu i propylenu (FEP), określane jako Liquid Marbles, oraz (ii) hydrożelowe kapsuły fibrynowo-algininowe (FA). Biorąc pod uwagę wyniki obserwacji mikroskopowych i własne doświadczenia Autorka do dalszych badań wybrała model kapsuł FA, zapewniający synchronizację dojrzewania jądrowego i cytoplazmatycznego, kluczowych dla osiągnięcia potencjału rozwojowego oocytów. Pomimo tego, iż wyniki tych badań zostały opisane we wspomnianej wcześniej publikacji, zrozumiałym jest, że ze względu na wykorzystanie kapsuł FA w drugiej części badań, Doktorantka postanowiła je przedstawić w swojej dysertacji. *Natomiast nie jest jasne, dlaczego ta część badań nie ma odzwierciedlenia w tytule pracy? Proszę o wyjaśnienie tej kwestii w czasie obrony;*
2. wpływu wybranych substancji endokrynnie czynnych, tj. fungicydu winklozoliny oraz steroidu anabolicznego – nandrolonu, a także immunosupresantu – cyklosporyny A na kompetencje rozwojowe komórek wzgórka. Wyniki badań pokazały, że wszystkie trzy badane związki wpływają na badane procesy w komórkach wzgórka oraz jakość dojrzewających oocytów. *Tutaj chciałbym prosić Doktorantkę o odpowiedź na pytanie, co było powodem tego, że właśnie te trzy związki zastosowała w swoich doświadczeniach?*

W rozdziale pt. „**Hipotezy, cele i zadania badawcze**” Doktorantka postawiła dwie hipotezy badawcze, oraz sformułowała 4 cele badawcze, których realizacja była możliwa poprzez wykonanie 13-tu zadań badawczych. Są one dobrze zaplanowane i dotyczą wspomnianych wcześniej dwóch zasadniczych aspektów podjętych badań. W drugiej hipotezie badawczej ujęte zostały tylko dwa z trzech badanych związków, tj. winklozolina i nandrolon. *Tutaj nasuwa się pytanie, dlaczego Autorka nie zdecydowała się zawrzeć w drugiej z hipotez badawczych cyklosporyny A, skoro badała jej wpływ na kompetencje rozwojowe oocytu i żywotność otaczających go komórek wzgórka? W celach i zadaniach badawczych również brak jest informacji o planowanych, a później prowadzonych, badaniach dotyczących wpływu cyklosporyny A na procesy śmierci komórkowej, metabolizm energetyczny w kompleksach oocyt-komórki wzgórka, czy też na proces dojrzewania oocytów poddanych procedurze IVM z wykorzystaniem hodowli 3D. Proszę o wyjaśnienie tej kwestii podczas obrony pracy.*

Należy podkreślić, że przedstawione przez Autorkę hipotezy badawcze opierają się na świetnej znajomości piśmiennictwa, którego przegląd znajdujemy w rozdziale „**Wstęp**”.

Autorka pracy opisuje w tym rozdziale najpierw rozwój pęcherzyków jajnikowych i oocytu, charakteryzuje proces różnicowania komórek ziarnistych wzgórka, następnie przedstawia źródła syntezy ATP wykorzystywanego przez oocyt i komórki wzgórka, a także rolę kropeł lipidowych, mitochondriów, metabolizmu glukozy i reaktywnych form tlenu w kompleksie oocyt-komórki wzgórka. W dalszej części tego rozdziału Autorka charakteryzuje cyklosporynę A oraz badane związki o natywności hormonalnej (winklozolina i nandrolon), a następnie w sposób przejrzysty opisuje procesy śmierci komórkowej (apoptoza i autofagia). Ostatnia sekcja wstępu dotyczy procesu dojrzewania *in vitro* kompleksów oocyt-komórki wzgórka. W rozdziale tym Doktorantka przedstawia różne modele hodowli dojrzewającej oocytów i kompleksów oocyt-komórki wzgórka, wyjaśniając jednocześnie, że model 3D jest jednym ze sposobów, dzięki któremu możliwe jest zwiększenie kompetencji rozwojowych zarodków, otrzymanych z oocytów po zakończonej procedurze IVM. Tutaj czytelnik zostaje również zapoznany z zaletami i możliwościami tworzenia modeli 3D w postaci kapsuł hydrożelowych, które można zastosować w hodowli kompleksów oocyt-komórki wzgórka. Treść rozdziału „Wstęp” uzupełnia 13 świetnie przygotowanych i dobrze opisanych rycin, które ułatwiają czytelnikowi zrozumienie skomplikowanych procesów komórkowych. Podział treści poszczególnych podrozdziałów Wstępu został bardzo dobrze przemyślany i dobrze przygotowany pod względem merytorycznym. Było to możliwe dzięki znakomitej erudycji Autorki pracy. Która przed przystąpieniem do redagowania pracy doktorskiej zapoznała się aż z 367 pozycjami piśmiennictwa, głównie anglojęzycznego.

Rozdział 3. pt. „**Materiały i metody**” został podzielony na 2 główne podrozdziały: „Materiał badawczy” i „Metody”. W pierwszym z nich Autorka podaje, że materiał badawczy stanowiły jajniki świń niedojrzałych i dojrzałych płciowo. Z pierwszych izolowano pęcherzyki o średnicy 4-6 mm służące później do pozyskiwania kompleksów oocyt-komórki wzgórka, natomiast z jajników dojrzałych płciowo świń izolowano pęcherzyki antralne o średnicy 6-8 mm, służące do pozyskiwania płynu pęcherzykowego. Był on wykorzystany jako suplement pożywki hodowlanej podczas procedury IVM. Schemat przedstawiający wspomniane wcześniej dwa etapy badań oraz przebieg realizacji zaplanowanych zadań badawczych przedstawiono na rycinie 14, natomiast opisy poszczególnych doświadczeń i analiz w rozdziale pt. „Metody”, w którym wyodrębniono 18 podrozdziałów odpowiadających poszczególnym doświadczeniom i prowadzonym analizom. W tej części pracy znajdują się dokładne opisy izolacji kompleksów oocyt-komórki wzgórka oraz pozyskiwania płynu pęcherzykowego z pęcherzyków jajnikowych, a następnie opisy hodowli wspomnianych kompleksów z wykorzystaniem odpowiednio modelu super-hydrofobowych mikrobioreaktorów określanych jako Liquid Marbles oraz modelu hydrożelowych kapsuł fibrynowo-algininowych (FA). Opisy tych procedur uzupełniają zamieszczone fotografie na rycinach 15 i 16, przedstawiające poszczególne etapy opisywanych procedur. Po zakończeniu procedury IMV, odpowiednio przygotowane i zatopione w żywicy epoksydowej kompleksy oocyt-komórki wzgórka obrazowano przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego. Ponadto analizowano żywotność komórek wzgórka stosując ich barwienie odpowiednimi odczynnikami, by następnie zobrazować je przy użyciu laserowego mikroskopu konfokalnego. Biorąc pod uwagę wyniki obserwacji mikroskopowych dalsze analizy kompleksów oocyt-komórki wzgórka przeprowadzono wykorzystując hydrożelowe kapsuły fibrynowo-algininowe. W celu zweryfikowania drugiej hipotezy badawczej kompleksy oocyt-komórki wzgórka eksponowano przez 48 godzin na działanie winklozolini, nandrolonu i cyklosporyny A podczas procedury IVM z wykorzystaniem kapsuł FA. Po inkubacji izolowano kompleksy oocyt-komórki wzgórka z kapsuł, a następnie przeprowadzono szereg analiz takich jak: identyfikacja komórek apoptotycznych metodą TUNEL, obrazowanie kropli lipidowych i mitochondriów przy użyciu odpowiednich barwników fluorescencyjnych,

analiza metabolicznej funkcji mitochondriów poprzez pomiar zużycia tlenu i glikolizy przez komórki w czasie rzeczywistym przy zastosowaniu Seahorse XFp Cell Mito Stress Test, ekspresja wybranych genów zaangażowanych w proces lipolizy, neutralizowanie reaktywnych form tlenu oraz czynnika promującego dojrzewanie komórek stosując metodę RT-qPCR. Przeprowadzono również analizę białek szlaków apoptotycznej śmierci komórek stosując zestaw RayBio Human Apoptosis Antibody Array Kit, a także wykonano pomiary stężenia cAMP i glutationu metodą ELISA. W ostatnim podrozdziale opisano metodykę prowadzonych analiz ilościowych i jakościowych oraz stosowane analizy statystyczne. Wszystkie metody analityczne, sposoby pomiaru poszczególnych wskaźników oraz weryfikacja uzyskanych wyników analiz zostały precyzyjnie, przejrzyście i szczegółowo opisane, co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy laboratoryjnej.

W odniesieniu do opisywanych metod mam następujące pytania:

- 1) *w jaki sposób sprawdzano jakość wyizolowanego RNA?*
- 2) *czy i w jaki sposób walidowano metodę RT-qPCR, czy nie lepiej byłoby zastosować sondy TaqMan zamiast odczynnika SYBR Green?*
- 3) *uprzejmie proszę o wyjaśnienie, w jakim celu zamieszczono Tabelę 4 i czy w poszczególnych grupach (kontrolnej i doświadczalnych) było po jednej próbce?*
- 4) *czy przeprowadzono walidację zestawu do analizy białek? Zastosowana mikromacierz jest przeznaczona do analizy ludzkich białek apoptotycznych, a kompleksy oocyt-komórki wzgórka pochodziły z jajników owiec.*

Uzyskane wyniki zostały dobrze udokumentowane i zaprezentowane w następnym rozdziale pracy pt. „**Wyniki**”. Jest on podzielony na 5 podrozdziałów adekwatnych do zaplanowanych zadań badawczych. Na stronie 92 znajduje się Tabela 8, w której Autorka zamieściła wykaz zadań badawczych, a także metod stosowanych w celu weryfikacji hipotez badawczych. Uważam, że był to dobry pomysł, gdyż biorąc pod uwagę ogrom stosowanych metod analitycznych i analizowanych parametrów czytelnik po przeczytaniu wcześniejszych rozdziałów mógłby mieć wątpliwości, które geny uwzględniano jako markery poszczególnych badanych procesów. Wyniki badań zostały zaprezentowane w 3 tabelach i 25 rycinach, z których jedna jest graficznym podsumowaniem wyników analiz ultrastruktury, rozmieszczenia i aktywności mitochondriów oraz kropli lipidowych w oocytach poddanych dojrzewaniu *in vitro* w obecności badanych związków endokrynnie czynnych i cyklosporyny A. Na rycinach 21-25 i tabelach nr 9 i 10 przedstawiono wyniki analiz wpływu zastosowanych modeli hodowli 3D na wzrost i rozwój kompleksów oocyt-komórki wzgórka, a także żywotność komórek wzgórka. Wykazano, że zarówno kapsuły fibrynowo-algininowe, jak i hydrofobowe mikrobiorekatory stwarzają optymalne warunki wzrostu i dojrzewania kompleksów oocyt-komórki wzgórka, a także umożliwiają utrzymanie ich struktury przestrzennej w trakcie trwania 72-godzinnej hodowli. Jednak ze względu na to, że kapsuły FA zapewniają lepsze warunki do dojrzewania jądrowego, a jednocześnie są łatwiejsze do operowania, drugą część badań dotyczącą wpływu związków hormonalnie czynnych i cyklosporyny A, prowadzono na kompleksach oocyt-komórki wzgórka hodowanych w hydrożelowych kapsułach fibrynowo-algininowych. Wyniki tej części badań przedstawiające wpływ wspomnianych związków na proces apoptozy, metabolizm i proces dojrzewania oocytu przedstawiono na rycinach 26-45 i w tabeli 11. Przeprowadzone analizy dowiodły, że każdy z zastosowanych związków stymuluje proces apoptozy komórek wzgórka, chociaż ich działanie zachodzi za pośrednictwem innych szlaków: winklozolina aktywuje szlak p53 – FOXO3 – kaspaza 3, nandrolon: TNF β – kaspaza 3, a cyklosporyna A: cytochrom c – kaspaza 3. Ponadto, cyklosporyna A aktywuje proces autofagii. Z kolei

nandrolon zwiększa ekspresję białek związanych z transformacją nowotworową, natomiast w przeciwieństwie do winklozoliny, która zwiększa produkcję ATP, nandrolon i cyklosporyna A obniżają syntezę tego nukleotydu w komórkach COCs. Ponadto ekspozycja COCs na winklozolinę zwiększa poziom reaktywnych form tlenu. W badaniach tych wykazano również, że nandrolon hamuje proces dojrzewania cytoplazmatycznego oocytu, o tym świadczy wzrost akumulacji kropli lipidowych oraz ekspresji mRNA perylipiny 2 (markera kropli lipidowych), a także dojrzewania jądrowego (stwierdzono wzrost akumulacji cAMP). Natomiast winklozolina przyspiesza dojrzewanie oocytu o czym świadczy podwyższony poziom cykliny B.

W odniesieniu do tego rozdziału mam następujące uwagi i pytania:

1. *Niektóre opisy wyników nie są zgodne z danymi przedstawionymi na wykresach: np. na stronie 105 w pierwszym akapicie opis wyników dotyczących ekspresji białka p53 nie zgadza się z danymi zaprezentowanymi na Ryc. 27A, podobnie na str. 123 pierwsze zdanie w drugim akapicie nie jest prawdziwe, gdyż zwiększenie poziomu mRNA genu FOXO3 nie jest statystycznie istotne we wszystkich grupach doświadczalnych.*
2. *W podpisach wykresów brakuje informacji o liczbie powtórzeń „n”. Ponadto w przypadku niektórych wykresów nie podano informacji, czy są to średnie \pm S.E.M czy S.D.*
3. *Dlaczego nie porównywano wyników w grupie traktowanej cyklosporyną A z wartościami pozostałych dwóch grup doświadczalnych?*
4. *Proponuję połączyć wykresy 43 i 44 w jeden wykres z panelami A i B.*

Na kolejnych 14 stronach pracy w rozdziale „**Dyskusja**” Autorka w sposób umiejętny przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników badań, konfrontując je z rezultatami badań wcześniej opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym oraz krajowym. Rozdział ten został podzielony na dwie główne części: pierwszą dotyczącą dojrzewania oocytów świni z wykorzystaniem dwóch modeli hodowli 3D kompleksów oocyt-komórki wzgórka, oraz drugą podzieloną na 3 podrozdziały, dotyczące wpływu winklozoliny, nandrolonu i cyklosporyny A na kompetencje rozwojowe oocytu w kompleksie oocyt-komórki wzgórka. W tej części pracy Doktorantka przedstawiła znaczenie oraz wykorzystanie opracowanych przez siebie metod hodowli pozaustrojowej 3D całych kompleksów oocyt-komórki wzgórka w technikach ART, oraz w badaniach molekularnych dotyczących oddziaływania środowiskowych związków endokrynnie czynnych na dojrzewanie oocytów i komórki go otaczające. „Dyskusja” jest napisana w sposób zwięzły i precyzyjny, co świadczy o umiejętności syntetycznego podejścia do opisywanych zagadnień, właściwej interpretacji oraz umiejętności dyskusji wyników badań własnych, w świetle badań wcześniej opublikowanych przez innych autorów. Drobne uwagi edytorskie zaznaczyłem w tekście pracy, do ewentualnego wykorzystania przez Autorkę przy redagowaniu pracy do druku.

W rozdziale 6. zatytułowanym „**Podsumowanie**” Autorka dysertacji zawarła kilka uogólnień, do których nie wnoszę zastrzeżeń; są one odpowiednio udokumentowane i omówione we wcześniejszym rozdziale. *Natomiast chciałbym zapytać, dlaczego Autorka nie zdecydowała się na sformułowane kilku wniosków, które zwykle przedstawia się w tego typu opracowaniach.*

W ostatniej części pracy pt. „**Bibliografia**”, Doktorantka przedstawia wykaz piśmiennictwa obejmujący aż 367 pozycji. Został on przygotowany starannie, jednak przy tak dużej liczbie cytowanych pozycji, Autorka nie uniknęła błędów. *Niestety, nie wszystkie*

cytowania są w układzie alfabetycznym (np. pozycja nr 211). W tekście pracy znajdują się cytowania, których brak w wykazie bibliografii, np. str. 36, Zhang i wsp. 2010; Norris i wsp. 2009; str. 49, Marycarmen i wsp. 2018; str. 90, Livak i Schmittgen 2001; str. 130, Mikkelsen i Lindberg 2001; str. 135, Elks 1990, Llewellyn 2011, Handelsam 2010. Ponadto w Bibliografii można również znaleźć kilka pozycji, które nie mają odniesienia w tekście pracy.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Uwagi krytyczne i sugestie przedstawione w niniejszej recenzji w żaden sposób nie umniejszają wartości merytorycznej ocenianej pracy, która jest ciekawa i nowatorska. Ma ona walory poznawcze i aplikacyjne, a uzyskane wyniki dotyczące zarówno opracowania modelu hodowli 3D kompleksu oocyt-komórki wzgórka, jak wpływu substancji środowiskowych o charakterze endokrynnym oraz cyklosporyny A na proces dojrzewania oocyta oraz funkcje komórek go otaczających, stanowią istotny wkład w udoskonalenie procedury pozaustrojowej hodowli oocytów oraz poznanie mechanizmów oddziaływania badanych związków na ich rozwój. Wykorzystanie wielu technik mikroskopowych i analiz molekularnych świadczy o bardzo dobrym i dojrzałym warsztacie badawczym Doktorantki. Praca napisana została jasno i przejrzysto, a Autorka potrafiła przedstawić trudne zagadnienia w przystępnej formie. W związku z powyższym uważam, iż przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska pt. *”Analiza wpływu wybranych związków endokrynnie czynnych na metabolizm i zdolność rozwojową oocytów świni podczas dojrzewania in vitro”* spełnia wymogi określone w art. 13. Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), dlatego proszę wysoką Radę Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Gabrieli Gorczycy do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę nowatorstwo, walory metodyczne i naukowe ocenianej pracy wnoszę o wyróżnienie ocenianej dysertacji i jej Autorki stosowną nagrodą określoną przepisami obowiązującymi w Uniwersytecie Jagiellońskim.

