

Olsztyn, 03.08.2026 r.

Prof. dr hab. n. wet. Dariusz J. Skarżyński
Zespół Patologii i Medycyny Translacyjnej Rozrodu
InLife Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN
ul. Trelińskiego 18, 10-683 Olsztyn

Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
ul. Plac Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Miętkiewskiej p.t.:

„Transcriptome analysis of early stages of bovine embryos obtained in vivo from Polish Holstein-Friesian cows”.

I. PODSTAWA PRAWNA I OCENA FORMALNA

Recenzja została opracowana na wniosek Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (Uchwała nr 19 z dnia 14 maja 2026r.), zgodnie z wymaganiami Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z późn. zm.) oraz obowiązującymi przepisami regulującymi postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w formie monografii naukowej w języku angielskim i obejmuje 188 stron maszynopisu. Praca zawiera wszystkie elementy wymagane dla rozpraw doktorskich, w tym: streszczenie, obszerny przegląd piśmiennictwa, jasno sformułowane hipotezy badawcze i cele pracy, szczegółowy opis materiałów i metod, wyniki badań, dyskusję, wnioski, wykaz piśmiennictwa oraz materiały uzupełniające.

Rozprawa została przygotowana starannie pod względem edytorskim. Układ pracy jest logiczny i przejrzysty, a kolejność poszczególnych rozdziałów odpowiada klasycznej strukturze rozpraw eksperymentalnych z zakresu biologii i medycyny weterynaryjnej. Na uwagę zasługuje bardzo bogata dokumentacja metodyczna oraz obszerna prezentacja wyników analiz bioinformatycznych. Już na etapie oceny formalnej należy stwierdzić, że rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w obowiązujących przepisach prawa i może stanowić przedmiot dalszej oceny merytorycznej.

II. PROBLEM NAUKOWY I ZNACZENIE BADAŃ

Rozprawa poświęcona jest analizie molekularnych mechanizmów regulujących rozwój zarodków bydła uzyskanych *in vivo*, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu wieku dawczyń oraz warunków środowiskowych na profil transkryptomyczny zarodków we wczesnych stadiach rozwoju. Dodatkowym elementem badań jest zastosowanie analiz dekonwolucyjnych do charakterystyki zmian zachodzących podczas rozwoju zarodkowego.

Podjęta problematyka jest aktualna zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia. Współczesna hodowla bydła mlecznego w coraz większym stopniu wykorzystuje zaawansowane biotechniki rozrodu, takie jak superowulacja, embriotransfer czy produkcja zarodków *in vitro*. Jednocześnie obserwowany od wielu lat spadek efektywności rozrodu wysokowydajnych krów mlecznych oraz narastające konsekwencje zmian klimatycznych powodują, że poznanie molekularnych mechanizmów determinujących kompetencję rozwojową zarodków oraz identyfikacja czynników ograniczających ich prawidłowy rozwój należą obecnie do najważniejszych kierunków badań w biotechnologii i patologii rozrodu zwierząt.

Wybór zarodków uzyskanych *in vivo* jako materiału badawczego należy uznać za biologicznie uzasadniony. Model ten pozwala ograniczyć wpływ czynników związanych z procedurami produkcji zarodków *in vitro* i lepiej odzwierciedla fizjologiczne warunki ich rozwoju. Dzięki temu uzyskane profile transkryptomiczne mają większy potencjał poznawczy i mogą w bardziej wiarygodny sposób odzwierciedlać molekularne mechanizmy zachodzące podczas wczesnego rozwoju zarodkowego. Na podkreślenie zasługuje również próba powiązania zmian ekspresji genów z fizjologicznymi konsekwencjami starzenia reprodukcyjnego dawczyń oraz oddziaływania stresu cieplnego. Oba czynniki odgrywają istotną rolę w ograniczaniu efektywności rozrodu bydła mlecznego i stanowią przedmiot intensywnych badań prowadzonych zarówno w aspekcie poznawczym, jak i praktycznym. Poszukiwanie molekularnych markerów kompetencji rozwojowej zarodków oraz identyfikacja mechanizmów odpowiedzialnych za ich obniżoną jakość mogą w przyszłości przyczynić się do doskonalenia programów hodowlanych i biotechnik wspomagane go rozrodu.

Przedstawiony problem badawczy ma wyraźnie interdyscyplinarny charakter i łączy zagadnienia biologii rozwoju, embriologii, biologii molekularnej, genomiki funkcjonalnej oraz bioinformatyki. Tak szerokie ujęcie stwarza możliwość uzyskania nowych informacji dotyczących molekularnych mechanizmów determinujących jakość i potencjał rozwojowy zarodków, a jednocześnie wpisuje się w aktualne światowe kierunki badań nad biologicznymi podstawami płodności zwierząt gospodarskich.

W mojej ocenie wybór problemu badawczego należy uznać za trafny, aktualny i dobrze uzasadniony zarówno z naukowego, jak i praktycznego punktu widzenia. Podjęta tematyka odpowiada współczesnym wyzwaniom biologii i biotechnologii rozrodu zwierząt oraz posiada potencjał poznawczy i aplikacyjny, uzasadniający realizację przedstawionych badań.

III. OPIS I OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Rozprawa dotyczy analizy transkryptomu zarodków bydła uzyskanych *in vivo* w kontekście wpływu wieku dawczyń oraz warunków środowiskowych na przebieg wczesnego rozwoju zarodkowego. Na podstawie aktualnego stanu wiedzy Autorka sformułowała trzy hipotezy badawcze dotyczące wpływu wieku dawczyń, warunków środowiskowych oraz stadium rozwoju zarodków na profil ekspresji genów. Cele pracy są logicznie powiązane z postawionymi hipotezami i obejmują zarówno identyfikację genów różnicowo ekspresowanych, analizę szlaków biologicznych, jak również wykorzystanie analiz dekonwolucyjnych do interpretacji danych transkryptomicznych.

Część eksperymentalna została oparta na analizie 34 zarodków uzyskanych od siedmiu krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej. Do realizacji badań wykorzystano nowoczesne metody biologii molekularnej, obejmujące sekwencjonowanie RNA oraz wieloetapową analizę bioinformatyczną. Na uwagę zasługuje szeroki zakres zastosowanych metod analitycznych oraz znaczny nakład pracy eksperymentalnej i obliczeniowej związanej z przygotowaniem oraz analizą danych transkryptomicznych. Rozprawa zawiera liczne tabele, ryciny oraz analizy funkcjonalne, świadczące o dużym zaangażowaniu Autorki w realizację projektu badawczego.

Na pozytywną ocenę zasługuje również obszerne wprowadzenie oraz dobrze udokumentowana dyskusja, które świadczą o dobrej znajomości aktualnej literatury przedmiotu i umiejętności osadzenia własnych wyników w szerszym kontekście współczesnych badań nad biologią i biotechnologią rozrodu. Rozprawa została przygotowana starannie pod względem edytorskim, a sposób prezentacji wyników jest przejrzysty i ułatwia ich analizę.

Już na etapie ogólnej charakterystyki pracy należy jednak zauważyć, że wartość poznawcza rozprawy będzie zależeć nie tyle od szerokiego zakresu zastosowanych metod analitycznych, ile przede wszystkim od stopnia, w jakim przyjęty model eksperymentalny umożliwia jednoznaczną weryfikację postawionych hipotez biologicznych oraz wiarygodną interpretację uzyskanych wyników. Ocena tych zagadnień stanowi przedmiot dalszej części niniejszej recenzji.

IV. OCENA SZCZEGÓŁOWA

1. Wstęp

Rozdział **Introduction** został opracowany starannie i stanowi jedną z mocniejszych części rozprawy. Autorka przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczący biologii wczesnego rozwoju zarodków bydła, wpływu wieku dawczyń na kompetencję rozwojową oocytów i zarodków, znaczenia stresu cieplnego w rozrodzie bydła mlecznego oraz możliwości wykorzystania nowoczesnych technik transkryptomicznych do identyfikacji molekularnych mechanizmów regulujących rozwój zarodków. Wprowadzenie obejmuje również zagadnienia związane z analizą dekonwolucyjną danych transkryptomicznych, stanowiącą jeden z elementów części badawczej rozprawy. Dobór literatury należy ocenić wysoko. Autorka wykorzystała liczne, aktualne publikacje pochodzące z renomowanych czasopism z zakresu biologii rozrodu, embriologii oraz genomiki funkcjonalnej. Przegląd piśmiennictwa jest dobrze uporządkowany, logiczny i tworzy solidne podstawy teoretyczne dla przeprowadzonych badań własnych. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wprowadzenie nie koncentruje się wyłącznie na opisie metod transkryptomicznych, lecz przedstawia ich znaczenie w kontekście biologii rozwoju zarodków. Dzięki temu nowoczesne techniki molekularne zostały właściwie ukazane jako narzędzia służące wyjaśnianiu procesów biologicznych, a nie jako cel sam w sobie.

Pewien niedosyt budzi natomiast sposób zdefiniowania głównej luki badawczej. Chociaż Autorka bardzo dobrze przedstawia aktualny stan wiedzy, mniej miejsca poświęca jednoznaczemu wskazaniu, które zagadnienia pozostają nadal niewyjaśnione oraz w jaki sposób zaproponowany model badawczy pozwala na ich rozwiązanie. W rezultacie czytelnik otrzymuje bardzo dobre opracowanie literaturowe, jednak nie zawsze w pełni dostrzega elementy stanowiące zasadniczą nowość naukową rozprawy.

W mojej ocenie rozdział **Introduction** został przygotowany na wysokim poziomie merytorycznym i redakcyjnym. Niewielkie doprecyzowanie części poświęconej luce badawczej oraz wyraźniejsze zaakcentowanie oryginalności projektu dodatkowo wzmocniłoby jego wartość naukową.

2. Hipotezy badawcze i cele pracy

Na podstawie przedstawionego przeglądu piśmiennictwa Autorka sformułowała trzy hipotezy badawcze dotyczące wpływu wieku dawczyń, warunków środowiskowych oraz stadium rozwoju zarodków na profil ekspresji genów w zarodkach bydła uzyskanych *in vivo*. Hipotezy te są

logiczną konsekwencją przedstawionego stanu wiedzy i odpowiadają aktualnym kierunkom badań prowadzonych w biologii i biotechnologii rozrodu zwierząt.

Cele pracy zostały prawidłowo powiązane z postawionymi hipotezami i obejmują analizę różnicowej ekspresji genów, identyfikację szlaków biologicznych oraz wykorzystanie nowoczesnych metod bioinformatycznych, w tym analiz dekonwolucyjnych, do interpretacji uzyskanych danych. Konstrukcja celów wskazuje, że Autorka dążyła do możliwie kompleksowej oceny czynników wpływających na molekularne mechanizmy rozwoju zarodków.

Jednocześnie należy zauważyć, że zarówno hipotezy badawcze, jak i wynikające z nich cele mają bardzo szeroki zakres i obejmują kilka odrębnych zagadnień biologicznych, takich jak wpływ wieku dawczyń, oddziaływanie warunków środowiskowych, zmiany związane ze stadium rozwoju zarodków oraz zastosowanie analiz dekonwolucyjnych. Każde z tych zagadnień mogłoby stanowić przedmiot odrębnego projektu badawczego. Tak szeroko zdefiniowany zakres badań sprawia, że poszczególne cele nie są rozwijane z jednakową głębokością, a część przedstawionych analiz ma charakter bardziej eksploracyjny niż hipotezowo-weryfikacyjny. W konsekwencji nie wszystkie postawione hipotezy uzyskują równie silne potwierdzenie eksperymentalne. W mojej ocenie rozprawa zyskałaby na spójności, gdyby skoncentrowano się przede wszystkim na jednym dominującym problemie biologicznym, natomiast pozostałe zagadnienia potraktowano jako cele uzupełniające lub rozwinięcie głównego nurtu badań. Pozwoliłoby to na głębszą analizę biologiczną uzyskanych wyników oraz bardziej jednoznaczną weryfikację postawionych hipotez. Nie zmienia to jednak faktu, że zarówno hipotezy badawcze, jak i cele pracy są naukowo uzasadnione, wzajemnie spójne i odpowiadają aktualnemu stanowi wiedzy w zakresie biologii i biotechnologii rozrodu zwierząt.

3. Materiały i metody

Rozdział ***Materials and Methods*** został przygotowany bardzo starannie i należy do najmocniejszych części rozprawy. Opis zastosowanych procedur laboratoryjnych oraz analiz bioinformatycznych jest kompletny, przejrzysty i umożliwia odtworzenie przebiegu badań. Na podkreślenie zasługuje szczegółowe przedstawienie kolejnych etapów przygotowania materiału do sekwencjonowania, procedur kontroli jakości oraz analizy danych transkryptomicznych.

Na wysoką ocenę zasługuje wybór materiału biologicznego. Zastosowanie zarodków uzyskanych *in vivo* należy uznać za biologicznie uzasadnione i stanowi istotną wartość rozprawy, ponieważ pozwala ograniczyć wpływ czynników związanych z produkcją zarodków *in vitro* oraz lepiej odzwierciedla fizjologiczne warunki ich rozwoju.

Pozytywnie oceniam również dobór metod biologii molekularnej i bioinformatyki. Wykorzystane techniki odpowiadają współczesnym standardom badań transkryptomycznych i umożliwiają kompleksową analizę zmian ekspresji genów oraz ich interpretację funkcjonalną. Świadczy to o bardzo dobrym przygotowaniu metodycznym Autorki oraz opanowaniu nowoczesnego warsztatu badawczego.

Jednocześnie należy podkreślić, że wysoka jakość zastosowanych metod analitycznych nie eliminuje ograniczeń wynikających z konstrukcji modelu eksperymentalnego. W mojej ocenie zasadniczym wyzwaniem metodologicznym nie są zastosowane techniki laboratoryjne ani bioinformatyczne, lecz dobór materiału biologicznego i sposób zaprojektowania doświadczenia. Najważniejszym ograniczeniem projektu pozostaje niewielka liczba biologicznych replik (liczba krów). Badania przeprowadzono na 34 zarodkach uzyskanych od siedmiu krów dawczyń, przy czym grupa młodych zwierząt obejmowała jedynie dwie krowy. Z biologicznego punktu widzenia podstawową jednostką eksperymentalną pozostaje dawczyni, a nie pojedynczy zarodek. W konsekwencji interpretacja uzyskanych wyników wymaga szczególnie ostrożnego podejścia statystycznego, uwzględniającego zagnieżdżoną strukturę danych wynikającą z pozyskania wielu zarodków od tej samej krowy. Na uwagę zasługuje fakt, że Autorka dostrzega ten problem i odpowiednio uwzględnia identyfikację dawczyń w analizach statystycznych. Ostateczna ocena skuteczności zastosowanego modelu analitycznego zależy jednak od tego, w jakim stopniu pozwala on oddzielić wpływ analizowanych czynników od naturalnej zmienności biologicznej pomiędzy zwierzętami.

Podobne zastrzeżenia dotyczą jednoczesnej analizy wpływu wieku dawczyń, sezonu oraz stadium rozwoju zarodków. Każdy z tych czynników może istotnie wpływać na profil ekspresji genów, dlatego ich wzajemne oddziaływanie wymaga szczególnie starannego uwzględnienia podczas analiz statystycznych oraz interpretacji biologicznej uzyskanych wyników.

Przedstawione uwagi nie podważają wysokiego poziomu zastosowanych metod laboratoryjnych ani bioinformatycznych. Wskazują jednak, że o końcowej wartości poznawczej rozprawy decydować będzie przede wszystkim trafność przyjętego modelu biologicznego oraz zakres, w jakim zastosowane analizy pozwalają jednoznacznie przypisać obserwowane zmiany ekspresji genów wpływowi badanych czynników.

4. Wyniki badań

Rozdział **Results** stanowi najbardziej obszerną część rozprawy i obejmuje kompleksową prezentację wyników analiz transkryptomycznych oraz bioinformatycznych dotyczących wpływu

wieku dawczyń, warunków środowiskowych oraz stadium rozwoju zarodków na profil ekspresji genów. Wyniki przedstawiono w sposób uporządkowany i przejrzysty, wykorzystując liczne tabele, ryciny oraz analizy funkcjonalne, co ułatwia śledzenie kolejnych etapów przeprowadzonych badań. Na wysoką ocenę zasługuje bardzo duży nakład pracy związany z przygotowaniem, analizą i interpretacją danych RNA-seq. Autorka przeprowadziła kompleksową analizę różnicowej ekspresji genów oraz powiązała uzyskane wyniki z analizami funkcjonalnymi, podejmując próbę identyfikacji procesów biologicznych potencjalnie związanych z kompetencją rozwojową zarodków. Świadczy to o bardzo dobrym opanowaniu współczesnych metod analizy danych transkryptomicznych.

Jednocześnie należy zauważyć, że obszerność i złożoność uzyskanego materiału powodują, iż rozdział ma miejscami charakter przede wszystkim eksploracyjny. Znaczna część wyników koncentruje się na identyfikacji genów różnicowo ekspresjonowanych oraz analizach funkcjonalnych, natomiast w mniejszym stopniu wskazuje, które spośród obserwowanych zmian mają rzeczywiście kluczowe znaczenie biologiczne dla rozwoju zarodków. W rezultacie liczba uzyskanych danych przewyższa zakres ich biologicznej interpretacji.

W mojej ocenie przedstawione wyniki w zdecydowanej większości odpowiadają postawionym celom badawczym i dostarczają nowych informacji dotyczących zmian transkryptomicznych zachodzących podczas wczesnego rozwoju zarodków bydła. Stopień, w jakim pozwalają one na jednoznaczną weryfikację wszystkich postawionych hipotez biologicznych, jest jednak zróżnicowany i pozostaje w pewnym stopniu ograniczony przez konstrukcję modelu eksperymentalnego.

Szczególnej ostrożności wymaga interpretacja różnic ekspresji genów w kontekście wpływu wieku dawczyń oraz warunków środowiskowych. W świetle przyjętego modelu biologicznego nie zawsze można jednoznacznie rozstrzygnąć, czy obserwowane zmiany wynikają wyłącznie z działania analizowanych czynników, czy też częściowo odzwierciedlają naturalną zmienność biologiczną pomiędzy dawczyniami. Nie zmniejsza to wartości uzyskanych danych, jednak wpływa na siłę biologicznych wniosków, jakie można na ich podstawie formułować.

Pomimo wskazanych ograniczeń uważam, że przedstawione wyniki stanowią wartościowy materiał naukowy i wnoszą nowe informacje dotyczące molekularnych mechanizmów regulujących rozwój zarodków bydła. **Mogą one stanowić dobrą podstawę do dalszych badań funkcjonalnych, ukierunkowanych na eksperymentalną weryfikację biologicznego znaczenia zidentyfikowanych zmian transkryptomicznych.**

5. Dyskusja

Rozdział **Discussion** został przygotowany na dobrym poziomie merytorycznym i świadczy o dobrej znajomości literatury przedmiotu oraz dużym zaangażowaniu Autorki w interpretację uzyskanych wyników. Wyniki własnych badań zostały odniesione do licznych publikacji dotyczących biologii rozwoju zarodków, funkcjonowania oocytów oraz wpływu wieku i czynników środowiskowych na procesy reprodukcyjne. Dzięki temu dyskusja dobrze wpisuje uzyskane rezultaty w aktualny stan wiedzy i pokazuje ich miejsce w kontekście współczesnych badań nad biologią rozrodu.

Pozytywnie oceniam fakt, że Autorka nie ogranicza się do prostego porównania własnych wyników z danymi literaturowymi, lecz podejmuje próbę wyjaśnienia potencjalnych mechanizmów biologicznych odpowiedzialnych za obserwowane zmiany ekspresji genów. Świadczy to o umiejętności biologicznej interpretacji danych oraz dążeniu do zrozumienia procesów leżących u podstaw uzyskanych obserwacji.

Jednocześnie dyskusja ujawnia podstawowe ograniczenie całej rozprawy. Znaczna część proponowanych mechanizmów biologicznych opiera się na interpretacji funkcji pojedynczych genów opisanych wcześniej w innych modelach eksperymentalnych lub u innych gatunków, podczas gdy bezpośrednie dowody potwierdzające ich znaczenie w rozwoju zarodków była pozostają ograniczone. W konsekwencji część przedstawionych interpretacji ma charakter dobrze uzasadnionych hipotez biologicznych, które **wymagają dalszej weryfikacji eksperymentalnej**. W mojej ocenie korzystne byłoby wyraźniejsze oddzielenie obserwacji wynikających bezpośrednio z przeprowadzonych analiz transkryptomicznych od interpretacji opartych na danych literaturowych oraz biologicznych hipotez wyjaśniających możliwe mechanizmy regulacyjne. Pozwoliłoby to lepiej określić stopień pewności poszczególnych wniosków oraz wyraźniej wskazać granicę pomiędzy wynikami uzyskanymi w ramach rozprawy a ich potencjalną interpretacją biologiczną.

Pewien niedosyt budzi również stosunkowo ograniczona dyskusja dotycząca ograniczeń przyjętego modelu eksperymentalnego. W mojej opinii szersze omówienie wpływu liczby biologicznych replik, zmienności osobniczej oraz zagnieżdżonej struktury materiału biologicznego na interpretację wyników pozwoliłoby lepiej określić zakres ich uogólniania oraz zwiększyłoby wartość krytycznej analizy przeprowadzonych badań.

Pomimo wskazanych uwag rozdział **Discussion** oceniam wysoko. Świadczy on o dobrej orientacji Autorki w aktualnym stanie wiedzy, umiejętności prowadzenia dyskusji naukowej oraz zdolności do krytycznej interpretacji własnych wyników. Jednocześnie uważam, że bardziej

wyraźne rozdzielenie danych eksperymentalnych od ich biologicznej interpretacji dodatkowo wzmocniłoby wartość naukową tej części rozprawy.

V. Uwagi wymagające odniesienia podczas publicznej obrony

1. Liczba biologicznych replik i model statystyczny

Najistotniejszym ograniczeniem przedstawionych badań pozostaje niewielka liczba biologicznych replik. Analizy wykonano na 34 zarodkach uzyskanych od siedmiu krów dawczyń, przy czym grupa młodych zwierząt obejmowała jedynie dwie krowy. Z biologicznego punktu widzenia podstawową jednostką eksperymentalną pozostaje dawczyni, a nie pojedynczy zarodek. Dlatego sposób uwzględnienia zagnieżdżonej struktury danych ma zasadnicze znaczenie dla interpretacji uzyskanych wyników.

Proszę wyjaśnić, w jaki sposób zastosowany model statystyczny uwzględniał fakt, że analizowane zarodki nie stanowiły całkowicie niezależnych obserwacji biologicznych, lecz pochodziły od tych samych zwierząt.

2. Wiek dawczyń i czynniki współzmiennie

Rozprawa analizuje wpływ wieku dawczyń oraz warunków środowiskowych na profil transkryptomiczny zarodków. Ponieważ porównania sezonowe wykonywano na częściowo różnych grupach zwierząt, interpretacja uzyskanych różnic może być dodatkowo modyfikowana przez indywidualną zmienność biologiczną oraz inne czynniki współwystępujące ze starzeniem reprodukcyjnym.

Proszę odnieść się do pytania, w jakim stopniu obserwowane zmiany można przypisać wyłącznie wiekowi krów, a w jakim mogą one wynikać z liczby przebytych laktacji, kumulacji obciążeń metabolicznych lub innych czynników biologicznych.

3. Stadium rozwoju zarodków

Badaniami objęto zarodki znajdujące się na różnych etapach rozwoju przedimplantacyjnego (*compact morula*, *early blastocyst* oraz *blastocyst*). Stadium rozwoju jest jednym z najsilniejszych czynników wpływających na profil ekspresji genów, dlatego sposób jego uwzględnienia ma istotne znaczenie dla interpretacji wyników.

Proszę wyjaśnić, w jaki sposób stadium rozwoju zostało uwzględnione w analizach statystycznych oraz jaki mogło mieć wpływ na obserwowane różnice transkryptomiczne.

4. Interpretacja biologiczna wyników

Znaczna część proponowanych mechanizmów biologicznych została oparta na danych literaturowych dotyczących innych gatunków lub odmiennych modeli eksperymentalnych. W konsekwencji część przedstawionych interpretacji ma charakter dobrze uzasadnionych hipotez biologicznych, które wymagają dalszej weryfikacji eksperymentalnej.

Które spośród uzyskanych wyników uważa Pani za najlepiej udokumentowane biologicznie i dlaczego właśnie one stanowią najważniejszy wkład rozprawy do wiedzy o rozwoju zarodków bydła?

5. Analiza dekonwolucyjna

Analiza dekonwolucyjna stanowi interesujący i nowoczesny element rozprawy. Nie zawsze jednak jest jasne, czy pełni ona rolę źródła nowych informacji biologicznych, czy przede wszystkim narzędzia wspomagającego interpretację danych transkryptomicznych.

Proszę wyjaśnić, jaką wartość biologiczną wnosi analiza dekonwolucyjna do przedstawionej rozprawy oraz które z uzyskanych obserwacji uważa Pani za jej najważniejszy rezultat.

6. Perspektywy dalszych badań

Przedstawiona rozprawa dostarcza obszernego zbioru danych transkryptomicznych, które mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań funkcjonalnych. Szczególnie interesujące wydaje się eksperymentalne potwierdzenie biologicznego znaczenia wybranych genów i szlaków sygnałowych zidentyfikowanych w niniejszej pracy.

Które spośród uzyskanych wyników uważa Pani za najbardziej obiecujące z punktu widzenia dalszych badań oraz jakie eksperymenty funkcjonalne zaprojektowałaby Pani w pierwszej kolejności, aby zweryfikować ich znaczenie biologiczne?

VI. PODSUMOWANIE OCENY

Przedstawiona rozprawa doktorska stanowi ambitną próbę wyjaśnienia molekularnych mechanizmów regulujących rozwój zarodków bydła uzyskanych *in vivo* z wykorzystaniem nowoczesnych metod transkryptomicznych i bioinformatycznych. Podjęta problematyka ma istotne znaczenie zarówno dla rozwoju podstawowej wiedzy z zakresu biologii rozrodu zwierząt, jak również dla doskonalenia biotechnik rozrodu oraz poprawy efektywności rozrodu w nowoczesnej hodowli bydła mlecznego.

Największą wartością rozprawy jest wykorzystanie biologicznie wartościowego materiału pochodzącego z zarodków uzyskanych *in vivo*, co znacząco zwiększa potencjał poznawczy uzyskanych wyników. Na podkreślenie zasługuje również bardzo dobre przygotowanie metodyczne Autorki, umiejętne wykorzystanie nowoczesnych metod biologii molekularnej oraz zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych, a także dobra znajomość aktualnej literatury przedmiotu i zdolność interpretacji uzyskanych wyników w kontekście współczesnej wiedzy z zakresu biologii rozrodu.

Moja ocena rozprawy została oparta przede wszystkim na analizie przyjętej koncepcji biologicznej oraz sile uzyskanych dowodów naukowych, a nie wyłącznie na zakresie zastosowanych metod analitycznych. W tym kontekście podstawowym ograniczeniem pracy pozostaje konstrukcja modelu eksperymentalnego, wynikająca przede wszystkim z niewielkiej liczby biologicznych replik, szczególnie w grupie młodych krów, oraz złożonej struktury materiału badawczego. Przedstawiona rozprawa jednocześnie stanowi przypomnienie, że o wartości naukowej badań nie decyduje wyłącznie liczba zastosowanych metod analitycznych ani zakres wygenerowanych danych, lecz przede wszystkim trafność postawionego problemu biologicznego, adekwatność modelu eksperymentalnego oraz stopień, w jakim uzyskane wyniki pozwalają wiarygodnie odpowiedzieć na postawione pytania naukowe.

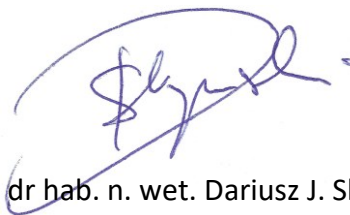
Ograniczenia te nie podważają wiarygodności uzyskanych wyników, jednak zmniejszają siłę biologicznych dowodów i wymagają ostrożności podczas interpretacji części obserwowanych zależności transkryptomicznych oraz zakresu ich uogólniania. Ponadto w mojej ocenie pewne elementy dyskusji mogłyby również wyraźniej oddzielać obserwacje wynikające bezpośrednio z przeprowadzonych analiz od hipotez biologicznych opartych na danych literaturowych. Dotyczy to przede wszystkim interpretacji funkcjonalnego znaczenia genów różnicowo ekspresowanych, których udział w regulacji kompetencji rozwojowej zarodków wymaga dalszej weryfikacji eksperymentalnej.

Pomimo wskazanych ograniczeń uważam, że rozprawa stanowi wartościowe opracowanie naukowe i wnosi nowe informacje dotyczące molekularnych podstaw rozwoju zarodków bydła. Autorka wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych, opanowała nowoczesny warsztat biologii molekularnej i bioinformatyki oraz zgromadziła obszerny materiał eksperymentalny stanowiący dobrą podstawę do dalszych badań nad biologicznymi mechanizmami determinującymi kompetencję rozwojową zarodków.

VII. WNIOSEK KOŃCOWY

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską mgr **Klaudii Miętkiewskiej** pt.: *"Transcriptome analysis of early stages of bovine embryos obtained in vivo from Polish Holstein-Friesian cows"*, stwierdzam, że przedstawiona praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wnosi nowe informacje do badań nad molekularnymi podstawami rozwoju zarodków bydła oraz świadczy o odpowiednim przygotowaniu Kandydatki do samodzielnego prowadzenia działalności naukowej. Pomimo wskazanych w recenzji ograniczeń dotyczących konstrukcji modelu eksperymentalnego oraz interpretacji części uzyskanych wyników uważam, że rozprawa spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r, poz. 1572) stawiane rozprawom doktorskim.

W związku z powyższym **wnoszę do Rady Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie mgr Klaudii Miętkiewskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk weterynaryjnych.**



prof. dr hab. n. wet. Dariusz J. Skarżyński

Katedra Rozrodu i Klinika Zwierząt Gospodarskich

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław

Tel. (+48) 602 618 472; (+48) 71 320 5303

e-mails: dariusz.skarzynski@upwr.edu.pl

<https://orcid.org/0000-0001-9537-3560>

https://www.researchgate.net/profile/Dariusz_Skarzynski

