

Prof. dr hab. S. Zduńczyk

20.07.2026.

Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

UW-M w Olsztynie

Ocena

pracy doktorskiej lek. wet. Klaudii Miętkiewskiej „Transcriptome analysis of early stages of bovine embryos obtained *in vivo* from Polish Holstein-Friesian cows”

Techniki wspomaganego rozrodu, szczególnie transfer zarodków, odgrywają coraz większą rolę w nowoczesnej hodowli bydła. Poznanie czynników wpływających na jakość zarodków ma duże znaczenie. Wiadomo, że zarodki pozyskiwane od starszych krów i w ciepłych porach roku cechują się niższą jakością. Mechanizmy wpływu wieku i wyższych temperatur otoczenia na jakość zarodków nie są jeszcze dokładnie poznane. Celem dysertacji była ocena wpływu wieku i sezonu na jakość przedimplantacyjnych zarodków bydła pozyskanych *in vivo* poprzez analizę zmian w ekspresji genów i szlakach metabolicznych związanych z jakością zarodków i ich potencjałem rozwojowym. Badania Doktorantki dotyczą więc ważnej i aktualnej problematyki.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 188 stron maszynopisu w języku angielskim. Składa się ona ze streszczenia, spisu treści, wprowadzenia, hipotez badawczych, opisu materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków, piśmiennictwa liczącego 320 pozycji, spisu 16 tabel i 30 rycin umieszczonych w tekście oraz 8 suplementarnych tabel i 5 suplementarnych rycin zawartych na dołączonej do maszynopisu pamięci USB.

We wprowadzeniu Doktorantka omawia dotychczasowe, nieliczne badania nad wpływem wieku krów na transkryptom zarodków pozyskanych *in vivo*, zmiany w zarodkach powodowane przez sezonowe zmiany temperatury oraz technologię sekwencjonowania RNA (RNA-Seq) opartą na sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS) i technikę bioinformatyczną dekonwolucji danych zbiorczego sekwencjonowania RNA (bulk RNA-seq). Wprowadzenie jest napisane interesująco, w oparciu o odpowiednio dobrane, aktualne piśmiennictwo.

W dysertacji weryfikowano 3 hipotezy badawcze:

1. Wiek matki powoduje różne zmiany w transkryptomie w zarodkach pobranych *in vivo* od krów młodych (2 lata) i starszych (>5 lat).
2. Podwyższona temperatura otoczenia wiąże się ze zmianami w genach zaangażowanych w kluczowe szlaki rozwojowe i metaboliczne.
3. Transkryptomy zarodków różnią się w zależności od stadium rozwoju, a analizy oparte na dekonwolucji zbiorczego sekwencjonowania RNA pojedynczych zarodków mogą pomóc w zidentyfikowaniu charakterystycznych dla danego stadium sygnatur ekspresji genów.

Szczegółowe cele badawcze przedstawiały się następująco:

1. Wygenerowanie zbioru danych FASTq blastocyst bydlęcych na podstawie analizy zbiorczej sekwencji RNA (bul RNA-seq) pojedynczych zarodków polskiej rasy HF (34 zarodki).
2. Dopasowanie i mapowanie 34 zarodków na różnych wczesnych etapach rozwoju u krów polskiej rasy HF do genomu referencyjnego Bos Taurus UMD 3,0.
3. Zidentyfikowanie transkryptów genów o zróżnicowanej ekspresji (transkrypty DEG) w zarodkach przedimplantacyjnych poprzez porównanie wieku krów (młodsze krowy – 2 lata vs starsze krowy – powyżej 5 lat).
4. Zidentyfikowanie transkryptów genów o zróżnicowanej ekspresji (DEG) w zarodkach przedimplantacyjnych poprzez porównanie stadiów rozwoju zarodków powstałych w okresie wiosennym (maj) i letnim (sierpień).

5. Ustalenie na podstawie analizy zbiorczego sekwencjonowania RNA (RNA-seq) z pojedynczych zarodków oraz dekonwolucji, jak zmiany w ekspresji genów wpływają na etapy rozwoju zarodków bydłych.

Materiał badawczy stanowiły 34 zarodki pobrane od 7 krów w różnym wieku poddanych synchronizacji rui i superowulacji. Zarodki podzielono na 2 grupy zależności od wieku krów (2 lata, $n = 17$) i 5-7 lat ($n = 17$) oraz w zależności od sezonu (wiosna, chłodno, $n = 12$) i (lato, ciepło, $n = 22$). Temperaturę otoczenia mierzono 3 razy dziennie w ciągu miesiąca poprzedzającego pobranie zarodków. W okresie wiosennym (kwiecień, maj) średnia temperatura wynosiła 9,9 °C, a latem (lipiec, sierpień) 23,2 °C. Po pozyskaniu zarodków oceniano ich jakość morfologiczną i stadium rozwoju wg standardów IETS, a następnie zamrażano na suchym lodzie i przechowywano w – 80 °C do czasu analizy.

W celu uzyskania profili transkryptomicznych zarodków przeprowadzono sekwencjonowanie RNA na platformie Illumina NovaSeq6000. Ekstrakcję RNA, syntezę cDNA, amplifikację oraz przygotowanie biblioteki przeprowadzono zgodnie z protokołem Takara Smart-seq2. Surowe odczyty zostały przefiltrowane pod kątem jakości i zmapowane do genomu referencyjnego *Bos taurus* UMD3.0. Analizę różnicowej ekspresji genów przeprowadzono w programie DESeq2, porównując zarodki pod kątem wieku matki i pór roku. Analizę wzbogacania Gene Ontology (GO) dla procesów biologicznych oraz dla szlaków KEGG przeprowadzono w programie Cytoscape przy użyciu narzędzia ClueGO. Sieci wzbogaconych terminów funkcjonalnych wygenerowano oddzielnie dla zestawów genów o zwiększonej i zmniejszonej ekspresji w celu wizualizacji procesów molekularnych, na które potencjalnie wpływają wiek i sezon. Dodatkowo zastosowano analizę dekonwolucyjną z wykorzystaniem algorytmów MuSiC i DeTREM w celu oszacowania wkładu poszczególnych etapów rozwoju embrionalnego w całościowy transkryptom.

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę wykazały, że wiek dawczyni i warunki sezonowe mają znaczący wpływ na profile ekspresji genów w zarodkach bydłęcych. Zidentyfikowano 30 kluczowych genów o zwiększonej ekspresji i 30 kluczowych genów o zmniejszonej ekspresji, których ekspresja była zróżnicowana w zależności od wieku oraz 30 kluczowych genów o zwiększonej ekspresji i 30 kluczowych genów o zmniejszonej ekspresji, których ekspresja była zależna od sezonu. Analiza dekonwulacyjna ekspresji genów wykazała kilka genów markerowych nakładających się we wszystkich stadiach rozwoju zarodka. Klasteryzacja genów pozwoliła jednak stwierdzić, że każde stadium rozwoju zarodka charakteryzuje się odmiennymi profilami ekspresji genów.

W obszernej dyskusji (46 stron) Doktorantka porównuje uzyskane wyniki z danymi z piśmiennictwa i omawia funkcje genów o wzmożonej i zmniejszonej ekspresji w zależności od wieku i sezonu, jak też podobieństwo transkrypcyjne między poszczególnymi stadiami rozwoju zarodka.

W przedstawionych w formie opisowej wnioskach Doktorantka podsumowuje i interpretuje uzyskane wyniki stwierdzając, że wiek dawczyni oraz pora roku wspólnie kształtują transkryptom zarodków bydła, wpływając na kluczowe procesy rozwojowe, metaboliczne oraz związane z adaptacją do stresu. W porównaniu z zarodkami pochodzącymi od młodszych krów, zarodki uzyskane od starszych krów wykazywały zwiększoną ekspresję genów biorących udział w szlakach metabolicznych steroidogenezy, regulacji metabolicznej oraz sygnalizacji immunologicznej, w tym genów CYP11A1, PDK4, HPRT1, STAT4 i EGR2, co sugeruje kompensacyjną aktywację szlaków endokrynologicznych i metabolicznych. Zarodki od starszych krów wykazywały z kolei obniżoną ekspresję kluczowych genów związanych z rozwojem i mitochondriami, takich jak AKT2, UQCRC2, FANCA, JMY i PROM1, co wskazuje na zaburzenia metabolizmu energetycznego, organizacji cytoszkieletu, stabilności genomowej oraz procesów związanych z implantacją. Zarodki pozyskane w ciepłym

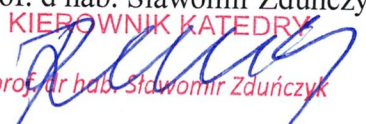
sezonie wykazywały zwiększoną ekspresję genów związanych z reakcją na stres, układem hormonalnym oraz implantacją, w tym HSPA6, FSHR, CXCR4, CYP11A1, BMPER i FGB, co jest związane ze wzmożoną adaptacją komórek do stresu oraz zmienioną sygnalizacją hormonalną. Zarodki te cechowały się obniżoną ekspresją genów związanych z funkcjonowaniem mitochondriów, dynamiką cytoszkieletu, transportem pęcherzyków komórkowych oraz regulacją epigenetyczną, takich jak UQCRC2, DNAH12, SYT9, ETV5 i RBMS3, co sugeruje wolniejsze tempo rozwoju i zaburzoną homeostazę metaboliczną w warunkach podwyższonej temperatury otoczenia. Ponadto wykazano wyraźne rozróżnienie etapów rozwoju, z wyraźnymi przejściami transkryptomycznymi między wczesnymi etapami podziału komórek a etapami późniejszymi. W transkryptomach zbiorczych całych zarodków dominowały w znacznej mierze sygnatury transkrypcyjne związane z późnym stadium blastocysty, podczas gdy udział wcześniejszych etapów rozwoju był ograniczony. Wskazuje to, że transkryptomy zbiorcze zarodków odzwierciedlają przede wszystkim programy ekspresji genów związane z późniejszymi etapami rozwoju oraz podkreśla przydatność podejść opartych na dekonwolucji jako ram interpretacyjnych do analizy transkryptomów rozwoju przedimplantacyjnego. Zidentyfikowane sygnatury transkryptomyczne stanowią podstawę do dalszych badań nad markerami molekularnymi kompetencji rozwojowej zarodków i mogą przyczynić się do optymalizacji strategii zarządzania reprodukcją – w tym uwzględnienia wieku dawczyń i warunków środowiskowych – w programach wspomaganego rozrodu bydła.

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę mają duże znaczenie naukowe. Dostarczyły one nowych danych transkryptomycznych o mechanizmach wpływu wieku dawczyń i sezonu na jakość zarodków bydła oraz o sygnaturach transkryptomycznych w różnych stadiach rozwoju zarodków przedimplantacyjnych. Mogą one stanowić podstawę do dalszych badań molekularnych nad oceną jakości zarodków bydła.

Mam jedynie niewiele uwag krytycznych odnośnie tej dysertacji. Tytuł jest dość ogólny. Mógłby on być bardziej szczegółowy i uwzględniać wpływ wieku, sezonu i stadiów rozwoju zarodka na ekspresję genów. Doktorantka określiła krowy dawczynie zarodków jako wieloródki (multiparous cows: str. 17), tymczasem krowy w wieku 2 lat były pierwiastkami, po pierwszym wycieleniu. W 2025 r. średni wiek pierwszego wycielenia krów pod oceną użytkowości wyniósł 824 dni (ok. 27 miesięcy) (Polska Federacja Hodowców Bydła i Producentów Mleka). Tak też jest to przedstawione na rycinie 2. Z kolei na tejże rycinie starsze krowy są opisane jako po VI laktacji. Ponieważ były one w wieku 5-7 lat, optymalnie powinny być w 3-5 laktacji. Nie podano również, kto przeprowadził procedurę pozyskiwania zarodków. Zespół Embriotransferu? Doktorantka podaje, że oceniono jakość morfologiczną pozyskanych zarodków (str. 20), natomiast nie przedstawiła wyników tej oceny. Wydaje się, że niektóre publikacje są nieprawidłowo cytowane, np. publikacja nr 10 cytowana na str. 10 w kontekście rozrodu bydła dotyczy komórek Sertoliego świń, publikacja nr 17 cytowana na tej samej stronie - gruczołakoraka okrężnicy u ludzi. Chciałbym również zauważyć, że zgodnie z art. 187 ust. 4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce do rozprawy doktorskiej przygotowanej w języku obcym powinno być dołączone streszczenie w języku polskim.

Przedstawione uwagi nie obniżają wysokiej oceny recenzowanej pracy, wynikającej z aktualności problematyki, nowoczesności metod badawczych oraz naukowego znaczenia uzyskanych wyników. Stwierdzam, że recenzowana praca doktorska odpowiada w pełni warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 z późn. zm.).

Biorąc powyższe pod uwagę wnoszę o dopuszczenie lek. wet. Klaudii Miętkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie Jej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Sławomir Zduńczyk
KIEROWNIK KATEDRY

prof. dr hab. Sławomir Zduńczyk