

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
mgr Amiry Podolak  
pt.: "Ewaluacja wpływu zawartości mitochondrialnego DNA w zarodkach na ich rozwój i  
potencjał implantacyjny"**

Informacje o pracy oraz ocena strony formalnej

Praca Pani mgr Amiry Podolak na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk o zdrowiu, została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Łukaszuka z Zakładu Pielęgniarstwa Położniczo-Ginekologicznego Wydziału Nauk o Zdrowiu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Rozprawę przygotowano zgodnie z wymogami ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, jak również rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora.

Przedstawiona do oceny praca doktorska została przygotowana w oparciu o cykl trzech artykułów naukowych o sumarycznej liczbie IF=14,605 oraz 350 pkt MEiN, w tym jednej pracy przeglądowej; wszystkie zostały opublikowane w 2022 roku w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports. W przedstawionych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. We wszystkich pracach badawczych recenzowanego cyklu mgr Amira Podolak uczestniczyła w każdym etapie ich przygotowania, od stworzenia koncepcji oraz projektowania eksperymentów, poprzez prowadzenie analiz interpretację danych, po przygotowywanie manuskryptów do druku. Natomiast w przypadku

pracy przeglądowej zebrała i przeanalizowała dostępną literaturę tematu oraz przygotowała manuskrypt do publikacji. Świadczy to o bardzo dużym zaangażowaniu i samodzielności Doktorantki.

Rozprawa doktorska zawiera następujące treści: spis artykułów stanowiących rozprawę doktorską, wstęp, cele pracy, materiały i metody a także odmówienie publikacji będących integralną częścią rozprawy, wnioski oraz streszczenia i bibliografia. Dobór literatury jest jak najbardziej odpowiedni, powiązany z tematyką pracy i świadczy o bardzo dobrej orientacji Doktorantki w badanej tematyce. Dysertację doktorską zamyka zestaw oświadczeń współautorów, wskazujących zakres ich pracy i udział w przygotowanie publikacji. Niestety załączone zostały jedynie cztery oświadczenia dotyczące udziału współautorów w powstanie tylko jednej z prac naukowych, które stanowią podstawę o ubieganie się o stopień naukowy doktora. Zgodnie z §5 pkt. 2 Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r.: "W przypadku gdy rozprawę doktorską stanowi samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, kandydat przedkłada promotorom .... oświadczenia wszystkich jej współautorów określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie. W przypadku gdy praca zbiorowa ma więcej niż pięciu współautorów, kandydat przedkłada oświadczenie określające jego indywidualny wkład w powstanie tej pracy oraz oświadczenia co najmniej czterech pozostałych współautorów". Zamieszczenie informacji o roli współautorów w rozdziale Author Contributions w poszczególnych pracach niestety nie zwalnia z obowiązku umieszczenia oświadczeń podpisanych przez każdego ze współautorów. Jest to uwaga formalna, która oczywiście nie wpływa na całościową ocenę przedstawionej do recenzji pracy. Prezentacja omawianych treści liczy 37 stron. Do pracy dołączono również wydruk wszystkich artykułów naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej. Układ przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej jest bardzo przejrzysty i poprawny przy tego typu formacie pracy, opartym na monotematycznym cyklu publikacji.

#### Wartość naukowa i merytoryczna pracy

Organella, jakimi są mitochondria, odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy komórki. Przeprowadzają fosforylację oksydacyjną przy udziale łańcucha oddechowego, produkując ATP. W mitochondriach zachodzi wiele ważnych procesów metabolicznych, m.in. cykl kwasów trójkarboksylowych,  $\beta$ -oksydacja kwasów tłuszczowych czy cykl mocznikowy. Ponadto biorą udział w syntezie centrów żelazowo-siarkowych, uczestniczą w programowanej śmierci komórki, oprócz tego zaangażowane są w zachowanie równowagi wapniowej, czy metabolizmie aminokwasów i

nukleotydów. Wiadomo również, że odgrywają kluczową rolę podczas oogenezy i wczesnej embriogenezy. Występują niezwykle licznie w oocytach i komórkach wczesnych zarodków, a ich liczba może być wyznacznikiem potencjału rozwojowego zarodka. Replikacja mitochondriów w zarodkach zachodzi dopiero po implantacji, stąd zaburzenia w liczbie oraz funkcjonowaniu mitochondriów prowadzą do nieprawidłowej embriogenezy lub wręcz jej zahamowania. Dla prawidłowego rozwoju konieczna jest więc na tyle liczna populacja mitochondriów o wysokim potencjale wewnętrznej błony mitochondrialnej by rozwijający się zarodek mógł wydajnie odpowiedzieć podwyższonym metabolizmem na zwiększające się jego potrzeby energetyczne. Z drugiej strony zaobserwowano, iż żywotność zarodków zwiększa się ze spadkiem ich aktywności metabolicznej. W oparciu o wiedzę na temat kluczowej roli mitochondriów w embriogenezie w ostatnich latach (w zasadzie od 2015 r.) pojawił się szereg prac sugerujących wykorzystanie oceny zawartości mtDNA jako markera selekcji zarodków w procedurze IVF, chociaż wykorzystanie w praktyce klinicznej tego parametru jest ciągle niejednoznaczne, ze względu na sprzeczne wyniki prezentowane przez badaczy.

Problem badawczy podjęty przez Doktorantkę skupia się wokół poszukiwania korelacji pomiędzy poziomem mitochondrialnego DNA, określonego w stosunku do zawartości jądrowego DNA, a takimi parametrami jak: ploidalność, morfologia zarodków, potencjał implantacyjny oraz wiek matki. Nadrzędnym celem założonym w badaniach była ocena możliwości wykorzystania tych wyników w praktyce klinicznej by można było dokonać wydajnej selekcji embrionów w procedurach IVF.

Chcąc zrealizować powyższe cele wykonano kilka kluczowych dobrze zaprojektowanych zadań badawczych. Do najważniejszych wniosków uzyskanych z przeprowadzonych eksperymentów należy zaliczyć:

1. stwierdzenie zależności pomiędzy poziomem mtDNA a ploidalnością zarodków;
2. zaobserwowanie różnic pomiędzy zawartością mtDNA w zarodkach w różnych dobach biopsji blastocysty;
3. wykazanie braku zależności pomiędzy zawartością mtDNA w zarodkach a ich potencjałem implantacyjnym;
4. stwierdzenie braku zależności pomiędzy zawartością mtDNA a morfologią i płcią emrionów, jak również wiekiem matki.

Autorka rozprawy bardzo krytycznie analizuje uzyskane wyniki wskazując jednocześnie potencjalne przyczyny takich obserwacji i konieczność dalszych analiz by móc uzyskać jednoznaczną i powtarzalną odpowiedź na postawiony problem. Dokonuje również analizy porównawczej z opublikowanymi wcześniej wynikami innych grup badawczych i przedyskutowuje możliwe przyczyny zaobserwowanych rozbieżności odnosząc się w tym do wyników własnych. Jest to niezwykle cenne, zwłaszcza, że wyniki zawarte w dwóch eksperymentalnych pracach miały na celu odpowiedzieć na pytanie czy ocena zawartości mtDNA byłaby dobrym markerem do rutynowego stosowania w selekcji zarodków w procedurze zapłodnienia pozaustrojowego.

#### Uwagi krytyczne

Mimo wielu wymienionych wcześniej zalet pracy, Autorka nie ustrzegła się przed popełnieniem pewnych błędów czy niedociągnięć.

1. W rozdziale Materiały i metody Autorka zawarła dość ogólny opis samej metodyki oceny współczynnika mtDNA/gDNA i to jest zrozumiałe ze względu na dokładne omówienie tego zagadnienia w opublikowanych pracach, natomiast zamieszczenie w tym rozdziale informacji na temat dokonanego przeglądu literatury czy po raz kolejny przypomnienie miejsca opublikowania wyników badań jest zupełnie zbędne.

2. Uważam, że wnioski, choć poprawne, są sformułowane dość lakonicznie i nie oddają w pełni osiągnięć prezentowanych badań. Niemal we wszystkich wnioskach autorka ogranicza się jedynie do ogólnej informacji na temat istnienia lub braku zależności pomiędzy zawartością mitochondrialnego DNA a poszczególnymi analizowanymi zmiennymi. Interesowałoby natomiast czytelnika jakiego typu zależności Doktorantka zaobserwowała, zwłaszcza, że wyniki tych analiz były dość zaskakujące - w zarodkach aneuploidalnych współczynnik mtDNA/gDNA okazał się być znacząco wyższy.

3. W niektórych miejscach rozprawy doktorskiej zwraca uwagę pewien żargon czy skróty myślowe, jak np.: "rozkład... nie jest normalny", "kilo par zasad", "poliubikwitynacja mitochondriów", "mtDNA występuje w... kulistej formie".

4. Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła mi pewne pytania i spostrzeżenia do dalszej dyskusji:

- Stosunek mtDNA/gDNA w obu pracach eksperymentalnych osiąga odmienny zakres wartości: w publikacji z *Current issues in molecular biology* waha się w zakresie 5,1-11,5, natomiast w pracy opublikowanej w *IJMS* osiąga wartości 0,84-1,87. Z czego wynika taka różnica?

- Przy dużej rozbieżności i zmienności wyników spowodowanej asymetryczną dystrybucją mitochondriów pomiędzy blastomerami, nawet u tych samych pacjentek, analiza ilościowa mtDNA nie jest dobrym parametrem w ocenie np. jakości zarodka. W takim razie jakie analizy, badania mogłyby dać lepsze efekty w takiej ocenie? Czy Doktorantka ma jakiś pomysł na rozwiązanie takiego problemu?

#### Ocena końcowa

Zaprezentowany w pracy doktorskiej cykl artykułów naukowych jest oryginalny, spójny tematycznie i kompleksowy. Doktorantka prawidłowo zaplanowała cykl badawczy oraz skutecznie zweryfikowała postawioną hipotezę badawczą.

Podsumowując opinię stwierdzam, że Doktorantka znakomicie wywiązała się ze wszystkich zadań, jakie zostały postawione w celach pracy. Uzyskane wyniki mają szeroki zakres, są wartościowe i nowatorskie, i wnoszą istotny wkład w poznanie wpływu zawartości mtDNA na rozwój i potencjał implantacyjny zarodków. Wierzę, że prace, stanowiące integralną część rozprawy doktorskiej, w których powstaniu Doktorantka miała wiodącą rolę, znajdą uznanie w międzynarodowym środowisku naukowym. Są to bardzo "świeże" prace a dwie z nich są już cytowane przez autorów spoza grona współautorów tych publikacji (Baza Scopus, 15.11.2022). Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 roku, poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 roku, poz. 1669). W związku z powyższym, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki o Zdrowiu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Amiry Podolak do dalszych etapów przewodu doktorskiego, rekomendując jednocześnie wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



dr hab. Joanna Jakóbkiewicz-Banecka