



UNIwersytet Rolniczy
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Katedra Zoologii i Dobrostanu Zwierząt

Kraków, dnia 10 marca 2022 roku

dr hab. Marcin Lis, prof. URK
Katedra Zoologii i Dobrostanu Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja
w Krakowie

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Agaty Szczerba

pt.: „Badania nad długotrwałą hodowlą pierwotnych komórek płciowych kury”

wykonanej pod kierunkiem

prof. dr hab. Marka Bednarczyka

i promotora pomocniczego

PhD Takashi Kuwana, Visiting Professor

Zarodek ptasi jest uznanym modelem stosowanym w szeroko pojętych badaniach biologicznych. Można nawet zaryzykować stwierdzenie, że skoro Arystoteles w IV w p.n.e. opisując rozwój embrionalny kręgowca posłużył się „modelem *in ovo*”, należy on również do najstarszych. O jego popularności decyduje niewątpliwie fakt, że pomimo oczywistych różnic filogenetycznych, embrion ptasi wykazuje podobieństwo do ssaczego. Jednocześnie, rozwój *in ovo*, w przeciwieństwie do *in utero*, umożliwia stosunkowo łatwą obserwację i dostęp do zarodka już we wczesnym stadium rozwoju (w momencie zniesienia jaja trwa gastrulacja). Co więcej zarodki ptasie charakteryzuje duża tolerancja na przeprowadzane manipulacje. Z powyższych powodów stanowią one niezwykle dogodny materiał w badaniach biotechnologicznych.

We współczesnej biotechnologii szczególne miejsce zajmują zagadnienia dotyczące wykorzystania komórek pluripotentnych. W tym kontekście za niezwykle aktualne i potrzebne należy uznać podjęte przez Panią mgr inż. Agatę Szczerbę badania dotyczące pozyskiwania i hodowli pierwotnych komórek płciowych kury



(ang. Primordial Germ Cells - PGCs). Komórki te są prekursorami komórek rozrodczych oraz embrionalnych komórek macierzystych zarodka, a tym samym jako jedyne mogą przekazywać pomiędzy pokoleniami informacji zapisanej w materiale genetycznym. Specyficzna struktura morfologiczna ptasiego embrionu i jego struktur poza zarodkowych, umożliwia relatywnie łatwą izolację PGCs. Wynika to z faktu, że komórki te, po uformowaniu się krążenia naczyniowego, krążą w krwiobiegu, migrując śródmiąższowo do zawiązków gonad. Niestety, stosowane dotychczas rutynowe metody identyfikacji i izolacji PGCs pozwalają tylko na pozyskanie stosunkowo niewielkiej ich liczby. Stanowi to główne ograniczenie prowadzonych prac eksperymentalnych z tego zakresu, a tym bardziej praktyczne wykorzystanie ich wyników.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agaty Szczerby jest ambitną odpowiedzią na powyższe wyzwanie. Zdaniem Autorki, odpowiednio dobrane i przeprowadzone manipulacje *in vivo* oraz/lub *in vitro* mogą implikować zwiększeniem dostępności pierwotnych komórek płciowych ptaków. W tym celu, zaplanowano cykl przemyślanych doświadczeń, które miały rozwiązać takie kluczowe kwestie:

- oszacowanie rzeczywistej liczby pierwotnych komórek płciowych znajdujących się w systemie krwionośnym zarodka w zależności od fazy jego rozwoju;
- opracowanie łatwej do zastosowania w praktyce, przyżyciowej techniki identyfikacji PGCs;
- udoskonalenie metody hodowli (polifercji) *in vitro* PGCs różnych typów (migrujących i gonadalnych) oraz ocena ich właściwości.

Rezultaty tych badań przedstawione zostały w cyklu dwóch, tematycznie spójnych publikacji:

- Szczerba A., Kuwana T., Bednarczyk M. Concentration and total number of circulating primordial germ cells in Green-legged Partridge-like chicken embryos, Poultry Science (Elsevier), 2021, 100, 1, 319-324 DOI - <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.016>



- Szczerba A., Kuwana T., Paradowska M., Bednarczyk M. In Vitro Culture of Chicken Circulating and Gonadal Primordial Germ Cells on a Somatic Feeder Layer of Avian Origin, *Animals (MDPI)*, 2020, 10, 1769, DOI - <https://doi.org/10.3390/ani10101769>,

Wszystkie prace zostały opublikowane w uznanych czasopismach naukowych, objętych oceną przez ISI Journal Citation Reports, prezentujących prace z zakresu hodowli zwierząt (w tym drobiu), biotechnologii i bioinżynierii. Łączna wartość wskaźnika wpływu (IF) dla wymienionych prac wynosi 4,98, a liczba punktów MEiN wynosi 240. W każdej wymienionych publikacji Pani mgr inż. Agata Szczerba jest pierwszym autorem, a jej wkład w ich powstanie (szacowany na 60%) jest niepodważalny i wiodący. Przedstawione oświadczenia współautorów publikacji jednoznacznie świadczą, że Doktorantka brała czynny udział we wszystkich etapach ich powstawania: od opracowania koncepcji i planu doświadczeń oraz założeń metodycznych, poprzez samodzielną pracę laboratoryjną (pobieranie materiału, hodowle *in vitro* PSGs, analizy histologiczne), analizę i interpretację wyników, aż po przygotowanie manuskryptów. Zakres wykonanej pracy, świadczy o samodzielności i dojrzałości naukowej Doktorantki. Na szczególne wyróżnienie zasługuje nie tylko opanowanie licznych metod laboratoryjnych (m.in. mikroiniekcji w celu pobrania krwi od zarodków, hodowli i rozpoznawania PSGs), ale również wprowadzanie udoskonaleń. Należy podkreślić, że doświadczenie zdobyte w pracy laboratoryjnej pozwoliło na opracowanie własnej metody przyżyciowej identyfikacji kurzych PSGs, potwierdzonej zgłoszeniem patentowym (nr zgłoszenia P.434242; autorzy: Szczerba A., Kuwana T., Bednarczyk M. „Sposób identyfikacji żywych, ptasich pierwotnych komórek płciowych”). Żałuję, że dokument poświadczający przyjęcie zgłoszenie nie został zamieszczony w przesłanych materiałach, a jest tylko wspomniany w autoreferacie. Niewątpliwie, bardzo wysoka jakość naukowa ocenianej dysertacji jest wynikiem samodzielnej ciężkiej pracy wykonanej przez Panią mgr inż. Agatę Szczerbę, a także możliwości przedyskutowania uzyskanych wyników w międzynarodowym gronie uznanych specjalistami z dziedziny biotechnologii.



Należy także podkreślić fakt, Rozprawa została wykonana ramach projektu badawczego pt.: „Pierwotne komórki płciowe - nowe podejście do badań epigenetycznych u kurcząt” (nr UMO-2017/27/B/NZ9/01510), który uzyskał finansowanie Narodowego Centrum Nauki w konkursie OPUS 14.

W mojej ocenie, wyniki badań Pani Agaty Szczerby stanowiące podstawę Rozprawy, udowadniają, że:

- analiza mikroskopowa z zastosowaniem ciemnego pola widzenia oraz dodatkowego źródła światła, pozwala na szybką i przyżyciową identyfikację ptasich pierwotnych komórek płciowych. Zastosowanie powyższej, samodzielnie opracowanej przez Doktorantkę, metody identyfikacji PGCs pozwolił określić optymalny terminem ich izolacji na fazę 14 HH rozwoju embrionalnego. W tym stadium stwierdza się zarówno najwyższą koncentrację, jak i całkowita liczbę PGCs komórek w krwioobiegu zarodka kurzego;
- możliwa jest długotrwała hodowla *in vitro* zarówno gonadalnych, jak i migrujących PGCs, podczas której nie tracą one swoich cechy funkcjonalnych;

Na tej podstawie można przyjąć, że zastosowywanie, opisanych w Rozprawie metod i rozwiązań powinno pozwolić na większą dostępności pierwotnych komórek płciowych ptaków, a tym samym poszerzyć zakres ich użycia, nie tylko w pracach eksperymentalnych, lecz także w komercyjnych przedsięwzięciach biotechnologicznych.

Mając na uwadze bardzo wysoką jakość merytoryczną ocenianej Rozprawy, hołdując tradycji dyskusji naukowej, ale także dając upust własnej ciekawości, chciałbym prosić Doktorantkę o wyjaśnienie następujących kwestii:

- 1) w jaki sposób badanie ptasich pierwotnych komórek płciowych może przyczynić się do poznania procesów przeprogramowania epigenetycznego i międzypokoleniowego dziedziczenia epigenetycznego;



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Katedra Zoologii i Dobrostanu Zwierząt

2) czy praktyczne zastosowanie PGCs ogranicza się tylko do ochrony zagrożonych gatunków ptaków;

Ponadto, bardzo interesuje mnie praktyczna strona wykonywania przyżyciowej mikroiniekcji do naczyń krwionośnych zarodka, dlatego proszę o nieco szersze, niż w Autoreferacie i załączonych publikacjach, omówienie tej metody.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agaty Szczerby pt.: „Badania nad długotrwałą hodowlą pierwotnych komórek płciowych kury” wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Bednarczyka i promotora pomocniczego PhD Takashi Kuwana, spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami w brzmieniu z dnia z dnia 15 września 2017 r. (Dz. U. 2017 r. poz. 1789.), zgodnie z Art. 175. 1. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669). W związku z powyższym, przedkładam Pani Przewodniczącej i Radzie Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich wnioski o dopuszczenie Pani mgr inż. Agaty Szczerby do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, pragnę podkreślić, że bardzo wysoko oceniam wartość naukową oraz aplikacyjną recenzowanej Rozprawy i w związku powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Politechniki Bydgoskiej im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich z wnioskiem o wyróżnienia dysertacji mgr inż. Agaty Szczerby.

Kraków, dnia 10 marca 2022


dr hab. inż. Marcin Lis, prof URK