



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań
tel. +48 61 848 71 87, e-mail: genetyka@up.poznan.pl

Prof. dr hab. Dorota Cieślak tel. +4861 846117 email dorota.cieslak@up.poznan.pl

Poznań, 13.11.2020

Prof. dr hab. Dorota Cieślak
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
Pracownia Rozrodu Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Ul. Wołyńska 33 60-631 Poznań

Recenzja pracy doktorskiej mgr Anny Choloniewskiej

pt. ” *Wpływ warunków hodowli in vitro na rozwój przedimplantacyjnych zarodków królika*” przygotowanej
pod kierunkiem
prof. dr hab. Jacka A. Modlińskiego i dr hab. Anny Piliszek

Podsumowanie rozprawy

Praca poświęcona jest poszukiwaniu optymalnego systemu inkubacji zarodków królika *in vitro* w oparciu o kompleksową analizę szeregu czynników związanych z inkubacją zarodków (m.in. rodzaj i skład pożywek do hodowli zarodków; udział tlenu w atmosferze) oraz analizę wybranych parametrów zarodkowych obejmujących m.in. % zarodków uzyskujących stadium blastocysty, liczbę blastomerów (całkowitą oraz z podziałem na 3 pierwsze linie komórkowe) i aktywność metaboliczną 4 szlaków z użyciem wybranych inhibitorów. Warunkiem przeprowadzenia badań było opracowanie modelowego wzorca rozwoju zarodków królika pozyskanych *in vivo* obejmującego opisanie procesu różnicowania blastomerów w 3 linie komórkowe (epiblast, endoderma pierwotna, trofektoderma) z uwzględnieniem czasu i lokalizacji przestrzennej. Model ten stanowił punkt odniesienia w badaniach zarodków pozyskanych *in vitro*. Przedstawiona praca ma przede wszystkim charakter badań podstawowych, ale posiada także potencjał aplikacyjny w medycynie człowieka. Królik uznawany jest za zdecydowanie lepszy od gryzoni model badań biomedycznych. W pracy testowano komercyjne pożywki do inkubacji *in vitro* zarodków człowieka. Ponadto, istnieją pewne podobieństwa pomiędzy komercyjną procedurą pozyskiwania *in vitro* zarodków człowieka w oparciu o oocyty dojrzewające *in vivo*, a procedurą niniejszej pracy opartej o zygoty królika powstałe *in vivo*. W obu przypadkach dojrzewanie oocytów zachodzi w warunkach naturalnych.

Autorka wyznaczyła 3 cele doświadczalne:

1. opracowanie modelowego wzorca rozwoju zarodków królika pozyskanych *in vivo*
2. analiza 4 szlaków metabolicznych z użyciem panelu 8 inhibitorów w zarodkach na różnym etapie przedimplantacyjnego rozwoju: 1) od zygoty do moruli oraz 2) od moruli do blastocysty w celu określenia znaczenia poszczególnych szlaków dla rozwoju zarodków na danym etapie
3. określenie wpływu warunków hodowli zarodków *in vitro*: stężenie tlenu w atmosferze (5%, 21%), rodzaj pożywki (RDH, 5 pożywek komercyjnych - jednoetapowych i sekwencyjnych), obecność komórek nabłonka jajowodu (ROEC) oraz rodzaj dodatku białkowego (BSA, FBS, KSR) na wybrane parametry zarodków królika (% blastocyst, liczba blastomerów z podziałem na komórki 3 pierwszych linii komórkowych, morfokinetyka).

Pragnę podkreślić, że przedstawiona praca doktorska obejmuje wyjątkowo rozbudowany eksperyment i bardzo bogaty panel badanych parametrów. Tak rozbudowany plan doświadczenia stawia szczególnie wysokie wymagania odnośnie sposobu jego prezentacji. Bardzo ważnym elementem w ocenie pracy doktorskiej jest ocena zakresu wykonanych analiz, w tym liczby zwierząt, grup doświadczalnych, liczby zarodków poddanych poszczególnym analizom i liczby powtórzeń itd. Ponieważ autorka nie przedstawiła kompleksowego schematu

przeprowadzonych badań z włączeniem wszystkich wątków i procedur, zrozumienie układu doświadczenia wymagało ode mnie kilkukrotnej analizy rozdziału Materiał i Metody.

Dla zobrazowania mojego stanowiska chciałabym przedstawić podsumowanie mojej wstępnej analizy układu 2 doświadczeń:

aktywność metaboliczna zarodków

- 2 grupy (2 okresy rozwoju zarodków poddane działaniu inhibitorów: zygota-morula oraz morula –blastocysta)
 - x 8 grup (8 inhibitorów dla 4 szlaków metabolicznych)
- te 2 elementy dają 16 kombinacji
- 19 grup (19 rozcieńczeń inhibitorów)
 - + 3 grupy kontrolne

warunki inkubacji *in vitro*

- 3 grupy (pożywka RDH z dodatkiem: BSA, FBS, KSR)
 - x 2 grupy (2 poziomy tlenu: 5% i 21%)
- te 2 elementy dają 6 kombinacji
- 1 grupa (Inkubacja z komórkami nabłonka jajowodu ROEC)
 - 5 grup (5 pożywek komercyjnych: 3 sekwencyjne, 2 jednoetapowe)
 - + grupy kontrolne

Uważam, że zakres wykorzystanych procedur laboratoryjnych jest bardzo bogaty i obejmuje: przygotowanie zwierząt i pozyskiwanie zarodków *in vivo* w stadiach od zygoty do blastocysty, hodowlę zarodków *in vitro* w bardzo rozbudowanym układzie doświadczalnym, barwienia immunofluorescencyjne z lokalizacją markerów 3 pierwszych linii komórkowych (SOX2 epiblast, SOX17 endoderma pierwotna, CDX2 trofektoderma) oraz analizę danych morfokinetycznych. Efektem kompleksowości doświadczenia jest uzyskanie imponującego zbioru danych charakteryzujących badane procesy. Dane to zostały przez Autorkę szczegółowo opisane i przeanalizowane.

Za oryginalny wkład ocenianej rozprawy uważam wykorzystanie procesów wewnątrzkomórkowych (szlaki metaboliczne, różnicowanie blastomerów) jako parametrów oceny jakości hodowanych *in vitro* zarodków królika zmierzającej do wskazania optymalnego środowiska najbardziej odzwierciedlającego warunki naturalne.

Pragnę zwrócić uwagę na następujące osiągnięcia niniejszej pracy, które uważam za najciekawsze:

1. Opisanie modelowego wzorca rozwoju zarodków królika pozyskanych *in vivo* niezbędnego do oceny różnicowania blastomerów w zarodkach rozwijających się *in vitro*: markery 3 pierwszych linii komórkowych (trofektodemy CDX2, endodermy pierwotnej SOX17, epiblastu SOX2) obecne są w zarodkach królika od wczesnej blastocysty: pojedyncze blastomery CDX2+ oraz SOX17+ pojawiają się wcześniej (E3.25), natomiast blastomery SOX2+ w stadium E3.5. W badanych stadiach (E3.25 do E3.5) obecne są także komórki nie zróżnicowane, a ich udział maleje wraz z rozwojem zarodka. Od stadium E4.0 wszystkie blastomery są zróżnicowane i należą do jednej z trzech linii komórkowych.
2. Wykazanie, że zygoty królika powstałe *in vivo* i hodowane *in vitro* do stadium blastocysty (6 dpc) nadal wykazują obecność znacznej liczby nie zróżnicowanych komórek niezależnie od warunków inkubacji (dodatki białkowe, stężenie tlenu).
3. Wykazanie, że kinetyka rozwoju zarodka wiąże się z procesem wzrostu i różnicowania komórek: zarodki rozwijające się szybciej mają więcej blastomerów SOX2+ i SOX17+ przy wyższej ogólnej liczbie komórek, natomiast zarodki rozwijające się wolniej mają więcej komórek CDX2+ przy niższej ogólnej liczbie blastomerów.
4. Wykazanie przewagi standardowych warunków hodowli *in vitro* zarodków króliczych nad pozostałymi systemami testowanymi w doświadczeniu. Hodowla w RDH/5% O₂ (wszystkie opcje) najkorzystniej wpływa na rozwój (więcej komórek) i różnicowanie blastomerów (więcej komórek poszczególnych linii).

5. Wykazanie, że metabolizm przedimplantacyjnych zarodków królika kontrolowany jest przez różne szlaki w zależności od etapu rozwoju: podczas bruzdkowania (zygota - morula) kontrolowany jest przez szlak fosforylacji oksydacyjnej, natomiast od moruli (72 hpc) wzrasta aktywność glikolizy i szlaku βoksydacyjnego. Istotność tego szlaku została po raz pierwszy zbadana w zarodkach królika.
6. Wykazanie ograniczonej przydatności komercyjnych pożywek stosowanych w hodowli *in vitro* zarodków człowieka (jednoetapowych i sekwencyjnych) do hodowli *in vitro* zarodków królika m.in. niższy % blastocyst i blastocyst wykultych, ograniczenia procesu różnicowania pierwszych linii komórkowych)
7. Wykazanie ograniczonej przydatności wspólnej inkubacji zarodków królika z pęcherzykami z komórek nabłonka jajowodu królika (m.in. brak wpływu na % blastocyst, ograniczenie różnicowania blastomerów).

Uwagi szczegółowe

Zdaję sobie sprawę, że wyniki niniejszej pracy doktorskiej będą publikowane, jednak jako Recenzentka mam obowiązek ocenić przedstawioną monografię. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **mgr Anny Choloniewskiej** napisana jest w języku polskim i ma typowy układ monografii naukowej. Liczy 178 stron z podziałem na rozdziały: streszczenie, summary, spis treści, spis skrótów, wstęp (11-44), hipoteza (45), cele pracy (46), materiały i metody (47-72), wyniki (73-111), dyskusję (112-138), wnioski (139), spis literatury (140-178) ok 580 pozycji. Praca jest ilustrowana tabelami (12), wykresami (19), schematami (5), zdjęciami zarodków (1) oraz rycinami (zestawy zdjęć mikroskopowych; 11). Autorka starannie formułuje zdania, a dokumentacja graficzna istotnie ułatwia lekturę i zrozumienie opisywanych zjawisk. Pragnę podkreślić bardzo dobrą jakość fotografii mikroskopowych oraz schematów dotyczących rozwoju i różnicowania zarodków.

Wykaz uwag:

1. *Summary* jest za mało skoncentrowane na istocie przeprowadzonych doświadczeń (zakres, procedury, liczba zarodków etc) i najważniejszych osiągnięciach. Opis w mojej opinii jest zbyt ogólny i nie charakteryzuje w pełni pracy.
2. Uważam stwierdzenie „*Celem badań było poznanie jak warunki hodowli in vitro wpływają na naturalny przebieg rozwoju przedimplantacyjnych zarodków królika*” za duży skrót myślowy, gdyż w warunkach *in vitro* nie można analizować naturalnych procesów. Na potwierdzenie przytoczę fakt, że głównym wynikiem tej pracy było wykazanie, że żaden z testowanych systemów *in vitro* nie odpowiadał wzorcowi różnicowania komórek zarodków *in vivo*.
3. Pomimo, że rozdział *Materiał i Metody* jest bardzo szczegółowy, sposób jego prezentacji wymaga od czytelnika dużego skupienia i znajomości układu doświadczalnego. Przedstawienie układu doświadczenia na jednym schemacie z podaniem nazwy poszczególnych grup, liczby zarodków i rodzaju procedur, którym te zarodki poddano w znacznym stopniu ułatwiłoby czytelnikowi jego zrozumienie. Dla przykładu opiszę wybrane wątki doświadczenia z inhibitorami ścieżek metabolicznych:
 - analizą objęto zarodki na 2 etapach rozwoju: zygota-morula oraz morula-blastocysta. Jednak nie wszystkie z 8 inhibitorów przetestowano na tych grupach zarodków np. ETMOX, DDGLU, 3-PB i 6-AN przetestowano wyłącznie na grupie zygota-morula. Z czego to wynikało?
 - czym kierowano się w wyborze poszczególnych stężeń inhibitorów ?
4. Rozdział *Wyniki* przedstawia wyniki poszczególnych doświadczeń z uwzględnieniem poszczególnych analiz/parametrów. Wyniki są zestawione zgodnie z sekwencją przeprowadzonych doświadczeń.

Uwagi:

- Wysoko oceniam krótkie podsumowania wyników po każdym podrozdziale
- Brakuje podsumowania liczbowego przeprowadzonych doświadczeń (w układzie procedura – liczba zarodków)
- Uważam, że krótkie wprowadzenia teoretyczne w każdym podrozdziale wyników nie są konieczne
- Wartościowym elementem podsumowania doświadczeń byłaby prezentacja optymalnego modelu hodowli zarodków królika *in vitro* bazującego na wynikach niniejszej pracy.

5. Dyskusję uważam za najlepiej napisany rozdział pracy. Jest zwarta i adresuje większość pytań.
6. Zastanawia mnie bardzo wysoka liczba referencji (ok 580 pozycji). Uważam, że znacznie przekracza ona optymalną liczbę źródeł literaturowych niezbędnych do przygotowania tego opracowania.

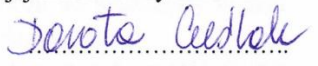
Pytania merytoryczne z prośbą o ustosunkowanie się:

1. W jakim stopniu wyniki dla zarodków królika uzyskane dla komercyjnych pożywek człowieka mogą być wykorzystane w modyfikacji tych pożywek? Jediną cechą różnicującą pochodzenie zarodków królika i człowieka był fakt, że zarodki człowieka powstają z zapłodnionych *in vitro*, ale dojrzewających *in vivo* oocytów, podczas gdy zarodki królika pochodzą z pozyskanych *in vivo* zygot
2. Wykazano, że zarodki o obniżonej jakości (m.in. rozwijające się wolniej czy inkubowane przy 21% O₂) mają więcej komórek CDX2+ przy niższej ogólnej liczbie blastomerów, natomiast zarodki lepszej jakości (rozwijające się szybciej) mają więcej blastomerów SOX2+ i SOX17+ przy wyższej ogólnej liczbie komórek. Proszę omówić ewentualny wpływ tych zjawisk na dalszy rozwój zarodka
3. Wykazano, że w systemie *Primovision* (hodowla indywidualnych zarodków) stadium blastocysty uzyskało 100% inkubowanych zygot, podczas gdy w warunkach hodowli grupowej „jedynie” 94%. Ogólnie wiadomo, że hodowla indywidualnych zarodków jest mniej skuteczna niż hodowla grupowa. Proszę o komentarz.
4. Jak Pani wytłumaczy przyczyny „częściowego” wykluwania blastocyst *in vitro*?
5. Proszę przedstawić swoją wizję na publikację wyników rozprawy. Chodzi mi o stronę merytoryczną – w jaki sposób Autorka planuje pogrupować dane i jakie hipotezy będzie weryfikować w poszczególnych artykułach.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że przedstawiona praca doktorska **mgr Anny Choloniewskiej** zawiera elementy nowatorskie, w istotny sposób poszerzające dotychczasowy stan wiedzy na temat rozwoju *in vitro* i różnicowania blastomerów przedimplantacyjnego zarodka królika. Imponujące spektrum badanych parametrów, zaawansowane procedury badawcze oraz jakość uzyskanych wyników sprawiają, że bez wątpienia będą one opublikowane w indeksowanych czasopismach. Pomimo moich krytycznych uwag dotyczących sposobu zaprezentowania układu doświadczenia i wyników uważam, że przedstawiona do recenzji praca zawiera oryginalne dane weryfikujące postawione hipotezy i całkowicie spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365; z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228; z 2011 r. Nr 84, poz. 455) i wnioskuję do **Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN w Jastrzębcu** o dopuszczenie Pani **mgr Anny Choloniewskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę aspekty nowatorskie, jakość i potencjał publikacyjny uzyskanych wyników oraz bardzo szerokie spektrum badawcze objęte niniejszą rozprawą, wnioskuję o jej stosowne wyróżnienie.


Prof. dr hab. Dorota Cieślak