



Balice, 8 listopada 2018

Dr hab. Jolanta Opiela
Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji
Balice k. Krakowa

Ocena
rozprawy doktorskiej mgr inż. Dawida Winiarczyka
pt.: „**APOPTOZA W OOCYTACH I PRZEDIMPLANTACYJNYCH ZARODKACH MYSZY**”

Uzyskiwanie zarodków różnych zwierząt metodami *in vitro* staje się w coraz większym zakresie technologią wykorzystywaną nie tylko do celów badawczych, ale także praktycznych. Technologia produkcji zarodków jest generalnie opanowana jednak jej ograniczeniem jest szeroko pojęta efektywność. Odnosi się to zarówno do liczby uzyskiwanych zarodków, jak też do niższej ich jakości. Wyjaśnienie przyczyn tego stanu rzeczy uwarunkowane jest głębszym poznaniem procesów i mechanizmów związanych zarówno z zapłodnieniem jak i rozwojem zarodkowym. O ile zjawisko apoptozy występuje powszechnie w ontogenezie począwszy od momentu rozwoju poimplantacyjnego, to występowanie tego zjawiska w okresie rozwoju przedimplantacyjnego jest niejasne i budzi wiele kontrowersji. Funkcją apoptozy w zarodku jest eliminacja komórek z nieprawidłowościami genetycznymi oraz nieprawidłowymi komórkami węzła zarodkowego blastocysty podczas różnicowania się epiblastu oraz endodermy pierwotnej. Apoptoza w warunkach fizjologicznych jest więc niezbędna dla prawidłowego rozwoju zarodkowego, ponieważ eliminuje komórki z błędami genetycznymi oraz spełnia funkcje morfogenne. Jak dotąd nie prowadzono badań wyjaśniających, dlaczego apoptoza nie występuje w najwcześniejszych etapach rozwoju przedimplantacyjnego ssaków. Celem niniejszego doktoratu było poznanie mechanizmów kontroli apoptozy w oocytach i poszczególnych etapach rozwoju przedimplantacyjnego zarodka myszy. Doktorant zaprezentował interesujący model badawczy w zakresie procedur doświadczalnych. Stosując różnorakie zabiegi mikromanipulacyjne zmniejszające lub zwiększające wyjściową masę zarodka, liczbę komórek w zarodku oraz zwiększające jego ploidię Doktorant powiązał ww. parametry z momentem pojawienia się w nim apoptozy. Przeprowadził ponadto analizę wpływu czynników proapoptotycznych na indukcję apoptozy w oocytach i zarodkach przedimplantacyjnych w warunkach *in vitro* oraz analizę profilu ekspresji genów pro- i

antyapoptotycznych w oocycie i zarodkach przedimplantacyjnych myszy. Doktorant zaproponował 2 mechanizmy mogące regulować apoptozę w pierwszych dniach rozwoju nowego osobnika, przy czym w obu kluczowym genem jest sirtuina 1 (*SIRT1*) badana na poziomie transkryptu.

Ocena pracy

Wstęp nazwany jako „Przegląd literatury” jest obszernym opracowaniem liczącym 16 stron i zawiera przejrzyste skonstruowany blok informacji podzielony na 2 wątki. Autor rozpoczyna od naszkicowania znaczenia i przebiegu procesu apoptozy koncentrując się najpierw na czynnikach indukujących i regulujących apoptozę. Przechodzi następnie do omówienia sirtuin i ich roli w regulacji apoptozy. W dalszym ciągu opisu przedstawia fazy apoptozy, który to opis wzbogacony jest klarownymi rysunkami przedstawiającymi wewnętrzny i zewnętrzny szlak apoptozy. Tę część Wstępu kończy opisem znaczenia zaprogramowanej śmierci w życiu organizmu. Drugi wątek Wstępu opisuje przedimplantacyjny rozwój zarodka myszy z wyodrębnionym zagadnieniem apoptozy oraz regulacji „timingu” różnicowania i apoptozy w przedimplantacyjnym zarodku myszy. Rozdział Autor kończy jasno i wyraźnie sformułowanym wywodem uzasadniającym podjęcie swoich badań.

W rozdziale **Cel pracy** zwięźle i klarownie przedstawiono w 4 podpunktach plan badań mający na celu wszechstronną analizę czynników regulujących proces apoptozy w oocycie i zarodku przedimplantacyjnym myszy. Nie wnoszę żadnych uwag krytycznych do dwóch pierwszych rozdziałów.

Rozdział **Materiały i metody** liczący 16 stron, rozpoczyna się przedstawieniem w sposób prosty i zrozumiały schematu doświadczeń podzielonego na 2 części: w części I określony został wpływ zmiany organizacji struktury zarodka na apoptozę, w części II określony został profil ekspresji wybranych genów związanych z apoptozą w odpowiedzi na 24 godz. inkubację z czynnikami proapoptotycznymi w różnych stadiach rozwoju zarodka przedimplantacyjnego myszy. Opis każdej części jest wzbogacony obrazowym schematem skonstruowanym z wykorzystaniem rycin i fotografii.

Zwięźle i czytelnie opisano grupy doświadczalne (5 grup z kontrolą w części I i 15 grup w części II). Każda grupa zawierała 10 oocytów lub zarodków a doświadczenie powtarzano trzykrotnie. Jasno widać jak ogromną pracę włożył Doktorant w wykonanie części eksperymentalnej doktoratu. W tym miejscu pragnę również pochwalić Doktoranta za kompetentne podejście do obliczeń statystycznych. Zważywszy na różnorodność grup doświadczalnych, ich dużą liczebność i stosunkowo małe n grup było to wyzwanie któremu doktorant sprostał. Zastosowane testy statystyczne obejmują: test Kruskala-Wallisa oraz test *post hoc* Dunna, dokładny test Fishera, regresję Poissona (model log-liniowy), jednokierunkową analizę wariancji oraz testy *post-hoc takie jak* : Dunnetta i Tukeya.

Do tej części mam drobną uwagę krytyczną dotyczącą sposobu przedstawienia rozdziału Materiały i Metody. W mojej ocenie podrozdział 4.II.4 *Pozyskiwanie oocytów* powinien stanowić pierwszy punkt rozdziału metody. Podrozdziały 4.II.6a *Narzędzia do*

mikromanipulacji i 4.II.6b Aparatura do mikromanipulacji powinny być częścią rozdziału *Materiały*. Równocześnie rozdział *4.II.6c Procedury mikromanipulacyjne* powinien stanowić część rozdziału *Metody* tak jak podrozdziały *4.II.7 Hodowla zarodków in vitro* *4.II.8 Lokalizacja białek metodą immunofluorescencji pośredniej* *II.9 Analiza obrazów konfokalnych* i cały podrozdział *4.II.10 Analizy molekularne (do części II)*. Zauważyłam również brak informacji nt. stosowanej objętości kropli pożywki w trakcie przeprowadzanych zabiegów mikrochirurgicznych czy hodowli zarodków *in vitro*.

WYNIKI podzielone są na 2 części adekwatnie do podziału doświadczenia przedstawionego we wcześniejszym rozdziale. Zatem wyniki części pierwszej ujęto w 3 podrozdziałach a wyniki części II doświadczenia przedstawiono w kolejnych 3 podrozdziałach. Sposób przedstawienia koresponduje logicznie z wykonanymi doświadczeniami oraz postawionymi celami szczegółowymi. Wyniki zostały zaprezentowane ogółem na 33 stronach w tym w formie 7 tabel 17 wykresów 5 wysokiej jakości rycin immunolokalizacji białek Casp3 i H2AX we wszystkich grupach doświadczalnych części I oraz dwóch zdjęć oocytów i zarodków po hodowli *in vitro* ze staurosporyną. Nie mam zastrzeżeń odnoszących się do merytorycznej strony uzyskanych wyników, które oceniam wysoko. Mam drobną uwagę redakcyjną dotyczącą jedynie prezentacji tabel. Tytuł tabeli powinien być w nagłówku natomiast informacje dotyczące statystyki w stopce tabeli (np. str. 49 i 50).

Podsumowując ten najbardziej obszerny rozdział pracy, zawierający olbrzymią ilość wartościowych wyników wystarczającą do przygotowania przynajmniej 2 wysokiej klasy publikacji, chciałabym wskazać na moim zdaniem najważniejsze, do których należy: 1. stwierdzenie że prawdopodobieństwo wystąpienia apoptozy nie jest bezpośrednio zależne od liczby komórek w zarodkach ale jest zależne od stadium rozwojowego i linii komórkowej (TE, ICM) 2. wykazanie istnienia antyapoptotycznych mechanizmów obronnych w zarodkach myszy 3. stwierdzenie że zarodki myszy są wysoce odporne na indukcję apoptozy od stadium od zygoty do stadium moruli 4. wykazanie istotnej roli genu *SIRT1* w ochronie zarodka przed apoptozą.

W **DYSKUSJI** zawartej na 14 stronach Doktorant przedstawił proponowany mechanizm przeciwstawnej regulacji apoptozy przez *SIRT1* w zarodkach przedimplantacyjnych myszy. Wyniki doktoranta odmienne od zaobserwowanych w komórkach nowotworowych gdzie *SIRT1* wzmacnia apoptozę w odpowiedzi na TNF α poprzez hamowanie działania NF- κ B –a więc świadczące o braku szlaku śmierci komórki zależnej od *SIRT1* uważam za cenne. Kolejne cenne wnioski dotyczą genów *FOXO* i *p53* gdzie jak wykazał Doktorant wysoki poziom *SIRT1* znosi zdolność tych genów do indukcji apoptozy w oocytach i we wczesnym okresie przedimplantacyjnym. Bardzo interesujący jest też wynik ekspresji proapoptotycznych genów *Bax*, *Casp3* i *p53* która nie była najwyższa w tych grupach gdzie obserwowana była apoptoza ale w przypadku działania czynnika apoptotycznego obserwowana była tendencja do wzrostu ekspresji wyżej wymienionych genów w kolejnych stadiach rozwojowych. Na podstawie tego interesującego wyniku, Doktorant przedstawił hipotezę, że – pomimo wysokiej ekspresji tych genów we wczesnym

zarodku przedimplantacyjnym – wysoki poziom *SIRT1* blokuje apoptozę. Dopiero gdy *SIRT1* osiągnie odpowiednio niski poziom, program śmierci komórkowej może zostać aktywowany. Kolejna bardzo ciekawa obserwacja dotyczy obniżenia liczby oraz częstotliwości występowania komórek apoptotycznych w zarodkach poddanych procedurom doświadczalnym w porównaniu do zarodków grupy kontrolnej. Autor przyznaje, że spodziewał się iż tak silna ingerencja w wewnętrzną organizację zarodka wywrze raczej przeciwny skutek i tłumaczy zjawisko istnieniem szeroko pojętych, silnych mechanizmów obronnych/ochronnych, związanych – być może – z regulacyjnymi zdolnościami zarodka, które „bronią” zarodek przed apoptozą, której skutkiem mogą być późniejsze, poważne zaburzenia w okresie postnatalnym. Powyższą dającą do myślenia obserwację rozszerzyłabym o kolejne możliwości tłumaczące to zjawisko.

Klarowność Dyskusji zwiększają zamieszczone w niej 3 rysunki prezentujące prawdopodobne mechanizmy działania *SIRT1* w regulacji apoptozy. Rozdział Dyskusja przedstawiony jest rzeczowo, koncentrując się na osiągniętych wynikach i ich interpretacji na tle prac innych Autorów. Doktorant wykazał się szeroką wiedzą i znajomością literatury. Na uwagę zasługuje Jego umiejętność koncentracji na temacie. Doktorant podsumował także krytycznie całość swoich badań dotyczącą roli *SIRT1* w regulacji apoptozy w przedimplantacyjnym rozwoju myszy, wskazując że jego badania ograniczone zostały tylko do analiz wyłącznie na poziomie transkryptu. Badania określające poziom kodowanych przez te geny białek oraz ich interakcji między sobą w pełni wyjaśniłyby rolę genu *SIRT1*. Wysoka dojrzałość Doktoranta w realizacji dysertacji wynika z faktu, że jest członkiem znakomitego zespołu kierowanego przez prof. Jacka Modlińskiego posiadającego najwyższe w tej specjalności kompetencje.

Wnioski stanowiące w zasadzie podsumowanie uzyskanych wyników są w pełni uzasadnione i przejrzyste przedstawione. Piśmiennictwo bogate, obejmujące 156 pozycji zawiera odpowiednio dobrane z tematem pracy publikacje.

Reasumując uważam, że Autor wykonał bardzo dużą, ambitną, starannie zrealizowaną i wyjątkowo wartościową pracę. Odnosi się to zarówno do samego zakresu przeprowadzonych badań, których wykonanie wymagało opanowania wielu trudnych i różnorodnych metod, jak też uzyskanych wyników, które oceniam jako niezwykle wartościowy wkład w poznanie mechanizmów apoptozy w oocytach i przedimplantacyjnych zarodkach myszy.

Upoważnia mnie to stwierdzenia, iż przedstawiona mi do oceny dysertacja spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę zatem o dopuszczenie pana mgr inż. Dawida Winiarczyka do następnych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto ze względu na aktualność i wysoką rangę podjętej problematyki, opanowanie i zastosowanie nowoczesnych metod badawczych a przede wszystkim uzyskanie bardzo wartościowych i ważnych wyników, proponuję wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Jolanta Opiela