



UNIwersytet Warszawski
Wydział Biologii
Instytut Zoologii
Zakład Embriologii



prof. dr hab. Marek Maleszewski
Kierownik Zakładu Embriologii
Przewodniczący Rady Naukowej Instytutu Zoologii UW

Prof. dr hab. Marek Maleszewski
Zakład Embriologii, Instytut Zoologii UW

Warszawa, 31 listopada 2018

Recenzja rozprawy doktorskiej zatytułowanej „Apoptoza w oocytach i przedimplantacyjnych zarodkach myszy” autorstwa Pana mgr. inż. Dawida Winiarczyka

W przedstawionej do oceny rozprawie autor zaprezentował i przedyskutował wyniki badań prowadzonych nad czynnikami, które mogą mieć wpływ na regulację apoptozy we wczesnych zarodkach myszy. Apoptoza jest ważnym elementem wielu procesów morfogenetycznych i jej występowanie stwierdzano podczas różnych stadiów rozwoju zarodków wielu organizmów modelowych. O zachodzeniu programowanej śmierci komórek w zarodku myszy donoszono wielokrotnie, nie ma wątpliwości, że stadium rozwojowym, w którego powstawaniu bierze udział ten proces, jest około implantacyjna blastocysta. Wydaje się jednak, że choć apoptoza jest zjawiskiem, które uczestniczy w „kontrolu jakości” oocytów, to od momentu zapłodnienia i przez cały okres bruzdkowania blastomery zarodka są przed nią chronione. Proces ten zapewne jest precyzyjnie regulowany podczas rozwoju zarodka, a mechanizmy jego kontroli są jak dotąd słabo poznane. Dlatego za dobrze uzasadnione uznać należy zadanie, które przed sobą postawił doktorant. Po pierwsze postanowił on bowiem zbadać jak na podatność na apoptozę oraz na czas jej występowania i jej intensywność wpływają indukowane eksperymentalnie *in vitro* zaburzenia w liczbie komórek zarodka, w ich ploidii, a także w stosunku jądro-cytoplazmatycznym blastomerów. Po drugie autor pracy podjął się zbadania tego, jak na zarodki w różnych stadiach rozwoju przedimplantacyjnego *in vitro* wpływają egzogenne czynniki proapoptotyczne. Doktorant analizował ich zdolność do indukcji apoptozy blastomerów, a także ich wpływ na ekspresję genów pro- i antapoptotycznych w zarodkach.

Wyniki badań wchodzących w zakres pierwszej części pracy zasadniczo potwierdziły słuszność hipotezy testowanej przez dyplomanta, która głosi, że blastomery bruzdkującego zarodka są niepodatne na apoptozę. Na czas i częstość tego procesu w zarodkach nie wywierało w sposób istotny zmniejszenie o połowę liczby jego komórek spowodowane usunięciem jednego blastomeru zarodka 2-komórkowego, lub wywołane poprzez fuzję blastomerów w tym stadium – ta druga procedura powodowała także tetraploidyzację jąder blastomerów. Doktorant wykazał także, że działanie przeciwne, czyli dwukrotne zwiększenie liczby komórek zarodka, które uzyskiwał poprzez agregację dwóch zarodków 2-komórkowych nie deregulowało pojawiania się apoptozy w podwójnych zarodkach chimerowych. Zmiana stosunku jądro-cytoplazmatycznego komórek zarodka, osiągnięta także w stadium 2-komórkowym poprzez enukleację jednego z blastomerów i następnie fuzję cytoplasm z pozostałym (nie poddawanym enukleacji) blastomerem również znacząco nie modyfikowała

zachodzenia apoptozy w zarodku eksperymentalnym w porównaniu z kontrolą. W tej części pracy doktorant wykazał zatem, że apoptoza w zarodku myszy jest prawdopodobnie regulowana przez zegar biologiczny, który zapewnia to, że regularnie pojawia się ona dopiero w stadium blastocysty, a w zarodkach o budowie zmodyfikowanej eksperymentalnie w stadiach odpowiadających czasowo blastocyście.

W dalszej części badań doktorant podjął próbę wyjaśnienia podłoża tego zjawiska i dlatego postanowił przyrzeć się bliżej częstości apoptozy oraz ekspresji genów kodujących czynniki pro- i antyapoptotyczne zarówno w oocytach i zarodkach hodowanych *in vitro* w czystej pożywce, jak i w obecności staurosporyny lub TNF α , które działają proapoptotycznie. Te eksperymenty potwierdziły, że bruzdkujące zarodki myszy są znacznie mniej podatne na indukcję apoptozy niż oocyty i blastocysty. Okazało się, że jest tak mimo tego, że zachodzi w nich ekspresja genów kodujących czynniki proapoptotyczne. Na podstawie zaobserwowanego wzoru ekspresji interesujących go genów doktorant zaproponował, że inhibitorem apoptozy, który chroni bruzdkujące zarodki przed indukcją tego procesu może być szlak przekazywania zależny od sirtuiny.

Ustosunkowując się bardziej szczegółowo do doświadczeń opisanych w rozprawie można stwierdzić, że zostały one zaplanowane prawidłowo i w oparciu o oryginalną hipotezę, oraz że zostały dobrze wykonane. Ich przedstawienie w rozprawie jest prawidłowe, a sama rozprawa jest napisana klarownie i logicznie. Jednak zdaniem recenzenta jest kilka kwestii dotyczących wykonywanych doświadczeń oraz ich interpretacji w rozprawie, które wymagają wyjaśnień.

1. Czy w wariancie pierwszym eksperymentalnej manipulacji budową zarodka rzeczywiście, tak jak twierdzi autor, dochodzi do zmiany stosunku jądro-cytoplazmatycznego? Wielokrotnie wykazano, a potwierdzają to też obserwacje poczynione przez autora rozprawy, że tempo rozwoju zarodków uzyskanych w wyniku oddzielenia blastomerów w stadium 2-komórkowym (zarodki 1/2) jest takie samo, jak w zarodkach kontrolnych. Także w tym samym czasie jak w kontroli zachodzą w nich zjawiska morfogenetyczne takie jak kompakcja i kavitacja. Zatem stosunek jądro-cytoplazmatyczny w poszczególnych stadiach rozwojowych jest w zarodkach 1/2 taki sam jak w zarodkach normalnych. Zdaniem recenzenta w tym wariancie zmianie ulega tylko liczba komórek w zarodku.

2. Czy przy analizie wpływu manipulacji budową zarodka na liczbę komórek porównywano liczbę komórek zarodków doświadczalnych z liczbą komórek w kontroli, czy też z liczbą komórek w kontroli podzieloną przez dwa dla trzech pierwszych wariantów i pomnożoną przez dwa dla wariantu 4? Zdaniem recenzenta tylko to drugie postępowanie jest prawidłowe i tylko wtedy, gdyby stwierdzono istotne różnice, można by mówić o różnicach w tempie podziału blastomerów. Tymczasem można odnieść wrażenie, że analiza przedstawiona w rozprawie została przeprowadzona względem liczby komórek w kontroli nie zmodyfikowanej w sposób uwzględniający to, że w punkcie wyjściowym eksperymentu w wariantach 1 – 3 liczba komórek zarodków eksperymentalnych była o połowę zmniejszona, a w wariancie 4 dwukrotnie zwiększona. Jeżeli tak było, to zdaniem recenzenta istotne informacje uzyskujemy tylko w tej części analizy, która poświęcona jest stosunkowi liczby komórek węzła zarodkowego do liczby komórek trofektodermy w blastocystach eksperymentalnych i kontrolnych, gdyż ta wielkość nie zależy od bezwzględnej liczby komórek w tych liniach.

3. W badaniach z wykorzystaniem immunofluorescencji doktorant zaobserwował silne i homogenne znakowanie przeciwciałem pierwszorzędowym skierowanym przeciwko histonowi H2AX wszystkich jąder komórkowych we wszystkich badanych zarodkach. Czy znakowanie to rzeczywiście oddaje lokalizację fosforylowanego histonu (γ H2AX), lokalizującego się w miejscach uszkodzenia DNA? Wzór znakowania pokazany w rozprawie bardziej przypomina lokalizację ogólnego H2AX w jądrach komórek zarodków (u myszy: Nashum et al. 2010, *Development* 137, 3785) niż γ H2AX (u myszy: Luo et al. 2006, *Biol Reprod* 75, 673; u świni: Wang et al. 2015, *PLOS One* DOI:10.1371/journal.pone.0142561).

4. Na str. 73, l. 6-7 od góry doktorant pisze, że „W grupie 2kom/St żaden z zarodków nie podzielił się po 24 godz. hodowli *in vitro*”. Nie znajdujemy jednak informacji, jak zachowywały się zarodki w innych wariantach hodowli – czy dzieliły się tak samo jak zarodki kontrolne?

Mimo że powyżej przedstawione kwestie zdaniem recenzenta wymagają wyjaśnień i ewentualnej korekty podczas przygotowania manuskryptu publikacji opartej na wynikach zawartych w rozprawie, stwierdzić można, że badania w niej przedstawione są istotne dla lepszego zrozumienia mechanizmów regulujących przedimplantacyjny rozwój zarodka ssaka. Sposób ich przeprowadzenia i zaprezentowania ich wyników w rozprawie świadczy o dojrzałości badawczej i naukowej dociekliwości doktoranta.

Przechodząc do omówienia strony formalnej rozprawy stwierdzić należy, że praca jest dobrze napisana pod względem językowym i logicznie zorganizowana w rozdziały i podrozdziały. Błędy redakcyjne i niedoskonałości językowe są w niej nieliczne. Najistotniejszym z nich wydaje się konsekwentne używanie przez autora pojęcia *częstotliwość apoptozy*, zamiast prawidłowego *częstość apoptozy*. Należy pamiętać, że o częstości mówimy tylko wtedy, gdy określamy liczbę zachodzących w czasie cykli zjawiska okresowego – apoptoza zaś takim zjawiskiem nie jest. Spis pozostałych niedociągnięć redakcyjnych, które recenzent zauważył, zawarty jest w załączniku do recenzji (zał. 1). Rozdział wstępny, nazwany przez autora *Przeglądem literatury* zawiera zwięzłe omówienie współczesnej wiedzy na temat przebiegu, kontroli i znaczenia apoptozy. Następnie zaprezentowany jest w nim przebieg rozwoju zarodka myszy i to, co wiemy na temat zachodzenia w jego trakcie procesów apoptotycznych. Rozdział ten stanowi bardzo dobre przygotowanie dla czytelnika, który w trakcie lektury może poznać tło badań przedstawionych w rozprawie. Ich cele zwięzłe przedstawiono w kolejnym rozdziale pracy. Nasuwa się jedynie uwaga krytyczna, że w rozdziale wstępnym zupełnie pominięto kluczową rolę kadheryny E, którą białko to odgrywa w czasie kompaktacji zarodka. Przedstawienie przez doktoranta stosowanych *Materiałów i metod* nie budzi żadnych istotnych zastrzeżeń, a wyróżnienie na początku tej części pracy podrozdziału prezentującego *Schemat doświadczeń* bardzo pomaga w lekturze rozprawy. Stwierdzić należy również, że doktorant właściwie wywiązał się z zadania, jakim było przedstawienie uzyskanych *Wyników*. Rozdział ten dobrze się czyta, po pierwsze ze względu na logiczne zorganizowanie materiału w rozdziały i podrozdziały, a po drugie dzięki prawidłowemu zilustrowaniu przez zamieszczone wykresy, zdjęcia i tablice, które są klarowne i pozwalają czytelnikowi samemu ocenić uzyskane rezultaty. W rozdziale *Dyskusja* wyniki są dobrze omówione i przeanalizowane w odniesieniu do doniesień literaturowych. Przeprowadzona tam interpretacja uzyskanych wyników i to jak powiązano je z tym, co dotychczas było wiadome wydają się w większości prawidłowe i dobrze uzasadnione. Zaproponowane modele tego jak apoptoza jest regulowana podczas

przedimplantacyjnego rozwoju zarodka logicznie wynikają z poczynionych obserwacji. Jednakże do *Dyskusji* recenzent ma następujące krytyczne uwagi szczegółowe:

1. Na str. 86, drugi akapit napisano „Na tym etapie komórki zarodków są wyjątkowo odporne na indukcję apoptozy (jakby za wszelką cenę musiało dojść do powstania blastocysty)” i dalej „zarodek musi się rozwijać aby bez strat ... doprowadzić do utworzenia ... prawidłowej blastocysty” (podkreślenia recenzenta). Takie sformułowania sugerują działanie celowej siły w zarodku, zaś podejście teleologiczne powinno być unikane przy opisie zjawisk przyrodniczych.

2. Na stronie 86 i 87 autor pisze, że udowodnionym jest iż biopsja blastomeru bruzdkującego zarodka ssaka ma niekorzystny wpływ na jego dalszy rozwój, a także na funkcjonowanie organizmu, który z niego powstaje. Właściwszym wydawałoby się jednak stwierdzenie, że choć taki efekt zasugerowano, to nie jest to powszechnie akceptowane.

3. str. 87, trzeci akapit od góry. Czy wytłumaczeniem obserwowanego obniżenia liczby komórek apoptotycznych w zarodkach doświadczalnych nie może być to, że w trzech z czterech wariantów doświadczalnych ogólna liczba komórek w zarodku była w poszczególnych stadiach rozwojowych o połowę obniżona w stosunku do kontroli?

Kolejną część rozprawy stanowią *Wnioski*, w których doktorant dobrze, choć może trochę zbyt lapidarnie podsumował to, co udało mu się wykazać w badaniach przedstawionych w ocenianej pracy. Rozprawę zamyka prawidłowo sporządzona *Bibliografia*.

Podsumowując tę recenzję stwierdzam, że nadesłana mi do oceny rozprawa doktorska p. mgr Dawida Winiarczyka spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767) i na tej podstawie wnioskuje o dopuszczenie p. mgr Winiarczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marek Maleszewski

Zał. 1.

Zestawienie uwag redakcyjnych do rozprawy doktorskiej mgr. inż. Dawida Winiarczyka

str. 3, l.8 od góry i str. 10, l.7 od dołu: zamiast „rozkład DNA” powinno być „fragmentacja DNA”.

str. 4, drugi i trzeci akapit: tryb osobowy („zaobserwowałem”) miesza się z bezosobowym („wykazano”).

str. 10, l.15 od dołu i str. 15, l.9 od góry: powinno być „konserwowanym”, a nie „konserwatywnym”.

str. 13, l.1 od góry: Powinno być „białka z tej grupy”, a nie „grupa białek”.

str. 14, l.14 od dołu: „nieuzasadniona indukcja” to niewłaściwe pojęcie.

str. 15, l.1 od dołu: lepiej „dla” zamiast „w celu”.

str. 20, l.2-3 od dołu: „powstaje ok. 10 mld komórek” – w jakim czasie? Skrót „ok.” piszemy z kropką.

str. 25, l.6 od dołu: „szlak apoptotyczny występuje w całości” – niezręczne.

str. 35, l.11 od dołu: powinno być „szczepu”, a nie „szczepowych”.

str. 40, l.1 od góry: „mikroskopijnych” ? Najlepiej podać przybliżoną objętość.

str. 40, l.11 od dołu: „płukano”, a nie „płukane”.

str. 42, l.7 od dołu: zamiast „pellet” lepiej „osad”.

str. 45: na wydruku obcięta prawa skrajna kolumna tabeli.

str. 84, l.7 od góry: „Uprzednio opisano już zarodków 2/1 ...” ?

str. 88, l.11 od góry: „Pierwsze geny ... zaobserwowano w łożysku” – zbyt daleko idący skrót myślowy.

str. 89, l.4 od góry: powinno być „pierwotnej”, do tego słowo to jest zbędnie powtórzone.