

Prof. dr hab. Maria Skrzyszowska
Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji
Instytut Zootechniki – PIB
ul. Krakowska 1
Balice/Kraków

Balice, 12 listopada 2020 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Chołoniewskiej

pt. „**Wpływ warunków hodowli *in vitro* na rozwój przedimplantacyjnych zarodków królika**”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka A. Modlińskiego i dr hab. Anny Piliszek ,
w Instytucie Genetyki i Biotechnologii Zwierząt PAN, w Jastrzębcu

Dynamiczny rozwój technologii wspomaganego rozrodu zwierząt (ARTs; ang. *assisted reproductive technologies*) takich m.in. jak zapłodnienie *in vitro*, klonowanie zarodkowe lub somatyczne, a także innych nowoczesnych metod embrionalnej inżynierii genetycznej (transgeneza gamet i zarodków) był możliwy, dzięki opracowaniu, w pierwszej kolejności, metod pozaustrojowej hodowli gamet i zarodków ssaków, co pozwoliło monitorować wczesny (przedimplantacyjny) etap embriogenezy, poza organizmem samicy-matki. Warunki środowiskowe (rodzaj pożywki hodowlanej, właściwa temperatura, czy specyficzne warunki gazowe (poziom tlenu i dwutlenku węgla) podczas inkubacji zarodków w inkubatorach, obok czynników genetycznych, stanowią główny czynnik przesądzający o prawidłowej realizacji scenariusza rozwojowego zarodka. Aktywność mitotyczna oraz tempo inicjacji kolejnych cykli komórkowych bruzdkowania w znacznym stopniu zdeterminowane są trafnością doboru zastosowanych parametrów fizyko-chemicznych hodowli *in vitro*. Mimo stosunkowo wysokiej skuteczności zarówno pożywek komercyjnych, jak i tych opracowywanych, modyfikowanych w laboratoriach, ich jakość jest wciąż suboptymalna w porównaniu do warunków fizjologicznych panujących w drogach rozrodczych samicy. Dlatego też, jakość zarodków osiągających stadium blastocysty w warunkach hodowli *in vitro* oceniana na podstawie całkowitej liczby komórek (zarówno komórek węzła zarodkowego jak i trofoektodermi) jest znacząco niższa w porównaniu do zarodków uzyskiwanych *in vivo*. W związku z powyższym, uzasadnione jest podejmowanie badań, które poszerzą wiedzę w tym obszarze i przyczynią się do wzrostu kompetencji rozwojowych hodowanych w warunkach pozaustrojowych zarodków ssaków. Recenzowana rozprawa wpisuje się w ten nurt badań. Poświęcona jest tematyce oddziaływania wybranych parametrów fizyko-chemicznych hodowli *in vitro* na różnicowanie się komórek zarodkowych królika w kierunku trofoektodermi, epiblastu i endodermi pierwotnej, a także tematyce aktywności wewnątrzkomórkowych szlaków metabolicznych, w

aspekcie ich wpływu na kompetencje rozwojowe zarodków królika. Pod tym względem oceniana rozprawa ma dużą wartość naukową w związku z nowatorskim podejściem do tematu.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 178 stron posiada typowy układ dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz wykazem stosowanych skrótów. Wstęp (34 strony) zawiera 5 podrozdziałów, które wprowadzają czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. W dalszej kolejności, po jednostronicowym przedstawieniu celów badań rozpoczyna się opis materiałów i metod (26 stron). Następny rozdział, Wyniki (39 stron) jest podzielony na 5 podrozdziałów, po których następuje dyskusja licząca 27 stron. Rozprawa kończy się przedstawieniem wniosków oraz spisem literatury (38 stron) zawierającym 581 pozycji.

Ocena merytoryczna

Wstęp. W rozdziale tym Doktorantka pomieściła obszerną wiedzę leżącą u podstaw zagadnień będących przedmiotem rozprawy, podkreślając znaczenie królika jako zwierzęcia modelowego w badaniach z zakresu biologii rozwoju, jak i biomedycyny. Kolejne podrozdziały poświęciła zagadnieniom dotyczącym przedimplantacyjnej fazy embriogenezy ssaków, różnicowaniu pierwszych linii komórkowych w blastocystach ssaków z uwzględnieniem czynników odgrywających istotną rolę w tworzeniu trofoektodermy (TE), epiblastu (EPI) i endodermy pierwotnej (PrE). Następnie opisała wewnątrzkomórkową aktywność metaboliczną zarodków królika na tle zarodków innych gatunków zwierząt, zarówno laboratoryjnych (mysz, szczur), ale także zwierząt gospodarskich (bydło i świnia domowa). Prawie 15 stron Doktorantka poświęciła opisaniu zagadnień związanych z hodowlą *in vitro* zarodków (w tym dość obszerny rys historyczny badań z tego zakresu, rodzaje pożywek, składy pożywek i ich białkowe suplementacje, systemy hodowli zarodków *in vitro*, inne parametry środowiskowe jak temperatura i skład mieszanki gazowej w trakcie inkubacji). Dodatkowo, we Wstępie Doktorantka zamieściła 3 barwne ryciny/schematy, które ilustrują m.in. etapy przedimplantacyjnego rozwoju zarodków królika, od zygoty do wylęgłej/wyklutej blastocysty (E0.75 do E6.5), z zaznaczeniem dwóch istotnych zdarzeń, do których dochodzi na tym etapie rozwoju czyli procesów kompaktacji i kawitacji.

Wstęp niewątpliwie dokumentuje dużą wiedzę Doktorantki w przedmiocie rozprawy, o czym świadczy bogato cytowane piśmiennictwo (ponad 500 pozycji), a sposób prezentacji wątków tematycznych, w zasadzie nie budzi moich zastrzeżeń, poza jednym:

- obszerny wielowątkowy opis można by przedstawić w formie bardziej skondensowanej, co niewątpliwie ułatwiłoby zdefiniować te zagadnienia, na temat których dotychczasowa wiedza jest niewystarczająca bądź fragmentaryczna i co uzasadniałoby konieczność podjęcia dalszych badań w tym obszarze.

Cele pracy zostały sformułowane w oparciu o przyjętą przez Doktorantkę hipotezę badawczą:

- rozwój i różnicowanie pierwszych linii komórkowych w zarodkach królika, w warunkach pozaustrojowych (*in vitro*), zależy od parametrów środowiskowych hodowli;

- aktywność wewnątrzkomórkowa szlaków metabolicznych u królika jest skorelowana ze stadiem rozwoju zarodka.

Na tej podstawie Doktorantka sformułowała **Cel główny**, który realizowany był poprzez 3 cele szczegółowe. Moje zastrzeżenia do tej części rozprawy dotyczą sformułowania Celu głównego:

Str. 47, Autorka pisze: „*Opracowanie i określenie systemu hodowli zarodków króliczych in vitro, pozwalającego na przebieg rozwoju zarodków odpowiadający rozwojowi in vivo, z zachowaniem ram czasowych, stopnia proliferacji i zróżnicowania komórek*” – pomijając stopień zapętlenia stylistycznego tego sformułowania, nie jest to adekwatne do tytułu rozprawy. W mojej opinii bardziej trafne byłoby: „*Określenie wpływu wybranych systemów hodowli na przedimplantacyjny potencjał rozwojowy zarodków królika, ze szczególnym uwzględnieniem ich oddziaływania na zdolność do różnicowania się pierwszych linii komórkowych*”.

- dodatkowo sugerowałabym odwrócić kolejność celów szczegółowych (trzeci jako drugi, a drugi jako trzeci i skrócić Cel szczegółowy 3 „Określenie wpływu stężenia tlenu w atmosferze hodowlanej, rodzaju dodatku białkowego w pożywce, systemu hodowli (jednoetapowy, sekwencyjny lub współhodowla z króliczymi komórkami nabłonka jajowodu) na rozwój i morfokinetykę przedimplantacyjnych zarodków króliczych oraz na różnicowanie w zarodkach pierwszych linii komórkowych” na „Określenie wpływu wybranych parametrów środowiskowych hodowli *in vitro* na rozwój, morfokinetykę oraz stopień różnicowania pierwszych linii komórkowych”.

Material i metody zostały opisane w odrębnych podrozdziałach, które korespondują z przedstawionymi celami szczegółowymi. Doktorantka w sposób wyczerpujący i skrupulatny opisuje metody badawcze, które zostały dobrane adekwatnie do postawionych zadań badawczych. Na podkreślenie zasługuje złożony warsztat metodyczny Doktorantki obejmujący nowoczesne metody i techniki badawcze, m.in. z zakresu embriologii eksperymentalnej, mikroskopii konfokalnej, czy metod immunofluorescencyjnych użytych na potrzeby detekcji białkowych markerów pierwszych linii komórkowych. Należy również podkreślić różnorodność testów statystycznych zastosowanych przez Doktorantkę do oceny/weryfikacji uzyskanych wyników. Wymagało to opanowania wielu nowych umiejętności i ogromnego nakładu pracy. Rozdział Materiały i metody wzbogacony został 8 tabelami i jednym schematem ilustrującym procedurę hodowli pęcherzyków z komórek nabłonkowych jajowodu, na potrzeby jednego z wariantów doświadczenia (współhodowli zarodków z komórkami somatycznymi).

Do tej części rozprawy mam kilka uwag/ wątpliwości:

- czy 40-mikrolitrowa objętość kropli pożywki na 7-10 zarodków i dodatkowo 5-7 pęcherzyków, zastosowana przez Doktorantkę w systemie współhodowli zarodków z pęcherzykami z komórek nabłonka jajowodowego (ROEC), nie jest zbyt drastycznie zaniżona, co w konsekwencji mogłoby oddziaływać, zarówno na odsetek jak i jakość zarodków osiagających stadium blastocysty?

- czy w systemie hodowli *time-lapse* (PrimoVision EVO+) istnieje możliwość zmiany warunków inkubacji pod względem mieszaniny gazowej (z 21% O₂ na 5% O₂ i odwrotnie)?

- jaka jest wydajność zabiegu usuwania osłonek przejrzystych i mucynowych z utrwalonych blastocyst królika (głównie tych rozwiniętych w warunkach *in vivo*, przeznaczonych do analizy

immunofluorescencyjnej w celu detekcji białkowych markerów poszczególnych linii komórkowych) i czy zabieg taki może skutkować uszkodzeniem zarodka?

- podobnie jak w przypadku Wstępu, rozdział Materiał i Metody można było przedstawić w bardziej zwartej formie, koncentrując się na informacjach ważnych, z punktu widzenia jakości pracy, a pomijając drobiazgowo opisy niektórych czynności.

Wyniki prac eksperymentalnych zostały opisane i zaprezentowane w usystematyzowany sposób w osobnych podrozdziałach, starannie udokumentowane w postaci 19 diagramów słupkowych/wykresów, 5 tabel oraz 11 fotogramów/rycin z mikroskopu konfokalnego, znakomitej jakości, które bardzo dobrze uzupełniają/ilustrują opisywane wątki. Uzyskane wyniki wnoszą nowe treści do ogólnej wiedzy na temat oddziaływania wybranych systemów i parametrów środowiskowych hodowli *in vitro* na tempo różnicowania się pierwszych linii komórkowych w uformowanych blastocystach, jak również na temat aktywności wewnątrzkomórkowych szlaków metabolicznych, w trakcie przedimplantacyjnego rozwoju zarodków królika. Do najbardziej wartościowych naukowo obserwacji Doktorantki należy zaliczyć:

- (i) jednoznaczne udowodnienie, że całkowita liczba komórek w zarodku, w tym komórek różnicujących się w kierunku epiblastu, wykazujących obecność białka markerowego SOX2 zależna jest od czasu rozpoczęcia przez zygotę pierwszych cykli mitotycznych. Doktorantka potwierdziła to testem korelacji Spearmana wykazując negatywną korelację między całkowitą liczbą komórek/komórek epiblastu i szybkim tempem podziałowym bruzdkowania. Wyniki te dostarczają argumentu na poparcie wcześniejszych obserwacji/wiedzy na temat wysokiego potencjału rozwojowego zarodków wykazujących najkrótszy czas osiągnięcia stadium 2- i 4-komórkowego.
- (ii) Wykazanie, że w 6-dniowych blastocystach rozwijających się *in vitro*, udział niezróżnicowanych komórek w całej populacji komórek blastocysty był na poziomie zbliżonym do występującego w zarodkach 3.50-3.75-dniowych, rozwijających się w warunkach *in vivo*. Odzwierciedla to stopień zaburzeń procesu różnicowania pierwszych linii komórkowych w blastocystach królika hodowanych *in vitro*.
- (iii) Potwierdzenie hipotezy, że aktywność wewnątrzkomórkowych szlaków metabolicznych u królika jest skorelowana ze stadiami rozwojowymi zarodka. Odnotowano zróżnicowanie podatności/zapotrzebowania zarodka na substraty energetyczne; i tak, na etapie bruzdkowania wykazano wyższą aktywność szlaku fosforylacji oksydacyjnej, a od stadium moruli odnotowano wzrost aktywności szlaków glikolizy i β -oksydacji kwasów tłuszczowych.

Do tej części rozprawy mam kilka uwag:

- str. 74 - dwa pierwsze akapity do Wstępu
- str. 83 - cały podrozdział 6.3 (jednostronicowy) do Wstępu i/lub Materiał i Metody
- str. 85/Wykres 2. – mało przejrzysty ze względu na zbyt dużo zmiennych parametrów (dwa podstadia rozwojowe blastocyst, hodowla w atmosferze 5% i 21% O₂, pożywka suplementowana różnymi dodatkami białkowymi), co utrudnia porównania między populacjami hodowanych zarodków. Zdecydowanie ułatwiłoby takie porównania przedstawienie danych na dwóch wykresach, na jednym – odsetek blastocyst hodowanych w

atmosferze 5% O₂, w kilku wariantach suplementacji pożywki, a na drugim – w atmosferze 21% O₂.

- str. 86, 88/Wykresy 3. i 5. – brak informacji dotyczącej wieku blastocysty E?
- str. 92/Wykres 8. – brak danych dotyczących odsetka blastocyst hodowanych w systemie PrimoVision, w pożywce suplementowanej FBS
- str. 92/Ryc.4 – w przedstawionej sekwencji zdjęć rejestrujących rozwój zarodków królika w trakcie hodowli w systemie PrimoVision, na drugim zdjęciu, zarodek opisano jako 4-komórkowy, w mojej opinii jest to zarodek 6-8 komórkowy, z kolei, na trzecim zdjęciu opisanym kompaktacja poprawniej byłoby wskazać stadium tego zarodka, czyli 8-16 komórkowy, z dopiskiem - kompaktacja
- i jeszcze uwaga, natury ogólnej – brak informacji na temat liczby powtórzeń w ramach każdego eksperymentu.

Dyskusja jest rzetelnym omówieniem znaczenia uzyskanych wyników, została napisana z dużą znajomością zagadnienia i obszernej literatury źródłowej. Chciałabym podkreślić, że jest to bardzo interesująca część rozprawy, zawierająca krytyczne omówienie uzyskanych wyników na tle danych literaturowych.

Do tej części rozprawy mam drobne uwagi, raczej sugestie:

- str.113 – nie ma uzasadnienia ten jednostronnicowy opis/wprowadzenie do dyskusji, które jest powtórzeniem treści zawartych we Wstępie i Celach badań
- str. 115 – Doktorantka zaprezentowała w formie schematu wzorzec różnicowania komórek blastocysty królika *in vivo*, warto byłoby przedstawić również taki schemat w odniesieniu do procesów różnicowania komórkowego (cytotyferencjacji) w blastocystach rozwijających się *in vitro*, w oparciu o najkorzystniejszy wariant hodowli, wynikający z przeprowadzonych badań własnych.
- str. 116 – Autorka pisze: „Należy zwrócić uwagę, że wiele badań porównujących rozwój zarodków hodowanych *in vitro* z rozwojem zarodków *in vivo*, jako porównywalny punkt końcowy przyjmuje stadium blastocysty. Jednak w rozwoju przedimplantacyjnym królika stadium blastocysty, czyli okres od momentu kawitacji (ok. E3.0/E3.25) do momentu implantacji (E6.5) trwa około 3 dni i 6-12 godzin. Zatem różni autorzy pisząc o stadium blastocysty opisywali zarodki zarówno 3.5-dniowe, jak i 6-dniowe”. W mojej opinii, autorzy, pisząc o blastocystach mają na uwadze uformowane blastocysty, z wyraźnie wyodrębnionym węzłem zarodkowym, a więc stadia późnej, ekspandującej blastocysty, a nie zarodki na etapach inicjowania procesu kawitacji.

Wnioski. Rozprawa zakończona jest sześcioma, dość ogólnie sformułowanymi wnioskami. Moje zastrzeżenia dotyczące wniosków:

- Wnioski są zbyt lakonicznie sformułowane, wymagają rozwinięcia i uprecyzjowania.
- brak wniosku stwierdzającego w sposób jednoznaczny, występowanie drastycznych różnic w jakości blastocyst królika rozwijających się w warunkach *in vitro* (radikalny spadek liczby komórek, zaburzony proces różnicowania się pierwszych linii komórkowych) w porównaniu do wzorca referencyjnego w postaci zarodków rozwijających się *in vivo*.
- wnioski nr 4 i nr 5 są *de facto* tożsame.

Szkoda, że Doktorantka nie wykorzystała wniosków, które w formie podsumowania zamieściła w kolejnych podrozdziałach Wyników.

Podsumowanie recenzji

Rozprawę doktorską Pani mgr Anny Chołoniewskiej pt.: **”Wpływ warunków hodowli *in vitro* na rozwój przedimplantacyjnych zarodków królika”** oceniam pozytywnie zarówno w wymiarze koncepcyjnym, jak i metodycznym. Obszerny materiał doświadczalny, bogaty warsztat metodyczny, oryginalne, dobrze udokumentowane i dogłębnie zinterpretowane wyniki, a także rozległa znajomość literatury przedmiotu świadczą o dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy badawczej. Warto również podkreślić, że przeprowadzenie badań wiązało się z ogromnym nakładem pracy. Uzyskane przez Doktorantkę oryginalne wyniki poszerzają naszą wiedzę na temat wpływu warunków hodowli *in vitro* na zmianę profilu morfokinetycznego zarodków królika. Natomiast, pytania, wątpliwości i sugestie wymienione w recenzji mają charakter wyłącznie porządkowy i dyskusyjny i nie obniżają ogólnej, pozytywnej oceny merytorycznej opracowania.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim w art.13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2014 roku z późniejszymi zmianami (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz.595; z 2005 r. Nr164, poz. 1365; z 2010 r Nr96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228; z 2011 r. Nr 84, poz. 455) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Genetyki i Biotechnologii Zwierząt w Jastrzębcu o dopuszczenie Pani mgr Anny Chołoniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.