

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

Balice, 12 maja 2020 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr Marcina Kuci

pt. „Wpływ subletalnego stresu w postaci wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na kompetencje rozwojowe i metabolizm zarodków świni podczas ich przedimplantacyjnego rozwoju”

*wykonanej pod kierunkiem dr hab. Marka Romka,
w Instytucie Zoologii i i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński
w Krakowie*

Rozwój technologii wspomaganego rozrodu zwierząt (ARTs; ang. *assisted reproductive technologies*), takich jak pozaustrojowe uzyskiwanie zarodków (IVP; ang. *in vitro embryo production*) w oparciu o zapłodnienie *in vitro* oraz klonowanie zarodkowe lub somatyczne, a także nowoczesnych metod embrionalnej inżynierii genetycznej takich jak transgeneza gamet i zarodków, szczególnego znaczenia nabiera w odniesieniu do biotechnologii reprodukcyjnej świń. Świnia domowa (*Sus scrofa domestica*), ze względu na wysoki stopień zgodności genetycznej, a także wielkość i wydolność swoich narządów, anatomicznie i fizjologicznie zbliżonych do narządów człowieka, jest atrakcyjnym gatunkiem zwierząt, coraz częściej wykorzystywanym w interdyscyplinarnych badaniach biomedycznych jako potencjalny dawca tkanek i organów do międzygatunkowej transplantacji (ksenotransplantacji) czy jako zwierzę modelowe m.in. chorób cywilizacyjnych, takich jak: cukrzyca, otyłość, zespół metaboliczny bądź choroby neurodegeneracyjne. Jednocześnie jest to gatunek, u którego skuteczność metod wspomaganego rozrodu jest niższa w porównaniu do innych gatunków zwierząt gospodarskich, być może uwarunkowana gatunkowo-specyficznymi różnicami w ultrastrukturze, biochemii i fizjologii molekularnej komórek zarodkowych świni, m.in. większą zawartością kropli lipidowych, a także wysokimi wymaganiami co do warunków pozaustrojowego środowiska hodowlanego. Jakość blastocyst, rozwijających się po zapłodnieniu *in vitro*, oceniana na podstawie całkowitej liczby komórek (zarówno komórek węzła zarodkowego jak i trofoektodermy) jest znacząco niższa w porównaniu do zarodków uzyskiwanych *in vivo*. Dlatego też, szczególnie uzasadnione jest podejmowanie badań, które mogą wnieść istotny wkład w poznanie molekularnych czynników i mechanizmów, warunkujących poprawę jakości hodowanych *in vitro* zarodków świni, a tym samym przyczynić się do uzyskiwania wartościowych zarodków o wysokim potencjale rozwojowym. Recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się w ten nurt badań.

Poświęcona jest problematyce jakości i kompetencji rozwojowych zarodków świni, w następstwie zastosowania stresora w postaci wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP; ang. *high hydrostatic pressure*). Doktorant badał reakcję/odpowiedź komórek zarodkowych (blastomerów) na stres HHP, zadany w stadium zygoty lub moruli, w oparciu o wybrane parametry aktywności mitochondrialnej takie jak: potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi_m$), poziom reaktywnych form tlenu (ROS), zawartość ATP w komórkach zarodkowych, a także dokonując pomiaru ekspresji białek enzymatycznych (heksokinazy II, syntazy cytrynianowej, palmitoilotransferazy karnityny I) uczestniczących w głównych szlakach metabolicznych (glikoliza, cykl Krebsa, β -oksydacja kwasów tłuszczowych) oraz objętości względnej kropli lipidowych w blastocystach.

Być może inspiracją do podjęcia badań w tym zakresie, były nieliczne publikacje sugerujące pozytywny wpływ HHP, w kontekście wydajności technik wspomaganego rozrodu zwierząt. W świetle powyższych rozważań tematykę recenzowanej pracy doktorskiej, dotyczącą oddziaływania ciśnienia hydrostatycznego na przedimplantacyjny potencjał rozwojowy i metabolizm zarodków świni, należy uznać za interesującą, ważną, innowacyjną i trafnie dobraną, jako krok w kierunku rozpoznania czynników i mechanizmów regulujących wewnątrzkomórkowe szlaki metaboliczne lipidów, znacząco różniących się od adekwatnych szlaków w komórkach zarodków innych gatunków ssaków, w tym zwierząt gospodarskich.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa licząca 120 stron posiada typową formę monografii. Rozpoczyna się streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz wykazem stosowanych skrótów. Wstęp (26 stron) zawiera 8 podrozdziałów, które wprowadzają czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. W dalszej kolejności, po jednostronicowym przedstawieniu celów badań rozpoczyna się opis materiałów i metod (21 stron). Następny rozdział, Wyniki (30 stron) są podzielone na 9 podrozdziałów, po których następuje dyskusja licząca 12 stron. Rozprawa kończy się przedstawieniem wniosków i zwięzłego podsumowania oraz spisem literatury zawierającym 156 pozycji.

Ocena merytoryczna

Wstęp. W rozdziale tym Doktorant pomieścił obszerną, starannie wyselekcjonowaną wiedzę leżącą u podstaw zagadnień będących przedmiotem rozprawy. Po ogólnym omówieniu parametrów decydujących o wewnątrzkomórkowej aktywności metabolicznej w oocytach i zarodkach takich jak: morfologia, liczebność i rozmieszczenie mitochondriów w środowisku cytoplazmatycznym komórki, skupił się na metabolizmie energetycznym tych organelli w komórkach zarodków świni, podkreślając gatunkowo-specyficzne różnice występujące między tym gatunkiem zwierząt, a innymi gatunkami ssaków, w tym człowiekiem, a także poruszając problem utleniania kwasów tłuszczowych. Podkreślił znaczenie mitochondriów w powstawanie wolnych rodników tlenowych (ROS), które są niezbędne do prawidłowego przebiegu wielu procesów życiowych, m.in. w regulacji ekspresji genów, procesów fosforylacji białek, stężenia wapnia w komórkach i.in., ale ich nadmiar jest powodem biodestrukcji elementów strukturalnych i funkcjonalnych komórek, co skutkuje śmiercią komórek w wyniku apoptozy lub nekrozy. Ponadto, opisał oddziaływanie

wewnątrzkomórkowych szlaków metabolizmu energetycznego na rozwój zarodkowy (embriogenezę) ssaków. Sposób rozplanowania tego rozdziału, logiczna prezentacja wątków tematycznych, nie budzą moich zastrzeżeń. Dodatkowo, we Wstępie Doktorant zamieścił 3 barwne ryciny, które w formie graficznej opisują wewnątrzkomórkowe szlaki metaboliczne, glikolizy i cyklu Krebsa oraz kompleksy białkowe tworzące łańcuch oddechowy.

Do tej części rozprawy mam pewne uwagi, które jednak nie mają wpływu na moją pozytywną ocenę tego tekstu.:

- zabrakło mi choćby krótkiego uzasadnienia dla wyboru świni domowej jako modelu zwierzęcego do przeprowadzenia zaprojektowanych badań, co czyniłoby ten wielowątkowy opis bardziej zwartym i logicznie uzasadnionym.

- str. 12, jest: „...u ludzi w żeńskich komórkach rozrodczych...”, powinno być „w żeńskich komórkach rozrodczych człowieka”

- str. 13 błąd ortograficzny „...specjalnym sekwencją sygnalizacyjnym”, poprawnie powinno być: „...sekwencjom...”

- str. 22, jest: „W hodowli zarodków *in vitro* obserwuje się zatrzymanie rozwoju zarodkowego wynikające prawdopodobnie z niemożności przejścia mitochondriów na wyższy stopień reorganizacji zapewniający zwiększoną produkcję energii w postaci ATP” - zamiast „z niemożności reorganizacji mitochondriów lub z niemożności przejścia mitochondriów na wyższy stopień organizacji...”. Warto również zauważyć, że blok rozwojowy ujawnia się najczęściej na etapie aktywacji genomu zarodkowego, a powody jego wystąpienia mogą być natury genetycznej jak i środowiskowej, i to może skutkować osłabieniem aktywności mitochondriów.

- str. 24 – niedokończone zdanie

- str. 26 jest: „oocytów ludzkich..” powinno być: „oocytów człowieka”

- str. 37 , drugi akapit; jest: „wzrost ekspresji różnorodnych genów m.in...”, raczej: „wzrost ekspresji niektórych genów, m.in...”, bądź „wzrost ekspresji wielu genów, m.in...”

- str. 38; jest: „Obecnie jednak nikt nie opisał zmian...” raczej : „Dotychczas nikt nie opisał zmian...”

Cele pracy zostały dość jasno przedstawione w postaci celu głównego i 8 celów szczegółowych. Mam jednak kilka zastrzeżeń do tej części rozprawy:

- brak jasno sprecyzowanej hipotezy badawczej, aczkolwiek nie do końca, ponieważ w rozdziale Dyskusja można doszukać się elementów tej hipotezy, ale to właśnie w tym miejscu powinna być wyraźnie sformułowana.

- cel szczegółowy nr 2 jest nieprecyzyjnie zdefiniowany i przez to niezrozumiały.

- moja wątpliwość, polemicznej natury, dotyczy przyjętego przez Doktoranta określenia: „szybka lub długotrwała odpowiedź komórek zarodkowych”, w reakcji na stres zadany w postaci HHP w stadium zygoty lub moruli. Zastanawiam się, czy bardziej adekwatnym terminem nie byłoby określenie *wczesna lub późna* odpowiedź na stres HHP.

Materiał i metody zostały opisane w odrębnych podrozdziałach, które dobrze korespondują z przedstawionymi celami szczegółowymi. Na podkreślenie zasługuje złożony warsztat metodyczny Doktoranta, który wykorzystał do badań szereg nowoczesnych metod i technik

badawczych, w tym z zakresu mikroskopii konfokalnej, transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz technik immunohistochemicznych i biochemicznych, a także biotechnologicznych z dziedziny rozrodu (przyżyciowe pozyskiwanie oocytów i zarodków od stymulowanych hormonalnie samic-dawczyń, hodowle *in vitro* zarodków). Wymagało to opanowania wielu nowych umiejętności i ogromnego nakładu pracy. Metody zostały prawidłowo dobrane do potrzeb realizacji założonych celów. Rozdział Materiały i metody wzbogacony został trzema rycinami ilustrującymi m.in. sposób liczenia objętości względnej mitochondriów względem jednostkowej objętości cytoplazmy oraz powierzchni względnej zewnętrznej błony mitochondrialnej względem jednostkowej objętości mitochondrium, w oparciu o obraz z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM).

Do tej części rozprawy mam następujące uwagi:

- w oparciu o jakie kryteria/przesłanki ustalono wartość subletalnego stresu HHP dla zarodków świni na poziomie 20 MPa?
- czy uzasadnione jest używanie określenia subletalny w odniesieniu do HHP, gdyż stresor ten nie wywoływał zwiększenia częstości występowania śmierci apoptotycznej lub nekrotycznej w przeważającej części komórek zarodków, w konsekwencji prowadzącej do wzmożonej śmiertelności zarodkowej?
- w pierwszym podrozdziale oprócz odczynników chemicznych warto byłoby umieścić również wykaz specjalistycznej aparatury/sprzętów wykorzystywanych do badań
- bardziej zasadne byłoby umieszczenie schematu/opisu doświadczeń na końcu rozdziału, a nie na początku.

Wyniki prac eksperymentalnych zostały przedstawione starannie i udokumentowane w postaci czytelnych diagramów słupkowych, 11 tabel oraz 20 fotogramów z mikroskopu konfokalnego, transmisyjnego mikroskopu elektronowego, fluorescencyjnego i kontrastowo-fazowego, które w zdecydowanej większości są znakomitej jakości, i bardzo dobrze uzupełniają/ilustrują opisywane wątki. Uzyskane wyniki wnoszą nowe i ważne treści do ogólnej wiedzy na temat oddziaływania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na potencjał rozwojowy i wewnątrzkomórkowy metabolizm zarodków świni.

Do tej części rozprawy mam kilka uwag:

- str. 63; pomyłka w tekście „...nie wykazano statystycznie istotnych różnic ($p < 0,05$)...”, jeśli tak, to powinno być ($p > 0,05$); ten błąd powtarza się także na kolejnych stronach: 68,74,77
- str. 64; Ryc. 10, na obrazach spod mikroskopów (kontrastowo-fazowego i fluorescencyjnego) przedstawiono blastocysty kontrolne, nie poddawane stresowi HHP, w których oceniano poziom ROS, w oparciu o intensywność fluorescencji, po wybarwieniu specyficznym fluorochromem (kontrola pozytywna) i nie barwionych (kontrola negatywna). W kontroli pozytywnej, przed wybarwieniem zarodki dodatkowo inkubowano w 2% nadtlenu wodoru w celu zwiększenia poziomu ROS i tego nie rozumiem, bo w tej sytuacji nie oceniano rzeczywistego poziomu ROS w blastocystach kontrolnych tylko chemicznie indukowanego. Moją wątpliwość budzi także jakość zarodków z kontroli pozytywnej - raczej nie przypominają one blastocyst.
- str. 64; proponuję zmodyfikować tytuł podrozdziału 4.2, „Pomiar czasowego przebiegu zmian...”, na „*Sekwencyjny pomiar przebiegu zmian...*”

- str. 68; „Opisane powyżej modyfikacje parametrów blastocyst wykryte po zastosowaniu HHP w stadium moruli były podobne do parametrów blastocyst uzyskanych po zastosowaniu HHP w stadium moruli z wyjątkiem...), domyślam się, że miało być „Opisane powyżej modyfikacje parametrów blastocyst wykryte po zastosowaniu HHP w stadium **zygoty** były podobne do parametrów blastocyst uzyskanych po zastosowaniu HHP w stadium moruli z wyjątkiem...)

Dyskusja jest rzetelnym omówieniem wyników, została napisana z dużą znajomością zagadnienia i literatury źródłowej. Jest to bardzo interesująca część rozprawy, zawierająca obszerne omówienie wszystkich badanych wątków.

Do tej części rozprawy mam kilka uwag:

- str. 90; w pierwszym zdaniu Dyskusji Doktorant użył dość niefortunnego określenia „... wpływ HHP...na ważne funkcje komórkowe ich blastomerów...”, poprawniej byłoby „wpływ HHP...na metabolizm wewnątrzkomórkowy zarodków...”

- str. 90/91; zbędne powtórzenia o charakterze metodycznym

- str. 91; błędnie zacytowana praca (Sturmeijer i Leese, 2003)

- str. 93; brak statystycznie istotnych różnic w zawartości ATP w komórkach zarodków traktowanych HHP i kontrolnych Doktorant interpretuje zbyt małą liczbą powtórzeń (4-6), z jego kalkulacji wynika, że powinno ich być 15-20, a minimalna liczba zarodków na poziomie 1000. Czy należy zatem przyjąć, że uzyskanych wyników dotyczących pomiarów zawartości ATP, nie można jednoznacznie ocenić ?

- str. 96; stwierdzenie: „Wyniki te wskazują, że stres HHP zastosowany w szczególności w stadium zygoty jest bardziej skuteczną metodą produkcji zarodków świni *in vitro* niż standardowy system hodowli w pożywce NCSU-23” jest fałszywym stwierdzeniem, ponieważ HHP nie jest metodą produkcji zarodków, a jedynie czynnikiem, który może wpływać na ich potencjał rozwojowy, a po drugie pożywka NCSU-23 z różnymi modyfikacjami była/jest powszechnie stosowana w hodowli *in vitro* zarodków świni, również w tym doświadczeniu zarodki, zarówno traktowane HHP jak i kontrolne, hodowano w takich warunkach. Dlatego nie można tych metod przeciwstawiać i poprawniej będzie sformułować to następująco: „Wyniki te wskazują, że stres HHP zastosowany w szczególności w stadium zygoty *skutecznie zwiększa potencjał rozwojowy zarodków świni, hodowanych w standardowych warunkach hodowli z użyciem pożywki NCSU-23.*”

Wnioski. Rozprawa zakończona jest ośmioma, w większości logicznie sformułowanymi wnioskami wskazującymi osiągnięcia naukowe wykonanej pracy. Doktorant wykazał, m.in., że: 1) HHP w stadium zygoty lub moruli oddziałuje korzystnie na potencjał rozwojowy *in vitro* zarodków świni, a także na ich jakość, 2) HHP w stadium zygoty lub moruli wywołuje szybką i długotrwałą odpowiedź komórek zarodkowych w postaci obniżenia produkcji energii w oparciu o fosforylację oksydacyjną, a w konsekwencji redukcję poziomu stresu oksydacyjnego, przy zachowaniu wzmożonej produkcji energii w beztlenowym szlaku glikolizy; 3) HHP w stadium zygoty wpływa na zmiany morfologiczne i ultrastrukturalne mitochondriów w komórkach blastocysty, powodując wzrost objętości tych organelli oraz pola powierzchni wewnętrznej błony mitochondrialnej; 4) HHP w stadium zygoty indukuje wzrost ekspresji białek enzymatycznych (heksokinazy II i syntazy cytrynianowej), natomiast

nie powoduje zmian w poziomie ekspresji palmitoilotransferazy karnityny II; 5) HHP w stadium zygoty nie wpływa na zmianę objętości kropli lipidowych, ale skutkuje obniżeniem poziomu całkowitej zawartości lipidów w komórkach blastocysty.

Moje zastrzeżenia dotyczą wniosku 2:

- Wniosek jest zbyt lakoniczny, wymaga uściślenia

Podsumowanie recenzji

Rozprawę doktorską mgr. Marcina Kuci pt. "Wpływ subletalnego stresu w postaci wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na kompetencje rozwojowe i metabolizm zarodków świni podczas ich przedimplantacyjnego rozwoju" oceniam pozytywnie zarówno w wymiarze koncepcyjnym jak i metodycznym. Uzyskane wyniki posiadają nowatorski charakter, są znacząco poznawcze i inspirują do poszerzenia badań w oparciu o zarodki uzyskiwane w wyniku zastosowania takich technik wspomaganego rozrodu jak zapłodnienie in vitro (IVF) oraz klonowanie somatyczne (SCNT). Wymienione w recenzji uwagi mają wyłącznie charakter porządkowy i dyskusyjny i w żaden sposób nie obniżają ogólnej, pozytywnej oceny merytorycznej opracowania. Rozprawa spełnia wszystkie wymagania 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).

Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Marcina Kuci do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

