

**Dr hab. Marek Romek**  
Zakład Biologii i Obrazowania Komórki  
Instytut Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego  
ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków  
tel.: +12 664 53 41  
e-mail: marek.romek@uj.edu.pl

Kraków, 7 września 2016 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Joanny Romanek

pt. *"Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) na jakość kriokonserwowanych mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) świni"*

Komórki macierzyste pochodzące z dojrzałego organizmu, specyficzne dla różnych tkanek i organów mogą być namnażane in vitro w ściśle określonych warunkach hodowli wykazując samoodnawialność, ekspresję specyficznych markerów i potencjał do różnicowania się w określone linie komórkowe. Wykazano również ich ogromną plastyczność i potencjał rozwojowy. Wśród nich multipotencjalne, mezenchymalne komórki macierzyste, izolowane między innymi ze szpiku kostnego wykazują potencjał do różnicowania w komórki linii mezenchymalnych, między innymi kości, tkanki chrzęstnej i tłuszczowej. Wykorzystywane są w badaniach biomedycznych, klinicznych i przedklinicznych, oraz przy opracowywaniu różnorodnych metod terapeutycznych w tym terapii komórkowych i transplantacji. Obecnie świnia, w porównaniu z takimi gatunkami jak mysz czy szczur, uważana jest za najlepszy model zwierzęcy w nowoczesnych badaniach klinicznych, medycynie regeneracyjnej i transplantologii, z uwagi na jej wysokie podobieństwo do człowieka: posiada 96% zgodność genetyczną, podobną morfologię i wielkość organów, fizjologię oraz system immunologiczny. Biorąc pod uwagę fakt uzyskania świń zmodyfikowanych genetycznie poprzez wprowadzenie ludzkich transgenów, taki model staje się jeszcze bardziej adekwatny. Potencjał terapeutyczny MSC świni jest duży. Komórki te używane są w wielu eksperymentalnych modelach, np.: ostry zawał mięśnia sercowego, regeneracja skóry, niewydolność wątroby czy uszkodzenia chrzęstno-kostne. Z drugiej strony efektywność technik kriokonserwacji komórek jest aktualnie niewystarczająca. Korzystny

efekt działania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na różnorodne komórki, gamety i zarodki ssaków był do tej tematu stosunkowo niewielkiej liczby publikacji. Udowodniono, że zastosowanie HHP w przypadku zarodków myszy, bydła, owcy i świni przyczyniało się do zwiększenia ich kompetencji rozwojowych oraz jakości podczas rozwoju *in vitro*. Zwiększeniu uległa również ich tolerancja na późniejsze stresy w tym kriokonserwację poprzez zwiększenie ekspresji białek chaperonowych, które zaangażowane są w różnorodne procesy komórkowe, takie jak naprawa DNA, kontrola cyklu komórkowego czy metabolizmu energetycznego.

Z uwagi na powyżej przytoczone fakty temat recenzowanej rozprawy doktorskiej, czyli analiza wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na kriokonserwowane mezenchymalne komórki macierzyste świni wyizolowane ze szpiku kostnego, jest w mojej ocenie ważny, innowacyjny oraz trafnie dobrany.

Praca posiada typową i optymalną formę rozprawy doktorskiej. Po streszczeniu oraz spisie użytych oznaczeń i skrótów zamieszczono wyczerpujący, 14-sto stronicowy wstęp, który został napisany na podstawie szerokiego przeglądu dostępnej literatury. Po jego lekturze można stwierdzić, że Doktorantka dogłębnie zapoznała się ze wszystkimi aspektami swojej tematyki badawczej. Sposób rozplanowania tego rozdziału, jego przejrzystość i logiczność nie budzi moich zastrzeżeń. Doktorantka opisuje w nim kolejno szpikowe mezenchymalne komórki macierzyste (MSC), markery multipotencji, problemy jakie rodzi kriokonserwacja tych komórek ze szczególnym uwzględnieniem procesów apoptozy i opisem funkcji różnorodnych białek, które biorą w tych procesach udział. Autorka zajęła się również omówieniem roli dezoksyrybonukleazy aktywowanej przez kaspazę jak również analizą roli surwiwiny, białka należącego do rodziny inhibitorów apoptozy, podczas rozwoju oocytów i zarodków *in vitro*. Wstęp kończy bardzo obszerny opis wpływu zastosowania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na rozwój gamet i zarodków ssaków oraz na poprawę efektywności metod ich kriokonserwacji. Omawia również wpływ pokrewnej techniki, cyklicznego ciśnienia hydrostatycznego na biologię MSC oraz obecny stan wiedzy o mechanizmach odpowiedzialnych za reakcję komórek na stres wywołany ciśnieniem hydrostatycznym.

W oparciu o tą wiedzę Doktorantka planuje realizację głównego celu swoich badań, jakim jest opracowanie efektywnej, ulepszonej techniki kriokonserwacji komórek MSC świni poprzez poddanie ich działaniu HHP. By osiągnąć ten cel, poprawnie zaplanowano imponujący cykl doświadczeń i analiz wykonanych przy pomocy licznych technik opisanych

wyczerpująco w rozdziale „Materiały i Metody”. W pierwszym etapie, na podstawie oceny żywotności komórek, tempa ich proliferacji, apoptozy, ekspresji surwiwiny i ekspresji 3 markerów multipotencji MSC wybrano optymalną wartość HHP dla komórek poddanych kriokonserwacji. Dla tych wybranych wartości analizowano później wpływ HHP na efektywność kriokonserwacji poprzez ocenę poziomu zmian apoptotycznych w trzech fazach. Posłużono się tutaj nowoczesnymi technikami badawczymi, między innymi: Western-blotting, chemiluminescencją, immunofluorescencją czy też ilościową reakcją RT-PCR. Mój podziw budzi liczba analizowanych w trakcie badań transkryptów i białek. Zastanawiam się jednak, dlaczego z listy analizowanych markerów multipotencji pominięto czynnik transkrypcyjny Oct4? Dodatkowo, czy podczas wstępnych badań próbowano różnicować wyizolowane ze szpiku komórki MSC w kierunku chondrocytów, osteocytów lub adipocytów? Za wyjątkowo cenną technikę zastosowaną w niniejszej pracy uważam analizę zdolności funkcjonalnych MSC poprzez ocenę jakości blastocyst bydłych uzyskanych *in vitro* współhodowanych z komórkami MSC. Pragnę podkreślić, że w celu opracowania i zastosowania tego nowatorskiego, lecz niezwykle pracochłonnego modelu eksperymentalnego Doktorantka musiała dodatkowo poznać kilka trudnych technik takich jak: uzyskiwanie oocytów, dojrzewanie i zapłodnienie *in vitro* oraz hodowla zarodków do stadium blastocysty. Zapewne z uwagi na dużą liczbę użytych w pracy technik, przez nieuwagę nie podano szczegółowo procedury premedykacji i znieczulenia ogólnego świni lub odpowiedniej cytacji, str. 35, oraz niedokładnie opisano procedurę dwustopniowego zamrażania komórek MSC, str. 36.

W rozdziale „Wyniki”, w sposób przejrzysty i zwięzły Doktorantka zaprezentowała dane uzyskane w trakcie wykonywanych przez siebie eksperymentów posługując się licznymi rycinami, tabelami, zdjęciami i mikrofotografiami. Na uwagę zasługuje wysoka jakość tej prezentacji, na tle której jedynie fotografie Fot. 1 na str. 49 i Fot. 7 na str. 61 prezentują się niekorzystnie. W celu ustalenia najkorzystniejszej wartości HHP (40 i 60 MPa) zastosowanego przed kriokonserwacją komórek MSC, analizowano ich żywotność, tempo proliferacji, ekspresję markerów pluripotencji jak również stopień zmian apoptotycznych mierząc ekspresję białka Bax, zliczając odsetek żywych komórek po barwieniu błękitem trypanu, wykrywając fosfatydyloserynę i jodek propidyny oraz oznaczając ilość transkryptów C-myc, Rex1, Sox2 i surwiwiny. W drugim etapie, dla wybranych wartości HHP i grupy kontrolnej oceniano stopień zaawansowania apoptozy poprzez analizę: aktywności kaspazy 8, ekspresji białek Bax, Bcl<sub>L</sub> i Bcl<sub>S</sub>, surwiwiny i CAD. Oceniono również wpływ HHP na zdolności funkcjonalne MSC poprzez ich współhodowle z zarodkami bydłymi mierząc

odsetek dzielących się zarodków i uzyskanych blastocyst oraz stopień fragmentacji DNA w blastocystach metodą TUNEL. Analiza statystyczna została wykonana prawidłowo z zastosowaniem adekwatnych testów. Uzyskane wyniki sugerują, że zastosowanie HHP przed kriokonserwacją nie wykazuje negatywnego wpływu na jakość komórek lecz zwiększa ich żywotność po rozmrożeniu i tempo proliferacji. Można więc stwierdzić, że cel pracy został przez Doktorantkę zrealizowany. Zastosowanie MSC świni do współhodowli zarodków bydłęcych nie dało oczekiwanych wyników, wpływa bowiem niekorzystnie na odsetek uzyskanych blastocyst. Nasuwa się tutaj pytanie czy różnice międzygatunkowe nie miały wpływu na uzyskane w niniejszej pracy wyniki?

W rozdziale „DYSKUSJA”, z uwagi na nowatorski charakter pracy, uzyskane wyniki przedyskutowane zostały wieloaspektowo. Logiczność wywodów nie budzi jakichkolwiek zastrzeżeń. Nie zastosowałbym jedynie sformułowania, które deprecjonuje wyniki uzyskane przez Doktorantkę, cyt.: „jednak zbyt mała liczba ocenianych blastocyst nie pozwala na sformułowanie wiarygodnych wniosków”. Uważam bowiem, że otrzymane na tym etapie badań wyniki są wiarygodne, ponieważ Doktorantka uzyskała statystycznie istotne różnice pomiędzy wartościami indeksu apoptotycznego dla różnych grup blastocyst. Oczywiście są to wyniki wstępne, które należy potwierdzić na większej próbie losowej.

Za najbardziej wartościowe osiągnięcia w pracy Pani mgr inż. Joanny Romanek uważam:

- (1) dokładną analizę procesów apoptozy na etapie inicjacji, fazy wykonawczej i zniszczenia dla komórek MSC świeżych, poddanych kriokonserwacji oraz HHP
- (2) zastosowanie HHP w celu ulepszenia metody kriokonserwacji komórek MSC oraz ze względu na innowacyjność
- (3) zastosowanie współhodowli MSC i przedimplntacyjnych zarodków do oceny zdolności funkcjonalnych komórek.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Joanny Romanek inspiruje do podjęcia kolejnych badań i eksperymentów, co również świadczy o jej wysokim poziomie naukowym. Osobiście byłbym zainteresowany wpływem współhodowli mezenchymalnych komórek macierzystych świni wyizolowanych ze szpiku kostnego i zarodków świni na potencjał rozwojowy oraz jakość w ten sposób uzyskanych blastocyst. Na podstawie dotychczasowych badań udowodniono, że kriokonserwacja komórek, oocytów i zarodków obniża ich metabolizm prowadząc między innymi do spadku potencjału na wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Ciekawa więc byłaby analiza głównych szlaków metabolicznych, w tym glikolizy w komórkach MSC i wpływ HHP

na te procesy. Odrębnym zagadnieniem byłyby badania poziomu aktywnych form tlenu, dysmutazy ponadtlenkowej i katalaz w takim układzie eksperymentalnym.

Recenzowana praca liczy ogółem 94 strony tekstu, 10 tablic z fotografiami wizualizującymi uzyskane wyniki, w tym 7 tablic z mikroskopowymi zdjęciami analizowanych komórek i zarodków jak również 11 rycin i 9 tabel, które zawierają trzy schematyczne plany zrealizowanych doświadczeń oraz uzyskane wyniki wraz z ich opracowaniami statystycznymi. Starannie zredagowany spis cytowanych w pracy publikacji zawiera 123 pozycje, w większości opublikowane w ciągu kilku ostatnich lat. Pragnę podkreślić wysoki poziom edytorski rozprawy, znalazłem w niej znikomą liczbę błędów literowych i interpunkcyjnych. Moim zdaniem rozprawa napisana została w sposób prosty i precyzyjny, a do strony językowej nie wnoszę żadnych zastrzeżeń. Z obowiązku recenzenta wymienić muszę zauważone przeze mnie, nieliczne błędy edytorskie lub niezręczności językowe:

- w rozdziale „WYNIKI” nie zamieszczono tytułu podrozdziału „Ocena poziomu multipotencji MSC”, str. 51,
- sformułowania: „wysoce statystycznie istotnie wyższą” str. 5 w. 4 od góry, „statystycznie niższym” str. 5 w. 10 od góry, „statystycznie wysoce istotne różnice” str. 50 w. 7 od góry, „statystycznie wysoce istotny wzrost ”str. 66 w. 6 od dołu, str. 67 w. 1 od dołu są niezręczne, możemy powiedzieć, że są to np. „statystycznie istotne różnice przy wysokim poziomie istotności”,
- zamiast terminu „membrany” proponuję użyć terminu „błony”, str. 17 w. 16 od dołu,
- zamiast żargonowego pojęcia „komórki granulocyty” używałbym raczej sformułowania „komórki ziarniste”, str. 46 w. 1 i 9 od góry,
- w opisie fotografii zamieszczał bym skalę, a nie wartości powiększeń: Fot. 2, 3, 9 tak jak zrobiono to w przypadku pozostałych zdjęciach mikroskopowych,
- sformułowania: „światło fluorescencyjne” i „światło widzialne” w opisie mikrofotografii wykonanych technikami mikroskopii fluorescencyjnej i mikroskopii świetlnej jasnego pola jest niezręczne, str. 55, światło fluorescencyjne jest także światłem widzialnym,
- sformułowanie „pozytywny sygnał fluorescencji” jest niezręczne, str. 73 w. 4 od góry,
- w Bibliografii, gdy wymieniamy kilka prac tego samego autora, drugim kryterium ich uporządkowania powinien być rok wydania, czego nie uwzględniono w przypadku prac Pani Opieli i Pana Pribenszky’ego.

Pragnę stanowczo podkreślić, że powyższe, nieliczne edytorskie niedociągnięcia nie wpływają na wysoką ocenę wartości naukowej recenzowanej pracy.

W podsumowaniu stwierdzam, że Pani mgr inż. Joanna Romanek swoją pracę opisaną w recenzowanej rozprawie doktorskiej prawidłowo zaplanowała, starannie wykonała, a cele badawcze zostały zrealizowane. Uzyskane przez Nią oryginalne wyniki w istotny sposób poszerzają istniejącą wiedzę na temat kriokonserwacji komórek macierzystych.

**W związku z powyższym wysoko oceniam wartość naukową rozprawy Pani mgr inż. Joanny Romanek i stwierdzam, że spełnia ona wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim, w szczególności warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 z 2003 r., poz. 595 z późniejszymi zmianami). Na tej podstawie zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Pani mgr inż. Joanny Romanek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



*dr hab. Marek Romek*