

Prof. dr hab. Jan Udała  
Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt  
i Higieny Środowiska  
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny  
w Szczecinie

### Recenzja

**pracy doktorskiej mgr Joanny Romanek *Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) na jakość kriokonserwowanych mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) świni* wykonanej w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie pod kierunkiem dr hab. Jolanty Opieli**

Dzięki wyjątkowym właściwościom do odnawiania się i różnicowania w różne linie komórkowe, mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) są obiektem badań naukowców różnych dziedzin, dając nadzieję w pierwszym rzędzie na ich zastosowanie w medycynie regeneracyjnej jak również wykorzystanie w biologii i biotechnologii, w tym zwiększeniu efektywności metod wspomagających rozród. Opanowanie metod pozyskiwania i izolacji tych komórek stworzyło nowe możliwości w zakresie szerszego poznania ich właściwości i dało impuls do szybkiego rozwoju badań w tym kierunku. W nurt tych badań, z dużym powodzeniem, włączył się również Zespół Działu Biotechnologii Rozrodu Zwierząt IZ PIB w Krakowie. Wykonane w tym Zespole nowatorskie i interdyscyplinarne prace, w które mocno zaangażowana była Promotor niniejszej rozprawy, przyczyniły się do bliższego poznania właściwości i możliwości modyfikacji MSC izolowanych ze szpiku kostnego oraz wyjaśnienia mechanizmów ich różnicowania w żądany typ komórek. Do szerszego zajęcia się MSC skłaniały również Zespół możliwości wykorzystania ich do przedimplantacyjnego zwiększenia potencjału rozwojowego zarodków, w tym klonalnych świń, który to problem rozwiązywany jest w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt od lat.

Stąd też, podjęcie badań przez Autorkę pracy nad możliwością wykorzystania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego do ograniczenia strat jakie występują w czasie konserwacji MSC oraz poprawą efektywności produkcji zarodków bydlęcych, należy uznać za interesujące i uzasadnione, zważywszy znaczenie realizowanych prac dla rozwoju badań z zakresu nowoczesnej medycyny regeneracyjnej oraz ochrony zdrowia ludzi i zwierząt. Podjęty problem badawczy wpisuje się w nurt badań realizowanych aktualnie na świecie, zmierzających do bliższego poznania właściwości MSC oraz możliwości ich modyfikacji.

Przedstawione we wstępie recenzji wybrane aspekty z zakresu znaczenia MSC i konieczności rozwijania nad nimi badań, podkreślają ważność podjętej tematyki pracy doktorskiej, a zarazem celowość jej wykonania. Ma ona charakter studium eksperymentalnego dotyczącego w głównej mierze wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) na wybrane właściwości biologiczne i zdolności funkcjonalne mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) świni.

Praca liczy 94 stron maszynopisu, zawiera 123 pozycje piśmiennictwa, z czego 112 stanowią prace obcojęzyczne (anglojęzyczne) oraz zawiera 11 rycin, 9 tabel i 10 fotografii. Praca została napisana według klasycznego schematu przyjętego dla tego rodzaju opracowań naukowych, z podziałem na rozdziały: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, bibliografia. Na początku pracy zamieszczono streszczenia w języku polskim i angielskim oraz stosowane skróty i oznaczenia, a na końcu pracy spis rycin, tabel i fotografii.

We wstępie, będącym zarazem przeglądem literatury, Autorka zaznacza, że w trakcie kriokonserwacji żywych komórek dochodzi zarówno do uszkodzeń mechanicznych obniżających wyniki ich odzyskiwania, jak również innych zaburzeń, między innymi indukcji procesu apoptozy. Po krótkim wyjaśnieniu tego procesu podaje możliwości ograniczenia jego negatywnych skutków wskazując, że jedną z dróg poprawy efektywności kriokonserwacji komórek może być indukcja reakcji obronnych poprzez poddawanie ich działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Mając na uwadze pozytywny wpływ tego parametru na poprawę kriotolerancji komórek rozrodczych przyjęto, że podobny efekt będzie w przypadku mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC). Dalej Doktorantka charakteryzuje te komórki podkreślając ich multipotentny charakter i wykazywanie ekspresji wielu markerów powierzchniowych przy jednoczesnym braku antygenów charakterystycznych dla komórek endotelialnych oraz hematopoetycznych. Wymienia także markery na podstawie, których określany jest multipotentny charakter MSC, omawiając trzy z nich, gen Rex1, Sox2 i C-myc, wykorzystane w swojej pracy. Podaje, że komórki o potwierdzonej ekspresji tych genów mogą być izolowane ze szpiku kostnego, co pozwala uzyskiwać duże ilości materiału od jednego osobnika, który trzeba przechować. Ze względu na fakt, iż efektywność kriokonserwacji nie jest jeszcze zadawalająca, a proces ten może wpływać także na właściwości biologiczne MSC, zachodzi potrzeba opracowania efektywnej metody pozwalającej zminimalizować wpływ zamrażania i rozmrażania na procesy biologiczne komórek. Uzupełnieniem tej części rozważań Autorki jest przedstawienie związków osłaniających wykorzystywanych w kriokonserwacji, z podziałem na penetrujące



i niepenetrujące. Omawiając najczęściej wykorzystywane związki w tych grupach i zmiany zachodzące w komórkach nawiązuje do apoptozy. Przytacza najnowsze prace kilku autorów z ostatnich lat dowodzące, że w rozmrażanych kriokonserwowanych MSC aktywowane są oba szlaki apoptozy – wewnętrzny i zewnętrzny, których możliwe jest hamowanie. Szlaki te następnie omawia, wskazując na dominujące znaczenie kaspaz, łączących powyższe szlaki, które można podzielić na inicjatorowe i wykonawcze. Wyjaśniając w przystępny sposób zmiany zachodzące w czasie apoptozy, podkreśla znaczenie kaspazy 8, będącej kaspazą inicjującą i formującą kompleks aktywujący sygnał śmierci. Zaznacza, iż obecność powyższej kaspazy jest wymagana do indukcji apoptozy szlakiem zewnętrznym. Podczas przebiegu natomiast szlaku wewnętrznego dochodzi do zachwiania równowagi między ilością wytwarzanych białek pro- i antyapoptycznych. Szerzej charakteryzuje białko Bax, powszechnie stosowane jako marker jakości oocytów i zarodków oraz białko Bcl<sub>x</sub>, mogące występować w dwóch izoformach: Bcl<sub>xL</sub> i Bcl<sub>xS</sub>. Opierając się na pracach innych autorów Doktorantka zaznacza, iż poziom ekspresji białek pro- i antyapoptycznych oraz kaspaz jest wykorzystywany również w ocenie jakościowej MSC.

Ważnym białkiem należącym do rodziny inhibitorów apoptozy, którego mechanizm działania w tym procesie opisuje Autorka, jest surwiwina. Poza oddziaływaniem na kaspazy 3 i 9, dodatkowo działa ona także w mechanizmie niezależnym od kaspaz hamując apoptozę poprzez inhibicję uwalniania czynnika indukującego apoptozę z mitochondrium. Różnice w poziomie ekspresji tego białka pozwalają typować go na markera jakości zarodków, co zostało wykorzystane w niniejszej pracy.

Obydwie drogi inicjacji apoptozy, jak opisuje dalej Autorka, prowadzą do aktywacji kaspazy 3, należącej do tzw. kaspaz wykonawczych, która pośrednio przyczynia się do fragmentacji DNA. Dalej przedstawia szczegółowo ścieżkę tego procesu, podkreślając w nim rolę białka dezoksyrybonukleazy aktywowanej przez kaspazę (CAD) i jego inhibitora (ICAD). Ze względu na potwierdzoną rolę białka CAD w degradacji chromatyny, zostało ono wykorzystane przez Autorkę niniejszej pracy do oceny jakości MSC pod kątem zmian apoptotycznych, zachodzących w czasie poddawania tych komórek działaniu HHP i kriokonserwacji.

Końcowa część rozdziału poświęcona jest głównemu czynnikowi badawczemu, tzn. wysokiemu ciśnieniu hydrostatycznemu (HHP). Na kilku stronach Doktorantka prezentuje aktualny stan wiedzy dotyczący wpływu tego czynnika na różne komórki organizmu i rozwijane kierunki badań z wykorzystaniem techniki HHP. Podkreśla wszechstronne możliwości jej zastosowania, m.in. w medycynie, technologii żywności, biotechnologii,

w tym również do poprawy jakości gamet i zarodków oraz komórek macierzystych ssaków hodowanych *in vitro*. Istotnym w kontekście realizowanych przez Nią badań jest przedstawienie możliwych dróg korzystnego oddziaływania HHP na organizm i komórki. W interesujący sposób omawia między innymi rolę białek opiekuńczych chaperonów, zwłaszcza należących do tej grupy białek szoku cieplnego (HSP), a wśród nich należące do rodziny HSP70, będącymi inhibitorami apoptozy. W pełni zatem słusznym, jednocześnie przekonującym i uzasadniającym celowość podjętych badań jest stwierdzenie Autorki, że komórki poddane HHP mogą zakumulować większą ilość białek opiekuńczych niż w warunkach fizjologicznych, dzięki czemu w przypadku działania kolejnego czynnika stresogennego, jakim jest np. kriokonserwacja, mogą one szybciej przeciwdziałać zachodzącym niekorzystnym zmianom.

Po przedstawieniu najważniejszych cech uzasadniających wybór HHP jako stresora, w dalszej części swoich rozważań Autorka zaznacza, że czynnik ten może być wykorzystany w technikach wspomaganego rozrodu do poprawy stopnia przeżywalności gamet po kriokonserwacji, hodowli *in vitro*, transferze jądra komórki somatycznej lub przy stosowaniu inseminacji. Przytacza szereg prac badawczych wykonanych na oocytach oraz blastocystach świni i myszy, wskazujących na zmienne efekty wpływu HHP na ich jakość w zależności od innych czynników, m.in. temperatury, pożywki, wysokości ciśnienia itp. Prace te jednoznacznie wskazują, że HHP wpływa nie tylko na poziom ekspresji genów, ale także na piętnowanie rodzicielskie genów podczas rozwoju embrionalnego. Parametr ten może również wpływać na ruchliwość plemników i ich zdolność zapładniającą.

Na tle realizowanych prac związanych z komórkami płciowymi i zarodkami, niewiele wiadomo o wpływie HHP na komórki macierzyste lub wykorzystaniu tych komórek poddanych działaniu HHP w współhodowli zarodków zwierząt. Badania, jakie realizowano na tych komórkach, dotyczyły cyklicznego ciśnienie hydrostatycznego. Był to zapewne istotny argument, motywujący do przeprowadzenia niniejszych badań.

*Podsumowując prezentowany rozdział wstęp, będący zarazem przeglądem piśmiennictwa, na szczególne podkreślenie zasługuje sposób i forma przedstawienia informacji. Jest ona jasna i przejrzysta. Autorka potrafiła zaprezentować trudne zagadnienia w przystępnym i zrozumiałym dla czytelnika układzie. Wykorzystano w nim aktualne materiały źródłowe, odpowiednio zinterpretowane, co świadczy o dobrej znajomości omawianej tematyki i dobrym Jej przygotowaniu teoretycznym. Dokonany przez Nią poprawnie przegląd literatury naukowej, zwłaszcza dotyczący mechanizmów apoptozy i wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na komórki, może stanowić źródło materiału faktograficznego, obejmującego wybrane zagadnienia z zakresu poprawy efektywności kriokonserwacji materiału biologicznego*



W rozdziale „Wstęp” zawarto kilka problemów dotyczących zjawisk towarzyszących apoptozie, znaczeniu i wpływie HHP na komórki i inne, które można było wyróżnić w postaci podrozdziałów. Rozdział ten byłby wtedy bardziej przejrzysty.

Na tle przedstawionych rozważań we wstępie, w pełni uzasadnionym jest podjęcie realizacji niniejszej pracy i postawienie głównego celu jakim było opracowanie efektywnej metody kriokonserwacji komórek MSC świni.

Cel ten realizowano poprzez sprawdzenie najkorzystniejszych wariantów ciśnienia zwiększających podatność MSC na kriokonserwację, a następnie zbadanie wpływu dwóch najkorzystniejszych wartości na jakość i zdolności funkcjonalne komórek poprzez ocenę zmian apoptotycznych oraz jakości zarodków bydłęcych uzyskiwanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* i hodowanych w obecności MSC poddawanych działaniu HHP.

Zaplanowane badania przeprowadzono na komórkach MSC izolowanych z pobranego szpiku kostnego loszek i knurków rasy polskiej białej zwisłouchej. Po kilkudniowej hodowli *in vitro* MSC poddawano działaniu HHP o ciśnieniu od 20 do 60 MPa. Po zamrożeniu i rozmrożeniu komórki poddawano wszechstronnym badaniom oceniając ich żywotność, tempo proliferacji, poziom ekspozycji fosfatydyloseryny na powierzchni komórek oraz poziom ekspresji transkryptów kilku genów. Po wyborze dwóch najkorzystniejszych wartości ciśnienia HHP, oceniano poziom zmian apoptotycznych w fazie inicjacji, wykonawczej oraz zniszczenia dokonując pomiaru ekspresji wybranych genów.

Wpływ HHP na zdolności funkcjonalne MSC oceniano pośrednio poprzez ocenę jakości blastocyst uzyskanych we współhodowli z komórkami MSC poddawanych wcześniej działaniu różnych wartości ciśnienia. W celu określenia bezpośredniego wpływu HHP na oceniane komórki, przeprowadzono ocenę obecności proapoptycznego białka Bax.

*Wykonanie badań wymagało dużego zaangażowania i dobrego przygotowania Doktorantki oraz całego Zespołu współpracującego w ich realizacji na każdym etapie poszczególnych procedur, począwszy od pobrania MSC i ich przygotowania do hodowli, poprzez hodowlę w odpowiednich pożywkach, a następnie ocenę danej cechy. W badaniach tych wykorzystano nowoczesny sprzęt i najnowsze metody z zakresu biologii molekularnej, które pozwoliły Jej między innymi dokonać izolacji RNA, oznaczyć ilości transkryptów genów, czy też wykonać pomiary aktywności kaspazy 8.*

*Dużego zaangażowania i znajomości problemu wymagały badania mające na celu określenie wpływu HHP na jakość zarodków, które uzyskiwano w warunkach *in vitro*, a w końcowym etapie doświadczenia oceniano metodą TUNEL.*

Formę opisową metodyki badawczej uzupełniają cztery ryciny (1A, 1B, 2 i 3) ilustrujące poszczególne procedury postępowania w czasie przygotowania prób do badań, konserwacji MSC, a następnie ocenę ich jakości. Jedna z rycin w przejrzysty sposób

prezentuje schemat pozaustrojowego uzyskiwania zarodków bydlęcych. Ryciny te pozwalają czytelnikowi lepiej zorientować się w postępowaniu metodycznym.

*Na uwagę zasługuje przejrzyste przedstawiony układ doświadczenia, a wszechstronność technik badawczych i potrzeba dostosowania metodyki świadczą o dobrym przygotowaniu Autorki pracy od strony analitycznej. Podkreślenia wymaga także trafny dobór metod badawczych, zwłaszcza w kwestii oceny zmian apoptotycznych mezenchymalnych komórek macierzystych, oznaczenia poziomu ekspresji białek oraz pozaustrojowej produkcji zarodków i oceny ich jakości. Wynika to zapewne z dużych możliwości realizacji specjalistycznych badań w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i dobrej znajomości technik badawczych, zwłaszcza dotyczących oceny zmian apoptotycznych komórki przez Promotor rozprawy, będącej uznaną specjalistką w tym zakresie.*

W następnym rozdziale pracy szczegółowo omówiono uzyskane wyniki. Przyjęty układ rozdzielania wyników od dyskusji jest czytelny i dobrze służy poznaniu najważniejszych efektów pracy.

W toku realizacji badań Autorka uzyskała szereg interesujących wyników. Mają one znaczenie poznawcze i praktyczne, zmierzają bowiem do opracowania skutecznej metody konserwacji MSC. W badaniach swoich wykazała, że zastosowanie zróżnicowanego wysokiego ciśnienia hydrostatycznego nie wpłynęło istotnie na poziom ekspresji proapoptycznego białka Bax w komórkach MSC nie poddanych kriokonserwacji. Poddanie natomiast tych komórek działaniu HHP, a następnie kriokonserwacji miało istotny wpływ na ich żywotność zaraz po rozmrożeniu. Opierając się na pracach innych badaczy wykonanych na oocytach i zarodkach Autorka przypuszcza, iż procedura HHP poprzez stymulację reakcji obronnych na stres poprawia żywotność komórek, gamet oraz zarodków kriokonserwowanych różnymi metodami. Efekt ten okazuje się jednak krótkotrwały, gdyż po 8 dniach brak było różnic między grupami. Poddanie komórek MSC działaniu HHP korzystnie wpłynęło na ich tempo proliferacji. Najbardziej korzystny wpływ miał wariant z ciśnieniem 40 MPa. Na podstawie oceny powyższego tempa proliferacji Autorka przypuszcza, że wysokie ciśnienie hydrostatyczne o podanej wartości wpływa na zmiany w ekspresji genów biorących udział w regulacji tempa proliferacji komórek. Z analizowanych trzech genów badany czynnik wywierał znaczący wpływ na ekspresję genu Rex1. Wartość ciśnienia 60 MPa okazała się w tym przypadku najkorzystniejsza. Nie wykazano natomiast żadnych statystycznie istotnych różnic w przypadku genów C-myc i Sox2. Wyniki te Autorka porównuje w następnym rozdziale dyskusja z pracami innych badaczy poddających komórki MSC stresowi napięcia. W pracach tych napięcie w przeciwieństwie do HHP stymulowało ekspresję genu C-myc. Po interesującej dyskusji przypuszcza, że brak zmian w profilu tego genu w wykonanych przez Nią badaniach może wynikać z faktu, iż stosowane wartości



ciśnienia HHP były wartościami doświadczalnymi i mogły się okazać niewystarczającym bodźcem do stymulacji ekspresji genu. Dalej Doktorantka podkreśla, że MSC poddawane działaniu HHP o wartości ciśnienia 60MPa zawsze charakteryzowały się wyższym poziomem ekspresji badanych genów w porównaniu z grupą kontrolną, mimo iż statystycznie nie wykazano istotnych różnic. W konkluzji swoich rozważań stwierdza Ona dalej, że HHP nie wpływa na utratę multipotencji przez MSC.

W kontekście podawanych wyników, a następnie ich dyskusji, pewnego uściślenia wymagają podane dane na ryc. 5, 6 i 7 (str. 52 i 53) i na str. 68. Z danych tych wynika, że istotne różnice wystąpiły w przypadku ekspresji genu Rex1, natomiast przy omawianiu wyników podane jest, że odnoszą się one do ekspresji genu C-myc. W następnym zdaniu podano także, że nie zaobserwowano żadnych statystycznie istotnych różnic w poziomie ekspresji genu Rex1 oraz Sox2 pomiędzy analizowanymi grupami doświadczalnymi. W świetle zamieszczonych danych na ryc. 5 i 7 jest to słuszne tylko w odniesieniu do genu Sox2. Dyskusyjnym wydaje się również stwierdzenie na str. 69, że poddanie komórek MSC działaniu HHP nie wpływa na poziom ekspresji badanych genów (C-myc, Rex1, Sox2)..... . Można z nim się zgodzić porównując wyniki z grupą kontrolną, ale w przypadku ekspresji genu Rex1 między grupami doświadczalnymi różnice statystycznie istotne występowały. Czy można bliżej wyjaśnić powyższe wątpliwości?

Interesujące i inspirujące do dalszych prac są wyniki oceniające stopień zmian apoptotycznych w komórkach mezenchymalnych wszystkich 5 wariantów HHP oraz wybranych dwóch wartości ciśnienia 40 i 60 MPa. Wykonane analizy z zastosowaniem aneksyny V i jodku propidyny nie wykazały różnic statystycznie istotnych w liczbie komórek nekrotycznych, apoptotycznych i żywych poddanych działaniu HHP o zróżnicowanych wartościach ciśnienia a komórkami grupy kontrolnej. Pomimo braku powyższych różnic można było zauważyć, że MSC poddawane działaniu HHP o wartości 40 i 60MPa cechowały się najniższą liczbą komórek apoptotycznych oraz najwyższą liczbą komórek żywych. W wykonanych następnym badaniach nad zaawansowaniem zmian apoptotycznych w MSC, generalnie nie wykazano większych różnic odnośnie analizowanych wskaźników między grupami doświadczalnymi a grupą kontrolną. Dotyczyło to w fazie inicjacji apoptozy ekspresji kaspazy 8, w fazie wykonawczej ekspresji białek Bax, Bcl<sub>xL</sub>, Bcl<sub>xS</sub> oraz surwiwiny, a w fazie zniszczenia poziomu białka CAD. Na tej podstawie Autorka stwierdza, że poddawanie komórek działaniu HHP nie wpływa na ekspresję badanych białek pro- i anti-apoptotycznych, nie ma więc szkodliwego wpływu na jakość MSC.

Za nowatorskie i interesujące niewątpliwie należy uznać podjęcie badań nad współhodowlą zarodków z komórkami MSC. W dostępnej literaturze brak jest bowiem prac na powyższy temat. Na podstawie badań innych autorów dotyczących współhodowli tych komórek z innymi komórkami, Autorka przyjęła hipotezę o korzystnym wpływie komórek MSC na hodowlę zarodków. Uzyskane wyniki ich rozwoju do stadium blastocysty odbiegają jednak od oczekiwanych. Hodowla bowiem zarodków z komórkami MSC, zarówno poddanymi jak i niepoddanymi działaniu HHP, statystycznie istotnie zmniejszyła liczbę otrzymanych blastocyst. Wykonana wstępnie analiza TUNEL wykazała, że blastocysty uzyskane z hodowli z MSC poddawanych działaniu HHP odznaczały się niższym indeksem apoptotycznym w porównaniu do blastocyst uzyskanych z hodowli bez MSC i niepoddawanych działaniu HHP. W konkluzji Autorka stwierdza, że współhodowla zarodków z komórkami MSC wpływa niekorzystnie na liczbę uzyskanych blastocyst, przy jednoczesnym braku negatywnego wpływu na ich jakość.

*W moim odczuciu, te niejednoznaczne wyniki nie powinny zniechęcać Autorkę, a wręcz przeciwnie mobilizować Ją do zgłębiania problemu i poszukiwania nowych rozwiązań nad wykorzystaniem komórek MSC w doskonaleniu metod pozaustrojowej produkcji zarodków. Zagadnienie wydaje się ważne w kontekście stosunkowo niskiej skuteczności produkcji zarodków w warunkach in vitro. Badania te na pewno warto powtórzyć na większym liczebnie materiale i uwzględnić inne warunki prowadzenia hodowli, do czego nawiązuje w swoich rozważaniach.*

Należy podkreślić, że wykonanie powyższych badań wymagało dużego wysiłku, dużych umiejętności i sprawności organizacyjnej. Przy nieznacznym rozwinięciu przeglądu literatury i uwzględnieniu większej liczby prób, badania wykonane w tym zakresie mogłyby stanowić wystarczający materiał do odrębnej pracy doktorskiej.

*Na szczególne podkreślenie zasługuje zamieszczony materiał faktograficzny, dokumentujący i potwierdzający otrzymane wyniki. Profesjonalnie wykonane fotografie i ryciny, o dużej przejrzystości i wyrazistości, świadczą o dobrym opanowaniu technik badawczych, podnoszą wartość pracy i pozwalają czytelnikowi zgłębić omawiane problemy.*

Otrzymane wyniki Autorka interpretuje w następnym rozdziale, dyskusja. W rozdziale tym wyniki własne porównuje z pracami innych autorów, wykonanych na ludziach i zwierzętach, przedstawia własne spostrzeżenia i poglądy w kwestii omawianych zagadnień. Na tle rzeczowej dyskusji, bogatego i trafnego doboru materiałów źródłowych, opracowanie tego rozdziału świadczy o dobrym przygotowaniu i znajomości tematu przez Doktorantkę.



W jasnej i zrozumiałej formie prezentuje swoje, jak i innych badaczy osiągnięcia. Niejednoznaczne i trudne czasami do interpretacji wyniki przedstawia obiektywnie i ostrożnie, co należy uznać za pozytywną cechę u młodej osoby rozpoczynającej karierę naukową. *Za bardzo pozytywne w tym względzie, należy uznać ocenę własną metody HHP w powiązaniu z możliwościami praktycznego jej wykorzystania. Krytyczne uwagi zawarte w końcowym akapicie rozdziału, wynikają z obiektywnych spostrzeżeń Autorki i mogą być cenną wskazówką dla badaczy chcących zgłębić ten problem. Tego typu podejście do problemu, w którym poddaje się ostrej krytyce wykorzystywaną przez siebie metodę i uzyskane wyniki, zasługuje na szczególne uznanie.*

Reasumpcji uzyskanych wyników dokonuje Autorka w następnym rozdziale „Podsumowanie i wnioski”. Zawarte informacje w tym rozdziale, w trzech pierwszych punktach są w zasadzie najważniejszymi spostrzeżeniami, dlatego ujęcie tego rozdziału w tej formie nie jest w moim odczuciu najbardziej trafne. Bardziej właściwym byłoby dokonanie najpierw krótkiego podsumowania, a następnie podanie po nim wniosków.

Przyjęty sposób przedstawienia najważniejszych rezultatów wynikających z przeprowadzonych badań w powyższej formie jest odczuciem oceniającego i nie umniejsza znaczenia pracy, która pod względem merytorycznym posiada dużą wartość, świadczy o dużych umiejętnościach i kompetencjach Autorki.

W wyniku przeprowadzenia badań Doktorantka uzyskała szereg cennych danych o charakterze poznawczym, mogących przyczynić się do rozwoju badań w tym kierunku i wykorzystania ich w praktyce, co nadaje pracy oryginalności i podkreśla jej twórczy charakter. Na podkreślenie zasługuje:

1. Nowatorski charakter pracy w odniesieniu do oceny wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na jakość i zdolności funkcjonalne kriokonserwowanych mezenchymalnych komórek macierzystych oraz ich wpływu na jakość zarodków bydłych uzyskiwanych po zapłodnieniu in vitro.
2. Bardzo dobre opracowanie metodyczne, odpowiedni dobór najnowszych metod z zakresu biologii molekularnej, zarówno w odniesieniu do komórek macierzystych jak i zarodków, co świadczy o dużym potencjale i możliwościach realizacji badań, wpisujących się w nurt aktualnej problematyki badawczej na świecie.
3. Wykazanie, że zastosowane wartości ciśnienia hydrostatycznego nie mają generalnie szkodliwego wpływu na jakość komórek MSC i zarodków, a ewentualne wykorzystanie tego parametru w praktyce wymagać będzie dalszych prac badawczych.

Po zapoznaniu się z treścią pracy, proponuję uwzględnienie drobnych uwag natury redakcyjnej nie mających wpływu na wartość pracy:

- str. 19 (11d) - jest apoptotycznej, powinno być apoptotyczne
- str. 22 (5g) – jest indukującą, powinno być indukcję
- str. 25 (10d) – w zdaniu niepotrzebne jest „a”
- str. 27 (8d) – w wyrazie oceny jest 2x „y”
- str. 52 (1g) – zamiast pomiędzy powinno być „w”
- str. 68 (3d) – w zdaniu brak jest wyrazu ekspresji
- str. 69 (2g) – zamiast ciśnieniu powinno chyba być działaniu
- str. 72 (12g) – przy cytowaniu wielu autorów powinna być użyta liczba mnoga
- str. 76 (8g) – jest wynikając, powinno być wynikające

### Wniosek końcowy

*Przedstawiona do oceny rozprawa dotyczy ważnego i aktualnego problemu związanego generalnie z szerszym poznaniem właściwości i zwiększeniem możliwości wykorzystania mezenchymalnych komórek macierzystych. Przyjęta koncepcja rozwiązania tego problemu jest oryginalna, dobrze przemyślana i zrealizowana. Praca ma niepodważalne walory poznawcze, z wyraźnym ukierunkowaniem aplikacyjnym.*

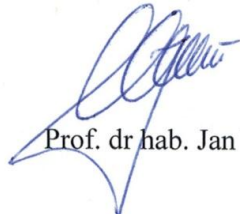
*Na podkreślenie zasługuje kompleksowe podejście metodyczne, które pozwoliło Autorce w pełni wykonać postawione zadania, pomimo że otrzymane wyniki nie zawsze były zgodne z Jej oczekiwaniami. Powinny one zachęcać i inspirować do dalszych prac w tym kierunku, co jest również pozytywnym aspektem niniejszej pracy. Wykonanie badań wymagało dobrego przygotowania teoretycznego, specjalistycznego sprzętu, umiejętności analitycznych, dobrego opanowania warsztatu badawczego. Wszechstronne podejście do poszczególnych zagadnień, rzeczowa i krytyczna w stosunku do własnych osiągnięć dyskusja, świadczą o dużym obiektywizmie i dojrzałości naukowej Doktorantki. Uzyskane przez Nią wyniki są trwałym i oryginalnym osiągnięciem badawczym, przyczyniają się do rozwoju badań w uprawianej dyscyplinie oraz w dyscyplinach pokrewnych, biologii i biotechnologii.*

*Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że praca doktorska mgr Joanny Romanek pt. "Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) na jakość krikonserwowanych mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) świni" odpowiada wymaganiom określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z póź. zm.).*

*Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr Joanny Romanek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.*

**Mając na uwadze dużą wartość naukową i nowatorski charakter pracy, bogaty warsztat badawczy, szeroki zakres, sposób opracowania i przedstawienia wyników, rzeczową i krytyczną dyskusję, walory poznawcze i aplikacyjne, przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej wniosek o wyróżnienie pracy.**

Szczecin, 5 września 2016 roku

  
 Prof. dr hab. Jan Udała