

Wrocław, 15.09.2021

Prof. dr hab. Anna Chelmońska-Soyta
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Pokrzywnickiej pt.: „Cytometr odkształceniowy typu MEMS do badania deformowalności oocytów zwierzęcych” przedstawionej do obrony na Politechnice Wrocławskiej.

Praca u była realizowana w dyscyplinie automatyka, elektronika, i elektrotechnika.

1. Ocena osiągnięcia naukowego powstałego w wyniku realizacji pracy

Od ponad dziesięciu lat mam możliwość obserwacji rozwoju technik lab- on-chip i MEMS dedykowanych obserwacji obiektów biologicznych w tym komórek ssaków, zarodków ssaków pierwotniaków, bakterii i grzybów i powstających w zespołach Katedry Mikrosystemów Wydziału Elektroniki, Fotoniki i Mikrosystemów Politechniki Wrocławskiej i prowadzonych przez Pana prof. Jana Dziubana i Pana dr hab. Rafała Walczaka, promotora ocenianej dysertacji. Stopień złożoności technik i urządzeń służących tym badaniom z roku na rok wzrasta a tym samym możliwości obserwacyjne i badania właściwości biologicznych obiektów poddawanych badaniom pozwalają na co raz bardziej wnikliwą ich analizę.

Prezentowany w dysertacji doktorskiej Pani mgr inż. Aleksandry Pokrzywnickiej cytometr odkształceniowy typu MEMS jest w mojej ocenie jednym z najbardziej zaawansowanych urządzeń powstałych w wyniku ostatnich prac zespołu, ponieważ pozwala nie tylko na określenie właściwości badanego obiektu w jego stanie fizjologicznym, ale również umożliwia zbadanie jego zachowania pod wpływem czynników doświadczalnych, co rozszerza wachlarz informacji dotyczących właściwości takiego obiektu.

Przyjęte rozwiązania techniczne pozwalają na badania właściwości odkształceniowych oocytów świń pod wpływem siły mechanicznej i ocenę zmian wielkości komórek i ich morfologii na poziomie rozdzielczości mikroskopu optycznego, także z możliwością oceny poziomu fluorescencji.

Wrażliwość komórek na bodźce mechaniczne jest ważnym mechanizmem umożliwiającym im kontakt i adaptację do otaczającego środowiska. Z drugiej strony fizyczne właściwości komórek w tym sztywność, sprężystość i płynność cytoplazmy i błon komórkowych będące pochodnymi ukształtowania i aktywności mikrostruktur komórkowych w tym przede wszystkim cytoszkieletu komórki, zawartości wody i środowiska osmotycznego decydują o ich właściwościach fizjologicznych i aktywności biologicznej. W przypadku oocytów wielkość i charakter odpowiedzi na bodźce mechaniczne wiąże się z stopniem dojrzałości oocytów w procesie ich dojrzewania, zdolnością penetracji plemników, właściwościami kriogenicznymi ważnymi z punktu widzenia technik wspomaganego rozrodu i prawdopodobnie kompetencją biologiczną warunkującą zdolność do utworzenia prawidłowego zarodka i jego dalszego rozwoju .

Dlatego wiele ośrodków naukowych w powiązaniu z laboratoriami biologii rozrodu podejmuje próby oceny właściwości mechanicznych oocytów głównie w kontekście określenia na ich podstawie kompetencji biologicznej tych komórek.

Cytometr odkształceniowy zaproponowany przez Panią mgr Aleksandrę Pokrzywnicką pozwala ocenić stopień podatności oocytów świń na siły wywierane przez ruchomą membranę krzemową na podstawie zmian zewnętrznej i wewnętrznej średnicy komórki, pola powierzchni cytoplazmy i całego pola powierzchni wraz z polem powierzchni *zona pellucida*, wyglądu morfologicznego oraz intensywności fluorescencji w preparatach bezpośrednich i znakowanych odpowiednimi fluorochromami.

Wybór przedmiotu badań nie był przypadkowy. Świnie służą człowiekowi nie tylko jako jedno z podstawowych źródeł białka zwierzęcego, ale także jako potencjalne źródło materiału biologicznego kompatybilnego z tkankami ludzkimi. Uzyskanie transgenicznych świń – dawców narządów do przeszczepów w tym nerek jest coraz bliższe sukcesu. Jednak w procedurach transgenezy cały czas barierą pozostaje skuteczność otrzymywania zarodków *in vitro*. W tym procesie jakość oocytów decyduje o liczbie i kompetencji rozwojowej zarodków. Dlatego badania nad dodatkowymi parametrami oceniającymi biologiczną wartość oocytów świń mają pełne uzasadnienie.

To co wyróżnia przedstawiony cytometr odkształceniowy od innych metod badania odkształceń oocytów jest sposób wywołania odkształcenia polegający na zadziaaniu membrany w sposób możliwie jednorodny, tak aby siły działające na komórkę nie były skoncentrowane na ograniczonej powierzchni tak jak to jest np. w przypadku mikroskopów AFM. Jednocześnie zaproponowany system uwzględnia dostosowanie warunków pomiaru do wielkości komórki a także nowatorski sposób oświetlenia komory pomiarowej światłem laserowym. Dodatkowo oocyty po badaniu mogą zostać wyprowadzone z cytometru i być poddane dalszym badaniom lub procedurom np. zapłodnienia pozaustrojowego.

Głównym celem pracy było opracowanie oryginalnej i autorskiej konstrukcji, technologii jej wytworzenia i metodologii badawczej i potwierdzenie sprawności działania mikrocytometru typu MEMS, co zostało wykonane i opisane w niniejszej dysertacji. Już wstępne wyniki badań nad oocytami wskazały, że niektóre badane parametry np. zmiany wielkości pola powierzchni ooplazmy i *zona pellucida* zależą od klasy morfologicznej oocytów, ocenianej na podstawie standardowej oceny mikroskopowej. Zauważano również, że zmiany pola powierzchni *zona pellucida* i ooplazmy wyrażone w procencie zmiany w stosunku do parametrów wyjściowych komórki pod wpływem ucisku nie są takie same i powiązane są z budową morfologiczną oocytu a w szczególności zależą od wielkości przestrzeni perivitelinowej. Te wstępne obserwacje potwierdzają użyteczność opracowanej konstrukcji i uwiarygadniają prawidłowość zastosowanych rozwiązań.

Badania mgr Aleksandry Pokrzywnickiej jak i innych wskazują jednak na bardzo indywidualny rozkład odpowiedzi oocytów na bodźce fizyczne. Z drugiej strony wieloparametryczna ocena oocytów za pomocą skonstruowanego cytometru pozwala na jej doskonalenie w kierunku wykorzystania możliwości uczenia sztucznej inteligencji i opracowania odpowiedniego algorytmu wyznaczającego cechy oocytów o najwyższych kompetencjach rozwojowych.

Podsumowując uważam, że przedstawione wyniki pracy, których efektem jest rozwój i skonstruowanie oryginalnego cytometru odkształceniowego przyczyniły się do postępu w wiedzy w zakresie wykorzystania urządzeń typu MEMS w badaniach nad biologią rozrodczą ssaków.

2. Ocena szczegółowa pracy

Oceniana dysertacja doktorska jest zwartym wydrukiem komputerowym zawierającym 6 uporządkowanych i logicznie powiązanych rozdziałów obejmujących: wstęp, wprowadzenie, opis konstrukcji, technologii i właściwości cytometru, wynik badań oocytów, wnioski końcowe i ocenę przydatności wyników oraz spis literatury.

W mojej ocenie, przed postawieniem ostatecznych wniosków pracy przynajmniej wyniki badań oocytów tj. ta część pracy, która dotyczy zastosowania cytometru, powinny zostać przedyskutowane z wynikami prac innych autorów badających właściwości mechaniczne oocytów. Niektóre informacje umieszczone w rozdziale „Wprowadzenie” mogły by być bardzo dobrymi argumentami w dyskusji nad wartością przedstawionych wyników. Dyskusja jest rozdziałem pracy niezbędnym i koniecznym do uzupełnienia przed oddaniem pracy do druku przynajmniej w części badań obejmujących zagadnienia z obszaru badań o życiu.

Cel pracy został jasno określony i poprzedzony bardzo szczegółowym przeglądem metod badających mechaniczne właściwości komórek zwierzęcych w tym oocytów zawartych w rozdziale nr 2. Rozdział ten zawiera również szczegółowe informacje z zakresu biologii oocytów i ich wykorzystania w technikach wspomaganego rozrodu. Jest napisany bezbłędnie i zawiera wszystkie niezbędne informacje konieczne do zrozumienia technicznych wyzwań związanych z konstrukcją cytometru. W mojej ocenie ta część rozprawy zasługuje na szczególne wyróżnienie i uznanie, ponieważ wymagała bardzo dobrego opanowania przez doktorantkę wiedzy w zakresie odrębnej od przedmiotu dysertacji dyscypliny.

Nie bardzo jednak mogę się zgodzić z poglądem Autorki wyrażonym na str. 23:

„Dodatkowo w dalszych rozważaniach wzięto pod uwagę jedynie bodźce mechaniczne, ponieważ jako jedyne (poza czynnikami biochemicznymi) wpływają na deformacje oocytów znajdujących się w żywym organizmie. Natomiast takie grupy bodźców jak optyczne, magnetyczne, akustyczne czy elektryczne nie występują naturalnie” w układzie rozrodczym ssaków”. Chciałam zwrócić uwagę na fakt, że na przykład silne zmiany polaryzacji elektrycznej błony oocyty występują w procesie zapłodnienia. Zatem nie wiemy dokładnie, które z wymienionych grup bodźców rzeczywiście mogą wpływać na dynamicznie zmieniające się struktury gamet i zarodków.

Rozdział trzeci dysertacji w całości poświęcony jest rozwojowi konstrukcji cytometru odkształceniowego i szczegółowa ocena jego zawartości leży poza moimi kompetencjami.

Jednak chciałam zwrócić uwagę, że w trakcie badań zostały opracowane 3 warianty urządzenia o zróżnicowanym stopniu złożoności. Dwa z nich w pełni odpowiadają założeniom projektu i mogą zostać wykorzystane w praktyce. Wariant 2 pozwala bowiem na dostosowanie warunków pomiaru do wielkości oocytów w wyniku rozwiązania polegającego na wbudowaniu czujników pozwalających na ocenę rzeczywistego ugięcia membrany krzemowej.

Natomiast wariant 3, najbardziej zaawansowany, pozwala nie tylko na ocenę własności oocytów pod wpływem przyłożonej siły, ale również pozwala na analizę wielkości emitowanej

fluorescencji przez oocyt lub jego organella, której źródłem może być autofluorescencja komórek lub obecność fluorochromów po poddaniu oocytów odpowiedniemu barwieniu.

Rozdział 4 poświęcony jest badaniom odkształceń oocytów w opracowanych wariantach cytometru.

W rozdziale 5 przedstawiono podsumowanie uzyskanych wyników.

Rozdział 6 zawiera spis cytowanej aktualnej literatury obejmujący swym zakresem prace obszaru badań nad rozwiązaniami lab-on-chip i MEMS w badaniu deformowalności komórek ale również w zakresie biologii i funkcji oocytów.

Doktorantka w badaniach nad oocytami (opisanymi w rozdziale 4) wykorzystwała 2 warianty cytometru odkształceniowego. Wariant trzeci nie był wykorzystywany do systematycznych badań oocytów z powodu ograniczeń w dostępie do materiału biologicznego. Analiza obrazu i pomiary oocytów zostały przeprowadzone dzięki oprogramowaniu autorstwa mgr inż. Danylo Lizantesa. Informacja ta znajduje się na str.45 rozprawy.

Wariant pierwszy cytometru służył do testowania kanałów fluidycznych oraz zbadania sprawności działania membrany krzemowej do wywierania kontrolowanego ucisku na oocyty. Wstępna parametryzacja komórek wykazała, że w ustalonych warunkach oocyty ulegają deformacji. Mierzono zmianę średnicy całej komórki wraz *zona pellucida* i średnicę wewnętrzną komórki początkowo uwzględniając, na podstawie obrazu jednopłaszczyznowego, średnicę biegnącą poziomo i pionowo i oznaczaną jako W_{out} i W_{in} i H_{out} i H_{in} . Po wykonaniu serii oznaczeń uznano, że różnice pomiędzy średnicami W i H są niewielkie i do dalszych badań wykorzystano pomiary H_{out} i H_{in} . Istotność zmiany różnic w długości średnic powinny być wg mojej oceny potwierdzona badaniem statystycznym.

Badania wykonane w pierwszym wariantcie cytometru potwierdziły możliwość oceny stopnia ugięcia oocytów pod wpływem wywieranego ucisku przez membranę, jednak różnice wielkości oocytów wymagały określenia rzeczywistego ugięcia membrany, tak aby oocyty o różnej średnicy mogły być ściskane w takim samym stopniu niezależnie od wielkości komórki np. o 65 czy 80% wartości średnicy.

Takie warunki doświadczenia zapewniał wariant 2 cytometru odkształceniowego, w którym wbudowane czujniki światłowodowe w podstawę urządzenia pozwalały na ocenę jej rzeczywistego ugięcia. Badanie przy pomocy tego cytometru na komórkach utrwalonych wykazało, że siła ściskająca komórki i prowadząca do zmniejszenia średnicy nawet o 80% nie wywołuje mikroskopowo widocznych uszkodzeń utrwalonych oocytów. Potwierdzono indywidualną odpowiedź komórek na bodziec mechaniczny. Przeprowadzone obliczenia, w których powiązано obserwację zmiany pola komórek i ich średnicy wykazały, że ooplazma była bardziej podatna na odkształcenia niż *zona pellucida*.

Jednocześnie wskazano, na ważną funkcję *zona pellucida* polegającą na przeciwdziałaniu zbytnej kompresji ooplazmy. Ten wynik jest w mojej ocenie bardzo wartościowy, bowiem nie tylko uzupełnia wiedzę o właściwościach *zona pellucida* ale również wskazuje na konieczność dalszych jej badań w kontekście stopnia elastyczności i powiązania z funkcją komórek ziarnistych otaczających oocyty przed procesem denudacji.

W kolejnym doświadczeniu, w badaniach nad żywymi oocytami wykazano, że wartość zmian średnicy i pola komórki zmienia się proporcjonalnie do stopnia ściśnięcia jednak podobnie jak w przypadku komórek utrwalonych ma indywidualny charakter. W badaniach potwierdzono ochronną rolę *zona pellucida* wobec zmian odkształceniowych ooplazmy a także wskazano na

większą deformowalność oocytów niższej jakości klasyfikowanych wg standardowej klasyfikacji morfologicznej.

W każdym wariancie doświadczenia badania przeprowadzono na odpowiedniej liczbie oocytów pozwalających na wiarygodną analizę. Jednak uważam, że wyniki badań grup oocytów powinny zostać poddane analizie statystycznej a w wyniki średniej zawarte w odpowiednich tabelach w każdym przypadku powinny być uzupełnione wartością rozrzutu wokół średniej.

Sądzę również, że bardzo ciekawym uzupełnieniem tych cennych obserwacji byłaby ocena czasu powrotu deformowanego oocytu do pierwotnych wymiarów. Ocena takiej właściwości mogłaby dodatkowo wskazywać na zdolność komórki do odpowiedzi na stres mechaniczny.

Szkoda, że niemożliwym było przeprowadzanie badań nad fluorescencją oocytów, ponieważ aktualnie badania z wykorzystaniem zjawiska fluorescencji komórek pozwalają na badanie ich nowych właściwości w tym np. badania zjawisk elektrycznych towarzyszących procesom zapłodnienia.

Podsumowując: badania przeprowadzone na żywych i utrwalonych oocytach świń potwierdziły możliwość prowadzenia zaawansowanych metod pomiaru odpowiedzi oocytów świń na bodźce mechaniczne przy użyciu cytometru odkształceniowego wg oryginalnej i autorskiej koncepcji mgr inż. Aleksandry Pokrzywnickiej. Uzupełniają one warsztat embriologów w bardzo ważny instrument oceny oocytów, który może być wykorzystany w badaniu ich kompetencji rozwojowych. Badania te są kolejnym krokiem w doskonaleniu technik lab – on- chip w obszarze biologii reprodukcji i technik wspomaganego rozrodu u zwierząt.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość merytoryczną ocenianej dysertacji spełniającej wymagania art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. *o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz. U. Nr 65, poz. 595, stan prawny na dzień 30 września 2011 r.) i w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. *Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.)

zwracam się do Komisji o dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry Pokrzywnickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zwracam się z wnioskiem o wyróżnienie i nagrodzenie tej rozprawy stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Anna Chelmońska-Soyta