PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 26.06.2017
L. dz. RN-7/2017

Ocena rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Buski pod tytułem: „Wczesne sygnały obecności zarodków w przedimplantacyjnym okresie ciąży u myszy"

Implantacja jest zjawiskiem niezwykle interesującym, nie do końca poznanym, lecz niewątpliwie angażującym układ immunologiczny matki. Jednak tylko z 20 - 35 % zapłodnionych komórek jajowych rozwija się płód zdolny do życia pozamacicznego, pozostałe komórki giną w większości w okresie przed- i około-implantacyjnym ciąży. Rzeczywista częstość występowania poronień przewyższa więc liczbę rozpoznawanych klinicznie ciąż. Podkreśla się, że prawdopodobnie istnieje naturalne ograniczenie procesów reprodukcji, gdyż nawet skuteczność zapłodnienia pozaustrojowego (IVF) nie przekracza 50 %. Prace dotyczące mechanizmów implantacji są więc niezwykle ważne dla powodzenia ciąży i mają potencjalnie istotne znaczenie kliniczne. Poznanie tych mechanizmów, w tym immunologicznych i genomowych zależnych od płodu i lokalnych właściwości błony śluzowej matki, wydaje się być kluczem do sukcesu w profilaktyce niepowodzeń rozrodu. W ostatnich latach wprowadzono określenie RIF (ang. recurrent implantation failure, nawracające niepowodzenia implantacji) po wielokrotnych niepowodzeniach IVF, których doświadcza około 10% tak leczonych kobiet. Wyjaśnienie mechanizmów implantacji jest więc niezwykle istotne, by leczyć zarówno RIF, jak i poronienia nawracające (ang. recurrent miscarriage, RM). Podkreśla się, że RIF i RM to nie diagnoza, ale kliniczna prezentacja zaburzeń, które wymagają dokładnego poznania. Dlatego praca mgr inż. Katarzyny Buski tak doskonale wpisuje się w aktualne trendy w medycynie rozrodu.

Przedstawiona mi do oceny praca jest napisana w układzie typowym dla rozpraw doktorskich. Doktorantka zamieszcza informację o tym, że praca

została zrealizowana ramach grantu NCN nr N N311 523940. Doktorantka jest ponadto autorem publikacji pt. Buska, K., Kedzierska, A. E., Slawek, A., & Chelmonska-Soyta, A. (2017). Global decrease in the expression of signalling pathways' genes in murine uterus during preimplantation pregnancy. Reproductive Biology, 17(1), 89-96 w cenionym czasopiśmie z zakresu biologii rozrodu (IF 1, 524). Fakty te istotnie podnoszą wartość pracy.

Rozprawa składa się z 6 podstawowych rozdziałów oraz załączonych streszczeń zarówno w języku polskim, jak i w języku angielskim, zawiera wykaz używanych skrótów oraz spis tabel i rysunków. We wstępie pracy autorka precyzyjnie przedstawia zagadnienia dotyczące poznanych już mechanizmów implantacji: interakcje matczyno-płodowe, szlaki sygnałowe tego procesu, receptywność błony śluzowej macicy i wpływ hormonów płciowych na rozwój ciąży. Niezwykle dokładnie opisuje zmiany morfologiczne i czynniki transkrypcyjne w regulowaniu receptywności endometrium w oparciu o aktualną wiedzę zaczerpniętą z najnowszego piśmiennictwa. Molekularne mechanizmy inwazji trofoblastu również zostały przedstawione w precyzyjny i przejrzysty sposób, z uwzględnieniem roli kinaz MAP i kinazy białkowej B (PI3K/Akt) tak ważnych w procesie „in vitro aktywacji", który jest już stosowany w praktyce klinicznej w przypadku przedwczesnego wygasania funkcji jajnika (POF). Następnie doktorantka precyzyjnie opisuje immunologiczne aspekty przedimplantacyjnego okresu ciąży podkreślając rolę odpowiedzi Th1/Th2/Th17 i komórek T reg $CD25^{+}CD4^{+}FoxP3^{+}$ w indukcji tolerancji immunologicznej w ciąży. Uważam, ze należałoby częściej cytować piśmiennictwo z ostatnich lat. W moim odczuciu bardzo ciekawy, choć dosyć krótki jest podrozdział będący odpowiedzią dlaczego model ciąży u myszy może służyć badaniu niepowodzeń rozrodu u człowieka i innych ssaków, podkreślający znaczenie hierarchicznego charakteru szlaków sygnałowych

podczas implantacji. Należałoby raczej używać określenia receptywność błony śluzowej macicy, zamiast receptywność macicy. Mówimy limfocyty T jako mediatory, nie mediatorzy. Lepiej też unikać bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego- określeń typu : „synchronizacja implantacyjnej kompetencji embrionu". Te drobne uwagi nie wpływają jednak na wysoką ocenę merytoryczną tej części rozprawy doktorskiej.

Mgr inż. Katarzyna Buska wyznacza sobie następujące cele badawcze: ocenę skutków obecności zarodków w przedimplantacyjnej fazie ciąży mierzonych jakością przekazywanych sygnałów od zarodka do organizmu matczynego w kompartmencie lokalnym (macica) i obwodowym (obwodowych limfocytach T $CD4^+$) oraz ocenę przekazywania sygnałów zarodkowych zależnie od potencjału rozwojowego zarodka. Zaplanowała przeprowadzić:

- analizę transkryptomu tkanek macicy w przedimplantacyjnym okresie ciąży naturalnej, z uwzględnieniem oceny ekspresji genów głównych ścieżek przekazywania sygnału
- porównanie proteomów limfocytów T $CD4^+$ w przedimplantacyjnym okresie ciąży naturalnej jako skutku efektywnej sygnalizacji zarodkowej na obwodzie,
- analizę transkryptomu tkanek macicy w przedimplantacyjnym okresie ciąży, po transferze zarodków o zróżnicowanym statusie biologicznym z uwzględnieniem oceny ekspresji genów głównych ścieżek przekazywania sygnału,
- porównanie proteomów limfocytów T $CD4^+$ w okresie przedimplantacyjnym po transferze zarodków o zróżnicowanym statusie biologicznym, jako skutku efektywnej sygnalizacji „jakości zarodka" na obwodzie.

Powyższe cele zostały zdefiniowane w sposób precyzyjny, poświęcone są istotnemu problemowi. Należy podkreślić, że badania na modelu zwierzęcym można następnie odnieść do dokładniejszego poznania procesów implantacji u człowieka.

Rozdział „Materiały i metody" przedstawia poniższy plan 2 eksperymentów, które kończyła eutanazja samic 3,5 dnia ciąży (okres przedimplantacyjny) i pobieranie narządów: macicy do badań ekspresji genów i białek oraz śledziony do badań proteomicznych. Zaplanowano:

Eksperyment 1

Grupa 1: samice myszy w ciąży naturalnej w okresie przedimplantacyjnym

Myszy po indukcji owulacji i kryte naturalnie, poddane eutanazji 3,5 dnia po kryciu (3,5dpc).

Grupa 2: samice myszy w pseudociąży

Myszy po indukcji owulacji, kryte naturalnie samcami po wazektomii, poddawane eutanazji w 3,5 dniu po pokryciu (3,5 dpc) jako kontrola Grupy 1.

Eksperyment 2

Grupa 3: samice myszy po transplantacji zarodków prawidłowych (noral embryos, NE)

Myszy po niechirurgicznej transplantacji zarodków prawidłowych uzyskanych od samic dawczyń, poddane eutanazji 3,5 dnia ciąży (3,5dpc).

Grupa 4: samice myszy po transplantacji zarodków poddanych działaniu TNFα (TNFα –related embryos, TNFα E)

Myszy po niechirurgicznej transplantacji zarodków o obniżonym potencjale biologicznym spowodowanym hodowlą w obecności TNFα, uzyskanych od samic dawczyń, poddane eutanazji 3,5 dnia ciąży (3,5dpc).

Plan eksperymentów przedstawiono również na czytelnych rycinach, co znacznie wzbogaca wartość pracy. Doktorantka nie podaje informacji o liczbie zwierząt poddanych eksperymentom. Należy podkreślić, że na badania uzyskano zgody właściwej komisji bioetycznej (I Lokalna Komisji a Doświadczeń do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy IITD PAN we Wrocławiu; nr zgody 44/2010).

Następnie autorka precyzyjnie opisuje hodowlę zarówno zarodków prawidłowych, jak i o obniżonym potencjale biologicznym oraz zastosowane badania proteomiczne: izolację i sortowanie komórek T $CD4^+$, elektroforezę 2D, spektrometrię mas, RT-PCR, Western Blot. Zwraca uwagę zastosowanie przez doktorantkę różnorodnych metod badawczych.

Użyte w opracowaniu metody statystyczne są dobrze dobrane, co gwarantuje rzetelność sformułowanych wniosków. Obliczenia statystyczne przeprowadzono wybierając różnorodne testy warunkujące wnikliwą analizę zebranych wyników.

W rozdziale Wyniki autorka bardzo precyzyjnie analizuje uzyskane wyniki, przedstawiając je w tabelach oraz na czytelnych rycinach, dla poszczególnych eksperymentów. W eksperymencie 1 analiza wyników dotyczących ekspresji genów w macicy w okresie przedimplantacyjnym polegała na porównaniu ekspresji wszystkich 84 badanych genów pomiędzy grupami oraz analizie ekspresji genów w poszczególnych ścieżkach sygnałowych. Uzyskane wyniki wykazały obniżenie poziomu ekspresji genów w endometrium w obecności zarodka w macicy (grupa badana) przed implantacją w porównaniu do pseudociąży. Spośród 84 badanych genów ekspresja

24 (30,0%) genów była wyższa w grupie myszy w przedimplantacyjnym okresie ciąży, a 56 (70%) genów charakteryzowała się obniżoną ekspresją. Znamienną statystycznie różnicę w ekspresji w grupie badanej zaobserwowano dla 27 genów: 24 o obniżonej ekspresji oraz 3 o podwyższonym poziomie ekspresji. Doktorantka zaobserwowała, że geny o znamiennie istotnie obniżonej ekspresji są zależne od regulacji przez sześć ścieżek: NFκB, P53, Hedgehog, Notch, LDL i mitogennej. W wymienionych szlakach sygnałowych, geny o obniżonej ekspresji ($p<0,05$) stanowiły 100% wszystkich genów o ekspresji zróżnicowanej między grupami. W eksperymencie 2 analiza wyników dotyczących ekspresji genów w macicy w okresie przedimplantacyjnym polegała na całościowym porównaniu ekspresji 84 badanych genów pomiędzy grupami oraz analizie ekspresji genów w poszczególnych ścieżkach sygnałowych. Wyniki doświadczenia wykazały obniżenie poziomu badanych transkryptów w grupie samic po transferze zarodków o obniżonym potencjale biologicznym w porównaniu do kontroli. Spośród 84 badanych genów ekspresja 24 (30,0%) genów była wyższa w grupie myszy po transplantacji zarodków o obniżonym potencjale, a 56 (70%) genów charakteryzowała się obniżoną ekspresją w badanej grupie myszy. Bardzo wartościowe wydaje się być zamieszczenie przez doktorantkę zdjęć prezentujących rozwój zarodka na różnych etapach od 1,5 dpc do 4,5 dpc w grupie zarodków hodowanych z TNFα i w grupie zarodków prawidłowych, także zarodków barwionych fluorescencyjnie. Podobnie jak w przypadku eksperymentu 1, również tym razem analizę regulacji szlaków sygnałowych oparto na liczbie istotnie statycznie różnicy w ekspresji genów w porównaniu do całkowitej liczby genów w danej ścieżce. W ten sposób wytypowano 2 szlaki: NfκB (87,5%) i WNT (25%) jako dwa najistotniejsze w trakcie komunikacji matczyno-zarodkowej w przedimplantacyjnym okresie ciąży regulowanym przez jakość zarodka. W przypadku pozostałych ścieżek

sygnałowych liczba znamiennie regulowanych genów wynosiła od 7,7% (Mitogenna) do 20% (ścieżka TGFβ). Zdecydowana większość genów, których ekspresja różniła się pomiędzy grupami należała do ścieżki NfκB. W dalszej części doktorantka analizuje badania proteomiczne poszczególnych eksperymentów, tworząc mapę proteomiczną śledzionowych limfocytów T $CD4^+$ myszy w ciąży oraz mapę proteomiczną limfocytów T $CD4^+$ myszy w przedimplantacyjnym okresie ciąży po transferze zarodków prawidłowych i zarodków po hodowli z TNFα. Jest to autorskie osiągnięcie doktorantki wzbogacone graficzną wizualizacją spotów białkowych o zmiennej ekspresji. Rysunek zidentyfikowanych białek limfocytów T $CD4^+$ mógłby być bardziej czytelny.

Nie można wykluczyć, że uzyskane wyniki mogą mieć potencjalnie duże znaczenie dla praktyki klinicznej. Poznanie mechanizmów okresu przedimplantacyjnego u myszy może przyczynić się do zrozumienia tych procesów u człowieka, a tym samym wpłynąć na poprawę wyników położniczych poprzez wprowadzenie nowych sposobów leczenia opartych o wpływ na szlaki sygnałowe w ciąży.

Dyskusja przeprowadzona przez autorkę pracy w pełni dokumentuje zdolność analitycznej interpretacji posiadanych danych. Doktorantka udowadnia, że implantacja jest poprzedzona procesami sprzyjającymi nabyciu kompetencji do zagnieżdżenia przez zarodek i receptywności przez macicę. Autorka zaznacza nowatorski charakter uzyskanych wyników pokazujących hierarchię i wagę sygnałów pochodzących od zarodka po porównaniu ekspresji genów głównych ścieżek przekazywania sygnału w macicy myszy. Prezentuje również pionierskie wyniki wskazując na podwyższenie ekspresji genu Ptgs2 w trakcie przedimplantacyjnego okresu ciąży u myszy, udowadniając, że gen Ptgs2 i jego białkowy produkt PTGS2 są indukowane i ekspresjonowane na

krótko przed implantacją. Doktorantka postuluję, że ekspresja Ptgs2 jest najwcześniejszym pozytywnym sygnałem rozpoznania zarodka i przygotowania do implantacji u myszy. Świadczy to o dużej dojrzałości naukowej i umiejętności analitycznej interpretacji uzyskanych wyników. Bardzo cenna jest konkluzja podsumowująca dyskusję, że sygnały płynące od zarodków są rozpoznawane przez obwodowe limfocyty T, ale wywoływana reakcja zależy również od jakości biologicznej zarodka, a limfocyty krwi obwodowej mogą służyć jako biosensory jakości zarodka już przed implantacją.

Autorka sformułowała następujące wnioski:

1. Obecność zarodka w macicy w okresie przedimplantacyjnym powoduje transkrypcyjne wyciszenie, czyli obniżenie transkrypcji genów głównych szlaków sygnałowych w tkance macicy w trakcie ciąży naturalnej.
2. Szlaki sygnałowe akywnie reglowane przez obecność zarodka w przedimplantacyjnym okresie ciąży to ścieżki NFκB, TGFβ i WNT. Szlak NFκB wydaje się być szczególnie istotny, ponieważ jego zróżnicowaną regulację zaobserwowano zarówno w trakcie ciąży naturalnej jak i eksperymencie z wykorzystaniem transplantacji zarodków o zróżnicowanym potencjale biologicznym.
3. Sygnalizacja w immunologicznym kompartymencie obwodowym jest widoczna przed implantacją zarodka i ma związek z ekspresją białek cytoszkieletowych oraz immunoregulatorowych w limfocytach $TCD4^{+}$.
4. Jakość sygnałów zarodkowych przed implantacją jest różna w zależności od „jakości" zarodka, co jest widoczne zarówno w kompartmencie lokalnym (macica) jak i obwodowym (limfocyty T obwodowe).

Wnioski są logiczną konsekwencja postawionych w badaniu celów. Na końcu rozdziału Wnioski doktorantka zamieszcza czytelną rycinę o dużej wartości merytorycznej, gdzie na kanwie ustalonej wiedzy naukowej dotyczącej

interakcji matczyno-zarodkowych okresu przedimplantacyjnego zamieszcza własne wyniki będące uzupełnieniem dotychczasowych danych.

Praca jest napisana poprawną polszczyzną, bez większych uchybień stylistycznych i gramatycznych. Drobne błędy językowe nie umniejszają wartości pracy. Łącznie zawiera 233 strony oraz obejmuje 465 pozycji odpowiednio dobranego piśmiennictwa.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Buski do dalszych etapów przewodu doktorskiego, dziękując za przywilej tej recenzji. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie tej pracy.

677573 8
Prof. dr hab. med. Małgorzata Jerzak
specjalista położnictwa i ginekologii
specjalista ginekologii onkologicznej
tel. 604 208 955

Prof. dr hab. med. Małgorzata Jerzak

Warszawa, 13.06.2017