

Prof. dr hab. Jacek Malejczyk
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Centrum Biostruktury
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel.: 22 629 52 82; 601 342 781
jacek.malejczyk@wum.edu.pl

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR WERONIKI LEBIEDZIŃSKIEJ PT. „CHARAKTERYSTYKA EKSPRESJI GLIKOPROTEINY ZONA PELLUCIDA 3 W TKANKACH ZDROWYCH ORAZ JEJ ONTOGENEZA WRAZ Z ROZWOJEM JĄDRA I SPERMATOGENEZY”

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu mgr Weroniki Lebedzińskiej została przygotowana w postaci 78 stronicowej monografii w języku polskim. Pracę wykonano w Klinice Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku we współpracy z Uniwersytetem w Turku, Finlandia pod kierunkiem Prof. dr hab. Nafisa Rahmana. Klinika Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku kierowana przez Prof. dr hab. Sławomira Wołczyńskiego jest jednym z wiodących ośrodków prowadzących nowoczesne badania w dziedzinie rozrodczości człowieka i badania mgr Lebedzińskiej doskonale wpisują się w tę tematykę.

Białka osłonki przejrzystej (zona pellucida, ZP) chronią oocyt oraz odgrywają kluczową rolę w procesie zaplemnienia komórki jajowej. Jedno z nich, ZP3 nie tylko pełni funkcje strukturalne, ale również, dzięki związanymi z nim oligosacharydami, ma funkcje wiązania rozmaitych receptorów. Dotychczas sądzono, że ekspresja ZP3 jest ograniczona do oocytów i osłonki przejrzystej oraz niektórych nowotworów. Dzięki badaniom prowadzonym przez zespół prof. prof. Wołczyńskiego i Rahmana z udziałem Doktorantki okazało się jednak, że ZP3 jest również ekspresowane w jądrach. To bardzo interesujące odkrycie, dlatego uważam, że podjęcie przez mgr Lebedzińską badań nad charakterystyką i znaczeniem ekspresji ZP3 w tkankach jądra u człowieka i myszy było potrzebne i uzasadnione.

Rozprawa doktorska mgr Weroniki Lebedzińskiej ma układ typowy dla tego typu monografii. Zawiera streszczenie w języku angielskim i polskim, listę skrótów, wstęp, cel, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, rycin, spis tabel oraz piśmiennictwo.

Streszczenie w języku angielskim i polskim w zwięzły sposób opisuje przesłanki podjęcia badań, cel pracy, uzyskane wyników oraz ich podsumowanie.

Wstęp zaczyna się krótkim wprowadzeniem doskonale uzasadniającym potrzebę podjęcia badań. Następnie Doktorantka szczegółowo opisuje budowę i funkcje białka ZP3 oraz rozwój płodowy jądra, steroidogenezę, budowę histologiczną jądra i proces spermatogenezy. Wszystkie informacje zostały przedstawione jasno i czytelnie w oparciu o dane z aktualnego piśmiennictwa. Dodam, że wstęp został dodatkowo zilustrowany bardzo dobrymi,

przejrzystymi, kolorowymi rycinami przedstawiającymi mechanizm regulacji płci męskiej oraz proces spermatogenezy. Informacje zawarte we wstępie są bardzo dobrym wprowadzeniem do tematu badań i stanowią logiczne uzasadnienie celu pracy Doktorantki.

Ogólnym celem pracy mgr Weroniki Lebedzińskiej było scharakteryzowanie ekspresji ZP3 w wybranych tkankach ludzkich i mysich oraz zbadanie ontogenezy ZP3 wraz rozwojem jądra i spermatogenezy u myszy. Celami szczegółowymi było natomiast:

1. Określenie, porównanie i lokalizacja ekspresji genu i białka ZP3 w jajnikach, jądrach i innych zdrowych tkankach u myszy i człowieka.
2. Określenie ekspresji oraz lokalizacji szczegółowej ZP3 w jądrze, spermatogenezie oraz komórkach macierzystych/progenitorowych spermatogenezy.
3. Charakterystyka ontogenezy ekspresji i lokalizacji ZP3 w jądrze mysim począwszy od życia płodowego, przed i po okresie dojrzewania płciowego do okresu osiągnięcia dojrzałości w kontekście zmian hormonalnych i rozwoju jąder/spermatogenezy.
4. Ocena wpływu wybranych hormonów płciowych i gonadotropin na ekspresję ZP3 w linii komórkowej GC-1spd.

Uważam, że wyżej wymienione cele szczegółowe zostały sformułowane prawidłowo i stanowią logiczny ciąg mający doprowadzić do uzyskania odpowiedzi na postawione pytania.

W Materiałach i metodach Doktorantka wyczerpująco opisała wszystkie ludzkie i mysie tkanki, których użyto w pracy oraz sposób ich przygotowania do dalszych badań. Należy zaznaczyć, że prowadzenie badań zostało pozytywnie zaopiniowane przez lokalną komisję bioetyczną.

W kolejnych podrozdziałach mgr Lebedzińska opisała metody hodowli komórek i ich stymulacji. W celu stymulacji, aby uniknąć (jak rozumiem) wpływu hormonów zawartych w FBS komórki były wcześniej „głodzone” w medium z 0,5% FBS. To uzasadnione działanie, chociaż niekiedy może mieć niekorzystny wpływ na komórki. Czy nie byłoby zatem bardziej zasadne użyć FBS pozbawionego steroidów? Mam również pytanie, czy stosowana pożywka zawierała czerwień fenolową, która również wywiera efekty zbliżone do hormonów steroidowych.

Dalej Doktorantka opisała metody zastosowanych badań molekularnych oraz immunohistochemicznych. Dobór metod jest właściwy do prowadzonych badań i nie budzi większych zastrzeżeń chociaż osobiście nie jestem entuzjastą ilościowej oceny RNA metodą SYBR-green.

Niestety, w opisie ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (Real-Time RCR) znalazłem poważne niedociągnięcia. Po pierwsze, metoda ilościowa SYBR green (domyślam się, że tą metodą posługiwała się Doktorantka) nie została właściwie opisana. Po drugie, z analizy wyników wnoszę, że mgr Lebedzińska posługiwała się również klasyczną metodą RT-PCR (?) z

analizą amplifikowanego produktu (produkt reakcji z metody SYBR-green, czy zwykły produkt RT-PCR?) poddanemu elektroforezie w żelu agarozowym. Niestety w Materiałach i metodach nie znalazłem o tym żadnej wzmianki. Generalnie, wygląda na to, że opis metodyki analizy mRNA badanych genów jest niewystarczający i nie zawiera informacji na temat rozdziału elektroforetycznego. Mam też czysto techniczne pytanie dotyczące wyboru genów referencyjnych. Na poparcie swojego wyboru Doktorantka nie podaje żadnej pozycji piśmiennictwa. Dlatego chciałbym się dowiedzieć, dlaczego wybrała te a nie inne geny i czy jej wybór ma potwierdzenie w literaturze?

Z innych drobnych uchybień mogę odnotować, że mgr Lebedzińska nie podała, co było grupą kontrolną w eksperymentach ze stymulacją komórek hormonami. Doktorantka miała też problem z opisem procedury przygotowywania skrawków histologicznych do barwienia IHC. Jak rozumiem, dysponowała gotowymi skrawkami uzyskanymi od histopatologów i nie zadała sobie wystarczająco dużo trudu, aby dokładnie opisać całą metodykę. Użyte w opisie kuriozalne sformułowania takie jak „utrwalone w parafinie” i „uwodnieniu w ksylenie” traktuję jako „wypadek przy pracy”.

Do pozostałych opisów metod i analizy statystycznej nie mam istotnych uwag.

W sekcji Wyniki mgr Lebedzińska po kolei opisała rezultaty swoich badań zaczynając od pokazania ekspresji ZP3 w mysim i ludzkim jądrze oraz w komórkach linii mysich spermatocytów. Pokazała również ekspresję ZP3, a raczej jej brak wielu różnych tkankach ludzkich. Dalej, zgodnie z wytyczonymi celami zbadała ekspresję ZP3 podczas ontogenezy jądra myszy, u myszy pozbawionych ekspresji receptora dla LH oraz oceniła ekspresję ZP3 w kontekście profilu ekspresji genów kodujących enzymy związane ze steroidogenezą.

Na koniec zbadała, czy stymulacja hormonami linii mysich spermatocytów ma wpływ na ekspresję ZP3. Wyniki tych ostatnich doświadczeń wskazują, że badane hormony nie modyfikowały ekspresji ZP3, muszę jednak zauważyć, że komórki były traktowane badanymi czynnikami tylko przez 24 godz. Nie można zatem wykluczyć, że wpływ hormonów mógłby ujawnić się po dłuższym czasie stymulacji. Z obowiązku recenzenta muszę też zauważyć, że na obydwu przedstawionych wykresach (Ryc. 23 i 24) wyniki przedstawione są w różny sposób. Na Ryc. 24 wyniki są prezentowane w odniesieniu do kontroli (metoda $2\Delta\Delta Ct$?) zaś na Ryc. 23 wydaje się, że tylko w odniesieniu do genu referencyjnego (metoda ΔCt ?). Nie ma to większego znaczenia w kontekście analizy porównawczej wyników, nie mniej sugeruje pewną drobną niestaranność w przygotowaniu i obróbce wyników.

Ogólnie uważam, że sposób przedstawienia wyników jest przejrzysty i bardzo przekonujący. Jestem szczególnie pod dużym wrażeniem doskonałych barwień immunohistochemicznych oraz wyników z mikroskopii fluorescencyjnej. W niektórych rycinach znalazłem drobne niejasności, na przykład nie jest wyjaśnione co oznacza skrót ND (Ryc. 3, 11). Domyślam się, że oznacza to

„not detected”, ale to tylko moje przypuszczenia. Dostrzegłem również termin „marker wielkości” (Ryc. 4, 9). Jest to wyrażenie żargonowe i powinno być zastąpione terminem standard molekularny.

Uzyskane wyniki mgr Lebedzińska przedyskutowała w świetle aktualnej wiedzy. Widać wyraźnie, że wiedza ta jest w dalszym ciągu niewielka, co stawia Doktorantkę i cały zespół w awangardzie badań nad fizjologią i klinicznym wykorzystaniem białka ZP3.

W dyskusji zabrakło mi krytycznego odniesienia do cytowanych danych z Human Protein Atlas, gdzie raportowano ekspresję ZP3 w wielu normalnych narządach ludzkich. Wyniki Doktorantki nie potwierdzają tych danych i to wymagałoby głębszej dyskusji. Podobnie przydałoby się również głębsze mechanistyczne spojrzenie na indukcję ekspresji ZP3 oraz jej znaczenie biologiczne.

Zaciekawił mnie wątek dotyczący możliwości użycia ZP3 jako potencjalnego antygenu w immunoterapii nowotworów oraz opartej na immunizacji antykoncepcji. Tę ostatnią możliwość Doktorantka przedyskutowała w szerokim kontekście metod antykoncepcyjnych, nie przekonało mnie to jednak, że ZP3 byłby rzeczywiście przydatny w tej dziedzinie medycyny rozrodu.

Pracę wieńczy 7 wniosków odpowiadających postawionym celom pracy:

1. Ekspresja na poziomie białkowym ZP3 w jądrach u myszy i ludzi jest obecna w spermatogoniach, spermatocytach i spermatydach, a także w linii komórkowej spermatocytów mysich GC-2spd(ts).
2. W jajniku ekspresja ZP3 występuje w pęcherzyku pierwotnym, wtórnym i antralnym.
3. Komórki somatyczne zdrowych jąder (Leydiga i Sertolego oraz macierzyste i progenitorowe spermatogonia nie mają ekspresji ZP3 na poziomie białkowym.
4. W ontogenezie jąder myszy ZP3 pojawia się 21 dniu wraz z zainicjowaniem spermatogenezy.
5. U myszy LuRKO -/- pozbawionych spermatogenezy nie dochodzi do ekspresji ZP3 w jądrach.
6. Hormony: estradiol, testosteron, progesteron, FSH, LH i hCG naie mają wpływu na poziom ekspresji ZP3 w komórkach spermatocytów mysich GC-2spd(ts).
7. Ekspresja ZP3 pojawia się wraz z uruchomieniem spermatogenezy.

Przedstawione przez Doktorantkę wnioski odpowiadają postawionym celom pracy, wynikają z uzyskanych wyników i są ich dobrym podsumowaniem. Jedynie w przypadku wpływu hormonów na ekspresję ZP3 (pkt. 6) byłbym bardziej ostrożny, ponieważ, jak wcześniej zaznaczyłem, czas obserwacji ograniczony był tylko do 24 godzin.

Przedstawione przeze mnie uwagi krytyczne nie mają istotnego znaczenia dla mojej ostatecznej, bardzo dobrej oceny rozprawy doktorskiej mgr Weroniki Lebedzińskiej. Podsumowując, stwierdzam, że Doktorantka wykazała się znajomością wielu metod

badawczych i dysponuje szeroką wiedzą w temacie prowadzonych badań. Nie mam wątpliwości, że osiągnęła stopień dojrzałości i samodzielności naukowej uprawniającej ją do ubiegania się o stopień doktora.

W związku z tym, uważam, że monografia mgr Weroniki Lebedzińskiej jest jej samodzielnym, oryginalnym i interesującym osiągnięciem oraz spełnia wszystkie ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktorski określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zmianami). W związku z tym wnoszę do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Weroniki Lebedzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 14/09/2023

prof. dr hab. Jacek Malejczyk