

Prof. dr hab. Barbara Bilińska
Uniwersytet Jagielloński

**Ocena rozprawy doktorskiej
mgr Weroniki Lebedzińskiej**

***pt. Charakterystyka ekspresji glikoproteiny Zona pellucida 3 w tkankach
zdrowych oraz jej ontogeneza wraz z rozwojem jądra i spermatogenezy***

Molekularne mechanizmy kontrolujące procesy steroidogenezy i spermatogenezy są obiektem badań specjalistów reprezentujących nauki podstawowe, aplikacyjne i kliniczne, a informacje dostępne w wyniku prowadzenia tych badań wzajemnie się uzupełniają. Uwaga wielu badaczy skupia się na określeniu mechanizmów odpowiedzialnych za zaburzenia steroidogennej funkcji gonad, za obniżanie się parametrów plemników lub rytmu ich uwalniania, co może służyć poznaniu patogenezy wielu schorzeń skutkujących obniżeniem męskiej płodności.

Ocena wartości naukowej rozprawy:

Planując badania zawarte w rozprawie doktorskiej, Pani mgr **Weronika Lebedzińska** zainteresowała się ciekawymi wynikami uzyskanymi w macierzystym zespole badawczym, a dotyczącymi obecności glikoproteiny ZP3 w prawidłowej tkance jądra. Należy zaznaczyć, że glikoproteina ZP3 wchodzi w skład osłonki przejrzystej (*Zona pellucida*) komórki jajowej, biorąc udział w oogenezie i procesie zapłodnienia, oraz wiązaniu plemnika i indukowaniu reakcji akrosomalnej. Poza prawidłowymi komórkami ekspresja ZP3 została również wykazana w niektórych nowotworach, co skłoniło badaczy do dalszych poszukiwań w kierunku wykorzystania tego białka jako celu w immunoterapii nowotworów. Ponieważ rola ZP3 w regulacji funkcji jądra jest dotychczas nierozpoznana, Doktorantka postanowiła dokonać charakterystyki ekspresji ZP3 w wybranych ludzkich i mysich tkankach oraz wykazać zmiany lokalizacji tej glikoproteiny wraz z rozwojem jądra i spermatogenezy u myszy. Zatem rozprawa doktorska Pani mgr Weroniki Lebedzińskiej bardzo dobrze wpisuje się w nurt aktualnych i ważnych badań dotyczących molekularnego podłoża zmian podczas różnicowania komórek w zdrowych ludzkich i mysich tkankach, ze szczególnym uwzględnieniem jądra. Dlatego wybór zagadnienia, które Doktorantka postanowiła rozwiązać oceniam bardzo wysoko, a istotnym uzasadnieniem podjęcia badań jest nikłe rozpoznanie znaczenia ZP3 w tkance jąder. Praca istotnie poszerza wiedzę z zakresu endokrynologii rozrodu i andrologii.

Ocena poprawności redakcyjnej rozprawy:

Układ redakcyjny jest typowy dla prac doktorskich. Poza głównymi składowymi rozprawy (wstępem, celem pracy, opisem materiału i metod, wynikami, dyskusją i wnioskami) znajduje się spis rycin i tabel oraz wykaz piśmiennictwa. Proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami zostały prawidłowo zachowane. Przed wstępem pracy zostały zamieszczone streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych w tekście skrótów oraz zgoda Komisji Bioetycznej UMB. Rozprawa liczy 78 stron tekstu i zawiera 102 pozycje anglojęzycznego, dobrze dobranego piśmiennictwa. Dokumentację wyników stanowią 2 tabele i 24 ryciny, w tym 16 rycin z licznymi mikrofotografiami wykonanymi w mikroskopie świetlnym w jasnym polu oraz mikroskopie konfokalnym.

Otrzymane wyniki i sposób ich prezentacji świadczy o opanowaniu warsztatu metodycznego niezbędnego do przeprowadzenia badań i do oceny badanych parametrów. Być może, z korzyścią dla odbioru pracy, można było dokonać częściowej redukcji uzyskanych wyników, tych, nie dotyczących jąder.

Ocena wartości merytorycznej rozprawy:

W dobrze i zwięźle napisanym *Wstępie* Doktorantka omawia znaczenie białek osłonki przejrzystej, skupiając się na glikoproteinie ZP3, będącej przedmiotem jej rozprawy i podaje dane na temat genu *Zp3* kodującego badane białko. W kolejnej części szczegółowo przedstawia rozwój jądra rozpoczynając od gonad bipotencjalnych we wczesnym okresie rozwoju embrionalnego i ilustruje ten proces czytelną ryciną nr 1. Zapoznaje czytelnika z rolą płodowych komórek Sertolego i Leydiga, zwracając uwagę na regulację tych ostatnich przez receptor LH/hCG aktywowany ludzką gonadotropiną kosmówkową. Skupia się również na roli testosteronu w prawidłowym przebiegu maskulinizacji zarodka na wczesnym etapie rozwoju. Ten bardzo dobrze napisany podrozdział kończy omówieniem różnicowania komórek rozrodczych i przedstawieniem tego procesu na informatywnej rycinie. Następnie, krótko charakteryzuje proces steroidogenezy, przedstawia budowę histologiczną dojrzałego jądra i szczegółowo omawia proces spermatogenezy.

Uważam, że *Wstęp* wystarczająco argumentuje postawiony cel pracy i podjęcie się charakterystyki ekspresji ZP3 w wybranych tkankach ludzkich i mysich ze szczególnym naciskiem na analizę zmian ZP3 w ontogenezie jądra i przebiegu spermatogenezy u myszy.

Na podkreślenie zasługuje zarówno wybór różnorodnego materiału do badań [tkanki mysie i ludzkie oraz komercyjna linia spermatocytów mysich GC-2spd(ts)] jak i trafne dobranie tkanek w odpowiednim okresie rozwoju osobniczego samców myszy, poczynając od 18. dnia życia płodowego, poprzez 1, 7, 15, 21, 35 dzień po urodzeniu aż do tkanek pobranych od osobników dwumiesięcznych.

Mgr Weronika Lebedzińska konsekwentnie realizowała postawione zadania. Izolowała RNA, prowadziła rozdziały elektroforetyczne wyizolowanych próbek RNA, produktów PCR i produktów PCR w czasie rzeczywistym. W celu sprawdzenia transkryptów mRNA wykonywała hybrydyzację in situ z

użyciem sondy RNAScope. Natomiast do oceny obecności i rozmieszczenia ZP3 w badanych tkankach i komórkach wykonywała odpowiednio barwienia immunohisto- i immunocytochemiczne. Doktorantka zastosowała również technikę *whole mount immunostaining* aby wybarwić całe kanaliki nasienne i dokonać oceny ekspresji ZP3 w komórkach macierzystych i progenitorowych. Dodatkowo, ekspresję ZP3 na poziomie białka analizowała w jądrach myszy LuRKO, czyli pozbawionych receptora LH techniką nokautu genowego. Ten znakomity model badawczy pozwolił na ocenę ekspresji ZP3 w jądrach z brakiem spermatogenezy.

Nie dostrzegłam informacji na temat pomiarów stężeń hormonów w rozdziałach *Materiał i Metody* oraz *Wyniki*. Czy istnieją zmiany zachodzące w profilach hormonalnych? Proszę doktorantkę o odpowiedź na to pytanie.

Doktorantka wykonała zaplanowane badania, opracowała i przedyskutowała wyniki i zweryfikowała postawioną tezę. Całość pracy doktorskiej wykonała w Klinice Rozrodczości i Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku we współpracy z Uniwersytetem w Turku w Finlandii. Część badań zostało sfinansowanych przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM 21 (2022/45/N/NZ4/03410), a część z subwencji przyznanych Uniwersytetowi Medycznemu w Białymstoku.

Do znaczących i nowatorskich rezultatów należy wykazanie lokalizacji białka ZP3 w komórkach rozrodczych ludzkich i mysich jąder: w spermatogoniach, spermatocytach i spermatydach oraz w linii komórek mysich GC-2spd(ts), co stwarza możliwość wykorzystania ZP3 jako docelowego antygenu w odwracalnej męskiej antykoncepcji.

Istotnym poznawczo wynikiem było również pokazanie braku ekspresji w komórkach macierzystych i progenitorowych oraz somatycznych komórkach Sertolego i komórkach Leydiga. Kolejnym, przekonującym dowodem funkcjonalnego znaczenia ZP3 w procesie spermatogenezy był brak ekspresji tego białka w jądrach myszy LuRKO. Co istotne, wykorzystanie tkanek mysich w różnych wieku pozwoliło Doktorantce wykazać pojawienie się ekspresji ZP3 dopiero w okresie dojrzewania samców myszy. W jądrach osobników w okresie prenatalnym i neonatalnym mgr Lebedzińska nie notowała ekspresji badanego białka. Wynik ten stanowi poparcie sugestii o potencjalnej roli ZP3 w regulacji spermatogenezy.

Dążenie do rozwiązania postawionego celu jest niewątpliwie zasługą przygotowania Doktorantki przez Promotora, Dra Nafiza Rahmana i Kierownika Kliniki, prof. dr hab. Sławomira Wołczyńskiego, których wiedza oraz doświadczenie naukowe i kliniczne są powszechnie znane i cenione.

Jednym z elementów oceny jest zwrócenie uwagi recenzenta na braki lub błędy w tekście pracy i dokumentacji. Pomimo, iż rozprawę Pani mgr Weroniki Lebedzińskiej cechuje staranność w przygotowaniu całości opracowania, Doktorantka, nie ustrzegła się nieścisłości i drobnych przeoczeń, które z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej.

- Str. 8, Streszczenie, Autorka pisze...”Osłonka przejrzysta była z powodzeniem stosowana jako docelowy antygen”.... jest to niezręczne sformułowanie, zapewne chodziło Autorce o białka osłonki przejrzystej. Dalej Autorka pisze...”Przeprowadzono barwienie immunologiczne całych kanalików...”. Wkradł się błąd, do barwienia całych kanalików zastosowano technikę immunohistochemiczną.
- Uwaga terminologiczna – w tekście pracy nazwy użytych do doświadczeń odczynników powinny być ujednoczone: I tak, na str. 25 (podrozdział 3.2) – przy pierwszym pojawieniu się terminu, prawidłowo użyto pełną nazwę i skrót (4% zbuforowana formalina (PFA), a następnie również prawidłowo, jedynie skrót 4% PFA. Dalej jednak jest Autorka odstępuje od tej zasady i pisze 4% roztwór formaliny zamiast 4% PFA (podrozdział 3.9) lub 4% roztwór formaliny (PFA) (podrozdział 3.11), również zamiast 4% PFA.
- str. 28. Proszę o doprecyzowanie jakie było stężenie nadtlenu wodoru podczas inkubacji preparatów użytych do hybrydyzacji *in situ* i w jakim buforze inkubowano preparaty aby odsonić antygen (podrozdział 3.8.).
- str. 29. piąta linia od dołu: Inkubacji poddaje się preparaty nie próby. W ostatniej linii, określenie „klej Pertex” proponuje zastąpić „medium do zatapiania Pertex” (podrozdział 3.9.), i dalej: komórki wysiano na szkiełkach w komorach 8-dołkowych, a nie na szkiełkach 8-dołkowych (podrozdział 3.10.).
- str. 39. Użycie kursywy przy skrótach FSHR i LHR jest niepoprawne, skoro Autorka pisze o ekspresji receptorów obu gonadotropin, a nie o ich transkryptach. Kursywę stosuje się do opisu genu, skrót białka piszemy pismem prostym. Wkradł się też błąd literowy, FSHR, a nie FHSR. Z kolei, na rycinie 15 gdzie Autorka przedstawia lokalizację transkryptów pismo proste Zp3 winno być zastąpione kursywą *Zp3*.
- W podpisie rycin 5, 6, 8, 15 zabrakło opisu skali mikrofotografii
- Rycina 9 przedstawia wyniki ekspresji ZP3 w liniach komórkowych BLTK1 i MSC-1, natomiast w rozdziale *Materiał i Metody* zabrakło informacji na ten temat.
- Ryciny 8, 10, 13 przedstawiają obrazy z mikroskopu konfokalnego, w rozdziale *Materiał i Metody* brakuje nazwy firmy mikroskopu i opisu skali.

Mój komentarz dotyczy także wniosków, które stanowią raczej podsumowanie wyników i nie mają charakteru wnioskowania. Proponuję, tam gdzie jest to możliwe, użyć komponent wnioskowania poprzez dodanie słów *wskazuje na...*, *przemawia za...* *świadczy o...*

Na przykład, Wniosek nr 5, cyt.: ‘U myszy LuRKO -/-, pozbawionych spermatogenezy nie dochodzi do ekspresji ZP3 w jądrach’ - mógłby brzmieć: „Brak ekspresji ZP3 w jądrach myszy LuRKO wskazuje na możliwy udział badanej glikoproteiny w regulacji spermatogenezy”.

Z kolei, Wniosek nr 4, cyt.: "W ontogenezie jąder myszy ZP3 pojawia się w 21 dniu wraz z zainicjowaniem spermatogenezy" oraz Wniosek nr 7, cyt.: „Ekspresja ZP3 pojawia się wraz z uruchomieniem spermatogenezy” – mógłby mieć wspólne brzmienie: „Pojawienie się ekspresji ZP3 w 21 dniu wraz z uruchomieniem spermatogenezy przemawia za funkcjonalną rolą ZP3 w przebiegu tego procesu.

Przedstawione powyżej przykłady nie są zarzutem merytorycznym, a jedynie przyczynkiem do dyskusji, dotyczącym umiejętności formułowania wniosków przez młodych badaczy.

Pomimo podniesionych uwag bardzo pozytywnie oceniam przedłożoną do recenzji dysertację i stwierdzam, że Pani mgr **Weronika Lebiedzińska** zasługuje w pełni na nadanie stopnia doktora. Doktorantka wykazała znajomość problematyki oraz umiejętność pracy nowoczesnymi technikami i prawidłowo je wykorzystwała. Całość opracowania wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki i umiejętność dyskusji wyników własnych na tle światowego piśmiennictwa. Atutem rozprawy jest wartość poznawcza badań, które istotnie poszerzyły wiedzę o roli glikoproteiny ZP3 w rozwoju jądra myszy.

Wniosek końcowy

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Weroniki Lebiedzińskiej spełnia wszystkie kryteria stawiane pracom doktorskim w myśl artykułu 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2022 r. poz. 574). Wnoszę zatem do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Weroniki Lebiedzińskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Prof. dr hab. Barbara Bilińska
Czł. koresp. PAN

Kraków, 24 lipca 2023 r.

