



Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra Endokrynologii Ginekologicznej i Leczenia Niepłodności
Zakład Diagnostyki i Leczenia Niepłodności
Department of Gynecological Endocrinology and Infertility Treatment
Division of Diagnosis and Treatment of Infertility
Karol Marcinkowski University of Medical Sciences, Poznań, Poland

60-535 Poznań
ul. Polna 33
Poland

Tel.: +48(61) 8419412,
Fax: +48(61) 8419612
e-mail: knier@gpsk.am.poznan.pl

Prof. dr hab.n. med. Leszek Pawelczyk
Kierownik Katedry i Zakładu
Leszek Pawelczyk, M.D., Ph.D.
Professor
Head of Department and Division

Poznań, 3 września 2023

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Weroniki Lebedzińskiej

**p.t. „Charakterystyka ekspresji glikoproteiny zona pellucida 3 w tkankach
zdrowych oraz jej ontogeneza wraz z rozwojem jądra i spermatogenezy”**

Glikoproteiny osłonki przejrzystej zostały opisane a następnie zidentyfikowane jako trzy osobne białka ZP 1, 2 i 3 po raz pierwszy przez Jeffrey'a Bleila i Paula Wassermana w 1980 roku (*Bleil, J.D. & Wasserman, P.M.: 1978, J. Cell Biol. (abstr.) Bleil, J.D. & Wasserman, P.M.: 1980, Dev. Biol.*). Od tego momentu rozpoczęły się intensywne badania dotyczące charakterystyki biochemicznej, immunologicznej oraz genetycznych mechanizmów regulujących czynność tych glikoprotein jak również ich znaczenia w procesach rozrodczych. W 2004 roku Lefievre i wsp. zidentyfikowali czwartą glikoproteinę osłonki przejrzystej ZP4 (*Lefievre L. et al.;: 2004, Hum Reprod.*). ZP3 będąc jednym z trzech głównych składników osłonki otaczającej komórkę jajową ssaków, poprzez umożliwianie wiązania się plemników oraz inicjowanie reakcji akrosomalnej, umożliwia plemnikowi przeniknięcie przez warstwę zony pellucida i zapłodnienie oocytu. Tak więc jest niezbędnym elementem w komórkowym procesie rozrodu. W późnych latach 90-tych w wielu ośrodkach rozpoczęto badania nad zastosowaniem blokowania glikoproteiny ZP3 w antykoncepcji, najpierw u samic zwierząt wolnożyjących a następnie u kobiet. O ile u zwierząt strategia immunizacji ZP3 przyniosła wymierne efekty to niestety u kobiet ze względu na autoimmunologiczne zapalenie jajników prowadzące do jego trwałej destrukcji zatrzymało dalsze badania.

Jeszcze do niedawna, ogólnie przyjętym dogmatem w medycynie rozrodu, pozostawał fakt, że glikoproteina ZP3 zlokalizowana jest tylko w obrębie komórki jajowej. W ostatnim dziesięcioleciu pojawiły się prace, w dużej części zrealizowane przez zespół prof. Rahmana, dokumentujące ekspresję glikoproteiny ZP3 zarówno w rakach nabłonkowych jajnika i ich przerzutach a także w raku prostaty, jelita grubego i ostatnio raku drobnokomórkowym płuc. Obserwacje te dają szansę na zupełnie nowe strategie terapeutyczne w onkologii. Podjęty przez doktorantkę temat dotyczący poszukiwania nowych lokalizacji glikoproteiny ZP3 jest niezwykle interesujący a wręcz fascynujący.

Przedstawiona do oceny rozprawa liczy 77 strony maszynopisu. Układ pracy jest typowy i obejmuje: streszczenia w języku angielskim i polskim, wykaz skrótów, wstęp, cel, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, spisy rycin i tabel oraz piśmiennictwo.

W pierwszej części wstępu doktorantka w sposób zwięzły zapoznaje czytelnika z aktualną wiedzą dotyczącą glikoproteiny ZP3, omawiając jej lokalizację, budowę, genetyczne uwarunkowania jej produkcji oraz rolę jaką pełni w zarówno w oogenezie jak i procesie zapłodnienia komórki jajowej i wczesnym okresie rozwoju zarodka. W drugiej części tego rozdziału rozprawy autorka w sposób przejrzysty opisuje embriologiczne i histologiczne etapy rozwoju jądra, z uwzględnieniem okresu płodowego jak i postnatalnego oraz uwarunkowania genetyczne i endokrynne regulujące powyższe procesy. Ponadto, w sposób kompendialny przedstawia wiedzę dotyczącą budowy histologicznej jądra, dokonującej się w nim steroidogenezy oraz spermatogenezy. Jednocześnie, doktorantka, w sposób niezwykle sprawnie dokonuje równoległego porównania dokonujących się wyżej opisanych procesów w jądrach ludzkich i mysich. Jedyna drobna uwaga, która nasuwa się recenzentowi to bardzo lapidarny opis obu rycin znajdujących się w tej części rozprawy. Zamieszczenie wyjaśnień zastosowanych skrótów w podpisach znacznie ułatwiłoby ich interpretację. Całość przedstawionej treści jest przejrzysta i zawiera najistotniejsze elementy aktualnej wiedzy w tym zakresie oraz stanowi znakomite wprowadzenie i uzasadnienie celu pojętej rozprawy naukowej.

Cel pracy sformułowany jest jasno i precyzyjnie a jego rozwinięcie w postaci celów szczegółowych nakreśla plan prowadzony badań i przygotowuje czytelnika do analizy uzyskanych wyników.

Materiał badawczy stanowi 16 fragmentów zdrowych tkanek ludzkich od osób dorosłych oraz jądra mysie z 18 dnia embrionalnego, 1,7,15,21 i 35 dnia po urodzeniu i 2,6 miesiąca życia oraz jajniki, śledziona i mięsień szkieletowy. Z obowiązku recenzenta należy podkreślić jednak pewną rozbieżność w opisie zastosowanego do eksperymentu materiału mysiego. Na stronie 25 doktorantka zaznacza, że do badań nad ontogenezą użyto jąder z 6 miesiąca życia po czym w tabeli 6 wymienia grupy eksperymentalne kończące się na 2 miesiącu życia. Już w tym miejscu pragnę podkreślić, że ta rozbieżność znajduje się w opisie wyników. Materiał z 6 miesiąca życia został wykorzystany tylko w immunohistochemicznej lokalizacji białka ZP3 natomiast

lokalizacja transkryptów mRNA ZP3 oraz immunohistochemiczna ekspresja enzymów steroidogenezy kończyła się na materiale z 2 miesiąca życia. Metody badawcze zastosowane przez autorkę obejmują niezwykle nowoczesne i wysublimowane techniki z zakresu genetyki i biologii molekularnej oraz immunohistochemii, pozwalające na precyzyjne badanie glikoproteiny ZP3 na poziomie ekspresji samego białka jak i mRNA ZP3. Świadczy to dobitnie o znakomitym opanowaniu przez doktorantkę bardzo bogatego warsztatu laboratoryjnego i naukowego.

Wyniki zostały przedstawione na 22 czytelnym rycinach. Ich opis jest niezwykle precyzyjny i zrozumiały oraz w pełni korespondujący z założonymi celami. Z całą stanowczością należy podkreślić, że stwierdzenie przez mgr Weronikę Lebedzińską obecności glikoproteiny ZP3 w jądrze ludzkim i mysim jest pionierskie w skali światowej i zmienia naszą wiedzę dotyczącą lokalizacji tej glikoproteiny w organizmie ludzi i myszy. Dzięki znakomicie zaplanowanym i zrealizowanym eksperymentom badawczym, doktorantka nie tylko wykazała obecność ZP3 w jądrze ale wykazała jej lokalizację w spermatogoniach, spermatocytach i spermatydach przy braku tej glikoproteiny w komórkach Leydiga, Sertolego, macierzystych, progenitorowych oraz dojrzałych plemnikach. Ponadto, przeprowadzając eksperymenty umożliwiające analizę poszczególnych etapów ontogenezy jąder oraz włączając do badania myszy ze znokautownym receptorem LH, mgr Weronika Lebedzińska wykazała ścisły związek pomiędzy spermatogenezą a występowaniem glikoproteiny ZP3 w jądrach. W tym momencie nasuwa się pytanie czy istnieje także mechanizm odwrotny tzn. czy zablokowanie ZP3 na komórkach rozrodczych jądra na wczesnych etapach ich rozwoju np. spermatogonii czy spermatocytów zahamuje ich dalsze dojrzewanie do stadium dojrzałego plemnika. Kolejnym elementem wykonanych przez mgr Weronikę Lebedzińską badań była ocena wpływu hormonów gonadotropowych (LH, FSH oraz hCG) i steroidowych (estradiol, progesteron i testosteron) na ekspresję ZP3 w linii komórkowej spermatocytów mysich. Na podstawie uzyskanych wyników doktorantka wykazała brak wpływu któregośkolwiek z analizowanych hormonów, niezależnie od zastosowanej dawki, na ekspresję badanej glikoproteiny na mysich spermatocytach. Badania Kempistego i wsp., które mgr Lebedzińska cytuje w Dyskusji, wykazały synergistyczne działanie estradiolu i progesteronu na zwiększenie ekspresji ZP3 mRNA jak i białka ZP3 na psich oocytach (*Kempisty B.et.al.: Theriogenology, 2012;77:684-693*). Być może podczas dalszych badań w tym temacie warto byłoby sprawdzić efekt stymulacji oparty na kombinacji poszczególnych hormonów na spermatocyty. Niezależnie od powyższych drobnych uwag, pragnę podkreślić, że jako recenzent, zajmujący się od bardzo wielu lat medycyną rozrodu, jestem pod ogromnym wrażeniem uzyskanych przez mgr Weronikę Lebedzińską wyników.

Przygotowanie Dyskusji mającej na celu konfrontację wyników własnych z tymi opisanymi przez innych badaczy, w sytuacji gdy uzyskane wyniki są absolutnie pionierskie w skali światowej, wydaje się być niemożliwe. Pomimo braku jakichkolwiek publikacji na temat obecności glikoproteiny ZP3 w jądrze, mgr Weronika Lebedzińska przeprowadza fascynujące rozważania nad możliwościami wyłączenia białka ZP3 obecnego na spermatogoniach, spermatocytach i

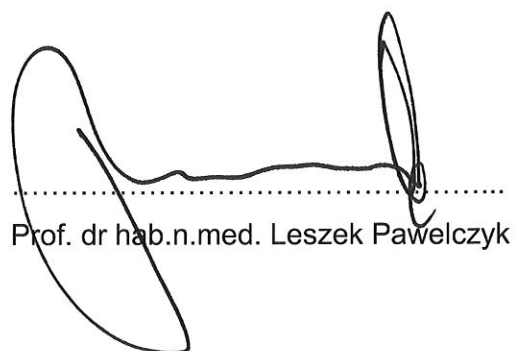
spermatydach dla celów antykoncepcyjnych. Zaproponowane przez doktorantkę w dyskusji praktyczne wykorzystanie uzyskanych wyników i wyciągniętych wniosków, może otworzyć zupełnie nowe możliwości dla tak długo poszukiwanej i potrzebnej antykoncepcji dla mężczyzn.

Całość rozprawy kończy się siedmioma wnioskami, które w rzeczowy sposób podsumowują uzyskane wyniki i w pełni korespondują z założonymi celami rozprawy.

Cytowane przez Doktorantkę piśmiennictwo liczące 104 pozycje jest niezwykle trafnie dobrane i świadczy o znakomitej znajomości tematu.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że rozprawa Pani mgr Weroniki Lebedzińskiej została znakomicie zaplanowana i zrealizowana w sposób bardzo precyzyjny co świadczy o jej ogromnej dojrzałości intelektualnej i naukowej a zastosowanie bardzo nowoczesnych metod potwierdza doskonały warsztat badawczy doktorantki. Uzyskane wyniki mają charakter pionierski w skali światowej i posiadają potencjalną ogromną wartość użyteczną w medycynie rozrodu człowieka. Dlatego wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku prośbę o wyróżnienie tej rozprawy.

Uważam, że przedstawiona mi do oceny praca spełnia wszelkie wymagania dla tego rodzaju rozpraw. Wobec powyższego wnioskuję do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Weroniki Lebedzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab.n.med. Leszek Pawelczyk