

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 MARII SZTACHELSKIEJ PT. „ZMIANY EKSPRESJI RECEPTORÓW PROGESTERONOWYCH I ICH ROLA W ENDOMETRIUM W CYKLU MIESIĄCZKOWYM.”

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu mgr Marii Sztachelskiej została przygotowana w postaci monografii w języku polskim. Pracę wykonano w Zakładzie Biologii i Patologii Rozrodu Człowieka Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie pod kierunkiem Prof. dr hab. Sławomira Wołczyńskiego. Wprawdzie tematyka dotycząca roli progesteronu i jego receptorów w cyklu miesięczkowym wydaje się dość dobrze poznana, jednak w dalszym ciągu nasza wiedza w tej dziedzinie pozostaje niepełna. W szczególności badania podjęte przez Doktorantkę mają istotne znaczenie dla lepszego zrozumienia mechanizmów odpowiedzialnych za implantację, a tym samym patomechanizmów niepłodności związanej z zaburzeniami receptywności endometrium. Tym samym uważam, że podjęcie przez Doktorantkę tej tematyki było w pełni uzasadnione.

Monografia mgr Marii Sztachelskiej ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, spis rycin i tabel oraz bibliografię.

Streszczenie w języku angielskim i polskim zawiera bardzo zwięzły opis tematu pracy i uzyskanych wyników. We wstępie Doktorantka przedstawia podstawowe informacje na temat roli i budowy endometrium oraz regulacji hormonalnej i cyklicznych zmian jakim ono podlega. Szczególny nacisk został położony na mechanizm działania progesteronu i charakterystykę jego receptorów jądrowych i błonowych. Ponadto zostały opisane znane ścieżki przekazywania sygnałów przez te receptory. We wstępie Doktorantka odniosła się również do mechanizmów zagnieżdżania się zarodka ze szczególnym uwzględnieniem markerów receptywności endometrium na poziomie strukturalnym, biochemicznym i molekularnym. Zawarte we wstępie treści zostały dodatkowo zilustrowane sześcioma oryginalnymi, kolorowymi rycinami. Podstawowe informacje o receptorach progesteronowych zostały natomiast podsumowane w tabeli. Podsumowując, wstęp jest bardzo dobrym, zwięzłym i jasnym wprowadzeniem do tematyki badań Doktorantki i stanowi dobre uzasadnienie celów jej pracy.

Główny cel pracy mgr Marii Sztachelskiej było scharakteryzowanie profilu ekspresji receptorów progesteronowych w różnych fazach cyklu menstruacyjnego oraz ich roli w reakcji doczesnowej. Doktorantka przedstawiła również cztery szczegółowe cele obejmujące następujący zakres badań.

1. Ocena ekspresji genów i białek receptorów progesteronowych w tkankach endometrium w cyklu miesięczkowym.
2. Ocena zmian ekspresji genów receptorów progesteronowych w przebiegu przemiany doczesnowej komórek zrębu endometrium.
3. Zbadanie znaczenia receptorów progesteronowych i ich wpływu na przemianę doczesnową prze użyciu specyficznych inhibitorów jądrowych i błonowych receptorów progesteronowych.
4. Zbadanie wpływu stymulacji progesteronem oraz specyficznymi inhibitorami jądrowych i błonowych receptorów progesteronowych na ekspresję genów receptorów kwasu lizofosfatydowego i sfingozyno-1-fosforanu.

W mojej opinii cele te zostały sformułowane prawidłowo, a przesłanki do ich realizacji znajdują potwierdzenie w aktualnym stanie wiedzy.

Kolejna część pracy „Materiały i metody” zawiera opis badanej grupy pacjentek oraz metod zastosowanych do realizacji postawionych celów badawczych. Generalnie opis metodyki badań jest poprawny. Mam tylko kilka drobnych uwag, na które jak sądzę Doktorantka ustosunkuje się w trakcie obrony pracy.

Z opisu dowiadujemy się, że do badań włączono 20 pacjentek w różnych fazach cyklu, niestety Autorka nie podała, ile z nich było w fazie proliferacyjnej i sekrecyjnej. Informacji na temat liczebności odpowiednich grup nie znalazłem również w wynikach. Mam też uwagę co do ogólnego opisu grupy, którą Doktorantka nazwała kobietami „leczonymi metodą pozaustrojowego zapłodnienia z powodu niepłodności wywołanej czynnikiem męskim.” Słowo „leczony” budzi tutaj moją wątpliwość, szczególnie, że niepłodność była związana z czynnikiem męskim.

Z kolei w opisie metody ilościowej reakcji RT-PCR zabrakło mi informacji na temat jak wyliczano względną ekspresję mRNA. To bardzo istotny punkt, który wymaga wyjaśnienia. Podobnie nie jest dla mnie jasne jakie były przesłanki do użycia beta-aktyny jako genu referencyjnego.

W badaniach *in vitro* na komórkach zrębu endometrium Doktorantka posłużyła się pożywką z surowicą pozbawioną steroidów. Jest to warte podkreślenia, ponieważ wielu badaczy popełnia błąd stosując zwykłe surowice. W tym miejscu chciałbym również z ciekawości zapytać czy stosowano pożywkę podstawową z czerwienią fenolową (rutynowy składnik pożywek)? Czerwień fenolowa ma właściwości estrogenowe i w zasadzie ją również należałoby wyeliminować z układu doświadczalnego.

Poza wymienionymi powyżej uwagami stwierdzam, że pozostałe opisy metod badawczych są wystarczające i spełniają warunki dobrego opisu metodologii badań.

W sekcji „Wyniki” mgr Sztachelska opisała ekspresję mRNA genów kodujących różne receptory dla progesteronu w tkance endometrialnej pobranej w różnych fazach cyklu. Za pomocą technik immunohistochemicznych Doktorantka pokazała następnie jak wygląda lokalizacja i ekspresja tych receptorów w tkance endometrialnej pobranej w różnych fazach cyklu. Ta część została zilustrowana świetnymi mikrofotografiami, których interpretacja nie nastrocza żadnych wątpliwości.

W dalszej części tego rozdziału Doktorantka przedstawiła wyniki uzyskane z zastosowaniem komórek zrębu endometrium w hodowli *in vitro*. Z badań poświęconych ocenie ekspresji mRNA receptorów dla progesteronu oraz mRNA receptorów dla wybranych lizofosfolipidów w komórkach zrębu wynika, że traktowanie tych komórek hormonami i ich inhibitorami nie ma istotnego wpływu. Wprawdzie zaobserwowano różnice są statystycznie istotne, ale pozwolę sobie zauważyć, że różnice te generalnie nie przekraczają 20% wyjściowej ekspresji stąd, jak się zdaje, nie mają one znaczenia biologicznego. Należy jednak zauważyć, że Doktorantka wykazała, że traktowanie komórek zrębu estradiolem i progesteronem stymuluje znacznie produkcję PRL i IGFBP1. Efekt ten był hamowany przez antagonistów receptorów jądrowych (należy wytknąć Doktorantce, że nie podała na wykresach istotności statystycznej), ale nie przez specyficzny inhibitor PGRMC1 co wskazuje, że receptor ten jest negatywnym regulatorem reakcji doczesnowej. Obserwacja ta jest oryginalna i bardzo interesująca.

Podsumowując tą część rozprawy stwierdzam, że wyniki zostały starannie opracowane i przedstawione w jasny i przejrzysty sposób na wykresach i mikrofotografiach. Moja jedyna uwaga dotyczy braku umieszczenia w opisach do tabel i rycin informacji na temat zastosowanej metody statystycznej. Jak już wspomniałem wcześniej zabrakło też informacji o liczebności porównywanych grup oraz nie wiadomo w jakich jednostkach przedstawiono względną ekspresję mRNA.

Uzyskane wyniki Doktorantka przedyskutowała w świetle aktualnej wiedzy. Dyskusję oceniam bardzo dobrze, chociaż wydaje mi się, że Autorka nie musiała na początku tego rozdziału opisywać mechanizmów odpowiedzialnych za implantację oraz odnosić się do metody „skreczingu” endometrium, szczególnie, że te zagadnienia nie były tematem jej rozprawy. Co do pozostałej części dyskusji uważam, że Doktorantka wykazała się umiejętnością krytycznej analizy wyników oraz korzystania z piśmiennictwa. Piśmiennictwo zostało starannie dobrane i właściwie cytowane. Warto też zaznaczyć, że dyskusję podsumowała bardzo ładną i przejrzystą ryciną podsumowującą mechanizm działania progesteronu w przebiegu reakcji doczesnowej.

Na podstawie uzyskanych wyników i ich analizy Doktorantka przedstawiła 6 wniosków odpowiadających postawionym celom pracy:

1. Ekspresja błonowych i jądrowych receptorów progesteronowych obecna jest w endometrium we wszystkich fazach cyklu.
2. W wywołaniu przemiany doczesnowej uczestniczą jądrowe receptory progesteronowe.
3. Receptor PGRMC1 uczestniczy w regulacji przemiany doczesnowej ograniczając ją.
4. Aktywacja błonowych receptorów progesteronowych nie wywołuje reakcji doczesnowej.
5. Ekspresja receptorów lizofosfolipidów jest regulowana przez progesteron,

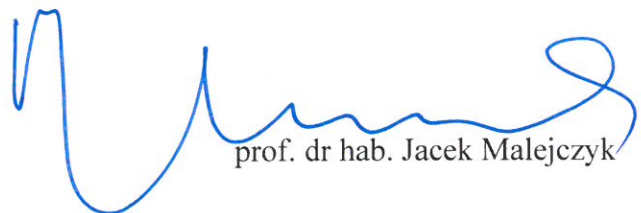
prawdopodobnie pełnią one istotną rolę w przygotowaniu przemiany doczesowej endometrium.

6. Badanie reakcji doczesowej *in vitro* w endometrium w przyszłości może być testem diagnostycznym w grupie pacjentek z niepowodzeniami implantacji.

Przedstawione przez Doktorantkę wnioski są prawidłowe i są dobrym podsumowaniem uzyskanych wyników.

Podsumowując, stwierdzam, że Doktorantka dysponuje bogatym warsztatem badawczym i szrołą wiedzą w temacie prowadzonych badań i nie mam wątpliwości, że osiągnęła stopień dojrzałości i samodzielności naukowej uprawniający ją do ubiegania się o stopień doktora. Moje uwagi zawarte w recenzji mają charakter formalny i nie mają wpływu na moją ogólną bardzo wysoką ocenę rozprawy. Dlatego uważam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr Marii Sztachelskiej jest oryginalnym osiągnięciem Autorki oraz spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktorski. W związku z tym wnoszę do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Marii Sztachelskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 31/07/2021



prof. dr hab. Jacek Malejczyk