

Prof. dr hab. Barbara Bilińska
Zakład Endokrynologii
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Uniwersytet Jagielloński

Ocena
rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Malcher
pt. *Identyfikacja genów krytycznych dla procesu spermatogenezy:*
próba określenia molekularnych markerów azoospermii

Azoospermia może być skutkiem licznych nieprawidłowości zachodzących w procesie spermatogenezy, wywołanych m.in. zaburzeniami regulacji hormonalnej, czynnikami genetycznymi, immunologiczno-infekcyjnymi lub środowiskowymi. Dlatego molekularne mechanizmy regulacji spermatogenezy są obiektem badań specjalistów reprezentujących nauki podstawowe, aplikacyjne i kliniczne, a informacje dostępne w wyniku prowadzenia tych badań wzajemnie się uzupełniają.

Ocena merytoryczna pracy:

Tezy rozprawy mgr Agnieszki Malcher związane są z najnowszymi trendami w badaniach biomedycznych dotyczących poszukiwania nowych genów zaangażowanych w proces spermatogenezy i niepłodność męską. Dlatego wybór zagadnienia, które Doktorantka postanowiła rozwiązać oceniam bardzo wysoko.

Temat rozprawy jest ściśle związany z kluczowym zagadnieniem jakim jest diagnostyka mężczyzn z azoospermią. Zrealizowane badania jednoznacznie wskazują, że diagnostyka oparta jedynie na ocenie histopatologicznej jest niepełna i może być obciążona błędem. Dlatego znaczącym osiągnięciem niniejszej rozprawy jest zidentyfikowanie potencjalnych biomarkerów azoospermii i tym samym stworzenie molekularnego narzędzia diagnostyczno-prognostycznego, które w przyszłości może znaleźć zastosowanie w rzetelnej ocenie i leczeniu patologii gonady męskiej. Poprawna diagnostyka męskiej niepłodności stanowi poważne wyzwanie XXI wieku.

Należy podkreślić, że Doktorantka realizowała badania w oparciu o dwa projekty badawcze, z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego i Narodowego Centrum Nauki.

Badania były wieloetapowe i opierały się przede wszystkim na porównaniu klasyfikacji hierarchicznej profilu ekspresji genów pacjentów z azoospermią z ich

oceną histopatologiczną, porównaniu profilu ekspresji genów gonady męskiej z prawidłową i upośledzoną spermatogenezą, porównaniu profilu ekspresji genów w grupie pacjentów z zaburzeniem spermatogenezy na wczesnym i późnym etapie różnicowania się komórek gametogenicznych oraz porównaniu profilu ekspresji genów pacjentów z azoospermią, u których notowano lub nie notowano poprawy w wyniku terapii hormonalnej.

Materiał biologiczny stanowiły wycinki gonady męskiej pacjentów ($n = 19$) z azoospermią idiopatyczną, pobrane podczas biopsji diagnostycznej. Część pacjentów z azoospermią nieobstrukcyjną została poddana terapii hormonalnej. Grupę kontrolną stanowiły komercyjnie dostępne próby RNA z gonady męskiej o prawidłowym obrazie histologicznym z trzech amerykańskich firm. Na prowadzenie badań została wydana zgoda (nr 994/12) Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Do realizacji założonych celów Doktorantka wykorzystwała nowoczesne techniki biologii molekularnej, a izolację RNA prowadziła w oparciu o zmodyfikowaną metodę Chomczyńskiego wraz z dodatkowym oczyszczaniem przy użyciu zestawu RNeasy Plus Mini firmy Qiagen. Analizę profili ekspresji genów badała przy użyciu macierzy ekspresyjnych GeneChip Human Gene ST 1.0 firmy Affymetrix. Sprawdzanie wyników na poziomie mRNA wykonywała stosując techniki *real time* PCR, czyli ocenę w czasie rzeczywistym. Korzystała również z niezależnego zbioru danych pochodzących z bazy danych ArrayExpress. Analizy immunoblottingu typu Western i techniki immunohistochemiczne wykorzystwała do oceny poziomu białka i jego tkankowej lokalizacji. W celu określenia wariantów allelicznych wykonała sekwencjonowanie wybranych fragmentów DNA.

Analiza porównawcza profilu ekspresji genów w grupie pacjentów niepłodnych i grupie kontrolnej pozwoliła Pani mgr Malcher na wyodrębnienie blisko 5000 genów różniących się ekspresją, z czego Doktorantka wyodrębniła 7 genów, których ekspresja była znacząco (4 x) obniżona u pacjentów z azoospermią w stosunku do kontroli, co oznacza iż zidentyfikowała geny potencjalnie istotne dla płodności męskiej.

Kolejna analiza pozwoliła na wyselekcjonowanie dalszych 7 genów o wysoce podwyższonej ekspresji (5 x) u pacjentów z blokiem spermatogenezy komórek na późnym etapie różnicowania, co pozwoliło na wykazanie potencjalnych markerów molekularnych określających stopień upośledzenia spermatogenezy. Dzięki

dalszemu etapowi badań dotyczącemu analizy porównawczej pacjentów poddanych terapii hormonalnej, Doktorantka wyodrębniła jeden gen, którego ekspresja była znacząco podwyższona u pacjenta z azoospermią, u którego nie notowano poprawy w wyniku leczenia i tym samym zidentyfikowała potencjalny biomarker określający szansę na pomyślne leczenie azoospermii.

Na podstawie powyższych wyników Doktorantka sformułowała wnioski potwierdzające założone cele pracy.

Nie mam wątpliwości, że Doktorantka zasługuje na nadanie stopnia doktora, wykazała się rzetelną znajomością problematyki badawczej i umiejętnością realizacji postawionych zadań. Jej doskonałe przygotowanie metodyczne wynika z doświadczenia kierującego rozprawą Profesora Macieja Kurpisza i osób pracujących w Jego zespole w Zakładzie Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych oraz umiejętności współpracy naukowej w macierzystym Instytucie.

Ocena metodologiczna pracy:

Praca doktorska mgr Agnieszki Malcher jest obszernym (158 stron), tradycyjnie skonstruowanym opracowaniem z wyodrębnionymi rozdziałami: *Wstęp, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Posumowanie i Wnioski oraz Streszczenie i Literatura*. Na ostatnich siedmiu stronach zamieszczone zostały tabele uzupełniające, które znakomicie pełnią swoją uzupełniającą funkcję. W rozprawie Doktorantka zacytowała 234 pozycji literatury, w tym około 70 % z ostatnich 10 lat.

Rozprawę otwiera spis rycin i tabel oraz wykaz skrótów, a treść pracy udokumentowana została 42. rycinami i 37. tabelami wraz dalszymi 11. tabelami uzupełniającymi przedstawiającymi m.in. wartości ekspresji potencjalnych biomarkerów azoospermii i zaburzeń spermatogenezy. Część rycin to informatywne schematy i tabele, a rysunki z kolei dobrze ilustrują tekst Wstępu rozprawy.

Cele pracy zostały jasno i zwięźle sformułowane. Doktorantka w podrozdziałach Wstępu omawia budowę i funkcje gonady męskiej, szczególną uwagę poświęca procesowi spermatogenezy i jego regulacji na poziomie molekularnym, w dalszych podrozdziałach skupia się na problemie klinicznym jakim jest niepłodność męska, przedstawia obraz azoospermii i potencjalne przyczyny jej powstania oraz zwraca uwagę na istotę diagnostyki niepłodności męskiej i jej leczenia. Opis metod został zawarty na 20 stronach i prezentuje bardzo szczegółowo

każdą z zastosowanych technik, co pozwala na ocenę poprawnego doboru i zastosowania wybranych metod. W tym miejscu pragnę podkreślić wagę profesjonalnie przygotowanego wykazu skrótów. Autorka używa licznych skrótów i ich prawidłowe rozwinięcie w języku angielskim i polskim wpływa znacząco na czytelność rozprawy. Również zawarte w tym rozdziale liczne tabele (5-8), (12-25), zawierające spis stosowanych do analiz odczynników wraz z jego zastosowaniem i pochodzeniem, przyczyniają się do jasności całego rozdziału i pokazują profesjonalne podejście doktorantki do pracy laboratoryjnej.

Dyskusja jest napisana dojrzałe w oparciu o bardzo dobrze dobraną światową literaturę. Autorka podkreśla znaczenie mikromacierzy jako narzędzia do poszukiwania biomarkerów męskiej niepłodności.

Zarówno walory poznawcze pracy jak i prawidłowo dobrane techniki molekularne użyte do realizacji postawionych celów zasługują na podkreślenie.

Poniżej, przedstawiam uwagi z prośbą o wyjaśnienie oraz inne drobne usterki stylistyczne, które zestawiałam w punktach.

1. Sformułowanie „W przedstawionym projekcie...” należałoby zastąpić „W przedstawionej pracy...” (str. 72).

2. Barwienie preparatów hematoksyliną skutkuje wybarwieniem jąder komórkowych na kolor fioletowy, a nie niebieski (str.73), co widać na fotografiach (str.108-109).

3. Proszę o wyjaśnienie określenia „analiza nienadzorowana” (str. 119).

4. W licznych miejscach tekstu rozprawy wkradł się błąd w pisowni słowa „ponadto”, które pisze się razem, a nie rozdzielnie.

5. Jak Pani tłumaczy brak immunolokalizacji białka związanego z syndromem Williams-Beuren regionu 28 (WBSCR28) w plemnikach? Na rycinie 35c (str.109) widnieje kanalik bez wyraźnej obecności plemników, trudno zatem rozstrzygnąć czy komórki te są negatywne, czy może ich nieobecność w świetle kanalika nie pozwoliła na ocenę lokalizacji badanego białka.

6. W dyskusji (str.125) poprawy wymaga akapit*Wykazano, że myszy pozbawione genu Prss37 były bezpłodne, a plemniki pozbawione białka Adam3.....objawiając się defektem w migracji z macicy do jajowodu [217]....* Cytacja 217 powinna być nieco wyżej zaznaczona (dotyczy myszy z knockoutem genu *Prss37*). W miejscu cytacji [217] proponuję zacytować pracę wykonaną na myszach z knockoutem genu *Adam3*, korygując równocześnie drugą część zdania, gdyż podany

efekt braku białka Adam3 jest nieścisty. Mógłby brzmieć*objawiając się defektem wiązania plemnika do osłonki przejrzystej.*

Podsumowując pragnę zaznaczyć, że całość pracy zredagowana jest bardzo starannie, co przemawia za dużym zaangażowaniem Doktorantki i Promotora nie tylko w część badawczą pracy, ale także w jej edytorską poprawność.

Wiadomo również, że przedstawienie uwag czy sugestii należy do obowiązku recenzenta, ale pomimo drobnych nieścisłości, które wykazałam powyżej rozprawę doktorską mgr Agnieszki Malcher oceniam bardzo pozytywnie. Weryfikację założeń badawczych Doktorantka osiągnęła na drodze logicznie zaplanowanych i dobrze wykonanych doświadczeń, co wskazuje na umiejętność wykorzystania wiedzy teoretycznej i praktycznej. Wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań są uzasadnione i inspirują do dalszych poszukiwań naukowych.

Na zakończenie pragnę również dodać, że część wyników rozprawy została opublikowana w 2013 roku w *Fertility and Sterility*. Doktorantka jest pierwszym autorem pracy w tym prestiżowym amerykańskim czasopiśmie o IF 4.174, (45 punktów wg MNiSW), co stanowi najlepsze uzasadnienie mojego wniosku końcowego.

W świetle przedstawionej oceny stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agnieszki Malcher spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim w myśl artykułu 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym, oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Malcher do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wartość merytoryczną pracy i opublikowanie części wyników (patrz powyżej) wnioskuję o jej wyróżnienie w formie przewidzianej regulaminem Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu.



W Krakowie, 19 marca 2014 r.

