



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Biologii Funkcjonalnej i Ekologii
Zakład Immunologii
prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska



Warszawa, 6.06.2022r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr analit. med. Michała Zycha,
z tytułu:**

**Wpływ hormonów płciowych na cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy u kobiet
dotkniętych problemem poronień oraz kobiet rodzących bez komplikacji**

Praca doktorska Pana Michała Zycha została wykonana w Zakładzie Immunologii Klinicznej, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy jest dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon, a promotorem pomocniczym dr n. med. Filip Dąbrowski.

Tematyka ocenianej pracy dotyczy poronień nawykowych, ważnego problemu medycznego i społecznego. Określenie istotnych w tym procesie przyczyn i ich mechanizmów pozwoliłoby lepiej zrozumieć naturę poronień i przeciwdziałać im. W rozwoju i utrzymaniu ciąży ważną rolę odgrywa układ odpornościowy, w tym proces tolerancji immunologicznej. Możliwość kontrolowania tego procesu, poprzez oddziaływanie na kluczowe w odpowiedzi immunologicznej szlaki sygnałowe i molekuly z nimi związane, pozwoliłoby prawdopodobnie uniknąć części samoistnych poronień.

W ten nurt poszukiwań wpisują się badania prowadzone przez mgr Michała Zycha. Podjął się zadania oceny wpływu hormonów płciowych na molekuly uczestniczące w rozwoju i regulacji odpowiedzi immunologicznej u kobiet z poronieniami oraz kobiet rodzących bez komplikacji. Należy uznać tę inicjatywę za ważne poznawczo zadanie naukowe z potencjałem aplikacyjnym.

Rozprawa doktorska Pana Michała Zycha przedstawiona została w postaci manuskryptu, zawierającego 213 stron i podzielonego na typowe dla tego rodzaju dysertacji rozdziały.

Wstęp jest dobrym wprowadzeniem do tematyki rozwijanej w rozprawie, opartym na przeglądzie wielu, ponad 300, pozycji z literatury przedmiotu. Doktorant przedstawia charakterystykę badanych w pracy cząstek. Analizuje rolę układu odpornościowego w ciąży i w czasie poronień oraz wpływ hormonów płciowych na układ odpornościowy. W końcu definiuje poronienie nawykowe. Przejrzyście napisany Wstęp stanowi dobre wprowadzenie do postawienia celów badawczych, a wybór publikacji świadczy o swobodnym poruszaniu się Doktoranta w tematyce.

W oparciu o aktualną wiedzę, Doktorant określił cele badawcze. Badaniami objął trzy grupy pacjentek: kobiety z poronieniami nawykowymi, kobiety ciężarne i kobiety nie będące w ciąży. Uwagę skupił na najważniejszych molekułach kontrolujących odpowiedź immunologiczną, głównie związanych z sygnałem drugim, oceniając ich ekspresję na limfocytach T oraz komórkach NK i NKT. Analizował również stężenia wydzielanych przez komórki cząstek kontrolujących układ odpornościowy. Szczególną uwagę zwraca w swoich badaniach na wpływ hormonów płciowych na limfocyty i komórki NK pochodzące od kobiet z poronieniami nawykowymi i kobiet w ciąży.

Doktorant zastosował szereg metod z zakresu biologii komórki, biochemii, cytometrię przepływową, które dokładnie opisano. Przedstawiono również założenia przeprowadzonych analiz. Doktorant przeprowadził dokładną charakterystykę badanych grup pacjentek.

Kolejny, liczący 60 stron rozdział zawiera opis uzyskanych w badaniach wyników. Rozdział ten został podzielony na odpowiednie podrozdziały reprezentujące główne tematy rozprawy. Doktorant opisuje uzyskane w badaniach wyniki, które zamieścił w wielu tabelach i rycinach, w większości kilkupoziomowych. Obszerne, wyczerpujące podpisy pod rycinami ułatwiają śledzenie myśli autora. Dodatkowe, ciekawe informacje wprowadzają przygotowane Heat mapy. Uwagę jednak zwraca sformułowanie „Hodowla stymulowana nie OKT-3”, pojawiające się w podpisach rycin 32-36, nie jest dla czytelnika jasne, co ono oznacza. W opisie wyników na stronie 86 (ostatnie zdanie) nie podano w której grupie stwierdzono obniżony odsetek limfocytów T regulatorowych z ekspresją cząstki TIGIT. Wyniki badań świadczą o dobrym opanowaniu przez doktoranta metodyki badawczej stosowanej w doświadczeniach i wskazują na Jego dużą wiedzę i umiejętności w tym zakresie.

Do najważniejszych osiągnięć Doktoranta należy zaliczyć wykazanie, że hormony płciowe mogą wpływać na ekspresję badanych cząstek kontrolujących układ odpornościowy. Szczególnie w obecności progesteronu o stężeniu 500 ng/ml, gdyż w tych wersjach

zaobserwował wzrost odsetka komórek z ekspresją większości badanych markerów: PD1, LAG-3, VISTA, TIM-3 i TIGIT na komórkach pochodzących od kobiet z poronieniami nawykowymi. Obserwacje te dotyczyły praktycznie wszystkich badanych populacji komórek. Pojawia się pytanie, czy Doktorant obserwował również wzrost gęstości badanych cząstek na komórce, przejawiający się wzrostem średniej fluorescencji płynącej z badanych komórek?

Inna ważna obserwacja dotyczy porównania ekspresji badanych markerów na komórkach w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi i kobiet ciężarnych. W tym przypadku stwierdził obniżenie odsetka komórek z ekspresją wspomnianych markerów w grupie kobiet z poronieniami nawykowymi. Zaobserwował również różnice w stężeniach niektórych molekuł kontrolnych i ligandów. Na uwagę zasługuje dobra dokumentacja wyników. Prawidłowo zostały dobrane testy laboratoryjne i odpowiednie kontrole. Należy podkreślić ogromną pracę wykonaną w zakresie pozyskiwania materiału, jak również dużej liczby oznaczeń wykonanych na komórkach bezpośrednio izolowanych i hodowanych w obecności hormonów płciowych.

Uzyskane wyniki zostały omówione na tle dostępnej wiedzy. Dyskusja napisana jest dojrzałe i przejrzyste. Doktorant odnosi się do obszernego piśmiennictwa, obejmującego głównie dostępne prace z obszaru onkologii i chorób autoimmunizacyjnych oraz istniejące prace z obszaru ginekologii i poronień nawykowych. Po dyskusji zamieszczono podsumowanie, podkreślające najważniejsze osiągnięcia.

Wyniki badań skłaniają mgr Michała Zycha do stwierdzenia, że istnieje możliwość wykorzystania ich w diagnostyce poronień nawykowych oraz terapii. Uzyskane wyniki są obiecujące, ale wymagają dalszych badań. W jakim kierunku, zdaniem Doktoranta, powinny być prowadzone? Czy mógłby, na podstawie własnych wyników, przemyśleń i piśmiennictwa, określić na które markery należałoby zwrócić szczególną uwagę, ocena których mogłaby być szczególnie ważna w diagnostyce poronień nawykowych?

Dysertacja napisana została starannie, mgr Michał Zych w jasny sposób przekazuje założenia pracy, wyniki i ich znaczenie w badaniach światowych. Trudno też doszukać się większych uchybień edytorskich, poza literówkami, nielicznymi niezręcznymi sformułowaniami jak komórki T zamiast limfocyty T, barwienie komórek zamiast znakowanie komórek, próbówka była barwiona zamiast komórki w próbówce były znakowane i tym podobne. W opisie niektórych odczynników, w tym stosowanych hormonów, nie podano źródła pochodzenia/firmy.

Podsumowując, oceniam rozprawę doktorską mgr Michała Zycha pozytywnie. Rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wskazuje na ogólną wiedzę teoretyczną Doktoranta w zakresie prowadzonych badań. Wykazał się również umiejętnością samodzielnego wykonywania pracy naukowej. Rozprawa spełnia wymagania określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) Tym samym, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Michała Zycha do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje również o wyróżnienie rozprawy nagrodą. Doktorant wykazał się umiejętnością samodzielnego rozwiązywania postawionych zadań naukowych, znajomością i opanowaniem nowoczesnych technik laboratoryjnych, szeroką znajomością tematu. Wykazał się również umiejętnością publikowania uzyskanych rezultatów w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.



prof. dr hab. Grażyna Korczak-Kowalska