

Prof. dr hab. Andrzej Sechman
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Al. Mickiewicza 24/28
e-mail: a.sechman@urk.edu.pl

Kraków, 29 maja 2020r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Alicji Kamińskiej

pt. „Komunikacja jukstakrynowa w gonadzie męskiej gryzoni a działanie androgenów oraz środowiskowych związków hormonalnie czynnych”

wykonanej w Zakładzie Endokrynologii
Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
pod kierunkiem dr hab. Anny Hejmej, prof. UJ

W ciągu ponad stuletniego okresu intensywnego rozwoju badań związanych z biologią rozrodu samców oraz endokrynologią gonady męskiej, uczeni podejmowali próby wyjaśnienia procesów związanych z produkcją plemników oraz syntezą męskich hormonów – androgenów. W Polsce liderem tych badań stał się ośrodek krakowski, w którym pod kierunkiem Pani Prof. Barbary Bilińskiej prowadzone były i nadal są kontynuowane prace dotyczące wyjaśnienia parakrynowych oddziaływań pomiędzy komórkami Leydiga, Sertoliego, komórkami plemnikotwórczymi oraz układu odpornościowego. Badania prowadzone w ostatnich latach w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego wykazały, że zablokowanie działania androgenów na poziomie receptora androgenowego jest przyczyną nieprawidłowej ekspresji i lokalizacji białek połączeń międzykomórkowych, m.in. złącz szczelinowych w nabłonku plemnikotwórczym, co z kolei wydaje się być jednym z czynników prowadzących do zaburzenia funkcji jąder. Rozprawa doktorska Pani mgr Alicji Kamińskiej, wpisująca się w nurt tych badań, jest próbą określenia wzajemnego oddziaływania między komunikacją jukstakrynową (z udziałem szlaku Notch) a sygnalizacją androgenową w jądrach gryzoni, przede wszystkim w komórkach Sertoliego, oraz wyjaśnienia, czy aktywność szlaku Notch może podlegać zaburzającemu działaniu środowiskowych substancji hormonalnie czynnych.

Oceniana rozprawa obejmuje w sumie 154 strony i jest podzielona na 8 rozdziałów: Wstęp, Hipoteza i cele pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie i Literatura. Jest to układ typowy, stosowany w tego typu naukowych opracowaniach. Główne rozdziały dysertacji zostały poprzedzone pięciostronicowym wykazem skrótów, który ułatwia lekturę całej pracy oraz informacją dotyczącą źródeł finansowania badań (2 tematy DS, których kierownikiem była Doktorantka oraz 2 granty NCN: MINIATURA1 i OPUS13 – kierowane przez dr hab. Annę Hejmej, promotora pracy). Znajduje się tutaj również wykaz publikacji naukowych, które ukazały się w czasopiśmie indeksowanych w bazie Web of Science o stosunkowo wysokim współczynniku wpływu IF, w których opublikowano część wyników badań zamieszczonych w pracy doktorskiej. Są to następujące prace:

1. Kamińska A. i inni (2018) Bisphenol A and dibutyl phthalate affect the expression of juxtacrine signaling factors in rat testis. *Chemosphere* 199: 182–190 (IF = 5,108; 100 pkt.)
2. Kamińska A. i inni (2020) Notch signaling regulates nuclear androgen receptor AR and membrane androgen receptor ZIP9 in mouse Sertoli cells. *Andrology* 8: 457-472. (IF = 3,106; 140 pkt.)
3. Kamińska A. i inni (2020) Disruption of androgen signaling during puberty affects Notch pathway in rat seminiferous epithelium. *Reproductive Biology and Endocrinology* 18:30 (IF = 2,589; 140 pkt.)

W publikacjach tych Pani mgr Alicja Kamińska jest pierwszym autorem, a więc należy przypuszczać, że miała znaczący udział w ich przygotowaniu. *W tym kontekście chciałbym zapytać, dlaczego Doktorantka nie zdecydowała się na pracę doktorską w postaci zbioru kilku publikacji naukowych, co na pewno ułatwiłoby analizę całej dysertacji?* Bowiem znaczna część wyników zamieszczonych w ocenianej dysertacji znajduje się również w przedstawionych publikacjach naukowych – były one recenzowane przez niezależnych recenzentów i nie powinny być ponownie oceniane przez recenzenta pracy.

W swojej pracy doktorskiej mgr Alicja Kamińska postawiła pytanie czy sygnalizacja jukstakrynowa oddziałuje z sygnalizacją androgenową i poprzez te interakcje wpływa na funkcjonowanie gonady męskiej. Tutaj należy wyjaśnić, że w gonadzie męskiej zachowanie homeostazy i zapewnienie właściwych warunków przebiegu spermatogenezy warunkowane jest współdziałaniem układu endokrynnego kontrolującego funkcje komórek Leydiga i Sertoliego oraz lokalnymi mechanizmami regulacyjnymi, do których zalicza się sygnalizację parakrynową, połączenia międzykomórkowe i sygnalizację jukstakrynową. Dotychczas najlepiej scharakteryzowanym szlakiem sygnałowym biorącym udział w oddziaływaniach jukstakrynowych jest szlak sygnałowy Notch, który odgrywa istotną rolę w koordynowaniu różnicowania komórek i decyzji dotyczących ich losów w wielu narządach. Aktywacja tego szlaku jest indukowana przez wiązanie zewnątrzkomórkowej domeny receptorów Notch z błonowymi ligandami obecnymi na sąsiednich komórkach. Powoduje to odcięcie zewnątrzkomórkowej domeny Notch przez dezintegrinę i metaloproteinazę ADAM, podczas gdy domena wewnątrzkomórkowa jest rozszczepiana przez kompleks γ -sekretazy. Uwolniona wewnątrzkomórkowa domena Notch (NICD) przemieszcza się do jądra, gdzie tworzy kompleks złożony z czynnika transkrypcyjnego RBP-J i białka MAML1, który wraz z acetylotransferazami histonowymi wpływa na ekspresję genów efektorowych (głównie represorów transkrypcji) należących do rodziny Hes i Hey. Postawiona przez Autorkę hipoteza badawcza zakłada istnienie wzajemnej zależności między sygnalizacją androgenową a aktywnością szlaku sygnałowego Notch w jądrze gryzoni (ze szczególnym uwzględnieniem udziału komórek Sertoliego jako głównych mediatorów działania androgenów w przebiegu procesu spermatogenezy) oraz możliwość zaburzającego wpływu środowiskowych substancji hormonalnie czynnych na aktywność szlaku Notch. Podstawowym celem pracy była weryfikacja tej hipotezy, w oparciu o wyniki uzyskane w eksperymentach *in vitro* i *in vivo* zaplanowanych w trzech kolejnych etapach. Sformułowanie celu badań zostało poprzedzone starannym opisem zagadnienia i jasnym uzasadnieniem w rozdziale 2 „Hipoteza i cele pracy”.

Należy podkreślić, że przedstawiona przez Autorkę hipoteza badawcza opiera się na świetnej znajomości piśmiennictwa, którego przegląd znajdujemy w rozdziale 1. „**Wstęp**”. Dotyczy on funkcji gonady męskiej i roli komórek Sertoliego w kontroli procesu spermatogenezy, sygnalizacji jukstakrynowej (ze szczególnym uwzględnieniem szlaku Notch) oraz androgenowej, gdzie transdukcja sygnału zachodzi za pośrednictwem receptora AR lub błonowego receptora ZIP9 oraz kładyn - białek androgenozależnych. Ponadto

w rozdziale tym znajdują się przydatne informacje dotyczące często stosowanych w badaniach sygnalizacji androgenowej, niesteroidowych antagonistów receptorów androgenowych, takich jak: flutamid i 2-hydroksyflutamid - dla receptora jądrowego (AR) oraz bicalutamid wykorzystany do zahamowania zarówno receptora AR, jak i błonowego receptora androgenowego (ZIP9). Można tutaj znaleźć również dane dotyczące stosowania 1,2-etanodimetanosulfonianu (EDS), który degradując komórki Leydiga, blokuje produkcję testosteronu. Substancje te zostały wykorzystane przez Autorkę pracy w zaplanowanych doświadczeniach. W ostatniej sekcji rozdziału „Wstęp” Autorka przybliży czytelnikowi zagadnienia związane z wpływem środowiskowych związków o aktywności hormonalnej, ze szczególnym uwzględnieniem stosowanych we własnych badaniach, bisfenolu A i ftalanu butylu, na funkcje osi podwzgórze-przysadka-jądra i procesy zachodzące w gonadzie męskiej. Tak dobrze przygotowany przegląd piśmiennictwa oraz znajomość poszczególnych zagadnień na pewno pomógł Autorce w opracowaniu metodologii badań, uzasadnieniu ich celowości oraz omówieniu wyników badań własnych. Jego wykaz obejmuje 318 pozycji, przedstawionych w rozdziale 8, zatytułowanym „Literatura”. Wykaz piśmiennictwa został przygotowany niezwykle starannie. Układ alfabetyczny, numeracja oraz interlinia między poszczególnymi pozycjami powoduje, że znalezienie danego cytowania nie sprawia trudności czytelnikowi. *W całym tekście znalazłem tylko jedno cytowanie na stronie 28 (Nordkap i wsp. 2011), które zostało pominięte w rozdziale „Literatura”. Tutaj pojawiają się jeszcze dwie uwagi, raczej techniczne: (i) nie jest jasne dlaczego w spisie piśmiennictwa Autorka w tytułach niektórych publikacji używa wielkich liter, jak w nazwach własnych, a w innych nie, (ii) szkoda, że Autorka nie zdecydowała się na umieszczenie numeru DOI, który pomaga w znalezieniu danej pozycji w Internecie, (iii) publikacje nr 156 i 157 oraz 290 i 291 wydane w tym samym roku, których pierwszym autorem jest ta sama osoba powinny być oznaczone literami „a” i „b”.*

Jak już wcześniej zaznaczyłem, podstawowym celem dysertacji przedstawionym w rozdziale 2 „**Hipoteza i cele pracy**” było zbadanie wzajemnego oddziaływania między komunikacją jukstakrynową a sygnalizacją androgenową w jądrach gryzoni, ze szczególnym uwzględnieniem udziału komórek Sertoliego oraz wyjaśnienie, czy aktywność szlaku Notch może podlegać zaburzającemu działaniu środowiskowych substancji hormonalnie czynnych. Autorka podjęła się pracochłonnych i kompleksowych badań, z wykorzystaniem modeli *in vitro* i *in vivo*, których realizacja obejmowała:

1. wyjaśnienie roli szlaku sygnałowego Notch w regulacji sygnalizacji androgenowej w komórkach Sertoliego i eksplantach jąder poprzez: (a) wykazanie zmian ekspresji receptorów androgenowych (AR i ZIP9), genów androgenozależnych (klaudyny 5 i klaudyny 11) oraz zmian stężenia cAMP w mysich i szczurzych komórkach Sertoliego oraz eksplantach jąder szczura po zahamowaniu aktywności szlaku Notch *in vitro* oraz (b) określenie roli ligandów szlaku Notch (JAG1, DLL1 i DLL4) w regulacji ekspresji receptorów AR i ZIP9 oraz klaudyny 5 i klaudyny 11 w mysich (TM4 i 15P1) oraz szczurzych (izolowanych od 20-dniowych szczurów) komórkach Sertoliego *in vitro*.
2. wyjaśnienie roli sygnalizacji androgenowej w kontroli ekspresji komponentów szlaku Notch oraz jego aktywności w gonadzie męskiej gryzoni, ze szczególnym uwzględnieniem komórek Sertoliego, poprzez: (a) wykazanie roli testosteronu w kontroli aktywności szlaku Notch w mysich i szczurzych komórkach Sertoliego *in vitro*, (b) wykazanie zmian ekspresji i lokalizacji komponentów szlaku Notch (Notch1/NIICD, HEY1, HES1) po zastosowaniu antagonistów receptorów androgenowych (2-hydroksyflutamid, bicalutamid) oraz wyciszeniu ekspresji AR

i ZIP9 w mysich oraz szczurzych komórkach Sertoliego *in vitro*, oraz (c) wykazanie zmian ekspresji oraz lokalizacji białek szlaku Notch (Notch1/N1ICD, HEY1, HES1, JAG1, DLL1, DLL4) w jądrach szczurów po zastosowaniu flutamidu lub EDS *in vivo* w okresie dojrzewania płciowego oraz dorosłości.

- określenie wpływu bisfenolu A i ftalanu dibutyłu (ksenobiotyków o aktywności hormonalnej) na sygnalizację jukstakrynową poprzez wykazanie zmian ekspresji komponentów szlaku Notch (Notch1/N1ICD, HEY1, HES1, HES5, JAG1, DLL1, DLL4) w eksplantach jąder szczurów inkubowanych *in vitro* w obecności tych ksenobiotyków.

Rozdział 3. pt. „**Material i metody**”, obejmujący 19 stron pracy, został podzielony na 13 podrozdziałów, w których zawarto szczegółowy opis przeprowadzonych doświadczeń, zastosowanych procedur oraz metod analitycznych i statystycznych. W pierwszych dwóch podrozdziałach (3.1. i 3.2.) Autorka najpierw opisała metodykę izolacji i hodowli eksplantów jąder szczurów szczepu Wistar, izolacji i hodowli pierwotnej szczurzych komórek Sertoliego, a także hodowli mysich komórek Sertoliego: TM4 – wykazujących ekspresję androgenowych receptorów jądrowych (AR) i błonowych (ZIP9) oraz 15P-1 – posiadających tylko receptor ZIP9. Użycie tych dwóch różnych linii komórkowych umożliwiło wyjaśnienie roli obu typów receptorów androgenowych w regulacji szlaku Notch w komórkach Sertoliego. W dalszej części Autorka przedstawiła schematy 5-ciu doświadczeń *in vitro*. W doświadczeniach tych w celu zahamowania sygnalizacji Notch zastosowano inhibitor γ -sekreazy, DAPT, oraz wyciszono ekspresję genu *Rbp-j* poprzez transfekcję komórek Sertoliego specyficznym siRNA, natomiast do aktywacji sygnalizacji Notch użyto immobilizowanych ligandów receptora Notch (JAG1, DLL1 i DLL4). W celu określenia roli receptorów androgenowych w regulacji szlaku Notch, komórki Sertoliego inkubowano z testosteronem lub/i antyandrogenami (2-hydroksyflutamidem i bikalutamidem), lub wyciszono ekspresję genów kodujących receptory *Ar* i *Zip9*. Do wykazania wpływu środowiskowych substancji hormonalnie czynnych na szlak Notch wykorzystano eksplanty jąder szczurów inkubowane w obecności bisfenolu A i ftalanu dibutyłu. W kolejnych dwóch podrozdziałach (3.3. i 3.4.) Autorka opisała przebieg doświadczeń *in vivo*, w których materiał badawczy stanowiły samce szczurów, które były utrzymywane w reżimie świetlnym 12L:12D wolnym dostępem do wody i paszy. Doświadczenia przeprowadzono na 5-tygodniowych samcach (będących w okresie dojrzewania płciowego) oraz na dojrzałych płciowo 3-miesięcznych samcach. W obu grupach wiekowych zwierzęta podzielono na dwie grupy: kontrolną i doświadczalną (n=6 w każdej grupie). W pierwszej grupie doświadczalnej szczury otrzymały przez 7 kolejnych dni podskórnie iniekcje flutamidu w dawce 50 mg/kg masy ciała, w celu zablokowania sygnalizacji receptorów AR. Drugą grupę doświadczalną stanowiły szczury, którym podano jednorazową iniekcję EDS w dawce 75 mg/kg masy ciała, w celu zablokowania syntezy i sekrecji testosteronu z komórek Leydiga. W 8 dniu po pierwszej iniekcji flutamidu lub EDS szczury uśmiercono, izolowano jądra, a następnie utrwalono z przeznaczeniem do badań immunohistochemicznych lub zamrażano i przechowywano do czasu prowadzenia analiz molekularnych. Dodatkowo od wszystkich osobników pobrano krew, a następnie uzyskano osocze do pomiaru stężenia testosteronu.

W kolejnych 8 podrozdziałach (3.5. – 3.12.) rozdziału „Material i metody” Autorka skrupulatnie opisała stosowane metody analityczne: izolację RNA i oznaczenie poziomu mRNA metodą qRT-PCR z zastosowaniem interkalatora SYBR Green; izolację białka i analizę Western blot – służącą do określenia ekspresji genu na poziomie białka; procedurę histologiczną oraz analizę immunohistochemiczną i immunofluorescencyjną; pomiar poziomu cAMP i testosteronu metodą immunoenzymatyczną; metodykę służącą do pomiaru

aktywności szlaku sygnałowego Notch poprzez pomiar aktywności czynnika transkrypcyjnego RBP-J, a także analizę żywotności komórek. Ostatnim podrozdziałem tej części pracy (3.13.) jest opis stosowanych metod statystycznych, które zdaniem recenzenta zostały prawidłowo dobrane i wykorzystane do określenia istotności różnic między średnimi.

W odniesieniu do tego rozdziału pracy chciałbym prosić Doktorantkę o wyjaśnienie następujących kwestii:

1. *Dlaczego w analizie ekspresji genów metodą qRT-PCR zastosowała aż 4 geny kontrolne? W jaki sposób obliczano średnią ekspresję i dlaczego na wykresach w przypadku grupy kontrolnej nie zaznaczono odchylenia standardowego (SD) lub błędu standardowego średniej (S.E.M)?*
2. *Z kolei w analizie Western blot wykorzystano tylko jeden gen kontrolny; czy w kontekście analizy qRT-PCR nie należało również odnieść poziom białka badanego genu do przynajmniej dwóch białek kontrolnych?*
3. *Czy i w jaki sposób przeprowadzono walidację użytych przeciwciał?*
4. *Dlaczego opisy tabel (Tabele 1-5) znajdują się pod tabelami, a nie nad nimi?*
5. *Zdaniem recenzenta w Tabeli 2 powinno się podać numer danego genu w Banku Genów (tzw. GenBank Accession Number), który ułatwiłby szybkie odnalezienie sekwencji nukleotydowej danego genu w bazach NCBI.*

Pomimo tych kilku wątpliwości uważam, że rozdział 3 „Materiał i metody” został dobrze skonstruowany; przebieg doświadczeń, jak również zastosowane metody badawcze przedstawiono w sposób precyzyjny, wyczerpujący i przejrzysty. Zamieszczone w tabelach dane dotyczące użytych sekwencji starterowych i przeciwciał pierwszorzędowych pozwalają czytelnikowi na zorientowanie się w liczbie analizowanych genów, a także wskazują na ogrom pracy, którą należało wykonać badając ich ekspresję. Szczegółowe opisy wielu nowoczesnych technik biologii molekularnej i procedur badawczych wykorzystanych w pracy świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Autorki dysertacji do pracy laboratoryjnej.

Uzyskane wyniki zostały dobrze udokumentowane i zaprezentowane w następnym rozdziale pracy (4. **Wyniki**). Obejmuje on aż 55 stron maszynopisu i jest podzielony na 3 główne podrozdziały adekwatne do zadań badawczych przedstawionych w rozdziale „Hipoteza i cele pracy”. Wyniki badań zostały zaprezentowane w jednej tabeli (Tabela 5) i na 49 tablicach, z których aż 32 stanowią tablice zawierające od 2 do 10 wykresów, przedstawiających wyniki analiz ekspresji badanych genów na poziomie mRNA i białka, uzyskane odpowiednio metodami qRT-PCR i Western blot. Wszystkie histogramy przedstawiające wyniki analiz Western blot zostały udokumentowane zamieszczonymi zdjęciami z uwidocznionymi prążkami, zarejestrowanymi podczas analizy densytometrycznej. Trzy spośród 49 tablic przedstawiają wyniki analiz żywotności mysich komórek Sertoliego linii TM4 i 15P-1 po zastosowaniu DAPT (inhibitor γ -sekreazy) oraz siRNA dla genów *Rbp-j*, *Ar* i *Zip9*. Ponadto, na 14 tablicach przedstawiono kolorowe zdjęcia spod mikroskopu przedstawiające lokalizację białek receptorów androgenowych AR i ZIP9 oraz komponentów szlaku Notch (N1ICD – aktywnej formy receptora Notch1, HEY1 i HES1 – białek efektorowych) w komórkach TM4 i 15P-1 metodą immunofluorescencyjną, a także lokalizację ligandów receptora Notch (JAG1, DLL1 i DLL4) oraz białek N1ICD, HEY1, HES1 i HES5 w eksplantach jąder szczurów metodą immunohistochemiczną. Należy podkreślić, że wszystkie tablice zostały przygotowane bardzo starannie i dobrze opisane, tak aby ułatwić czytelnikowi zorientowanie się w jaki sposób przeprowadzono dany eksperyment oraz co zawierają poszczególne wykresy i zdjęcia mikroskopowe. Znacząca część wyników

znajduje się we wcześniej przedstawionych publikacjach, a wykresy w nich zawarte są tożsame z prezentowanymi w ocenianej dysertacji.

Pierwsza część wyników opisana w podrozdziale 4.1. i częściowo opublikowana w pracy nr 2 (Kamińska i in., *Andrology* 2020) dotyczy roli szlaku Notch w regulacji ekspresji receptorów androgenowych AR i ZIP9 oraz białek androgenozależnych – klaudyn w gonadzie męskiej gryzoni. Autorka dysertacji, stosując analizę qRT-PCR, Western blot i immunofluorescencyjną wykazała, że zahamowanie szlaku Notch w mysich komórkach Sertoliego oraz szczurzych eksplantach jąder zwiększa ekspresję mRNA i białka receptorów androgenowych, jądrowego (AR) i błonowego (ZIP9), co w konsekwencji powoduje wzrost stężenia cAMP i nasila ekspresję klaudyny 11 oraz klaudyny 5. Aktywacja szlaku Notch poprzez ekspozycję komórek Sertoliego na rekombinowany ligand DLL1 zmniejsza ekspresję receptora AR oraz klaudyny 11, natomiast aktywacja szlaku Notch przez rekombinowany ligand JAG1 hamuje ekspresję receptora ZIP9 i klaudyny 5. Na podstawie tych wyników Autorka wnioskuje, że w komórkach Sertoliego szlak Notch reguluje sygnalizację androgenową poprzez specyficzne działanie ligandów DLL1 i JAG1 odpowiednio na ekspresję receptorów AR i ZIP9.

Druga część badań, które częściowo opublikowano w pracy nr 3 (Kamińska i in., *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2020) dotyczy roli sygnalizacji androgenowej w kontroli aktywności i ekspresji komponentów szlaku Notch w gonadzie męskiej. Wyniki tej części badań zostały udokumentowane w podrozdziale 4.2. Doktorantka wykazała, że testosteron, działając zarówno przez receptor AR, jak i ZIP9, zwiększa aktywność szlaku Notch w komórkach Sertoliego, z kolei zablokowanie sygnalizacji androgenowej powoduje zmniejszenie tej aktywności poprzez hamowanie ekspresji mRNA receptora Notch1 i białka N1ICD, a także białek efektorowych HEY1 i HES1. Ponadto, Autorka wykazała, że w komórkach Sertoliego regulacja ekspresji genów HEY1 i HES1 jest kontrolowana odpowiednio przez receptory AR i ZIP9. Z kolei w badaniach *in vivo* wykazała, że ograniczenie działania androgenów w okresie dojrzewania płciowego oraz dorosłości skutkuje obniżeniem ekspresji Notch1/N1ICD oraz HEY1 i HES1. Ponadto, wpływ podania flutamidu (bloкера receptorów androgenowych) lub EDS (bloкера syntezy testosteronu) na ekspresję i lokalizację ligandów JAG1, DLL1 i DLL4 zależał od wieku szczurów. Wyniki te wskazują na rolę androgenów w kontroli sygnalizacji Notch w jądrze oraz udział AR i ZIP9 w specyficznej regulacji genów efektorowych szlaku Notch w komórkach Sertoliego.

W trzeciej części prowadzonych badań, opisanych w podrozdziale 4.3. i opublikowanych w pracy nr 1 (Kamińska i in., *Chemosphere*, 2018) Autorka dysertacji wykazała, że ekspozycja eksplantów jąder szczura na bisfenol A lub ftalan dibutyli zwiększa ekspresję białka sygnałowego Notch1 i efektorowego HEY1, a także ligandów JAG1 i DLL4, natomiast zmniejsza ekspresję liganda DLL1. Ponadto, ekspozycja eksplantów na drugi z badanych ksenobiotyków zmniejsza ekspresję białka HES5. Wyniki analizy immunohistochemicznej potwierdziły, że oba związki zaburzają ekspresję komponentów szlaku Notch w kanalikule plemnikotwórczym oraz tkance interstycjalnej, jednak ich wpływ na poszczególne typy komórek jest zróżnicowany.

W odniesieniu do tego rozdziału pracy chciałbym prosić Doktorantkę o wyjaśnienie następujących kwestii:

1. *Dlaczego nie pokusiła się o zbadanie wpływu bisfenolu A i ftalanu dibutyli na ekspresję i lokalizację białek szlaku Notch w gonadach szczurów w warunkach in vivo lub w warunkach in vitro, ale na izolowanych komórkach Sertoliego?*

2. *Czy nie można było wykorzystać mysich linii komórkowych TM4 i 15P-1 w celu określenia wpływu badanych ksenobiotyków na interakcję między sygnalizacją androgenową a jukstakrynową?*
3. *W publikacji nr 2, przedstawiono również ekspresję mRNA genu Notch 2 i białka N2ICD w jądrach szczurów eksponowanych na działanie flutamidu lub EDS. Dlaczego Autorka nie zdecydowała się umieścić tych wyników w ocenianej dysertacji?*
4. *Dlaczego na wykresach przedstawiających ten sam parametr (np. ekspresję mRNA lub białka) nie zastosowano na osi odciętych takiej samej skali, która ułatwiłaby porównanie wyników?*
5. *Dlaczego wszystkie histogramy są w odcieniach szarości? Czy w dysertacji nie byłoby lepiej wykonać te wykresy w kolorze?*

Wyniki badań uzyskane przez Doktorantkę zostały omówione na 19 stronach pracy w rozdziale 5. „**Dyskusja**”. Został on podzielony na trzy podrozdziały odpowiadające sformułowanym celom badań. W tej części pracy Autorka umiejętnie analizuje wyniki badań własnych odnosząc je do piśmiennictwa z tego zakresu. Ta część pracy stanowi niewątpliwie istotny wkład Doktorantki w wyjaśnienie znaczenia szlaku Notch w kontroli sygnalizacji androgenowej (genomowej i pozagenomowej) oraz roli androgenów i sygnalizacji androgenowej w regulacji aktywności szlaku Notch w gonadzie męskiej. Autorka w sposób umiejętny wyjaśnia również w jaki sposób egzogenne substancje o aktywności hormonalnej, jak np. bisfenol A i ftalan dibutyli, zaburzają ekspresję poszczególnych komponentów szlaku Notch mogą oddziaływać na funkcje jądra szczurów. Tekst poszczególnych części „Dyskusji” jest napisany w sposób zwięzły i precyzyjny, co świadczy o umiejętności syntetycznego podejścia do opisywanych interakcji między sygnalizacją androgenową a jukstakrynową, właściwej interpretacji oraz umiejętności dyskusji wyników badań własnych, w świetle dotychczasowych poglądów uczonych zajmujących się tym zagadnieniem.

Szkoda, że Autorka nie zdecydowała się na zamieszczenie podsumowania w formie schematu, który ułatwiłby czytelnikowi lepsze zrozumienie skomplikowanych interakcji między sygnalizacją androgenową a jukstakrynową i/lub oddziaływania badanych ksenobiotyków na poszczególne komponenty szlaku Notch.

W rozdziale 6. zatytułowanym „**Wnioski**” Autorka dysertacji zawarła siedem uogólnień, do których nie wnoszę zastrzeżeń; są one odpowiednio udokumentowane i omówione we wcześniejszym rozdziale. Sformułowane wnioski dowodzą, że postawiona hipoteza została zweryfikowana, a założone cele badań zostały osiągnięte. Nie wnoszę również zastrzeżeń do zamieszczonych w rozdziale 7 streszczeń polsko- i anglojęzycznego.


W ostatnim 8. rozdziale pt. „**Literatura**”, Doktorantka na 22 stronach pracy przedstawia listę 318 cytowanych w tekście prac anglojęzycznych. Większość z nich stanowią pozycje piśmiennictwa ostatnich 10 lat, które tematycznie są ściśle związane z treścią pracy doktorskiej. Zapoznanie się z tak obszerną literaturą świadczy o znakomitej erudycji Autorki. Kilka drobnych uwag dotyczących tego rozdziału przedstawiłem na stronie 3 recenzji.

Praca napisana jest dobrą polszczyzną, a nieliczne błędy edytorskie są zaznaczone w egzemplarzu pracy recenzenta; nie wpływają one na ocenę merytoryczną całej pracy.

Podsumowanie i wnioski końcowe

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pani mgr Alicji Kamińskiej jest nowatorska, ciekawa i merytorycznie bardzo dobra. Ma ona walory poznawcze, a uzyskane

wyniki stanowią istotny wkład w zrozumienie interakcji między komunikacją jukstakrynową a sygnalizacją androgenową. Współdziałanie tych szlaków może stanowić istotny czynnik regulujący fizjologię komórek Sertoliego, a jego zaburzenia mogą skutkować zakłóceniem procesów kluczowych dla przebiegu spermatogenezy, takich jak ekspresja białek bariery krew-jądro. Na podkreślenie zasługują przyjęte założenia metodyczne i wykorzystanie nowoczesnych technik molekularnych w realizacji poszczególnych zadań badawczych, które pozwoliły Autorce dysertacji zrealizować zamierzone cele. Praca napisana została jasno i przejrzysto, a Autorka potrafiła przedstawić trudne zagadnienia w przystępnej formie. Pomimo kilku uwag wyrażonych w mojej recenzji stwierdzam jednoznacznie, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska pt. *„Komunikacja jukstakrynowa w gonadzie męskiej gryzoni a działanie androgenów oraz środowiskowych związków hormonalnie czynnych”* spełnia wymogi określone w „Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). Wnioskuje zatem o dopuszczenie przez Radę Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie Pani mgr Alicji Kamińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę przedstawione powyżej argumenty dotyczące walorów metodycznych i naukowych ocenianej pracy wnoszę o wyróżnienie ocenianej dysertacji i jej Autorki stosowną nagrodą określoną przepisami obowiązującymi w Uniwersytecie Jagiellońskim.



.....