

dr hab. Mariola Słowińska

Olsztyn, 22.06.2020

Tel. (+48 89) 539-31-35

Fax: (+48 89) 535-74-21

e-mail: [m.slowinska@pan.olsztyn.pl](mailto:m.slowinska@pan.olsztyn.pl)

#### RECENZJA

#### ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR LAURY PARDYAK

#### zatytułowanej „Znaczenie równowagi hormonalnej i połączeń międzykomórkowych w jądrach, najądrzach i nasieniowodach indora (*Meleagris gallopavo*) z syndromem żółtego nasienia”

wykonanej w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem Promotora prof. dr hab. Barbary Bilińskiej.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Laury Paradyak pt. „Znaczenie równowagi hormonalnej i połączeń międzykomórkowych w jądrach, najądrzach i nasieniowodach indora (*Meleagris gallopavo*) z syndromem żółtego nasienia” przygotowana została w postaci manuskryptu. W pracy zachowany został tradycyjny układ obejmujący Spis Treści, Wstęp, Hipotezę i Cele Pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję oraz Wnioski, Streszczenie i Literaturę. Warto nadmienić, że część doświadczalną pracy doktorskiej zrealizowano w oparciu o środki finansowe pochodzące z projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki PRELUDIUM 13 (2017/25/N/NZ9/00585), którego Pani mgr Laura Paradyak była kierownikiem. Ponadto, rezultaty badań prezentowane w rozprawie doktorskiej zostały już częściowo opublikowane w 2 czasopismach indeksowanych w bazie Web of Science: *British Poultry Science* (IF-1,421; 70 punktów MNiSW) oraz *Poultry Science* (IF-2,027; 140 punktów MNiSW), w których Pani Laura Paradyak odegrała rolę pierwszego autora. Wskazuje to, iż weryfikacja poprawności założonych tez była dokonana na poziomie Narodowego Centrum Nauki oraz Edytorów wymienionych czasopism.

Syndrom żółtego nasienia (YSS, ang. *Yellow Semen Syndrome*) ma charakter endemiczny w obrębie populacji indyka (*Meleagris gallopavo*). Nasienie YSS charakteryzuje się obniżoną zdolnością zapładniającą, a użycie takiego nasienia do sztucznego unasienniania samic prowadzi do spadku odsetka zapłodnionych jaj i wskaźnika wylęgowości w porównaniu do nasienia jasnego. Samce YSS posiadają dobrze rozwinięte drugorzędowe cechy płciowe, a rozmiar jąder jest

porównywalny z samcami produkującymi prawidłowe, jasne nasienie (WNS, ang. *White Normal Semen*). Ponadto, objętość nasienia oraz koncentracja plemników nasienia YSS nie różni się od nasienia osobników produkujących normalne nasienie. Dlatego szybka i skuteczna diagnostyka YSS w warunkach produkcyjnych jest prawie niemożliwa.

Wiodącym tematem rozprawy doktorskiej jest opisanie roli środowiska hormonalnego oraz komunikacji międzykomórkowej w jądrach, najądrzach i nasieniowodach indorów jako molekularnych czynników determinujących rozwój syndromu żółtego nasienia indorów. Zjawisko YSS u indorów opisano po raz pierwszy w latach 80-tych dwudziestego wieku, identyfikując plazmę nasienia o żółtym zabarwieniu i wysokiej koncentracji białka w porównaniu do samców produkujących normalne nasienie. Prowadzone od tamtej pory badania doprowadziły do szczegółowej charakterystyki parametrów jakościowych nasienia YSS. Żółte nasienie charakteryzuje się obecnością nieprawidłowych plemników i spermatyd oraz podwyższoną liczbą spermiofagów. Dodatkowo, parametry ruchu plemników opisujące prędkość jak i trajektorię ruchu są zaburzone w nasieniu YSS. Plazma żółtego nasienia, poza wysokim stężeniem białka charakteryzuje się podwyższoną aktywnością fosfatazy kwaśnej, aminotransferazy asparaginianowej oraz dysmutazy ponadtlenkowej. Analizy proteomiczne i metabolomiczne plazmy nasienia YSS pozwoliły na wskazanie potencjalnych markerów charakterystycznych dla tego syndromu. Jednakże, pomimo szczegółowych badań parametrów jakości nasienia YSS, przyczyny występowania tego syndromu u indorów nie zostały do tej pory poznane. Sugerowano związek pomiędzy nadmiernym gromadzeniem się kropeł lipidowych w nabłonku przewodów wyprowadzających, wzrostem poziomu cholesterolu i podwyższonym poziomem białek, a występowaniem YSS. Wśród możliwych przyczyn wymienia się także genetyczne predyspozycje, niesprzyjające warunki środowiska oraz krzyżowanie w celu poprawy umięśnienia i nieśności.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Laury Paradyak dotycząca zaburzeń równowagi hormonalnej i połączeń międzykomórkowych w układzie rozrodczym indorów YSS doskonale wpisuje się w tematykę związaną z poszukiwaniem molekularnych podstaw zaburzeń YSS. Ponadto, wiedza na temat komunikacji międzykomórkowej u ptaków jest zupełnie nieznana, w związku z tym zagadnienia poruszane przez Doktorantkę w rozprawie są jak najbardziej aktualne i godne uwagi. Wartość prezentowanej pracy podnosi wykorzystanie dwóch modeli doświadczalnych *in vivo* i *ex vivo*, co pozwala na kompleksową charakterystykę zmian w połączeniach międzykomórkowych w układzie rozrodczym indorów YSS.

We wstępie Doktorantka w bardzo przejrzysty sposób przedstawiła zagadnienia związane z budową i funkcjonowaniem układu rozrodczego samców ptaków, wskazując zarówno podobieństwa jak i różnice w fizjologii rozrodu pomiędzy ptakami i ssakami. Doktorantka

uzasadniła konieczność pogłębienia wiedzy na temat roli lokalnie działających hormonów steroidowych oraz molekularnej budowy połączeń międzykomórkowych układu rozrodczego ptaków w aspekcie syndromu YSS, który jest istotnym problemem w produkcji drobiarskiej i nadal brakuje wiedzy na temat molekularnych podstaw tego syndromu. Przekonuje to o zasadności sformułowanych hipotez badawczych oraz celów przedstawionej do oceny pracy doktorskiej. Ponadto wyjaśnienie molekularnych aspektów zaburzeń jakości nasienia indorów ma nie tylko istotne znaczenie poznawcze ale i aplikacyjne.

Materiał badawczy stanowiły tkanki układu rozrodczego (jądra, najądrza, nasieniowody), plemniki, plazma nasienia oraz osocze krwi indorów obciążonych YSS oraz indorów produkujących nasienie prawidłowe (użytych jako kontrola). W prawidłowy sposób dokonano klasyfikacji ptaków w kontekście typu produkowanego nasienia (YSS oraz WNS). Na szczególną uwagę zasługuje ilość i różnorodność wykonanych analiz, co świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę nowoczesnego warsztatu badawczego. Zastosowane metody to: hodowla *ex vivo* eksplantów jąder, analiza ekspresji genów metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym, analiza ekspresji białek metodami Western Blot oraz immunoenzymatyczną (ELISA), analiza immunohistochemiczna tkanek oraz analiza ultrastrukturalna i immunofluorescencja plemników. Do prawidłowego wykonania tych ostatnich Doktorantka opanowała biegle techniki mikroskopii świetlnej, fluorescencyjnej oraz elektronowej, co potwierdza perfekcyjnie wykonana dokumentacja fotograficzna badanych tkanek, zaprezentowana w wynikach pracy. Część metodyczna pracy nie budzi zastrzeżeń, zaś sposób przedstawienia zasługuje na wysoką ocenę. Autorka stosując opisane techniki wykazała się zarówno ich znajomością jak i prawidłowym zastosowaniem. Moim zdaniem, zastosowane metody badawcze zostały adekwatnie dobrane do realizacji postawionych celów, zostały także zaakceptowane przez recenzentów czasopism, w których opublikowano część prezentowanych badań.

W oparciu o logicznie zdefiniowane cele uzyskano wyniki, które dostarczyły nowych informacji o roli środowiska hormonalnego i roli komunikacji międzykomórkowej w jądrach, najądrzach i nasieniowodach indorów YSS. Na wstępie wykonano porównawczą analizę histologiczną budowy tkanek układu rozrodczego indorów YSS oraz indorów WNS. Analiza ultrastruktury plemników pozwoliła na wykazanie zmniejszonej grubości osłonki włóknistej plemników w nasieniu indorów YSS. W kolejnym kroku wykazano podwyższone stężenie estradiolu u osobników YSS, co dodatnio korelowało z zwiększoną ekspresją receptorów estrogenowych ( $ER\alpha$  i  $ER\beta$ ) w jądrach i najądrzach indorów YSS. Wykazano zwiększony poziom ekspresji aromatazy w tkankach rozrodczych i plemnikach indorów YSS co odzwierciedlać może wyższą endogenną syntezę estrogenów u samców z nieprawidłowym żółtym nasieniem. Analiza

ekspresji genów i lokalizacja białek połączeń ścisłych, szczelinowych i przylegania wykonana została po raz pierwszy dla ptaków. W pracy wykazano zmiany ekspresji okludyny, ZO-1, Cx43, N- i E- kadheryny,  $\beta$ -kateniny oraz ich odmienną subkomórkową lokalizację w tkankach rozrodczych samców YSS w porównaniu do osobników WNS. Zmiany te mogą prowadzić do zaburzeń mikrośrodowiska tkanek, w których dochodzi do produkcji, dojrzewania i magazynowania plemników i w konsekwencji odpowiadać za rozwój YSS. Powyższe obserwacje zostały potwierdzone w doświadczeniach *ex vivo*, polegających na inkubacji eksplantów jąder indorów YSS i WNS z w obecności estradiolu. Podsumowując, doktorantka wskazuje na istotę równowagi hormonalnej w regulacji interakcji międzykomórkowych, co w konsekwencji może prowadzić do upośledzenia funkcji narządów i pojawienia się syndromu żółtego nasienia u indorów. Uważam, iż interpretacja jak i dyskusja wyników jest wszechstronna i prawidłowa.

Podczas wnikliwej analizy pracy nasunęły mi się uwagi i pytania. Najistotniejsze z nich przedstawiam poniżej z prośbą o wyjaśnienie lub komentarz.

1) Podziału ptaków na dwie grupy YSS oraz WNS dokonano na podstawie analizy stężenia białka w plazmie nasienia indora. Nasienie o kolorze żółtym i wysokim stężeniu białka (>20 mg/ml) klasyfikowano jako YSS. Nasienie o białym kolorze i niskim stężeniu białka ( $\leq$ 20 mg/ml) klasyfikowano jako WNS.

Ponieważ stężenie białka plazmy nasienia było kluczowym czynnikiem grupującym ptaki należałoby opisać metodykę pomiaru białka w rozdziale Materiały i Metody.

Chciałabym również prosić o przedstawienie średnich wartości stężenia białka w plazmie nasienia dla ptaków YSS oraz WNS.

Interesuje mnie także, czy dokonano analizy jakości nasienia ptaków YSS oraz WNS?

2) W dostępnej literaturze brak jest informacji na temat molekularnej budowy połączeń międzykomórkowych w nabłonku tkanek układu rozrodczego ptaków. Wiadomo, że w nabłonku jąder i najądrzy ssaków występują trzy typy połączeń: ścisłe, szczelinowe i przylegania. We wstępie pracy wymieniono szereg białek, które są komponentami wskazanych połączeń u ssaków.

Interesuje mnie, jakimi kryteriami kierowała się Doktorantka przy wyborze białek tj. okludyny, ZO-1, Cx43, N- i E- kadheryny oraz  $\beta$ -kateniny do szczegółowych analiz u indorów YSS?

3) Szczegółowe analizy białek u ptaków są limitowane ograniczonym dostępem do specyficznych gatunkowo przeciwciał skierowanych przeciwko białkom ptaków. Często badacze posługują się przeciwciałami specyficznymi dla białek ssaków. Proszę o komentarz, jak ocenia Pani

specyficzność wybranych przeciwciał i czy w zastosowanych metodach obserwowano reakcje niespecyficzne utrudniające jednoznaczną interpretację wyników?

4) W doświadczeniu w systemie *ex vivo* uzyskane wyniki (tablica 16) analizowano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji, a następnie parametrycznym testem post-hoc Dunnet'a. Ponieważ analizowano wpływ estradiolu (pierwszy czynnik) oraz wpływ syndromu YSS (drugi czynnik) zastanawiam się nad możliwością zastosowania dwuczynnikowej analizy wariancji, do analizy efektów badanych czynników. Tym bardziej, że dane przeszły pozytywnie test na jednorodność wariancji i rozkład normalny.

5) W pracy pojawia się niefortunny skrót myślowy „zwiększona koncentracja plazmy nasienia” (str. 57, 58) tłumaczący obficie występującą plazmę nasienia u indorów YSS. Mam również uwagi do sformułowania „zwiększona objętość nasienia u indorów YSS”. Czy stwierdzenie to może zostać poparte wynikami pomiaru objętości nasienia ptaków YSS oraz WNS? Wszak dotychczasowe badania, wskazują, iż objętość nasienia oraz koncentracja plemników nasienia YSS nie różni się od nasienia osobników produkujących normalne nasienie.

#### WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Laury Pardyak spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Laury Pardyak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na znaczącą wartość naukową pracy wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii, o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Laury Pardyak.

Z poważaniem



Mariola Słowińska