

Prof. IGC PAN dr hab. Monika Frączek
Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Brzoskwini
pt.: „Efekty krótkotrwałego działania flutamidu w komórkach Leydiga szczura. Badania molekularne i ultrastrukturalne”, wykonanej w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych pod kierunkiem prof. dr. hab. Barbary Bilińskiej

Ocena wartości naukowej rozprawy

Podstawowe funkcje gonad męskich ssaków, do których należą: produkcja zdrowych i biologicznie funkcjonalnych plemników oraz produkcja hormonów steroidowych, podlega centralnej i lokalnej regulacji endokrynnej, w której kluczową rolę pełnią komórki somatyczne gonad. Wiele cennych informacji dotyczących komórkowych i molekularnych mechanizmów, przez które androgeny kontrolują procesy spermatogenezy i steroidogenezy, utrzymując ich wydajność w okresie dojrzałości płciowej, dostarczają badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. O ile klasyczny mechanizm działania androgenów, w tym testosteronu, przez wewnątrzkomórkowy receptor androgenowy jest stosunkowo dobrze poznany, to rola sygnalizacji androgenowej z udziałem nieklasycznych receptorów błonowych wciąż wymaga prowadzenia dalszych badań i potwierdzenia. Uważam, że rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Brzoskwini bardzo dobrze wpisuje się w ten aktualny i ważny nurt badawczy i wnosi nową wiedzę naukową na temat podłoża molekularnego zależnej od androgenów regulacji steroidogenezy w komórkach Leydiga, ze szczególnym uwzględnieniem roli homeostazy mitochondriów. Praca istotnie poszerza wiedzę z zakresu endokrynologii rozrodu i andrologii. Trzeba w tym miejscu podkreślić, że część wyników rozprawy doktorskiej mgr Brzoskwini została opublikowana w prestiżowych czasopismach naukowych indeksowanych w bazie Web of Science tj. *Scientific Reports* i *International Journal of Molecular Sciences*. W obydwu publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem.

Ocena poprawności redakcyjnej rozprawy

Układ redakcyjny pracy jest typowy dla rozpraw doktorskich. Zasadniczy trzon pracy zawiera 107 stron maszynopisu, na który składa się 6 rozdziałów tj. wstęp, hipoteza i cele pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz piśmiennictwo. Proporcje między poszczególnymi rozdziałami zostały zachowane. Doktorantka zamieściła również informację o finansowaniu badań oraz wykaz opublikowanych prac oryginalnych, które zawierają część wyników badań opisanych w rozprawie. Rozprawę uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spis skrótów. Streszczenia zostały błędnie umieszczone przed wykazem piśmiennictwa, a powinny znajdować się na końcu pracy. Rozprawa nie zawiera spisu tabel i tablic. Umieszczenie takich wykazów może nie jest obowiązkowe, ale ułatwiają recenzentowi czytanie dyskusji, odnosząc się do szczegółowej dokumentacji uzyskanych wyników badań.

Tekst rozprawy został napisany z dużą starannością, z dbałością zarówno o poprawność językową jak i stronę edytorską tekstu. Na pochwałę zasługuje szata graficzna pracy.

Ocena wartości merytorycznej rozprawy

We wstępie doktorantka w sposób zwięzły i treściwy omówiła podstawy centralnej i lokalnej regulacji hormonalnej w gonadach męskich. W kolejnych podrozdziałach szczegółowo opisuje strukturę i funkcję komórek Leydiga, zwłaszcza w kontekście przebiegu i regulacji aktywności steroidogennej tych komórek z udziałem czynników endogennych. W końcowej części tego rozdziału Doktorantka przedstawia niezbędne informacje na temat sygnalizacji androgenowej w gonadach męskich, uwzględniając klasyczny i nieklasyczny mechanizm działania androgenów oraz modelowe związki chemiczne wykorzystywane w badaniach mechanizmów leżących u podstaw działania receptorów androgenowych i ich wpływu na funkcjonowanie tkanki jądra. Uważam, że wstęp teoretyczny wystarczająco argumentuje postawioną w pracy hipotezę badawczą, która „zakłada istnienie zależności pomiędzy steroidogenną funkcją komórek Leydiga szczura i możliwością jej potencjalnej autoregulacji wywołanej krótkotrwałym zaburzeniem sygnalizacji androgenowej przez flutamid”. Doktorantka zakłada również, że „prawidłowa produkcja androgenów uwarunkowana jest stanem strukturalnym komórek Leydiga, a każde zaburzenie dostępu tych hormonów może wpływać na aktywność sekrecyjną komórek Leydiga i prowadzić do zmian w obrębie organelli”. Doktorantka sformułowała siedem szczegółowych celów badawczych, które przedstawiają raczej plan przeprowadzonych w pracy analiz i pomiarów. W mojej opinii niektóre cele zostały źle zredagowane. Na przykład; celem naukowym badań nie może być „pomiar obwodowych stężeń LH, cholesterolu i testosteronu oraz wewnątrzjądrowych stężeń testosteronu i

estradiolu". W tym miejscu powinniśmy wskazać na powód dla którego chcemy te oznaczenia wykonać, ewentualnie na jakie pytanie chcemy uzyskać odpowiedzi, analizując uzyskane wyniki.

Należy podkreślić, że postawione zadania Doktorantka zrealizowała w sposób logiczny, konsekwentny i kompleksowy za pomocą bardzo dobrze zaplanowanego warsztatu badawczego, uwzględniającego przeprowadzenie badań w dwóch uzupełniających się modelach badawczych: *in vivo*, który obejmował analizy skrawków jąder dojrzałych płciowo szczurów oraz *in vitro* z zastosowaniem hodowli pierwotnych szczurzych komórek Leydiga oraz linii mysich komórek TM3. Ekspresję badanych genów analizowano na poziomie transkryptu, wykorzystując ilościową reakcję PCR w czasie rzeczywistym, klasyczną technikę stosowaną w biologii molekularnej, oraz na poziomie białka w analizie Western Blot. Uzupełnieniem analiz molekularnych są przeprowadzone badania immunolokalizacji dla wszystkich badanych białek oraz wyniki obwodowego i wewnątrzjądroowego poziomu wybranych hormonów steroidowych uzyskane metodą ELISA. Bardzo ważnym i nowatorskim podejściem badawczym są przeprowadzone w pracy badania ultrastrukturalne z analizą morfometryczną wybranych parametrów komórek Leydiga, które po raz pierwszy wykorzystano do wykonania komputerowych rekonstrukcji 3D, pozwalających na ocenę wzajemnych powiązań między organellami wewnątrz pojedynczych komórek.

Rozdział z wynikami badań został opracowany bardzo starannie i stanowi obszerną część całej rozprawy. Wyniki przedstawiono w 5 czytelnych tabelach i na 38 tablicach, co bardzo ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z dużą ilością danych. Uwagę zwracają bardzo dobrej jakości mikrofotografie. Do najważniejszych wyników badań zaliczam:

1. Wykazanie zróżnicowanego rozmieszczenia receptorów adipokin w komórkach gonad szczura, co wskazuje na ich potencjalne lokalne para- lub autokrynne działanie. Androgeny mogą regulować ekspresję apelinu i waspiny oraz ich receptorów, odpowiednio APLNR i GRP78, w komórkach Leydiga przy udziale zarówno receptora androgenowego jak i błonowego receptora ZIP9. Wyniki wnoszą nową wiedzę na temat udziału adipokin w regulacji funkcji męskiego układu rozrodczego.
2. Scharakteryzowanie mechanizmu prowadzącego do nasilenia steroidogennej funkcji komórek Leydiga szczura w warunkach ograniczonego dostępu androgenów, który uwzględnia zmiany w budowie i rozmieszczeniu mitochondriów tych komórek. Co więcej, tworzeniu się aktywnych sieci mitochondrialnych towarzyszy wzrost ekspresji białek mitochondrialnych, Drp1 i Mfn2, zaangażowanych w dynamikę tych organelli.

Z całą pewnością należy stwierdzić, że Doktorantka zaprezentowała szeroki wachlarz umiejętności badawczych, łącząc badania molekularne i ultrastrukturalne, co wymagało nie tylko

opanowania rozbudowanego warsztatu metodycznego, ale również wykazania się umiejętnościami dogłębnej analizy badanych skomplikowanych procesów biologicznych oraz przedyskutowania uzyskanych wyników w oparciu o najnowsze i nierzadko wykluczające się dane z piśmiennictwa. W mojej opinii z tego zadania Doktorantka wywiązała się bardzo dobrze. Rozprawę kończy pięć dobrze sformułowanych ciekawych wniosków wynikających z przeprowadzonych badań, które stanowią inspirację do dalszych poszukiwań naukowo-badawczych.

Uwagi krytyczne

Ten punkt muszę uwzględnić w recenzji z obowiązku. Chcę podkreślić, że rozprawę czytałam z przyjemnością i nie mam istotnych uwag krytycznych, poza wcześniej wskazanymi uchybieniami, które nie umniejszają mojej wysokiej ocenie wartości naukowej i merytorycznej rozprawy. W tym miejscu proszę Doktorantkę o przedstawienie podczas obrony planu kontynuacji bardzo ciekawych badań dotyczących homeostazy mitochondriów m. in. w odniesieniu do rozbudowania warsztatu badawczego, czego zabrakło mi w dyskusji.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Brzoskwini spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 z 2003 r., poz. 595, z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Małgorzaty Brzoskwini do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w *dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne*. Ponadto, biorąc pod uwagę nowatorski charakter uzyskanych wyników oraz fakt, że ich część została opublikowana w prestiżowych międzynarodowych czasopismach naukowych o wysokim IF, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne UJ z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Monika Fojnek