

Rzeszów, 26.01.2023 r.

Prof. dr hab. Marek Koziński, dr h.c.  
Instytut Biologii i Biotechnologii  
Kolegium Nauk Przyrodniczych  
Uniwersytet Rzeszowski

## **OCENA**

### **rozprawy doktorskiej**

mgr Małgorzaty Brzostkówna

**pt. Efekty krótkotrwałego działania flutamidu w komórkach Leydiga szczura.**

**Badania molekularne i ultrastrukturalne**

**Recenzja została wykonana na wniosek Rady Dyscypliny Nauki biologiczne**

**Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z dnia 22.11.2022 r.**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana została w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, pod opieką naukową Pani Profesor dr hab. Barbary Bilińskiej, Członka PAN i PAU.

Na rozprawę doktorską składają się wyniki badań opublikowane w dwóch oryginalnych pracach, w latach 2020 i 2021, w czasopismach z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania Impact Factor wynosi 10,259 (5,923 i 4,993). Poniżej wyszczególniono publikacje Doktorantki, wchodzące w skład dorobku naukowego, na podstawie których ubiega się o stopień doktora nauk biologicznych:

1. **Brzostkówna M.**, Pardyak L., Rak A., Kamińska A., Hejmej A., Marek S., Kotula-Balak M., Bilińska B. Flutamide alters the expression of chemerin, apelin and vaspin and their respective receptors in the testes in adult rats, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21,;4439;

2. **Brzoskwinia M**, Pardyak L, Kamińska A, Tworzydło W, Hejmej A, Marek S, Biliński SM, Bilińska B. Flutamide treatment reveals a relationship between steroidogenic activity of Leydig cells and ultrastructure of their mitochondria. *Scientific Reports*, 2021, 11:13772.

Zgodnie z informacją Doktorantki część wyników rozprawy doktorskiej została zrealizowana w ramach projektu „Ekspresja adipokin – chemeryny, apeliny i waspiny oraz ich receptorów w komórkach Leydiga szczura po doświadczalnie wywołanym ograniczeniu działania androgenów” finansowanego ze środków przyznanych na działalność naukową służącą rozwojowi uczestników studiów doktoranckich na Wydziale Biologii UJ w roku 2019 (N18/MNS/00019) oraz projektu OPUS 12 (2016/23/B/NZ4/01788) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (zadanie dodatkowe „Zmiany aktywności steroidogennej komórek Leydiga i różnice w ich ultrastrukturze pod wpływem krótkotrwałej ekspozycji na flutamid” realizowane w latach 2019-2020.

Do oceny przedstawiony został manuskrypt napisany w języku polskim stanowiący kompendium uzyskanych wyników przedstawionych w pracach oryginalnych.

Doktorantka nie dołączyła do manuskryptu oryginalnych prac, które są dostępne w bazie Web of Science. Jej pierwsze miejsce w składzie autorskim potwierdza dominujący udział w prowadzonych badaniach, jak i zapisy zawarte w contribution obu prac oraz fakt imiennego dofinansowania badań prowadzonych w ramach studium doktoranckiego Wydziału Biologii UJ. W świetle powyższych danych recenzent uznaje, że indywidualny wkład Doktorantki w powstanie zaprezentowanych oryginalnych prac potwierdzony przez współautorów w contribution należy uznać za wystarczający do przedłożenia ich Dostojnej Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne w celu procedowania dalszego postępowania. Doktorantka uczestniczyła między innymi w planowaniu eksperymentów, pobieraniu materiału do badań, przeprowadzaniu analiz i opracowaniu wyników i pisania pracy.

Tematyka załączonych oryginalnych prac jest zgodna z załączonym manuskrytem przedłożonym do oceny i odzwierciedla treści zawarte pracach oryginalnych.

Przedstawiony do oceny manuskrypt liczy 117 stron. Zawiera następujące rozdziały: Wykaz stosowanych skrótów, Wstęp, Hipoteza i cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie, Summary oraz Literatura. Ponadto w przedstawionym do oceny manuskrypcie w treści zawartych jest 48 tablic i 4 ryciny.

Manuskrypt napisany jest poprawnym językiem z zachowaniem wymagań przewidzianych dla opracowań naukowych.

Oryginalne prace, w których zawarte są wyniki badań Doktorantki i współpracowników zostały opublikowane w czasopismach liczących się na arenie światowej nauki. Przed przyjęciem do druku poddane zostały wnikliwej analizie przez recenzentów, uznanych w świecie specjalistów w zakresie badań nad efektami działania flutamidu. Dużą niezgrabnością byłoby ponowne ocenienie przez recenzenta prac opublikowanych w wysoko impaktowych czasopismach. Powołany na recenzenta pracy doktorskiej pozwolę sobie ocenić zaprezentowany autoreferat zgodnie z wymaganiami dla postępowań o uzyskanie stopnia doktora nauk biologicznych.

We wstępie liczącym 15 stron Autorka zawarła przegląd współczesnej wiedzy z zakresu fizjologii męskiego układu rozrodczego. Przedstawiła współczesne dane literaturowe poczynając od omówienia wielopiętrowości regulacyjnej poprzez oddziaływanie auto i parakrynowe, opisała budowę komórek Leydiga wraz z syntezą hormonów steroidowych w ich obszarze. Odniosła się do roli mitochondriów w przebiegu steroidogenezy oraz roli adipokin w regulacji funkcji komórek Leydiga. Wstęp zamyka opis budowy i funkcji receptorów androgenowych wraz z klasycznym i nieklasycznym mechanizmem działania androgenów oraz z opisem działania antyandrogenów. Całość tego rozdziału ilustrowana jest 4-ma rycinami (jedna oryginalna, 3 zmienione i adaptowane).

Hipoteza badawcza przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej opiera się na doskonałej znajomości dostępnego światowego piśmiennictwa oraz wyników badań prowadzonych w Zakładzie. Dotyczy ona szeroko pojętej andrologii i zakłada istnienie zależności pomiędzy funkcją komórek Leydiga szczura wraz z możliwością jej autoregulacji po zaburzeniu sygnalizacji przez flutamid.

W celu potwierdzenia lub zaprzeczenia przedstawionej powyżej hipotezy badawczej Doktorantka podjęła się działań, które zawarte są w poniżej zaprezentowanych systemach z użyciem metod *in vivo*, jak i *in vitro*. Jako materiał badawczy służyły tkanki jąder dojrzałych płciowo szczurów, jak i pierwotna hodowla komórek Leydiga oraz hodowla linii komercyjnej TM3 mysich komórek Leydiga.

Jako szczegółowe cele badawcze Doktorantka przedstawiła analizę ekspresji genów kodujących perylipinę 1 *Plin1*, białko translokatorowe *Tspo*, białko natychmiastowo regulujące steroidogenezę *Star*, izoenzym 11A1 cytochromu P450 *Cyp11a1*, dehydrogenazę  $3\beta$ -hydroksysteroidową  $3\beta$ -*Hsd* i aromatazę *Cyp19a1* na poziomie mRNA i białka po ekspozycji na działanie flutamidu, pomiar poziomów hormonu luteinizującego LH, cholesterolu i testosteronu oraz wewnątrz jądrowy pomiar stężeń testosteronu i estradiolu oraz ocenę morfologii komórek Leydiga. Dodatkowo zaplanowała określenie sygnalizacji androgenowej

w kontroli ekspresji wybranych adipokin (apeliny, waspiny, chemeryny) oraz ich receptorów. Wykonała analizy ultrastrukturalne komórek Leydiga wraz z trójwymiarową oceną struktury mitochondriów. Określiła rolę sygnalizacji androgenowej w kontroli ekspresji białek mitochondrialnych w komórkach Leydiga.

Materiał badawczy stanowiły szczury Wistar ze zwierzętarni Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, a wszystkie procedury wykonywano za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej w Krakowie (Uchwała 116/2012 i 189/2018).

Wszystkie procedury w zakresie metodyki badań zostały wykonane zgodnie ze standardami uznanymi w światowym piśmiennictwie za obowiązujące i zostały zaakceptowane przez recenzentów prac oryginalnych.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników Doktorantka wykonała przy pomocy programu Statistical10.0 (Stat Soft). Zastosowała test Levene'a w celu sprawdzenia jednorodności wariancji, a do sprawdzenia normalności rozkładu test Shapiro-Wilka. Wyniki oceniła jednokierunkową analizą wariancji (ANOVA) i testem post-hoc Tukey'a lub Dunnett'a. Wyniki przedstawione w pracy zostały zaprezentowane jako średnia  $\pm$  odchylenie standardowe. Różnice istotne statystycznie przyjęto przy  $P < 0,05$ .

Uzyskane wyniki badania jąder barwionych hematoksyliną i eozyną nie wykazały istotnych różnic morfologicznych, natomiast stwierdzono istotne ( $p < 0.005$ ) powiększenie tkanki interstycjalnej w tkankach poddanych ekspozycji na flutamid.

Pozytywną reakcję immunohistochemiczną stwierdzono w tkance interstycjalnej zarówno u szczurów kontrolnych, jak i traktowanych flutamidem, przy czym reakcja była bardziej intensywna po ekspozycji na flutamid. U szczurów traktowanych flutamidem zaobserwowano istotny wzrost poziomu cholesterolu, hormonu luteinizującego (LH) i testosteronu (T) w osoczu krwi oraz poziomu testosteronu i estradiolu w homogenatach jąder. Zwiększenie poziomu LH w osoczu krwi wskazuje na funkcjonowanie osi podwzgórze-przysadka-gonady, co w efekcie prowadzi do nasilonej aktywności komórek Leydiga, a następnie do wzrostu wewnątrzjądrowego poziomu testosteronu i estradiolu.

W osoczu krwi szczurów poddanych działaniu flutamidu nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w poziomie apeliny, waspiny i chemeryny, co wskazuje na brak reakcji zablokowania receptora androgenowego na poziom adipokin w krwi.

Analiza przeżywalności komórek linii TM3 wykazała, że hydroksyflutamid (HF) i bikalutamid (BIC) w badanych stężeniach nie są toksyczne dla tej linii komórkowej. Badania ekspresji i lokalizacji apeliny i jej receptora (APLNR) na poziomie białka mRNA wykazały cytoplazmatyczny sygnał w komórkach linii TM3. Dalsze badania wykazały, że regulacja

ekspresji apeliny i jej receptora może odbywać się poprzez udział receptorów androgenowego (AR) i błonowego receptora androgenowego (ZIP9). Podobnie barwienie fluorescencyjne wykazało cytoplazmatyczny i jądrowy sygnał waspiny oraz cytoplazmatyczny receptora białka 78 kDa regulowanego glukozą (GRP78) w komórkach linii TM3. Analizy western blot i qRT-PCR potwierdziły regulację ekspresji waspiny i jej receptora przez androgeny.

Inkubacja komórek linii TM3 z testosteronem (T) spowodowała obniżenie intensywności sygnału chemeryny, natomiast inkubacja z hydroksyflutamidem (HF), hydroksyflutamidem oraz testosteronem (HF+T), bikalutamidem (BIC), bikalutamidem oraz testosteronem (BIC+T) spowodowały wzmocnienie sygnału w porównaniu do grupy kontrolnej oraz inkubowanej z testosteronem (T). Po inkubacji komórek z testosteronem (T) nie stwierdzono zmian ekspresji chemeryny na poziomie białka i transkryptu, podczas gdy inkubacja z hydroksyflutamidem (HF) oraz bikalutamidem (BIC) spowodowała znaczący wzrost ekspresji chemeryny. Po inkubacji komórek z bikalutamidem (BIC) i bikalutamidem oraz testosteronem (BIC+T) obserwowano istotny spadek ekspresji na poziomie białka i transkryptu. Sugeruje to, iż bikalutamid (BIC) skutecznie zablokował działanie testosteronu (T), co sugeruje, że regulacja poziomu receptora 1 podobnego do chemokin (CMKLR1) przez testosteron (T) może odbywać się przy udziale obu receptorów – androgenowego (AR) oraz błonowego receptora androgenowego (ZIP9).

W celu wykazania roli receptora androgenowego (AR) i błonowego receptora androgenowego (ZIP9) w kontroli ekspresji apeliny i jej receptora (APLNR), waspiny i jej receptora (GRP78) oraz chemeryny i jej receptorów (CCRL2 oraz CMKLR1), wyciszano ekspresję tych receptorów poprzez transfekcję specyficznymi małymi interferującymi RNA (siRNA) i badano ekspresję tych białek. Analiza przeżywalności komórek wykazała, że receptor androgenowy (AR) i błonowy receptor androgenowy (ZIP9) siRNA nie są toksyczne dla komórek linii TM3 w żadnym z zastosowanych stężeń. W komórkach z wyciszoną ekspresją receptora androgenowego (AR) i błonowego receptora androgenowego (ZIP9) zaobserwowano spadek intensywności sygnału apeliny i jej receptora w porównaniu do kontroli. Wyniki badań potwierdziły regulację ekspresji apeliny i jej receptora przez testosteron przy udziale obu receptorów androgenowego (AR) i błonowego androgenowego (ZIP9).

Doktorantka wykazała, iż wyciszenie ekspresji receptora androgenowego (AR) spowodowało nieznaczny wzrost intensywności sygnału waspiny ale nie spowodowało zmian w intensywności sygnału jej receptora (GRP78). Wyciszenie ekspresji błonowego receptora androgenowego (ZIP9) spowodowało spadek intensywności sygnału waspiny, a dodanie testosteronu (T) nie zmieniło natężenia sygnału. Spowodowało również wzmocnienie sygnału



receptora waspiny (GRP78), którego poziom nie zmienił się po dodaniu testosteronu (T). Uzyskane wyniki potwierdziły regulację poziomu waspiny i jej receptora przy udziale błonowego receptora androgenowego (ZIP9).

Kolejny fragment eksperymentu wykazał wzrost intensywności sygnału chemeryny przy wyciszeniu ekspresji receptora androgenowego (AR) i błonowego receptora androgenowego (ZIP9). Wyciszenie ekspresji tych receptorów oraz inkubacja transfekowanych komórek z testosteronem (T) skutkowała istotnym wzrostem ekspresji chemeryny na poziomie białka i mRNA. Wyciszenie ekspresji receptora androgenowego (AR) i błonowego receptora androgenowego (ZIP9) potwierdziło brak udziału androgenów w kontroli ekspresji receptora 1 związanego z białkiem G.

Doktorantka przeprowadziła analizę w obrazie ultrastrukturalnym. Komórki Leydiga szczurów doświadczalnych z flutamidem były większe w porównaniu do komórek kontrolnych, zaobserwowała również różnice w połączeniach międzykomórkowych.

Badanie immunofluorescencyjne w jądrach szczurów traktowanych flutamidem wykazały wzrost intensywności sygnału dynaminy 1 (Drp1) i mitofuzyny 2 (Mfn2) w porównaniu do kontroli, a intensywność sygnału translokazy błony zewnętrznej (Tom20) nie zmieniła się. Analiza western blot i qRT-PCR potwierdziła zmienioną ekspresję dynaminy 1 (Drp1) i mitofuzyny 2 (Mfn2), oraz nie potwierdziły zmian w ekspresji translokazy błony zewnętrznej (Tom20) na poziomie białka i mRNA w tkankach jąder szczurów grupy kontrolnej i badanej. Doktorantka wykazała, że regulacja ekspresji dynaminy 1 (Drp1) i mitofuzyny 2 (Mfn2) odbywa się z udziałem receptorów androgenowego (AR) i błonowego androgenowego (ZIP9).

Zarówno w hodowli pierwotnej komórek Leydiga szczurów (komórki PRLC), jaki w komórkach linii TM3 barwienie fluorescencyjne wykazało sygnał translokazy błony zewnętrznej (Tom20), w hodowli z testosteronem wykazano nieznaczny wzrost intensywności sygnału oraz charakteryzował je istotny wzrost ekspresji translokazy błony zewnętrznej (Tom20) na poziomie białka i mRNA w wynikach analiz western blot i qRT-PCR. Autorka sugeruje, że ekspresja translokazy błony zewnętrznej (Tom20) pozostaje pod kontrolą sygnalizacji androgenowej przez receptor androgenowy (AR), bez udziału błonowego receptora androgenowego (ZIP9).

W komórkach linii TM3, w których wyciszono ekspresję receptora androgenowego (AR) lub błonowego receptora androgenowego (ZIP9) zaobserwowano spadek intensywności sygnału dynaminy 1 (Drp1) i mitofuzyny 2 (Mfn2) w porównaniu do kontroli. Ekspozycja na testosteron nie wywołała zmian. Regulacja poziomu dynaminy 1 (Drp1) i mitofuzyny 2 (Mfn2)

przez testosteron odbywa się z udziałem receptorów androgenowego (AR) i błonowego androgenowego (ZIP9). Autorka wykazała natomiast, iż regulacja poziomu translokazy błony zewnętrznej (Tom20) przez testosteron odbywa się z udziałem receptora androgenowego (AR).

Podsumowując Autorka w manuskrypcie zaprezentowała wyniki badań, w których wykazała wpływ flutamidu na aktywność i ultrastrukturę komórek Leydiga szczurów. Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowała wnioski, iż podwyższenie poziomu hormonów steroidowych i wzrost ekspresji enzymów steroidogenezy sugeruje, iż blokada sygnalizacji androgenowej wzmacnia mechanizm kompensacyjny prowadzący do nasilenia steroidogenezy w komórkach Leydiga. Wzmocnienie aktywności steroidogenezy po flutamidzie wynika ze zmian ultrastrukturalnych w komórkach Leydiga – zwiększonej liczby mitochondriów, formowania lokalnych sieci mitochondrialnych. Zablockowanie sygnalizacji androgenowej w komórkach Leydiga obejmuje zmiany ekspresji apelin, waspiny i chemeryny oraz ich receptorów, co pozwala wnioskować o istotnej roli androgenów w regulacji funkcji tych adipokin. Zmiany ekspresji białek mitochondrialnych dynaminy1 (Drp1), mitofuzyny 2 (Mfn2) oraz translokazy błony zewnętrznej (Tom20) po zablockowaniu sygnalizacji androgenowej świadczą o zależnej od androgenów regulacji procesów fuzji i fragmentacji mitochondriów. Zaburzona ekspresja badanych adipokin i białek mitochondrialnych po wyciszeniu receptorów androgenowego (AR) i błonowego androgenowego (ZIP9) wskazuje na zróżnicowany mechanizm regulacji tych białek przez androgeny.

Uzyskane wyniki czynią ten cykl badań niezwykle wartościowym i wiele wnoszącym do nauki nie tylko w zakresie podstawowym, ale i aplikacyjnym. Na szczególne uznanie zasługuje fakt, że pomimo określania współzależności pomiędzy wieloma adipokinami, ich receptorami, receptorami androgenowymi, poziomami steroidów oraz wynikami morfometrii w warunkach fizjologicznych oraz po krótkotrwałym zadziaaniu flutamidu uzyskane wyniki po analizie wariancji w treści przedstawione zostały w sposób niezwykle czytelny i zrozumiały.

Reasumując, przedstawione do recenzji opracowanie będących rekapitulacją wyników Doktorantki z oryginalnych prac stanowi cenny wkład do światowej nauki poznania mechanizmów włączonych w szeroko pojętą regulację androgeny, ściśle sprzężoną z badaniami nad rakiem prostaty. W Polsce nowotwór ten stanowi już ok. 20 proc. wszystkich rozpoznanych nowotworów złośliwych. Oznacza to, że co piąty mężczyzna zmagający się z chorobą onkologiczną, choruje na raka prostaty.

W ocenianym opracowaniu oraz załączonych pracach Doktorantka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem szerokiego warsztatu badawczego, zrozumieniem rozpatrywanych

problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje moim zdaniem doskonały wybór tematyki, będący kontynuacją szeroko pojętej problematyki badawczej macierzystej jednostki, w szczególności Pani Promotor prof. dr hab. Barbary Bilińskiej, znajomość światowego piśmiennictwa, która umożliwia szeroką dyskusję w odniesieniu do wybranych zagadnień badawczych. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka posiada ważne w pracy badawczej cechy, takie jak pracowitość, solidność i dociekliwość.

### WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Małgorzaty Brzoskwina pt. *„Efekty krótkotrwałego działania flutamidu w komórkach Leydiga szczura. Badania molekularne i ultrastrukturalne”* w opinii recenzenta spełnia wszystkie wymagania – określone w art. 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 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455) – stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Małgorzaty Brzoskwina do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie mając na uwadze wysoki poziom naukowy zaprezentowanych badań i ich twórczy charakter, co również uznali recenzenci kwalifikujący prace do druku w czasopiśmie o światowym zasięgu, pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie w pełni uzasadniony moim zdaniem wniosek o wyróżnienie pracy, którego najlepszym uzasadnieniem niech będzie podsumowanie zaprezentowanych wyników badań łacińską maksymą „Ad Bonum Hominis”.

