



UNIWERSYTET  
MEDYCZNY  
W ŁODZI

Łódź, 05-09.2023 r.

Dr hab. n. med. Renata Walczak-Jędrzejowska  
Zakład Endokrynologii Płodności  
Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności  
Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Ul. Pomorska 251  
92-213 Łódź

## **Recenzja**

### **rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Lustofin**

pt.: „Rola hormonu folikulotropowego i estrogenów w kontroli sygnalizacji Notch  
w komórkach Sertoliego gryzoni”

wykonanej w Zakładzie Endokrynologii, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych,  
Wydział Biologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie,

pod kierunkiem naukowym dr hab. Anny Hejmej, prof. UJ

Prawidłowy przebieg procesu spermatogenezy, a co za tym idzie wytwarzanie dojrzałych, czynnościowo sprawnych plemników, uzależnione jest w dużej mierze od czynności komórek Sertolego – jedynych komórek somatycznych nabłonka plemnikotwórczego kanaliką jądra. Głównymi hormonami regulującymi czynność komórek Sertolego są hormon folikulotropowy (FSH) oraz steroidy płciowe, przede wszystkim androgeny ale także estrogeny. Oprócz sygnalizacji endokrynnej, prawidłowe funkcjonowanie tych komórek podlega także kontroli przez lokalne interakcje międzykomórkowe, do których zalicza się sygnalizację parakrynną, komunikację za pomocą połączeń szczelinowych, czy też sygnalizację jukstakrynową. W ostatnich latach coraz więcej badań z dziedziny endokrynologii i andrologii doświadczalnej skoncentrowanych jest właśnie na wyjaśnieniu wewnątrzkomórkowych mechanizmów regulacji szlaków sygnalizacyjnych min. w komórkach Sertolego, co może dostarczyć nowych informacji dotyczących roli tych komórek w przebiegu spermatogenezy, a w dalszej perspektywie, może służyć jako punkt wyjścia do identyfikacji przyczyn oraz potencjalnych celów terapeutycznych w zaburzeniach tego procesu u ludzi. Rozprawa Pani mgr Sylwii Lustofin doskonale wpisuje się w nurt tych badań. Nie mam wątpliwości, że uzyskane wyniki stanowią oryginalny wkład w poznanie nowych, dotychczas

nieznanych mechanizmów wzajemnego oddziaływania między sygnalizacją jukstakrynową z udziałem szlaku Notch a sygnalizacją endokrynną, zależną od hormonu folikulotropowego i estrogenów w komórkach Sertolego gryzoni. Dodatkowo, chciałam zauważyć, że o ile wybór sygnalizacji zależnej od FSH w kontekście badań fizjologii gonady męskiej, w szczególności czynności komórek Sertolego, wydaje się naturalne, to na uwagę zasługuje włączenie do badań także sygnalizacji zależnej od estrogenów. Obecnie nie ulega już wątpliwości, że estrogeny są niezbędne dla prawidłowego rozwoju i funkcjonowania gonad, jednakże mechanizmy leżące u podstawy ich działania są wciąż słabo poznane.

Chciałabym tutaj także podkreślić, że podjęta przez Doktorantkę tematyka badań stanowi kontynuację problematyki badawczej, realizowanej w ostatnich latach w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego, która wykazała udział androgenów w kontroli aktywności szlaku Notch w gonadzie męskiej gryzoni i znakomicie wpisuje się w specyfikę działalności naukowo-badawczej tej jednostki, której renomę od lat tworzyła m.in. Prof. Barbara Bilińska, uznany w kraju i na świecie autorytet badań na czynnością gonady męskiej, a obecnie z sukcesem kontynuuje Prof. Anna Hejmej, Promotor prezentowanej pracy.

Rozprawa ma charakter monotematycznej monografii, jest zredagowana prawidłowo, proporcje poszczególnych rozdziałów są zachowane i od strony formalnej nie budzi zastrzeżeń. Praca obejmuje 141 stron, 11 rycin, 49 tablic i 5 tabel. Przedstawia klasyczny, dla tego typu prac, układ rozdziałów zawierający następujące elementy: *Wstęp, Hipoteza i Cele Pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie* (w j. polskim i angielskim) i *Literatura*. Rozdziały dysertacji zostały poprzedzone informacją dotyczącą projektów badawczych, w ramach których zrealizowana została rozprawa doktorska, wykazem publikacji naukowych, w których zaprezentowano część wyników uzyskanych w toku realizacji prowadzonych przez Doktorantkę badań oraz *Wykazem Stosowanych Skrótów*. Należy tutaj podkreślić, że w jednym z projektów naukowych kierownikiem była Doktorantka, która na swój projekt otrzymała dofinansowanie działalności naukowej doktorantów na Wydziale Biologii UJ. Drugi projekt to grant Narodowego Centrum Nauki, którego kierownikiem była Promotor, Prof. Anna Hejmej (OPUS 13). Czasopisma, w których ukazały się w/w publikacje indeksowane są w bazie *Journal Citation Reports*. Sumaryczny *Impact Factor* publikacji to 8,181 a suma punktów MEiN to 280. W obu publikacjach Pani mgr Sylwia Lustofin jest pierwszym autorem, co wskazuje na jej znaczący wpływ w ich przygotowaniu.



Przedstawione publikacje to:

1. **Lustofin S**, Kamińska A, Pardyak L, Pawlicki P, Brzoskwina M, Szpręgiel I, Bilińska B, Hejmej A. Follicle-stimulating hormone regulates Notch signalling in seminiferous epithelium of continuously and seasonally breeding rodents. *Reproduction, Fertility and Development* 2022, 34: 560–575. (IF: 1,973; 140 punktów MEiN)
2. **Lustofin S**, Kamińska A, Brzoskwina M, Cyran J, Kotula-Balak M, Bilińska B, Hejmej A. Nuclear and membrane receptors for sex steroids are involved in the regulation of Delta/Serrate/LAG-2 proteins in rodent Sertoli cells. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23: 2284. (IF: 6,208; 140 punktów MEiN)

We *Wstępie* Doktorantka skrótkowo przedstawiła proces spermatogenezy i jej główny system kontroli hormonalnej jakim jest oś podwzgórze-przysadka-gonada. Następnie wskazała na kluczową rolę komórek Sertolego w kontroli rozwoju komórek plemnikotwórczych i przebiegu spermatogenezy w kanalikule jądra, która w dużej mierze zależna jest od interakcji międzykomórkowych, w tym szlaku sygnalizacji jukstakrynowej z udziałem szlaku Notch. W dalszych częściach Doktorantka omówiła szczegółowo i z dużą znajomością tematu, budowę receptora Notch i jego ligandów, mechanizm sygnalizacji szlaku Notch oraz dotychczasowe wyniki nielicznych badań dotyczących udziału tej sygnalizacji w komórkach gonady męskiej. W kolejnych sekcjach rozdziału Autorka skupiła się na przedstawieniu aktualnej wiedzy dotyczącej sygnalizacji endokrynej zależnej od hormonu folikulotropowego oraz estrogenów w komórkach Sertolego, a także jej roli w regulacji funkcji gonady męskiej. Biorąc pod uwagę zakres obecnej wiedzy, który został zaprezentowany we *Wstępie*, decyzja Doktorantki o kierunku prowadzonych badań jest uzasadniona i wystarczająco argumentuje postawianą w pracy hipotezę badawczą, która zakłada, że w nabłonku plemnikotwórczym gryzoni sygnalizacja komórkowa z udziałem szlaku Notch podlega w komórkach Sertolego regulacji zależnej od działania hormonu folikulotropowego i estrogenów. Dodatkowo Doktorantka postuluje, że badane zależności, mogą stanowić jeden z mechanizmów oddziaływania sygnalizacji FSH i estrogenowej na przebieg procesu spermatogenezy.

W celu weryfikacji postawionej hipotezy badawczej Doktorantka podjęła się przeprowadzenia kompleksowych badań, z wykorzystaniem kilku modeli doświadczalnych, których plan przedstawiony został jako dwa cele szczegółowe. W pierwszym z nich, który obejmował wyjaśnienie roli sygnalizacji FSH w komórkach Sertolego w regulacji ekspresji

ligandów, receptora i genów efektorowych szlaku Notch oraz aktywności tego szlaku w nabłonku plemnikotwórczym gryzoni, Doktorantka zaplanowała doświadczenia w dwóch układach *in vivo* oraz *in vitro*. W pierwszym z nich podjęła się analizy ekspresji oraz lokalizacji komponentów szlaku Notch (DLL1, DLL4, Notch1/N1ICD, HES1, HEY1) w jądrach okołopokwitaniowych samców szczurów i dojrzałych płciowo samców nornicy rudej, odpowiednio po farmakologicznym i fizjologicznym zahamowaniu produkcji gonadotropin, a następnie suplementacji FSH. Z kolei w układzie *in vitro*, z wykorzystaniem hodowli pierwotnej szczurzych komórek Sertolego oraz mysich komórek Sertolego linii TM4 zaplanowała analizę zmian w ekspresji komponentów szlaku Notch (DLL1, DLL4, Notch1/N1ICD, HES1, HEY1) oraz aktywności czynnika RBP-J po stymulacji sygnalizacji FSH lub wyciszeniu ekspresji receptora FSH.

Drugi cel szczegółowy obejmował wyjaśnienie roli sygnalizacji estrogenowej z udziałem receptorów ER $\alpha$ , ER $\beta$  i GPER w regulacji ekspresji ligandów, receptora oraz genów efektorowych szlaku Notch oraz aktywności tego szlaku w eksplantach jąder oraz komórkach Sertolego gryzoni. W układzie *ex vivo*, Doktorantka zaplanowała analizę ekspresji komponentów szlaku Notch (DLL1, DLL4, JAG1, Notch1/N1ICD, HES1, HEY1) po zastosowaniu 17 $\beta$ -estradiolu lub antagonistów receptorów estrogenowych (ICI 182,780; G15). W układzie *in vitro*, z wykorzystaniem hodowli pierwotnej szczurzych komórek Sertolego oraz mysich komórek Sertolego linii TM4, zaplanowana została analiza zmian ekspresji i lokalizacji komponentów szlaku Notch (DLL1, DLL4, JAG1, Notch1/N1ICD, HES1, HEY1) po ekspozycji na 17 $\beta$ -estradiol, antagonistów receptorów estrogenowych (ICI 182,780; G15) lub wyciszeniu ekspresji ER $\alpha$ , ER $\beta$  i GPER. Dodatkowo w mysich komórkach Sertolego w układzie *in vitro* Doktorantka analizowała udział 17 $\beta$ -estradiolu w kontroli aktywności czynnika transkrypcyjnego RBP-J oraz interakcji czynnika transkrypcyjnego RBP-J z promotorami genów efektorowych szlaku Notch (*Hes1* i *Hey1*).

W rozdziale *Materiał i Metody* zawarty został szczegółowy opis przeprowadzonych doświadczeń, zastosowanych metod i analiz statystycznych. W celu wykazania zmian w ekspresji badanych genów na poziomie transkryptu oraz białka Doktorantka wykorzystwała, odpowiednio, metodę łańcuchowej reakcji polimerazy z analizą przyrostu produktu w czasie rzeczywistym (qPCR) oraz analizę western blot. Uzupełnieniem analiz molekularnych są przeprowadzone procedury histologiczne skrawków jąder samców szczurów i nornic dotyczące zarówno oceny morfologicznej kanalików jądra jak i immunohistochemicznej lokalizacji badanych białek oraz analiza immunofluorescencyjna badanych białek na komórkach Sertolego wyizolowanych z jąder szczurów oraz komórkach linii TM4. Do oceny



stężenia FSH oraz cAMP wykorzystano metodę ELISA. Dodatkowo, wykorzystano metodę immunoprecypitacji chromatyny w celu oceny zmian interakcji czynnika RBP-J z regionami promotorowymi genów efektorowych szlaku Notch, *Hes1* i *Hey1* w odpowiedzi na aktywację lub inhibicję sygnalizacji estrogenowej. Na koniec rozdziału *Materiał i Metody* opisane zostały stosowane metody statystyczne, których wybór nie budzi wątpliwości recenzenta.

Rozdział *Wyniki* został przygotowany bardzo starannie i obejmuje znaczną część dysertacji, co nie powinno dziwić ze względu na ilość uzyskanych danych. Zamieszczone w tym rozdziale, wysokiej jakości tablice zawierające min. wykresy przedstawiające wyniki analiz ekspresji badanych genów na poziomie mRNA i białka a także mikrofotografie przedstawiające lokalizację badanych białek, zostały przygotowane z dbałością o szczegóły i bardzo dobrze opisane, tak aby ułatwić czytelnikowi odbiór prezentowanych wyników. Rozdział ten został podzielony na sekcje odpowiadające zadaniom badawczym przedstawionym w rozdziale *Hipoteza i cele badawcze*.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji pierwszego szczegółowego celu/zadania badawczego pozwoliły wykazać Doktorantce, że sygnalizacja FSH-FSHR bierze udział w regulacji komunikacji jukstakrynowej z udziałem szlaku Notch w komórkach Sertolego gryzoni. Powodowała ona m.in. wzrost ekspresji liganda DLL1, receptora Notch1 a także stymulację aktywności czynnika transkrypcyjnego RBP-J oraz obniżenie ekspresji mRNA i/lub białek docelowych genów szlaku Notch, *Hey1* i *Hes1*. Należy tutaj podkreślić, że dzięki zastosowaniu dwóch modeli badawczych *in vivo* t.j. okołodojrzewaniowych szczurów oraz dojrzałych osobników normicy rudej i modelu *in vitro*, Doktorantka mogła wywnioskować, że interakcja między sygnalizacją FSH a szlakiem Notch w komórkach Sertolego wskazuje na wspólny mechanizm działania FSH w kontroli szlaku Notch, który może prowadzić do zmiany aktywności nabłonka plemnikotwórczego podczas pierwszej fali spermatogenezy lub zmiany aktywności gonad, t.j. wznowienia spermatogenezy, u gryzoni w rozrodzie sezonowym.

Realizacja drugiego szczegółowego celu/zadania badawczego pozwoliła Doktorantce na wykazanie, że w komórkach Sertolego także sygnalizacja zależna od działania estrogenów reguluje aktywność szlaku Notch, przy czym w regulacji tej zaangażowane są zarówno klasyczne, jądrowe receptory dla estrogenów jak i receptor błonowy. I tak, estrogeny działając głównie przez ER $\alpha$ , regulują ekspresję ligandów DLL1 i JAG1 oraz genu efektorowego szlaku Notch – *Hey1*, a działając przez ER $\beta$  kontrolują ekspresję liganda DLL4, aktywność receptora Notch1, czynnika RBP-J i ekspresję genu efektorowego *Hes1*. Z kolei sygnalizacja za pośrednictwem GPER ma istotny wpływ na ekspresję liganda DLL4.

W rozdziale *Dyskusja* Autorka w sposób kompetentny, wnikliwy ale i krytyczny omawia uzyskane wyniki dokonując porównania z wynikami badań opublikowanych w renomowanych czasopismach. Widoczna jest tutaj umiejętność obiektywnej oceny własnych wyników i logicznego przeprowadzania wywodu naukowego ale także świadomość ewentualnych ograniczeń przeprowadzanych badań. W oparciu o uzyskane wyniki Doktorantka wyprowadziła 5 wniosków, które odpowiadają na postawione cel i stanowią logiczną konsekwencję uzyskanych danych.

**Muszę przyznać, że z chęcią poznałabym dalsze perspektywy badawcze Doktorantki, tak więc zachęcam do ich przedstawienia podczas obrony rozprawy doktorskiej.**

Autorka w swojej rozprawie powołuje się na 270 pozycji odpowiednio dobranego anglojęzycznego piśmiennictwa naukowego. Większość artykułów została opublikowana w ostatnich 20 latach. Lista publikacji dowodzi znajomości przez Doktorantkę literatury przedmiotu oraz umiejętności krytycznej oceny źródeł.

Streszczenia napisane są w sposób typowy dla rozpraw doktorskich i zawierają najważniejsze elementy pracy.

Na podkreślenie zasługuje staranne przygotowanie rozprawy doktorskiej zarówno pod względem językowym, edytorskim i graficznym. Dysertacja napisana została z dbałością o poprawność języka polskiego i angielskiego, bez zastrzeżeń do stosowanego nazewnictwa naukowego.

Ze względu na obowiązek recenzenta chciałam tylko nadmienić, że w tej niezwykle wartościowej i bardzo dobrze napisanej pracy Autorka nie ustrzegła się pojedynczych drobnych błędów, które w żaden sposób nie zmniejszają wartości naukowej i merytorycznej przedstawionej mi do oceny dysertacji. Zwykle są to drobne literówki (np. str. 11: jest „opowiada” zamiast „odpowiada”; str. 30 – jest „gonadzie” zamiast „w gonadzie”). Jeśli chodzi o szatę graficzną to zauważyłam jeden błąd - na str. 59 w Tablicy 4 brak jest „wstawki” w mikrofotografii E. Szkoda, że Doktorantka nie spróbowała przedstawić podsumowania poczynionych obserwacji w sposób graficzny, na przykład za pomocą schematów, choć zdaję sobie sprawę z tego, że zadanie to nie byłoby łatwe ze względu ilość uzyskanych wyników. Co prawda wydaje mi się, że taki zamysł był, chociażby dla wyników dotyczących sygnalizacji zależnej od FSH w regulacji szlaku Notch, gdyż na str. 110 Doktorantka napisała „Podsumowując, wyniki badań przedstawionych w niniejszej pracy wskazują na regulację aktywności szlaku Notch i ekspresji jego komponentów przez FSH w



komórkach Sertoliego gryzoni (Rycina 12).”, jednakże rycina ta nie została zamieszczona w dysertacji.

### **Podsumowanie**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **mgr Sylwii Lustofin** pt.: „Rola hormonu folikulotropowego i estrogenów w kontroli sygnalizacji Notch w komórkach Sertoliego gryzoni” ma charakter nowatorski i stanowi wartościowy wkład w zrozumienie roli sygnalizacji endokrynnej w kontroli wewnątrzkomórkowego mechanizmu regulacji komunikacji jukstakrynowej z udziałem szlaku Notch w gonadzie samca. Nie mam wątpliwości, że uzyskane wyniki poszerzają wiedzę z zakresu endokrynologii i andrologii doświadczalnej, stanowiąc istotny wkład w ich rozwój. Wykorzystanie w badaniach różnych modeli doświadczalnych oraz szerokiego zakresu metod z obszaru histologii, biochemii i biologii molekularnej, świadczy o niezwyklej znajomości warsztatu badawczego oraz zaangażowaniu Doktorantki, a umiejętność stawiania hipotez i ich rozwiązywania oraz krytycznej interpretacji uzyskanych wyników dowodzi jej dojrzałości naukowej.

Na tej podstawie stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki 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.). Mam zaszczyt wnieść do **Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego** o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Lustofin do dalszych etapów postępowania o nadanie **stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne**.

Równocześnie mając na uwadze wysoki poziom naukowy zaprezentowanych badań, ich nowatorski charakter i wartość poznawczą oraz fakt, że część wyników opublikowana została w uznanych czasopismach naukowych z bazy Web of Science, zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Sylwii Lustofin stosowną nagrodą.

Dr hab. n. med. Renata Walczak-Jędrzejowska

