

Olsztyn, 18 sierpnia 2023 roku
Prof. dr hab. Izabela Wocławek-Potocka,
Zakład Biologii Gamet i Zarodka
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk
ul. Tuwima 10,
10-747 Olsztyn
tel.: 089 5393155,
i.woclawek-potocka@pan.olsztyn.pl

OCENA
PRACY DOKTORSKIEJ MGR MICHAŁA DULIBANA

wykonanej w
Instytucie Zoologii i Badań Biomedycznych, Wydział Biologii, Uniwersytetu
Jagiellońskiego w Krakowie,
pod opieką naukową Pani prof. dr hab. Małgorzaty Kotuli-Balak,
nt.
**Genetyczna i epigenetyczna regulacja funkcji komórek jądra z udziałem
estrogenów**

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne,
Uniwersytetu Jagiellońskiego, zgodnie z wymaganiami art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca
2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 z późn.
zm.)

Pan mgr Michał Duliban przedłożył do oceny rozprawę doktorską zatytułowaną:
„Genetyczna i epigenetyczna regulacja funkcji komórek jądra z udziałem estrogenów”-
wykonaną pod opieką naukową prof. dr hab. Małgorzaty Kotuli-Balak.
Podstawą rozprawy doktorskiej są cztery oryginalne prace twórcze. Wszystkie prace
zostały opublikowane w uznanych czasopismach z listy Journal Citation Reports. Pierwsza
praca, pt.: *„Mouse testicular transcriptome after modulation of non-canonical oestrogen
receptor activity”* opublikowana została w *Reproduction, Fertility and Development* (IF

1.97), druga pt: „*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ , but Not α or G-Protein Coupled Estrogen Receptor Drives Functioning of Postnatal Boar Testis-Next Generation Sequencing Analysis*”, opublikowana została w *Animals (Basel)* (IF 3.23), trzecia pt: „*Transcriptome analysis of human Leydig cell tumours reveals potential mechanisms underlying its development*” opublikowana została w czasopiśmie *Andrologia* (IF 2.77), a czwarta pt.: „*Status of estrogen receptor expression and epigenetic methylation in Leydig cells after exposure to metalloestrogen – selenium*” w *Reproductive Toxicology* (IF 3.42). Sumaryczny IF prac wynosi 11. We wszystkich pracach Doktorant jest głównym autorem, a Jego wkład w te prace, jak wynika z załączonych oświadczeń, był znaczący i obejmował udział w opracowaniu koncepcji prowadzonych eksperymentów, wykonanie większości badań laboratoryjnych, opracowanie i interpretację wyników oraz przygotowanie manuskryptów.

Forma rozprawy doktorskiej jest typowa dla tego typu prac, których podstawą są artykuły naukowe. W przygotowanym do oceny opracowaniu zawarto następujące podrozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz najczęściej stosowanych skrótów, wstęp, opis celu badań i hipotez badawczych, opis materiałów i modelu badawczego, przedstawienie rezultatów badań i opis dyskusji, zakończonej wnioskami oraz bibliografię. Do rozprawy dołączono kopię wszystkich czterech publikacji wraz z oświadczeniami współautorów, w których jasno określono udział Doktoranta.

Tematyka pracy Doktorskiej dotyczy poznania wpływu nieklasycznej sygnalizacji estrogenowej na funkcję komórek jądra, z uwzględnieniem regulacji ekspresji genów i procesów epigenetycznych. Ze względu na fakt, że estrogeny są równie istotne w rozwoju męskiego układu rozrodczego, co androgeny a ich niezaburzona produkcja i stężenie we krwi gwarantują prawidłowe funkcjonowanie gonady męskiej, podjęte przez mgr Dulibana badania bardzo dobrze wpisują się w aktualny nurt prac dotyczących wyjaśnienia mechanizmów działania estrogenów w obrębie męskiego układu rodnych ssaków.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Rozprawę doktorską rozpoczynają streszczenia w języku polskim i angielskim, które bardzo dobrze wprowadzają czytelnika w tematykę pracy doktorskiej, prezentują zastosowane metody badawcze i przedstawiają najważniejsze wyniki. W 9 stronicowym Wstępie Doktorant na początku wprowadza czytelnika w anatomiczne i fizjologiczne

aspekty budowy i regulacji funkcjonowania męskiego układu rozrodczego. Następnie przedstawia krótki rys historyczny początku badań nad rolą estrogenów w układzie rodnym samca, by w końcu przejść do przeglądu literatury w aspekcie wewnątrzkomórkowych regulacji działania estrogenów, opisując dokładnie stan wiedzy na temat zarówno klasycznych regulacji – poprzez pobudzenie receptorów jądrowych jako klasycznych czynników transkrypcyjnych, jak również regulacji szybkich, poprzez aktywację wtórnych przekaźników w komórce. Po opisanu dwóch najbardziej oczywistych i najlepiej zbadanych mechanizmów działania estrogenów w komórce, Doktorant nawiązuje do możliwości działania estrogenów w męskim układzie rozrodczym również poprzez najmniej opisane w literaturze receptory pokrewne receptorom estrogenowym – ERR, będące jednocześnie w najbliższym kręgu zainteresowań Zespołu pod kierunkiem prof. Kotuli- Balak, szczególnie w aspekcie funkcji tych receptorów w procesach związanych z gospodarką lipidową oraz wyjaśnieniem ich roli w gonadzie męskiej i procesie nowotworzenia. W dalszej części Wstępu Doktorant opisuje również możliwość działania estrogenów poprzez kolejny typ receptorów jądrowych, aktywowanych przez proliferatory peroksysomów.

Dogłębny przegląd dostępnej literatury przedstawiony we Wstępie pracy jasno dowodzi dobrą znajomości badanej tematyki badań.

W dalszej części Wstępu precyzyjnie uzasadniono wybór konkretnych modeli zwierzęcych do weryfikacji postawionych w pracy doktorskiej hipotez i następnie ich testowania na wybranych modelach, jak również wyjaśniono użycie hodowli komórkowych *in vitro* oraz hodowli tkankowej *ex vivo*. Dodatkowo, przedstawiono również związek prowadzonych badań z coraz częściej występującymi u mężczyzn guzami jąder pochodzącymi z komórek Leydiga, w kontekście możliwości działania środowiskowych związków hormonalnie czynnych.

W ostatnim akapicie Wstępu, Doktorant przedstawia uzasadnienie dla podjętych w pracy doktorskiej zagadnień dotyczących wyjaśnienia wewnątrzkomórkowych, receptorowych mechanizmów działania estrogenów w gonadzie męskiej ssaków.

Na początku kolejnego rozdziału, Doktorant jasno prezentuje przyjętą w pracy hipotezę badawczą, mówiącą o tym że nieklasyczna sygnalizacja estrogenowa ma wpływ na status transkryptomiczny i epigenetyczny jądra w stanie fizjologicznym i patologicznym. W celu weryfikacji postawionej hipotezy, w pracy zaplanowano trzy założenia badawcze: pierwsze dotyczyło weryfikacji czy zablokowanie lub aktywacja nieklasycznych receptorów estrogenowych oraz interakcji białek receptorowych prowadzi

do zmian ekspresji genów w niedojrzałych i dojrzałych gonadach męskich; drugie miało na celu sprawdzenie czy w nowotworowych komórkach Leydiga człowieka ekspresja genów związanych z sygnalizacją estrogenową jest zaburzona; i na koniec trzecie miało na celu weryfikację czy metaloestrogeny modulują sygnalizację estrogenową wpływając na procesy epigenetyczne w nowotworowych komórkach Leydiga. W kontekście oceny prowadzonych badań na dwóch różnych gatunkach modelowych, liniach komórkowych i hodowli tkankowej, podjęty problem badawczy uznaję za oryginalny i o dużym znaczeniu poznawczym.

Rozdział Materiały i model badawczy rozpoczyna opis czterech różnych modeli badawczych: modelu *in vivo*, który stanowiły jądra samców myszy, nastrzykiwane uprzednio antagonistą receptora GPER, selektywnym antagonistą $ERR\alpha$, oraz selektywnym agonistą $ERR\gamma/ERR\beta$; modelu *ex vivo*, który pochodził z fragmentów jąder 7-dniowych knurów stymulowanych, po 12 godzinnej preinkubacji, selektywnym antagonistą $PPAR\alpha$, oraz anagonistą $PPAR\gamma$; mieszanego modelu *in vivo/in vitro*, pochodzącego z fragmentów łagodnych guzów komórek Leydiga pobranych podczas mikrobiopsji jądra; oraz czwartego, modelu *in vitro*, reprezentowanego przez mysie komórki linii MA-10, stymulowane doświadczalnie seleninem sodu. Jedyna wątpliwość, jaka nasuwa się przy ocenie wybranych modeli badawczych, to możliwość wystąpienia dużej heterogenności w modelu mieszanym pochodzącym z łagodnych guzów komórek Leydiga pobranych podczas mikrobiopsji jądra, szczególnie w odniesieniu do stosunkowo niewielkiej liczby użytych do badań pacjentów. Z obowiązku wnikliwego recenzenta, chciałabym zapytać jakie dodatkowe czynniki weryfikujące, w aspekcie analizy i weryfikacji samej próbki biopsji, zostały wzięte pod uwagę przy doborze pacjentów wybranych do badań, w celu eliminacji rozbieżności związanych z możliwą heterogennością próbek guza.

W następnym rozdziale opisano szeroki wachlarz technik badawczych tj.: sekwencjonowanie transkryptomu, ilościową metodę łańcuchowej reakcji polimerazy z odwrotną transkryptazą, analizy western blot, immunofluorescencję oraz technikę ELISA.

W dalszej części opracowania Doktorant przedstawił najważniejsze wyniki uzyskane podczas realizacji badań, i zamieścił je w formie czterech publikacji naukowych. Publikacja 1. "Mouse testicular transcriptome after modulation of non-canonical oestrogen receptor activity" *Reproduction, Fertility and Development*, 2020;

Publikacja 2. „*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ , but Not α or G-Protein Coupled Estrogen Receptor Drives Functioning of Postnatal Boar Testis-Next Generation Sequencing Analysis*”, *Animals (Basel)*, 2021;

Publikacja 3. „*Transcriptome analysis of human Leydig cell tumours reveals potential mechanisms underlying its development*” *Andrologia*, 2021;

Publikacja 4. „*Status of estrogen receptor expression and epigenetic methylation in Leydig cells after exposure to metalloestrogen – selenium*” *Reproductive Toxicology*, 2023.

Przedstawione wyniki badań zostały opublikowane w uznanych czasopismach z listy JCR i z pewnością przeszły już wnikliwą ocenę recenzencką. Na uznanie zasługuje kompleksowość przeprowadzonych badań oraz ilość uzyskanych wyników.

Za najważniejsze wyniki rozprawy doktorskiej uznaję:

1. Wykazanie udziału sygnalizacji estrogenowej w rozwoju guza komórek Leydiga,
2. Wykazanie udziału ERR w regulacji modyfikacji potranslacyjnej białek oraz roli $ERR\alpha$ w modulacji odpowiedzi immunologicznej, w komórkach jądra myszy,
3. Wykazanie istotnej roli receptorów PPAR γ w przemianach metabolicznych cukrów i aminokwasów w niedojrzałym jądrze knura,
4. Wykazanie wpływu selenu jako metaloestrogenu na sygnalizację estrogenową poprzez działanie pozagenomowe i wpływ na procesy epigenetyczne w modelu *in vitro*.

W kolejnym rozdziale Rezultaty i Dyskusja, Doktorant umiejętnie konfrontuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi pochodzącymi z innych zespołów badawczych oraz z zespołu w którym pracuje, przywołując najnowsze pozycje literaturowe. Bardzo cenne jest odwoływanie się do danych dotyczących badań z użyciem komórek i tkanek fizjologicznych jak i patologicznych pochodzących od człowieka i innych zwierzęcych modeli badawczych, gdyż daje to możliwość szerszych porównań nad fizjologią i patologią gonady męskiej ssaków. Dodatkowo, uzyskane wyniki jasno wskazują na dalszą potrzebę badań z użyciem różnych modeli badawczych, ze względu na możliwą weryfikację różnic gatunkowych.

Rozprawę doktorską kończy 6 rozbudowanych Wniosków, które w pełni odpowiadają na postawioną we Wstępie hipotezę badawczą. Z uwagi na złożoność uzyskanych wyników, przedstawione wnioski mogły by zostać umieszczone na schemacie

zbiorczym, który pozwoliłby lepiej zrozumieć mechanizmy zachodzących procesów i interakcje między nimi.

Ocena końcowa: Podsumowując, należy stwierdzić, że założone cele rozprawy doktorskiej zostały zrealizowane za pomocą nowoczesnych, kompleksowych metod badawczych, które wymagały dużego zaangażowania Doktoranta. W pracy uzyskano szereg wartościowych i oryginalnych wyników, które stanowią istotny wkład w badania nad wyjaśnieniem wewnątrzkomórkowych, receptorowych mechanizmów działania estrogenów w gonadzie męskiej ssaków. Uzyskane w pracy wyniki są niezwykle ważne ze względów poznawczych i otwierają nowe możliwości badań w zakresie aplikacyjnych możliwości ich wykorzystania w terapii guzów jąder u mężczyzn.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Michała Dulibana pt.: „*Genetyczna i epigenetyczna regulacja funkcji komórek jądra z udziałem estrogenów*” - wykonana pod opieką naukową prof. dr hab. Małgorzaty Kotuli-Balak., w pełni odpowiada wymogom stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora określonym 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.), dlatego też przedkładam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Michała Dulibana do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Z poważaniem

Olsztyn, 18 sierpnia 2023 r.

Izabela Monika
Wocławek-Potocka

prof. dr hab. n. wet. Izabela Wocławek-Potocka

Elektronicznie podpisany przez
Izabela Monika Wocławek-Potocka
Data: 2023.08.18 11:08:34 +02'00'