

Prof. dr hab. med. Jolanta Słowikowska-Hilczer

Zakład Endokrynologii Płodności

Katedra Andrologii i Endokrynologii Płodności

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

92-213 Łódź ul. Pomorska 251

tel. 42 201-41-42

Łódź, dn. 21.05.2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

pt. "Komunikacja jukstakrynowa w gonadzie męskiej gryzoni a działanie androgenów oraz środowiskowych związków hormonalnie czynnych"

mgr Alicji Kamińskiej

przygotowanej w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych

Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

pod kierunkiem dr hab. Anny Hejmej, prof. UJ

Doktorantka podjęła się opracowania niezwykle aktualnego problemu, jakim jest wpływ substancji wykazujących aktywność hormonalną na czynność męskich gonad. Są to związki, które znajdują się w środowisku naturalnym jako zanieczyszczenia powstałe na skutek działalności człowieka. Za szczególnie niebezpieczne dla męskiego układu płciowego uważane są te o działaniu antyandrogennym i estrogenopodobnym. Pomimo wieloletnich badań nadal mechanizmy wpływu tych substancji na żywe organizmy nie są do końca wyjaśnione. Doktorantka rozpoczęła badania od wyjaśnienia niektórych fizjologicznych mechanizmów kontroli procesu spermatogenezy z udziałem komórek Sertolego. Jak się okazuje te procesy są również słabo poznane, tak więc wyniki badań Doktorantki są niezwykle ważnym przyczynkiem do poznania fizjologii męskiej gonady. W oparciu o wyniki tych badań Doktorantka opracowała model wpływu czynników o działaniu antyandrogennym na połączenia jukstakrynowe z udziałem szlaku sygnałowego Notch w jądrze.

Praca została wykonana w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ, jednostce naukowej z doskonałą renomą w kraju i zagranicą tworzoną od lat m.in. przez prof. Barbarę Bilińską, a obecnie przez prof. Annę Hejmej. Badania nad fizjologią i patologią męskiej gonady prowadzone w tym Zakładzie zawsze prezentują wysoki

poziom naukowy, dlatego nie jestem zaskoczona, że taki poziom prezentuje również przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska.

Rozprawa doktorska mgr Alicji Kamińskiej liczy 154 strony maszynopisu, w tym 49 tablic, 5 tabel i 7 rycin, wykaz stosowanych skrótów, spis piśmiennictwa, streszczenia w języku polskim i angielskim. We „Wstępie”, liczącym 23 strony, Doktorantka omówiła wyczerpująco rolę komórek Sertolego w kontroli procesu spermatogenezy, sygnalizację jukstakrynową i szlak sygnałowy Notch, sygnalizację androgenową oraz białka kładyny. Na podstawie najnowszych badań przedstawiła również aktualną wiedzę na temat wpływu środowiskowych związków o aktywności hormonalnej na zaburzenia środowiska hormonalnego męskiej gonady. Wstęp ilustrowany jest barwnymi rycinami doskonale prezentującymi omawiane kwestie. Informacje przedstawione we „Wstępie” stanowią przegląd najnowszego piśmiennictwa z ostatnich 15 lat.

W celu potwierdzenia hipotezy badawczej, która zakładała istnienie wzajemnej zależności między sygnalizacją androgenową a aktywnością szlaku sygnałowego Notch w jądrze oraz możliwość zaburzającego wpływu środowiskowych substancji hormonalnie czynnych na aktywność szlaku Notch, mgr Alicja Kamińska podjęła się wykonania zadań takich jak:

1. wyjaśnienie roli szlaku sygnałowego Notch w regulacji sygnalizacji androgenowej w komórkach Sertolego i eksplantach jąder,
2. wyjaśnienie roli sygnalizacji androgenowej w kontroli ekspresji komponentów szlaku Notch oraz jego aktywności w jądrze, ze szczególnym uwzględnieniem komórek Sertolego,
3. określenie wpływu wybranych środowiskowych związków o aktywności hormonalnej na sygnalizację jukstakrynową.

Badania zostały przeprowadzone na gryzoniach w układzie *in vitro* i *in vivo* z wykorzystaniem różnorodnych nowoczesnych technik badawczych. Badania *in vitro* zostały przeprowadzone na liniach mysich komórek Sertolego TM4 i 15P-1, hodowli pierwotnej szczurzych komórek Sertolego oraz eksplantach jąder szczurów szczepu Wistar. Badano sygnalizację Notch stosując jej inhibitory i aktywatory, a także badano rolę receptorów androgenowych komórek Sertolego w regulacji szlaku Notch, stosując testosteron lub/i antyandrogeny lub wyciszając ekspresję genów *Ar* i *Zip9*. Do wykazania wpływu środowiskowych substancji hormonalnie czynnych na szlak Notch wykorzystano eksplanty jąder szczurów inkubowane w obecności bisfenolu A (BPA) i ftalanu dibutyłu (DBP). Z kolei doświadczenia *in vivo* przeprowadzono na samcach szczurów Wistar, u których w okresie dojrzewania płciowego lub dorosłości ograniczono dostępność androgenów poprzez zastosowanie flutamidu lub etanodimetanosulfonianu (EDS). W celu wykazania zmian ekspresji receptorów androgenowych, kładyn i komponentów szlaku Notch na poziomie

mRNA i białka zastosowano odpowiednio metody qRT-PCR i Western blot. Lokalizację badanych białek określono wykorzystując analizę immunohistochemiczną lub immunofluorescencyjną. Do oceny stężenia testosteronu oraz cAMP wykorzystano metodę immunoenzymatyczną. Do analizy statystycznej zastosowano odpowiednie testy.

Doktorantka przedstawiła uzyskane wyniki badań w postaci wysokiej jakości tablic z wykresami i mikrofotografiami oraz przejrzystych tabel, a także szczegółowo je omówiła. Wykazała m.in. że w komórkach Sertolego szlak Notch reguluje sygnalizację androgenową poprzez specyficzne działanie ligandów DLL1 i JAG1 na ekspresję receptorów androgenowych, odpowiednio jądrowego AR i błonowego ZIP9, a także że androgeny odgrywają rolę w kontroli sygnalizacji Notch w jądrze, a receptory AR i ZIP9 biorą udział w regulacji genów efektorowych szlaku Notch w komórkach Sertolego.

W dyskusji Doktorantka wiarygodnie uzasadniła potrzebę przeprowadzonych badań. Uzyskane wyniki zinterpretowała porównując je z aktualnymi wynikami badań przedstawianymi w literaturze światowej. Dyskusja prowadzona jest jasno i logicznie z dużą znajomością tematu i zrozumieniem wzajemnych, nieraz skomplikowanych, zależności między komórkami jądra. Autorka sformułowała 7 wniosków, które jasno wynikają z przeprowadzonych badań, są dobrze uzasadnione i są odpowiedzią na pytania postawione w celach pracy. Za podsumowujące uważam wnioski, które mówią że:

- Zmiany ekspresji receptora Notch1, jego aktywnej formy, genów efektorowych oraz ligandów szlaku Notch po ograniczeniu dostępności androgenów w okresie dojrzewania płciowego oraz dorosłości, potwierdzają istotną rolę tych hormonów w kontroli komunikacji jukstakrynowej w gonadzie męskiej gryzoni *in vivo*.
- Zaburzenie ekspresji komponentów szlaku Notch przez bezpośredni wpływ bisfenolu A (BPA) i ftalanu dibutyłu (DBP) *in vitro*, wskazuje, że komunikacja jukstakrynowa w gonadzie męskiej jest wrażliwa na działanie środowiskowych związków o aktywności hormonalnej, a jej zakłócenie może stanowić jedną z dróg negatywnego wpływu tych związków na funkcje jądra gryzoni.

W pracy Doktorantka wykorzystwała 318 pozycji odpowiednio dobranego anglojęzycznego piśmiennictwa naukowego. Większość artykułów została opublikowana po 2000 roku, a pojedyncze publikacje pochodzą z lat wcześniejszych.

Praca wnosi nowe, interesujące informacje naukowe, a wnioski są wyciągnięte logicznie na podstawie uzyskanych wyników. Wyniki badań częściowo zostały opublikowane w postaci trzech oryginalnych artykułów w czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu i wysokich współczynnikach wpływu. Doktorantka w każdej publikacji jest pierwszym autorem.

Na podkreślenie zasługuje niezwykle staranne przygotowanie rozprawy doktorskiej, bez zastrzeżeń do stosowanego nazewnictwa naukowego, a także poprawności języka polskiego i angielskiego.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską mgr Alicji Kamińskiej z przyjemnością stwierdzam, że Doktorantka doskonale wywiązała się ze swojego zadania odpowiadając na postawione na wstępie pracy pytania, a praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Praca w pełni spełnia warunki stawiane na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biologia, określone w art. 13 ust. 1 z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Alicji Kamińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Pracę oceniam bardzo wysoko i ze względu na oryginalność uzyskanych wyników i ich publikację w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym wnioskuję również o **wyróżnienie** rozprawy doktorskiej.


Prof. dr hab. med. Jolanta Słowikowska-Hilczer