

dr hab. Anna Korzekwa, prof. Instytutu
Zakład Ochrony Bioróżnorodności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Popielno, 4 sierpnia 2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Miłoś
pt. „Receptory pokrewne receptorom estrogenowym (ERR) w funkcjonowaniu
prawidłowych i nowotworowych komórek Leydiga”

wykonana zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Biologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego
w Krakowie z dnia 16 października 2018 r.

Formalna ocena pracy

Praca została wykonana pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Kotuli-Balak, prof. nadzwyczajnego w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Nowotwory narządów płciowych tworzą się w tkankach, które już w warunkach fizjologicznych są steroidozależne, stąd ich wzrost i rozwój podlega wpływom endokrynnym. Funkcja endokrynną, ale również odżywcza komórek Leydiga czyni je ważną składową gonady męskiej. Nowotwory z komórek Leydiga stanowią od 1,4 do 3% wszystkich wywodzących się z gonad u mężczyzn. Podjęte w rozprawie doktorskiej badania dotyczą zaangażowania ścieżki sygnałowej, jaka jest aktywowana pod wpływem estradiolu lub jego pochodnych w komórkach Leydiga. Modelowe komórki Leydiga gryzoni, zarówno fizjologiczne, jak i nowotworowe okazały się doskonałe do poznania funkcji jednego z receptorów estrogenowych.

Rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Miłoś stanowi spójną tematycznie kompilację trzech publikacji wraz z Opracowaniem w języku polskim w postaci 99 stron. Układ dysertacji zawiera rozdziały: Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cel i hipotezy badawcze, Materiały i Metody, Kopie oryginalnych prac badawczych, Rezultaty i Dyskusja, Wnioski i Bibliografia. Dołączono ponadto Wykaz zastosowanych skrótów, Oświadczenia współautorów oraz Informację o finansowaniu badań.

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowi kompilacja trzech publikacji:

1. **Milon A**, Opydo-Chanek M, Tworzydło W, Galas J, Pardyak L, Kamińska A, Ptak A, Kotula-Balak M, „Chlorinated biphenyls effect on estrogen-related receptor expression, steroid secretion, mitochondria ultrastructure but not on mitochondrial membrane potential in Leydig cells”, *Cell and Tissue Research*, 2017, 369:429-444 [IF=3.158].

2. Kotula-Balak M, **Milon A**, Pawlicki P, Opydo-Chanek M, Pacwa A, Lesniak K, Sekula M, Zarzycka M, Bubka M, Tworzydło W, Bilinska B, Hejmej A, „Insights into the role of estrogen-related receptors α , β and γ in tumor Leydig cells”, *Tissue and Cell*, 2018, 52:78-91 [IF=1.447].
3. **Milon A**, Knapczyk-Stwora K, Pawlicki P, Duliban M, Gorowska-Wojtowicz E, Kotula-Balak M, Bilinska B, „Effect of estrogen-related receptor silencing on miRNA protein machinery expression, global methylation, and deacetylation in bank vole (*Myodes glareolus*) and mouse tumor Leydig cells”, *Theriogenology*, 2019, 139:178-190 [IF=2.316].

Sumaryczny wskaźnik oddziaływania (IF) publikacji wynosi 6,921, liczba cytowań tych prac - 6, natomiast liczba punktów MNiSW - 210 według roku opublikowania, sprawdzone przeze mnie w dniu 31 lipca 2020 r.

Rozdział Wstęp w Opracowaniu pracy zawiera 5 stron. Doktorantka przedstawiła w nim informację o historii odkrycia komórek Leydiga, ich budowie wewnątrzkomórkowej, funkcji endokrynnej, regulacji czynności i roli w męskim układzie rozrodczym. Następnie omówiła działanie endogennych estrogenów z podziałem na te pochodzenia naturalnego i syntetycznego. Wskazała kancerogenną rolę estrogenów, w tym również w rozwoju nowotworu komórek Leydiga. Krótco opisała również budowę i wewnątrzkomórkowy mechanizm przekazywania receptorów estrogenowych.

Cel badań określony jest precyzyjnie, a publikacje wchodzące w skład rozprawy mieszczą się w jego zakresie.

W Opracowaniu nie sprecyzowano Zadań badawczych czy doświadczeń, co zapewne wynika z formy rozprawy doktorskiej – kompilacji trzech publikacji. Jednak sformułowanie Zadań badawczych, w mojej ocenie ułatwiłoby znacząco przedstawienie wyników i wniosków.

Trzystronicowy rozdział Materiały i Metody jest zwięzły, zawiera opis materiału badawczego i wszystkich metod z odniesieniem do szczegółów opisanych w publikacjach.

Następnie Doktorantka zamieściła w Opracowaniu trzy publikacje stanowiące podstawę pracy doktorskiej, a po nich dwunastostronicowy rozdział Rezultaty i Dyskusja, w którym zaznacza, że wyniki stanowiące dysertację doktorską przedstawiono w poniższym opisie w sposób chronologiczny względem roku opublikowania. Rozdział kończą Wnioski, czytelnie, spójnie i właściwie sformułowane na podstawie opublikowanych wyników.

Kolejno zawarto informację o finansowaniu badań w ramach realizacji pracy doktorskiej, Oświadczenia współautorów publikacji oraz Bibliografię, składającą się z 129 pozycji literatury anglojęzycznej, ułożoną alfabetycznie.

Ocena rozprawy doktorskiej

Wszystkie publikacje stanowiące podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej zostały poddane ocenie merytorycznej przez co najmniej dwóch recenzentów decydujących o przyjęciu ich do publikacji. Zatem moją rolą jako recenzenta jest ocena ich spójności w świetle postawionego celu badawczego i hipotez badawczych.

Do szczególnych osiągnięć ocenianej pracy doktorskiej zaliczam wykazanie:

- modulacji morfologii i funkcji, stężenia hormonów steroidowych, jonów wapnia, mitochondriów, ekspresji receptorów ERR, w komórkach nowotworowych Leydiga pod wpływem działania PCB, w zależności od rodzaju i dawki.
- zaangażowania ERR γ w zmiany morfologii prawidłowych i nowotworowych komórek Leydiga,
- regulacji funkcji steroidogennych przez ERR w zależności od typu jedynie w komórkach nowotworowych Leydiga, w odróżnieniu od prawidłowych.
- regulacji procesów epigenetycznych poprzez zmiany poziomu metylacji DNA, bez wpływu na deacetylację histonów pod wpływem sygnalizacji estrogenowej z udziałem receptorów ERR.

Pytania, prośby o komentarz oraz uwagi

1. Trzecia hipoteza badawcza w rozprawie doktorskiej brzmi: „Sygnalizacja estrogenowa z udziałem receptorów pokrewnych receptorom estrogenowym (ERR) kontroluje komórkowe, molekularne i epigenetyczne procesy w prawidłowych i nowotworowych komórkach Leydiga”. Użyte słowo „kontroluje” wskazuje na nadrzędną rolę receptorów ERR we wskazanych procesach. Czy faktycznie jest to kontrola, czy otrzymane wyniki pozwalają wskazać na wyższy potencjał przekaźnictwa sygnału przez ERR w porównaniu do przekaźnictwa przez inne typy receptorów estrogenowych?
2. W rozprawie doktorskiej określono efekt działania mieszaniny polichlorowanych bifenyli (PCB). Czy znany jest wpływ ksenoestrogenów naturalnych na mechanizm przekaźnictwa przez ERR w komórkach fizjologicznych i nowotworowych Leydiga u gryzoni, innych gatunków zwierząt i człowieka?
3. We Wstępie Opracowania Doktorantka opisuje, że w przypadku nornicy rudej wykazano produkcję estrogenów w komórkach plemnikotwórczych, podczas gdy u myszy nie wykazano. Czy zastosowanie dwóch gatunków jako modelowych i ich porównanie jest zatem mając powyższe na względzie uzasadnione?

4. Jony Ca^{2+} są pierwotnymi lub wtórnymi transmiterami, aktywują transkrypcję i apoptozę. Wzrost poziomu wapnia powoduje fosforylację określonych białek. Fosforylacja ta następuje jako wynik aktywacji przez wapń kinazy białkowej II (zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny) oraz kinazy białkowej C (zależnej od Ca^{2+} , diacyloglicerolu i fosfatydyloseryny). Zatem jony Ca^{2+} , jako wtórne przekaźniki informacji, powodując fosforylację białek prowadzą do określonej odpowiedzi metabolicznej komórki. Jony wapniowe działają jako transmitery również drogą tzw. pozagenomową i wtedy odpowiedź komórkowa jest aktywowany relatywnie szybko (
5. od kilku sekund do kilku minut od stymulacji). Taki sposób przekaźnictwa może mieć miejsce w przypadku działania estrogenów. Doktorantka wykonywała pomiar stężenia jonów wapnia jedynie po 24 h od stymulacji komórek PCB. Proszę o wskazanie jakiego efektu się spodziewano – czy chodziło o działanie jonów wapniowych genomowe czy pozagenomowe?
6. Czy w poszczególnych, użytych metodach badawczych stosowane były kontrole pozytywne lub negatywne, w zależności od potrzeb czy warunków analiz?
7. W trzeciej z kompilacji publikacji (Miłoś i wsp. 2019, Theriogenology) izolowano komórki Leydiga od nornic. Czy istnieje marker komórek Leydiga, np. na poziomie ekspresji mRNA, który pozwala potwierdzić homogenność hodowli tych komórek?
8. Zmiana morfologii komórek nowotworowych polegająca na tworzeniu skupisk, wg sugestii Doktorantki może być podstawą tworzenia ognisk przerzutowych. Czy byłoby możliwa zdaniem Doktorantki, kontynuacją badań w tym kierunku i stworzeniu np. hodowli – 3D imitującej translokację takich ognisk do środowiska komórek nabłonkowych, immunologicznych czy innych.

Posumowanie i wniosek końcowy

Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi i komentarze stanowią element naukowego dyskursu i nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji. Praca napisana jest bardzo starannie, w czytelny sposób i wyróżnia się logicznym tokiem drażenia problemu badawczego, ponieważ kolejne etapy są „cegiełkami” ostatecznie „zlepiającymi” odpowiedź na pytanie postawione w celu rozprawy, którym jest określenie roli receptorów pokrewnych receptorom estrogenowym w prawidłowych i nowotworowych komórkach Leydiga. Wszystkie publikacje wzajemnie się uzupełniają i jako całość wnoszą dużą dawkę nowej wiedzy. Doktorantka znakomicie wykorzystwała dostępne, nowoczesne metody badawcze do realizacji zamierzonych celów pracy. Uzyskane rezultaty są nowatorskie i ważne nie tylko z punktu widzenia

naukowego, ale gotowe do wykorzystania w badaniach klinicznych. Czasopisma, w których opublikowane zostały wyniki, dobrane zostały trafnie do tematyki, a ich IF jest wysoki, co wskazuje na ambitne podejście Doktorantki do pracy naukowej. Nie znalazłam w Opracowaniu większych błędów edytorskich i stylistycznych.

W mojej opinii, rozprawa doktorska mgr Agnieszki Miłoś stanowi przemyślane oraz interesujące, rozwiązanie problemu naukowego w odniesieniu do celów badawczych, metodyki, opracowania wyników i sformułowania wniosków, a prezentacja redakcyjna wyników przeprowadzonych badań jest również dowodem wysokich umiejętności Autorki do prowadzenia pracy naukowej. W związku z tym bez wątpienia stwierdzić należy, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska pt. *„Receptory pokrewne receptorom estrogenowym (ERR) w funkcjonowaniu prawidłowych i nowotworowych komórek Leydiga”* odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 ze zm. Dz.U. z 2005 r., Nr 164, poz. 1365) stawiane pracom doktorskim.

Przedkładałam zatem Wysockiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o przyjęcie pracy i dopuszczenie mgr Agnieszki Miłoś do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim. Wnioskuje również o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Ane Kowalska