

Prof. dr hab. Marek Koziorowski, dr h.c.
Zakład Fizjologii i Rozrodu Zwierząt
Instytut Biologii i Biotechnologii
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Rzeszowski

Rzeszów, 10.08.2020

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Piotra Pawlickiego
pt: Rola nieklasycznych receptorów estrogenowych
w tkance interstycjalnej gonady męskiej
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biologia

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana została w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego, pod kierunkiem Promotora *dr hab. Małgorzaty Kotuli-Balak, prof. UR.*

Na rozprawę doktorską składają się cztery wyszczególnione poniżej – prace oryginalne, opublikowane w latach 2017-2019 w czasopismach z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania Impact Factor wynosi 10,196, a punktacja wg MNiSW – 350. Poniżej wyszczególniono publikacje Doktoranta, wchodzące w skład dorobku naukowego przedłożonego w ramach ubiegania się o stopień doktora nauk biologicznych:

1. Pawlicki P., Miłoś A., Zarzycka M., Galas J., Tworzydło W., Kamińska A., Pardyak L., Leśniak K., Pacwa A., Bilińska B., Górowska-Wójtowicz E., Kotula-Balak M., (2017) Does signaling of estrogen-related receptors affect structure and function of bank vole Leydig cells? *Journal of Physiology and Pharmacology*, Jun;68(3):459-476. [70 pkt. MNiSW, IF= 2.457];

2. Kotula-Balak M., Pawlicki P., Miłoś A., Tworzydło W., Sekuła M., Pacwa A., Górowska-Wójtowicz E., Bilińska B., Pawlicka B., Wiater J., Zarzycka M., Galas J., (2018) The role of G-protein-coupled membrane estrogen receptor in mouse Leydig cell function—in vivo and in vitro evaluation. *Cell and Tissue Research*, Nov;374(2):389-412. [70 pkt. MNiSW, IF= 3.158];

3. Pawlicki P., Hejmej A., Miłoś A., Lustofin K., Płachno B. J., Tworzydło W., Górowska-Wójtowicz E., Pawlicka B., Kotula-Balak M., Bilińska B., (2019) Telocytes in the mouse testicular interstitium: implications of G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) and estrogen-related receptor (ERR) in the regulation of mouse testicular interstitial cells. *Protoplasma*, 256(2):393–408. [70 pkt. MNiSW, IF= 2.583];

4. Pawlicki P., Duliban M., Tuz R., Ptak A., Miłoś A., Górowska-Wójtowicz E., Tworzydło W., Płachno B. J., Bilińska B., Knapczyk-Stwora K., Kotula-Balak M., (2019) Do G-protein coupled estrogen receptor and bisphenol A analogs influence on Leydig cell epigenetic regulation in immature boar testis ex vivo? *Animal Reproduction Science*, 207, 21–35. [140 pkt. MNiSW, IF= 1.998].

Indywidualny wkład Doktoranta w powstanie zaprezentowanych prac oryginalnych potwierdzony przez współautorów należy uznać za wystarczający do przedłożenia ich Dostojnej Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne w celu procedowania dalszego postępowania. Doktorant uczestniczył między innymi w planowaniu eksperymentów, pobieraniu materiału do badań w modelu *in vitro*, *in vivo* oraz *ex vivo*, przeprowadzaniu analiz molekularnych i opracowaniu wyników (oświadczenia PT Współautorów). We wszystkich przedstawionych do oceny pracach wkład Doktoranta przekraczał 50 % (60%, 60%, 60% oraz 52%).

Tematyka załączonych publikacji dotyczy zagadnień związanych z rolą nieklasycznych receptorów estrogenowych w tkance interstycjalnej gonady męskiej. W pracach tych Doktorant wyjaśnia znaczenie i wpływ sygnalizacji estrogenowej z udziałem receptorów pokrewnych receptorom estrogenowym (ERR) i błonowych receptorów estrogenowych sprzężonych z białkami G (GPER) na fizjologię niedojrzałej i dojrzałej tkanki interstycjalnej gonady samców gryzoni i knurów.

Przedstawiony do oceny, opracowany w języku polskim manuskrypt, zawiera załączone oryginalne prace, liczy 124 strony. Zawiera następujące rozdziały: streszczenie, summary, wykaz skrótów stosowanych w pracy, cykl publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp, cel i hipotezy badawcze, materiały i metody, kopie oryginalnych prac badawczych,

rezultaty i dyskusję, wnioski, finansowanie badań, oświadczenia Autorów oraz bibliografię. Manuskrypt napisany jest poprawnym językiem z zachowaniem wymagań przewidzianych dla opracowań naukowych. Skutkuje to, iż opracowanie to czyta się „lekką”.

W prezentowanych wynikach doświadczeń *in vivo* modelem badawczym były dojrzałe płciowo nornice rude (łac. *Myodes glareolus*) oraz niedojrzałe i dojrzałe płciowo oraz starzejące się myszy szczepu C57BL/6. W badaniach *in vitro* wykorzystano komórki Leydiga MA-10. W hodowli organotypowej *ex vivo* użyto fragmentów jąder niedojrzałych knurów (rasy Wielka Biała Polska). W zależności od typu eksperymentu i modelu badawczego użyto: antagonistę receptora estrogenowego α (ERR α) - (XCT790) i błonowego receptora estrogenowego (GPER) - (G-15), agonistę receptorów estrogenowych β/γ (ERR β/γ) - (DY 131), 17 β -estradiol, ICI 182,780 oraz ksenoestrogeny [bisfenol A (BPA, ang. bisphenol A); tetrabromobisfenol A (TBBPA, ang. tetrabromobisphenol A); tetrachlorobisfenol A (TCBPA, ang. tetrachlorobisphenol A)], które były używane pojedynczo lub w kombinacjach. Stosowane dawki były dobierane na podstawie dostępnego piśmiennictwa i badań wstępnych.

Sezonowa zmienność aktywności endokrynnej układu rozrodczego u ssaków żyjących w klimacie umiarkowanym jest spowodowana zmianą długości dnia świetlnego. Zjawisko to występuje również u nornicy rudej. Aktywność rozrodcza tych zwierząt regulowana jest przez syntezę melatoniny, której poziom i dobową długość aktywności jest odwrotnie proporcjonalna do długości dnia świetlnego. Mysi model jest często wykorzystywany w badaniach z zakresu biologii rozrodu ze względu na wysoką homologię genów mysich do ludzkich.

Wstępne wyniki badań prowadzonych w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego, w których uczestniczył Doktorant pozwoliły Mu na postawienie hipotezy badawczej i określenie celu badań:

1. Sygnalizacja estrogenowa z udziałem receptorów ERR i GPER jest odpowiedzialna za utrzymanie prawidłowej histologii tkanki interstycjalnej oraz wpływa na proces steroidogenezy w niedojrzałej i dojrzałej płciowo gonadzie.

2. Receptor GPER współdziałając z innymi białkami sygnalizacji estrogenowej wpływa na utrzymanie prawidłowej cytoarchitektury i funkcji komórek Leydiga w różnych stadiach rozwoju gonady oraz kooperacja między receptorami ERR i GPER kontroluje liczbę, dystrybucję i działanie regulacyjne telocytów w dojrzałej płciowo gonadzie.

3. Ksenoestrogeny poprzez receptor GPER z udziałem mechanizmów epigenetycznych wpływają na funkcje tkanki interstycjalnej w niedojrzałej gonadzie.

W nawiązaniu do założeń określonych w hipotezie Doktorant przeprowadził badania, których celem było potwierdzenie lub zaprzeczenie słuszności prezentowanej hipotezy. W trakcie ich przeprowadzania Autor zastosował nowoczesne metody analityczne, m.in. RIA, ELISA, PCR, Real-Time PCR, Blott, czy analizę immunohistochemiczną, immunocytochemiczną lub immunocytofluorescencyjną. Użycie takich metod analitycznych odpowiednio pobrany materiał badawczy przy jasno określonym celu badań w pełni zrealizowanym oraz dogłębna analiza uzyskanych wyników zaskutkowała przyjęciem prac do druku w wysoko impaktowych czasopismach.

Analizę statystyczną otrzymanych wyników Autor przeprowadził przy użyciu oprogramowania Statistica (StatSoft, Tulsa, OK, USA). W celu sprawdzenia jednorodności wariancji zastosował test Levene'a, a do sprawdzenia normalności rozkładu test Shapiro-Wilka. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA). Przeprowadzano też analizy z wykorzystaniem testu porównawczego post-hoc Tukeya. Wyniki prezentowano jako średnie arytmetyczne $\pm$ błąd standardowy średniej (SEM), a wyniki uznawano za istotnie różne przy $p < 0,05$.

Przeprowadzone badania upoważniły Doktoranta do przedstawienia poniższych wyników i/lub wniosków:

W pracy nr 1 (Pawlicki et al. 2017) po raz pierwszy wykazano obecność receptorów estrogenowych ERR zlokalizowanych w obszarze okołojądrowym i jądrze komórek Leydiga nornicy rudej. Badania wykazały, że receptor estrogenowy α (ERR α) jest niezbędny do ścisłego współdziałania z komórkami Leydiga w zakresie ich funkcji endokrynnej – syntezy estrogenów, androgenów i hormonów białkowych. Receptory estrogenowe regulują reaktywność komórek Leydiga poprzez modulację ekspresji genów i ekspresję ich białka. Działanie estrogenów z udziałem receptorów estrogenowych reguluje również morfologię tkanki interstycjalnej, podobnie jak wpływa na proces steroidogenezy poprzez ekspresję genów i stężenie molekuł sygnalizacyjnych mających wpływ na steroidogenezę i funkcję wydzielniczą komórek Leydiga.

W kolejnej publikacji (Kotula-Balak et al. 2018) Doktorant postanowił zbadać mechanizm za pomocą, którego błonowy receptor estrogenowy GPER wraz z receptorem estrogenowym ER i aromatazą kontrolują procesy zachodzące w komórkach Leydiga na

różnym etapie rozwoju gonady myszy. Uzyskane wyniki dały podstawę do wyciągnięcia wniosku, iż membranowy receptor estrogenowy sprzężony z białkiem G (GPER) stanowi nową podstawę do zrozumienia roli estrogenu i cząsteczek sygnałowych estrogenu w regulacji funkcji komórek Leydiga. Przedstawione tutaj wyniki badań ujawniły, że GPER ma regulacyjny wpływ na sygnalizację estrogenową, a także na stężenie i wydzielanie estrogenu w mysich komórkach Leydiga, zależne od wieku samca i przypuszczalnego zaangażowania różnych organelli poprzez współpracę z receptorami estrogenowymi ER i aromatazą. Zatem wytworzenie mysiego modelu potrójnego knockoutu (tKO) (aromatazy, ER i GPER) może być ważnym wkładem w dalsze zrozumienie mechanizmów sygnalizacji estrogenowej w komórkach Leydiga. Zdaniem recenzenta ta sugestia zawarta w pracy, jak i autoreferacie realnie przyczynić się może do zrozumienia endokrynnych procesów regulacyjnych w obszarze jądra.

Kolejna praca (Pawlicki et al. 2019a) dotyczyła badań wpływu na komórki tkanki interstycjalnej sygnalizacji estrogenowej poprzez błonowy receptor estrogenowy (GPER) i receptory estrogenowe. Używając mikroskopii elektronowej Doktorant po raz pierwszy zlokalizował telocyty w przestrzeni międzykanalikowej jąder myszy po zadziałaniu antagonisty G-15. Obserwowane zmiany budowy histologicznej tkanki interstycjalnej wskazują, że ekspresja błonowego receptora estrogenowego może występować nie tylko w komórkach Leydiga ale i w innych komórkach - interstycjalnych i okołokanalikowych. Różnice w liczbie i rozmieszczeniu telocytów wywołane zaburzeniem sygnalizacji estrogenowej mogą powodować wzrost objętości tkanki interstycjalnej. Na podstawie wyników badań wnioskowano, że wrażliwość telocytów na zaburzenie sygnalizacji estrogenowej może w pośredni sposób wpływać na funkcję steroidogenną komórek Leydiga. Równocześnie zablokowanie błonowego receptora estrogenowego GPER prowadzi do wzrostu stężenia relaksyny (RLN). Uzyskane wyniki wskazują, iż telocyty odgrywają istotną rolę w tworzeniu odpowiedniego środowiska niezbędnego do utrzymania homeostazy. Uzyskane wyniki mogą mieć istotne znaczenie do wykorzystania telocytów w leczeniu chorób tkanki interstycjalnej jąder, szczególnie nowotworzenia.

W manuskrypcie 4 (Pawlicki et al. 2019b) Doktorant wykazał po raz pierwszy ekspresję błonowego receptora estrogenowego GPER w niedojrzałej gonadzie knura, co wskazuje, że receptor ten może pełnić funkcje na etapie rozwoju komórek steroidogennych. Użycie do badań antagonisty błonowego receptora estrogenowego oraz ksenoestrogenu bisfenolu A (BPA) i jego analogów (TBBPA i TCBPA) wykazało, że ksenoestrogeny (poza BPA i G-15+TCBPA) powodują obniżenie ekspresji receptora GPER na poziomie białka, nie powodując zmian

w budowie histologicznej ani w morfologii komórek Leydiga niedojrzałego jądra knura. Badania prezentowane w tej pracy wykazały również, iż ksenoestrogeny z udziałem błonowego receptora estrogenowego GPER modulują ekspresję białek kontrolujących biogenezę i funkcję miRNA w niedojrzałym jądrze knura, co może mieć także wpływ na proces steroidogenezy. Stąd też sugestia, że sygnalizacja estrogenowa przez błonowy receptor estrogenowy GPER jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania niedojrzałej gonady knura. Wszelkie zakłócenia tej sygnalizacji poprzez blokowanie receptora GPER lub ekspozycję na ksenoestrogeny prowadzą do zaburzeń w obszarach tkanki interstycjalnej i komórek Leydiga.

Podsumowując, Doktorant prezentując uzyskane wyniki z 4 manuskryptów po raz pierwszy wykazał tak szeroko możliwości włączenia receptorów estrogenowych ERR i błonowego receptora estrogenowego GPER w regulację steroidogenezy w obszarze komórek tkanki interstycjalnej jąder nornic, myszy i knurów. Na podstawie otrzymanych wyników Doktorant wnioskował, iż sygnalizacja estrogenowa z udziałem badanych receptorów wpływa na utrzymanie prawidłowej budowy histologicznej tkanki interstycjalnej oraz ultrastruktury komórek. Podkreślił, iż sygnalizacja przez ERR i GPER odgrywa również kluczową rolę w prawidłowym przebiegu procesu steroidogenezy w komórkach Leydiga gonady niedojrzałej i dojrzałej oraz w tworzeniu lokalnego środowiska tkanki interstycjalnej z udziałem telocytów, które po raz pierwszy zostały zlokalizowane w prezentowanych badaniach w jądrach myszy. Zrozumienie mechanizmów komórkowych, molekularnych i epigenetycznych leżących u podstaw działania receptorów estrogenowych ERR i/lub błonowych receptorów estrogenowych GPER w gonadzie jest niezwykle istotne dla przewidywania i zapobiegania zaburzeniom steroidogenezy, jak i spermatogenezy.

Reasumując, przedstawione do recenzji opracowanie wraz z załączonymi oryginalnymi opublikowanymi pracami stanowią cenny wkład do poznania mechanizmów włączonych w szeroko pojętą biologię rozrodu, ze szczególnym uwzględnieniem andrologii.

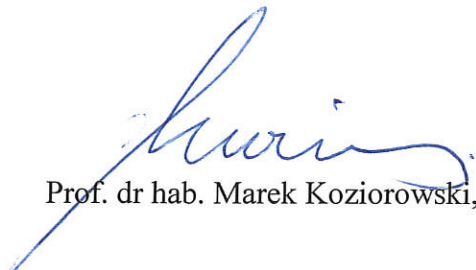
W załączonych pracach oraz ocenianym opracowaniu Doktorant wykazał się bardzo dobrym opanowaniem szerokiego warsztatu badawczego, zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością światowego piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje moim zdaniem doskonały wybór tematyki, będący kontynuacją szeroko pojętej problematyki badawczej macierzystego Zakładu Endokrynologii w zakresie biologii rozrodu, którego dorobek naukowy zaliczany jest do wiodących w kraju i znany za granicą. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać,

że Doktorant posiada ważne w pracy badawczej cechy, takie jak pracowitość, solidność i dociekliwość.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **Pana mgr Piotra Pawlickiego pt: Rola nieklasycznych receptorów estrogenowych w tkance interstycjalnej gonady męskiej** w opinii recenzenta spełnia wszystkie wymagania – określone w art. 13 us.1 z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.z 2003 r. Nr 65, poz. 59, z 2005 r. nr 164, poz. 1365, z 2010 r. nr 96, poz. 620, nr 182, poz. 1228 oraz 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 do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora *w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne*.

Równocześnie mając na uwadze wysoki poziom naukowy zaprezentowanych badań i ich twórczy charakter, co również uznali recenzenci kwalifikujący prace do druku w czasopismach o światowym zasięgu, pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie w pełni uzasadniony moim zdaniem wniosek o wyróżnienie pracy.



Prof. dr hab. Marek Koziorowski, dr h.c.