

Prof. dr hab. n. med. Maria Laszczyńska
Zakład Pielęgniarstwa
Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa
w Koszalinie ul. Leśna 1

Szczecin, 27.09.2023r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Lustofin
pt. „Rola hormonu folikulotropowego i estrogenów w kontroli
sygnalizacji Notch w komórkach Sertoliego gryzoni”

**Praca wykonana w Zakładzie Endokrynologii
Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych
pod kierunkiem dr hab. Anny Hejmej, prof. UJ**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Sylwii Lustofin dotyczy ważnego tematu związanego z wyjaśnieniem roli hormonu folikulotropowego (FSH) oraz estrogenów w regulacji ekspresji ligandów, receptora i genów efektorowych szlaku Notch oraz aktywności tego szlaku w komórkach Sertoliego gryzoni.

Sam wybór tematu pracy uważam za bardzo trafny, aktualny i potrzebny pomimo, że są już publikacje związane z tym tematem. Na podstawie literatury wiadomo, że prawidłowy przebieg procesu spermatogenezy uwarunkowany jest współdziałaniem zarówno regulacji endokrynej jak również lokalnych mechanizmów jak np. sygnalizacja parakrynowa czy sygnalizacja zależna od kontaktu, w które zaangażowane są komórki Sertoliego. Komórki te pośredniczą w endokrynej kontroli spermatogenezy dzięki ekspresji receptorów dla wielu hormonów takich jak: FSH, prolaktyny, hormonów tarczycy, androgenów oraz estrogenów. Jednak do podstawowych hormonalnych czynników warunkujących funkcje komórek Sertoliego zalicza się hormon folikulotropowy i testosteron. Hormon folikulotropowy stymuluje produkcję czynników parakrynych i składników odżywczych tak ważnych dla prawidłowego rozwoju komórek plemnikotwórczych. Badania ostatnich lat wskazują, że również estrogeny wpływają na funkcjonowanie komórek Sertoliego, i to zarówno poprzez jądrowe receptory estrogenowe jak również za pośrednictwem błonowego receptora estrogenowego. Aktywność komórek Sertoliego kontrolowana jest także za pośrednictwem zależnej od kontaktu komunikacji międzykomórkowej. Jednym z typów takiej komunikacji jest szlak sygnałowy Notch. Ze względu na to, że w tym temacie jest jeszcze sporo do zbadania, dlatego Doktorantka podjęła się próby wyjaśnienia znaczenia FSH oraz estrogenów w regulacji

ekspresji ligandów, receptora i genów efektorowych szlaku Notch oraz aktywności tego szlaku w komórkach Sertoliego gryzoni.

Praca została wykonana w Zakładzie Endokrynologii Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem dr hab. Anny Hejmej prof. UJ, która od wielu lat zajmuje się badaniami zarówno in vivo jak i in vitro związanymi z układem płciowym męskim.

Rozprawa doktorska, została dobrze zaplanowana, jest zredagowana prawidłowo, proporcje poszczególnych rozdziałów są zachowane i od strony formalnej nie budzi zastrzeżeń.

Praca liczy 141 stron, zawiera 49 tablic, 5 tabel i 18 rycin. Podzielona jest klasycznie na 8 rozdziałów: wstęp, hipotezy i cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie, summary i literatura. Na początku rozprawy Doktorantka podała źródło finansowania pracy - 2 projekty badawcze: OPUS13 Narodowe Centrum Nauki oraz dofinansowanie działalności naukowej doktorantów. Na str. 36, Autorka zamieściła informację o zgodzie Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie na przeprowadzenie badań.

Doktorantka bardzo dokładnie przygotowała i załączyła szczegółowy wykaz skrótów w języku angielskimi i polskim, zawarty na 5. stronach. Cytowane piśmiennictwo obejmuje 270 pozycji literatury. To co jest warte podkreślenia to wszystkie cytowane prace są anglojęzyczne. Świadczy to o bardzo dobrej znajomości języka angielskiego i umiejętności wyboru przez Autorkę odpowiednich publikacji do swojej pracy doktorskiej. Piśmiennictwo jest dobrze dobrane, a większość pozycji pochodzi z ostatnich piętnastu lat. Jest w nim również kilka publikacji wcześniejszych. Sposób cytowania prac jest wyjątkowo poprawny i recenzent nie dopatrywał się żadnej publikacji cytowanej nieprawidłowo.

We wstępie pracy, na 24 stronach, Doktorantka w sposób bardzo prosty i przemyślany, przedstawiła zagadnienia, niezbędne do zrozumienia wyników badań swojej pracy oraz ich interpretacji. Dodatkowo rozdział ten Autorka wzbogaciła ośmioma kolorowymi rycinami (ryc. 1-8), które w sposób poglądowy przyczyniły się do lepszego poznania i zrozumienia informacji zawartych we wstępie. Wstęp pracy podzieliła na 6 podrozdziałów. Doktorantka omówiła przejrzyście i wyczerpująco rolę komórek Sertoliego w procesie spermatogenezy, które pośredniczą w endokrynnej kontroli tego procesu. Komórki Sertoliego odgrywają również istotną rolę w parakrynnej regulacji procesu spermatogenezy oraz uczestniczą w

bezpośrednich oddziaływaniach pomiędzy komórkami w nabłonku plemnikotwórczym. W tej komunikacji międzykomórkowej ważną rolę odgrywają połączenia szczelinowe, a także sygnalizacja jukstakrynowa. W następnym podrozdziale Doktorantka w sposób bardzo szczegółowy przedstawiła szlak sygnałowy Notch. Jest to jeden z najlepiej poznanych mechanizmów komunikacji jukstakrynowej. Odgrywa on kluczową rolę w regulacji procesów związanych w rozwojem, takich jak proliferacja, różnicowanie czy apoptoza. Autorka opisała również bardzo merytorycznie receptory Notch oraz ich ligandy Delta-like oraz Jagged biorące udział w komunikacji poprzez szlak sygnałowy Notch. W kolejnych podrozdziałach wstępu Doktorantka szczegółowo i merytorycznie opisała zarówno sygnalizację FSH w komórkach Sertoliego, rolę FSH w nabłonku plemnikotwórczym jak i sygnalizację estrogenową w gonadzie męskiej. W ostatnim podrozdziale wstępu Autorka skupiła się na przedstawieniu aktualnego stanu wiedzy dotyczącego roli estrogenów w regulacji funkcji gonady męskiej.

Podsumowując mogę stwierdzić, że wstęp rozprawy doktorskiej stanowi rzetelne omówienie poruszanych zagadnień i oparty jest o aktualną literaturę. Biorąc pod uwagę zakres obecnej wiedzy, który został zaprezentowany we wstępie, zarówno z naukowego jak i poznawczego punktu widzenia, decyzja Doktorantki o kierunku prowadzonych badań jest uzasadniona.

Mgr Sylwia Lustofin przyjęła hipotezę badawczą, że w nabłonku plemnikotwórczym gryzoni komunikacja jukstakrynowa z udziałem szlaku Notch podlega regulacji przez działanie FSH i estrogenów w komórkach Sertoliego. W celu weryfikacji tej hipotezy Doktorantka przedstawiła również 2. cele szczegółowe: 1. Wyjaśnienie roli sygnalizacji FSH w komórkach Sertoliego w regulacji ekspresji ligandów, receptora i genów efektorowych szlaku Notch oraz aktywności tego szlaku w nabłonku plemnikotwórczym gryzoni, 2. Wyjaśnienie roli sygnalizacji estrogenowej z udziałem receptorów ER α , ER β i GPER w regulacji ekspresji ligandów, receptora oraz genów efektorowych szlaku Notch oraz aktywności tego szlaku w eksplantach jąder oraz komórkach Sertoliego gryzoni. Dla większej przejrzystości badań, Autorka dodatkowo każdy z tych celów podzieliła jeszcze na 3 bardziej szczegółowe cele.

Rozdział **Materiał i Metody**, zawarty na 21 stronach, został napisany z ogromną starannością. Rozdział ten został podzielony na 12 podrozdziałów. Doktorantka doświadczenia przeprowadziła w układzie *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro*.

W układzie *in vivo*, materiałem do badań były niedojrzałe płciowo samce szczurów Wistar oraz dojrzałe płciowo samce nornicy rudej. W celu poznania roli FSH w kontroli szlaku Notch Doktorantka przeprowadziła doświadczenie w układzie *in vivo* w którym w sposób farmakologiczny lub fizjologiczny hamowała produkcję gonadotropin, a następnie podawała substytut FSH lub nośnik. Do wykazania udziału sygnalizacji estrogenowej w regulacji szlaku Notch w gonadzie męskiej Autorka wykorzystwała model *ex vivo* w którym eksplanty jąder szczurów inkubowała w obecności 17β -estradiolu i antagonistów receptorów estrogenowych. Natomiast w układzie *in vitro* Doktorantka przeprowadziła badania z użyciem hodowli szczurzych komórek Sertoliego oraz linii mysich komórek Sertoliego TM4. Żeby potwierdzić udział FSH oraz jego receptora (FSHR) w kontroli szlaku Notch, mgr Sylwia Lustofin stymulowała komórki Sertoliego FSH lub wyciszała ekspresję jego receptora FSHR. Doktorantka chciała również określić rolę receptorów estrogenowych w komórkach Sertoliego. W tym celu inkubowała te komórki z 17β -estradiolem lub/i antagonistami receptorów estrogenowych, lub wyciszała ekspresję receptorów estrogenowych zarówno jądrowych jak i receptora błonowego. Autorka zastosowała również odpowiednie, analizy RT-qPCR i western blot do wykazania zmian ekspresji komponentów szlaku Notch na poziomie mRNA i białka. Przeprowadziła także analizę immunohistochemiczną i immunofluorescencyjną w celu określenia lokalizacji badanych białek w jądrach.

Na wysoką ocenę zasługuje zamieszczenie w tym rozdziale 3 kolorowych rycin (ryc. 9, 10 i 11) i 4 tabel (tab. 1, 2, 3 i 4). Na ryc. 9. Autorka zamieściła czytelny schemat przebiegu doświadczeń *in vivo* z wykorzystaniem samców szczurzych, a na ryc. 10. schemat przebiegu doświadczeń *in vivo* z wykorzystaniem samców nornicy rudej. Z kolei w tabelach Autorka przedstawiła: w **tabeli 1.** sekwencje siRNA stosowane w celu wyciszenia ekspresji genów, w **tabeli 2.** startery użyte do analizy RT-PCR w czasie rzeczywistym, w **tabeli 3.** przeciwciała pierwszorzędowe stosowane w analizie western blot, a w **tabeli 4.** przeciwciała pierwszorzędowe stosowane w immunohistochemii i immunofluorescencji.

Wysoko oceniam również badania Doktorantki przeprowadzone w warunkach *in vitro* na wyizolowanych komórkach Sertoliego z jąder szczurów szczepu Wistar oraz na mysiej linii komórek Sertoliego TM4. Autorka przeprowadziła izolację oraz hodowlę pierwotną szczurzych komórek Sertoliego, jak również hodowlę komórek Sertoliego linii TM4. Bardzo szczegółowo i dokładnie Doktorantka opisała przebieg doświadczenia co jest bardzo ważne w warunkach

powtórzenia tego eksperymentu. Wszystkie metody, które zastosowała Doktorantka w swoich badaniach zostały opisane i przeprowadzone z dużą dokładnością i rzetelnością. Mgr Sylwia Lustofin przeprowadziła izolację RNA a następnie procedurę odwrotnej transkrypcji i ilościową analizę RT-PCR w czasie rzeczywistym. Startery użyte do analizy RT-PCR w czasie rzeczywistym zostały przedstawione w tabeli 2. Autorka opisała również bardzo dokładnie analizę western blot oraz procedury histologiczne i analizę morfologiczną badanych jąder szczurów i nornic. Przeprowadziła również badania immunohistochemiczne i immunofluorescencyjne, a zastosowane przeciwciała pierwszorzędowe w tych badaniach przedstawiła w tabeli 4. W celu uzyskania odpowiedzi na postawione przez Doktorantkę w swojej pracy doktorskiej cele szczegółowe badań Autorka przedstawiła również i inne bardzo precyzyjne metody badań takie jak: testy immunoenzymatyczne, pomiar aktywności czynnika transkrypcyjnego RBP-J czy immunoprecypitację chromatyny. Analiza statystyczna uzyskanych wyników została przeprowadzona w oparciu o prawidłowo dobrane testy.

Rozdział **Wyniki** jest najbardziej rozbudowaną częścią pracy doktorskiej. Doktorantka przedstawiła go bardzo dokładnie i szczegółowo na 46 stronach i podzieliła na 2 podrozdziały 1. Rola FSH w kontroli aktywności i ekspresji komponentów szlaku Notch w gonadzie męskiej gryzoni oraz 2. Rola sygnalizacji estrogenowej w kontroli aktywności i ekspresji komponentów szlaku Notch w gonadzie męskiej. Dodatkowo Autorka każdy z tych podrozdziałów podzieliła jeszcze na 5 kolejnych podrozdziałów. Dzięki tak rozbudowanym podziałom wyniki badań były dla czytającego tę rozprawę łatwiejsze do poznania i zrozumienia. Doktorantka wyniki swojej pracy opisała w sposób bardzo staranny, przejrzysty i wyczerpujący. Przedstawiła je w formie tekstowej oraz w formie merytorycznie przygotowanych 49 tablic (tablice 1 – 49) i 1 tabeli (tabela 5). Przy tak ogromnej ilości wyników badań Autorka musiała dokładnie zaplanować sposób ich przedstawienia i interpretacji, żeby były one jasne i zrozumiałe dla czytającego tę rozprawę. Myślę, że udało się to Doktorantce i dlatego ze strony recenzenta - uznanie za tak czytelne i merytoryczne przedstawienie wyników swoich badań.

Na uznanie zasługuje również bardzo dobra jakość mikrofotografii, które Doktorantka zamieściła w specjalnie przygotowanych tablicach w połączeniu z wynikami uzyskanymi przy użyciu innych metod jak np. Tablica 2., w której pokazano wyniki ekspresji białka INHA – podjednostka α inhibiny oraz jego immunohistochemiczną lokalizację w nabłonku plemnikotwórczym jąder szczurów po ekspozycji na cetroreliks. W tablicy w części A

przedstawiono analizę western blot ekspresji białka INHA oraz histogram przedstawiający jego poziom znormalizowany względem poziomu β -aktyny. Doktorantka pokazała również na mikrofotografiach wstawki przedstawiające zaznaczony fragment nabłonka plemnikotwórczego w powiększeniu. Na mikrofotografiach są również zaznaczone strzałki czarne przedstawiające komórki Sertoliego i białe, otwarte przedstawiające komórki plemnikotwórcze. Wg takiego, bardzo dydaktycznego schematu, Doktorantka przygotowała kolejne tablice przedstawiające wyniki swoich badań.

Mgr Sylwia Lustofin bardzo dobrze poradziła sobie z analizą tak wielu parametrów o zróżnicowanym charakterze oraz zależnościach między nimi. Również sposób prezentowanych wyników jest bardzo przejrzysty i znacznie ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z dokumentacją przeprowadzonych analiz. Pozytywnie oceniam prezentowane w pracy wyniki. Zostały one przedstawione w logiczny sposób oraz udokumentowane tablicami bardzo dobrej jakości. Sposób prezentacji wyników świadczy o bardzo dobrym opanowaniu przez Doktorantkę warsztatu metodycznego niezbędnego do przedstawienia swoich wyników badań. Jako recenzent chciałabym również zwrócić uwagę na ogromny wkład pracy włożony przez Doktorantkę w celu uzyskania tak rozbudowanych i wartościowych wyników badań.

Rozdział **Dyskusja**, liczący 16 stron, Autorka podzieliła na 2 podrozdziały: 1. Rola sygnalizacji FSH w regulacji szlaku Notch w komórkach Sertoliego, 2. Rola sygnalizacji estrogenowej w regulacji szlaku Notch w komórkach Sertoliego. Zdaniem recenzenta takie przedstawienie dyskusji jest bardziej czytelne i lepsze w odbiorze przez czytającego. W pierwszej części dyskusji Doktorantka przedstawiła badania dotyczące roli FSH w regulacji szlaku sygnalizacyjnego Notch *in vivo* z wykorzystaniem dwóch modeli doświadczalnych w oparciu o farmakologiczną oraz fizjologiczną redukcję stężenia FSH, a następnie substytucję tego hormonu. Doktorantka przedyskutowała wraz z innymi autorami farmakologiczne zahamowanie wydzielania gonadotropin z przysadki mózgowej z zastosowaniem antagonistów GnRH jakim jest cetroreliks, który wiąże się z receptorami GnRH w przysadce mózgowej. Związek ten znalazł także zastosowanie w badaniach doświadczalnych dotyczących mechanizmów hormonalnej regulacji spermatogenezy. W rozprawie doktorskiej mgr Sylwii Lustofin skuteczność ekspozycji samców szczurów na cetroreliks potwierdzono w oparciu o ocenę masy i morfologię gonad. Doktorantka przedyskutowała również fizjologiczne wydzielanie gonadotropin występuje u gryzoni o rozrodzie sezonowym. U zwierząt tych

aktywność rozrodcza zależna jest od czynników środowiskowych, z których najważniejszym jest dostępność światła (długość fotoperiodu).

Wyniki uzyskane w rozprawie doktorskiej z wykorzystaniem modeli *in vivo* oraz w układzie *in vitro* dowiodły, że sygnalizacja FSH bierze udział w regulacji szlaku Notch w komórkach Sertoliego gryzoni.

Badania dotyczące roli sygnalizacji estrogenowej w kontroli aktywności szlaku Notch zostały przeprowadzone z wykorzystaniem modeli *ex vivo* oraz *in vitro*. Zastosowanie modelu *ex vivo*, jaki stanowią hodowle narządowe, pozwala na poznanie molekularnych aspektów funkcjonowania komórek gonady męskiej z zachowaniem struktury tego narządu, ale z wyłączeniem wpływu czynników pozagonadalnych, w tym hormonów osi podwzgórze-przysadka-jądro. Uzyskane w przedstawionej pracy wyniki dowiodły po raz pierwszy, że sygnalizacja estrogenowa zaangażowana jest w kontrolę ekspresji ligandów, receptorów oraz genów efektorowych szlaku Notch w komórkach Sertoliego. Doktorantka bardzo ciekawie podjęła próbę interpretacji uzyskanych wyników, umiejętnie porównując je z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Rozdział ten napisała czytelnie i merytorycznie. W sposób rzeczowy omówiła i przedyskutowała wyniki swoich badań i uzasadniła potrzebę ich przeprowadzenia i dalszej kontynuacji.

Na podstawie uzyskanych wyników swoich badań Doktorantka sformułowała 5 dobrze uzasadnionych i rozbudowanych wniosków. Są one odpowiedzią na pytania postawione w celach pracy.

Do rozprawy doktorskiej nie wnoszę zastrzeżeń merytorycznych. Drobną uwagę recenzenta dotyczy podpisu pod rycinami: 9, 10 i 11. Zdaniem recenzenta w podpisie pod ryciną powinny się znaleźć objaśnienia skrótów. Natomiast na rycinie 11 oraz w podpisie pod tą ryciną powinny być wszystkie słowa w języku polskim. Brak jest również w rozprawie spisu, rycin, tabel i tablic. Przedstawione w recenzji uwagi dotyczą szczegółów i nie mają wpływu na bardzo dobrą ocenę pracy.

W podsumowaniu stwierdzam, że praca stanowi oryginalny dorobek Doktorantki. Dotyczy ona ważnych zagadnień związanych z rolą hormonu folikulotropowego i estrogenów w kontroli sygnalizacji Notch w komórkach Sertoliego gryzoni. Zastosowanie różnorodnych technik badawczych i umiejętność interpretacji uzyskanych wyników dowodzi o dojrzałości

naukowej Autorki rozprawy. Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Sylwii Lustofin, którą oceniam bardzo dobrze, napisana jest poprawnym językiem polskim i wskazuje na dużą wiedzę Doktorantki w zakresie przeprowadzonych badań.

Po zapoznaniu się z rozprawą doktorską mgr Sylwii Lustofin 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 2018r. poz.1668 z późn. zm.) Dlatego zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Sylwii Lustofin do dalszych etapów przewodu doktorskiego i nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Wnioskuje również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej, ze względu na jej wysoki poziom merytoryczny, oryginalność uzyskanych wyników oraz włożony ogrom pracy, jak również dlatego, że część wyników badań zaprezentowanych w niniejszej pracy doktorskiej została już opublikowana w 2 czasopismach naukowych indeksowanych w bazie Journal Citation Reports, w których Doktorantka jest pierwszym autorem: *Reproduction, Fertility and Development* 2022, 34: 560–575.(IF: 1,973) i *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23: 2284. (IF: 6,208).

Prof. dr hab. n. med. Maria Laszczyńska

