



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

dr hab. n. med. Agnieszka Kolasa

Szczecin 07.09.2023

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii PUM

Wydział Medycyny i Stomatologii

al. Powstańców Wlkp. 72

70-111 Szczecin

tel. + 48 91 466 16 77/1680

agnieszka.kolasa@pum.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pana mgr Michała Dulibana

pt. „*Genetyczna i epigenetyczna regulacja funkcji komórek jądra z udziałem estrogenów*”

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Michała Dulibana zatytułowana „*Genetyczna i epigenetyczna regulacja funkcji komórek jądra z udziałem estrogenów*” została wykonana w Zakładzie Endokrynologii, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych, na Wydziale Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod opieką Promotora naukowego, Pani prof. dr hab. Małgorzaty Kotuli-Balak. Badania do pracy doktorskiej były realizowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki, OPUS 12 (2016/23/B/NZ4/01788) w projekcie pt.: „Sygnalizacja estrogenowa w gonadzie męskiej ssaków w rozwoju postnatalnym. Badanie molekularnych mechanizmów kontrolujących funkcjonowanie komórek Leydiga”, którego kierownikiem była Pani prof. Barbara Bilińska.

Podstawą ocenianej dysertacji jest spójny tematycznie cykl czterech, oryginalnych publikacji naukowych oraz poprzedzające je polskojęzyczne opracowanie. Przedstawione do oceny publikacje naukowe, wymienione poniżej, ukazały się w latach 2020-2023 w recenzowanych, międzynarodowych czasopiśmie, indeksowanych w bazie JCR (*Journal Citation Reports*) oraz umieszczonych w wykazie czasopism naukowych MEiN:

1). Duliban M, Gurgul A, Szmatoła T, Pawlicki P, Milon A, Arent ZJ, Grzmil P, Kotula-Balak M, Bilinska B: *Mouse testicular transcriptome after modulation of non-canonical oestrogen receptor activity*. *Reprod, Fertil and Develop*, 2020, 23:903-913 (IF =1,723; pkt. MEiN=140)

2). Duliban M, Pawlicki P, Gurgul A, Tuz R, Arent ZJ, Kotula-Balak M, Tarasiuk K: *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, 11:2868 (IF =2,752; pkt. MEiN=100)

3). Kotula-Balak M, Duliban M, Gurgul A, Krakowska I, Grzmił P, Bilinska B, Wolski JK: *Transcriptome analysis of human Leydig cell tumours reveals potential mechanisms underlying its development*. *Andrologia*, 2021, 53:e14222 (IF =2,775; pkt. MEiN=70)

4). Duliban M, Pawlicki P, Kamińska A, Yurdakok-Dikmen B, Tekin K, Kotula-Balak M: *Status of estrogen receptor expression and epigenetic methylation in Leydig cells after exposure to metalloestrogen – selenium*. *Reproductive Toxicology*, 2023, 118, 108389 (IF =3,421; pkt. MEiN=70)

Łączny współczynnik oddziaływania (IF) czasopism, w których opublikowano prace będące podstawą do ubiegania się o nadanie stopnia doktora wynosi 10,671, a suma punktów MEiN to 380. Należy podkreślić, że Pan mgr Michał Duliban jest pierwszym autorem w trzech publikacjach (nr 1, 2, 4), w Publikacji nr 1, 2 i 3 ma równy wkład w powstanie opracowań z drugim współautorem, w Publikacji nr 3 jest drugim autorem i we wszystkich publikacjach jest autorem korespondencyjnym (wraz ze swoją Promotor). Zgodnie z dołączonymi do rozprawy doktorskiej oświadczeniami wszystkich współautorów publikacji, udział Doktoranta w każdej z prac był wiodący, wynosił od 50 do 65% i polegał na: planowaniu i przeprowadzeniu badań (model *in vivo*, *in vitro* i *ex vivo*, qRT-PCR, WB, ELISA, immunocytofluorescencja, sekwencjonowanie nowej generacji), opracowaniu uzyskanych wyników (analizy bioinformatyczne), przygotowaniu manuskryptów i przeprowadzeniu procesu ich publikacji. W związku z powyższym, znaczący wkład Doktoranta w powstanie każdej z publikacji nie budzi wątpliwości. Przedłożone do oceny publikacje są tematycznie spójne i skupiają się wokół wyraźnie wyodrębnionego problemu, który dotyczy określenia genetycznej i epigenetycznej regulacji estrogenowej (przy udziale różnych receptorów estrogenowych) komórek gonady niedojrzałych i dojrzałych płciowo myszy i świń oraz zdrowych i guzowych ludzkich komórek Leydiga, czy komórek Leydiga hodowanych w pożywce zawierającej różne stężenia (4 i 8 μM) seleninu sodu, który jest uważany za metalloestrogen.

Podjęta przez Doktoranta tematyka badawcza jest w pełni uzasadniona i jest kontynuacją naukowych zainteresowań Zespołu Badawczego, w którym Doktorant realizował badania do pracy doktorskiej. Odkrycie we wczesnych latach 30-tych XX wieku, obecności estrogenów w moczu ogiera zapoczątkowało rozwój badań nad wpływem estrogenów (historycznie nazywanych żeńskimi hormonami płciowymi)

na morfologię i fizjologię męskiego układu płciowego. Przełomem dla tych badań było opracowanie transgenicznych nokautów zwierzęcych. I tak, mysie samce ERKO α miały mniejsze jądra, produkowały o 10% mniej plemników i odznaczały się obniżoną płodnością, natomiast wyniki badań nad ERKO β budzą nadal pewną wątpliwość (np. czy istnienie receptora estrogenowego beta nie kompensuje braku receptora estrogenowego alfa). Dopiero podwójny nokaut (ERKO $\alpha\beta$) wykazał, że różne receptory estrogenowe pełnią odrębne funkcje w różnych układach (immunologicznym, krwionośnym, nerwowym i in.). Do prawidłowego działania hormonów konieczna jest obecność właściwego receptora w komórce docelowej. Oprócz klasycznych (jądrowych) receptorów ER α i ER β , które są czynnikami transkrypcyjnymi, występują jeszcze: błonowy receptor estrogenowy związany z białkiem G (GPER) i receptory pokrewne receptorom estrogenowym (ERR), które jak wykazano, jako czynniki transkrypcyjne mogą aktywować ekspresje genów estrogenozależnych, niezależnie od obecności liganda. Przykładowo wykazano, że GPER jest zaangażowany w proliferację komórek plemnikotwórczych, a oddziaływanie pomiędzy GPER i ER (jak wykazał Zespół Badawczy pod kierownictwem Pani prof. Małgorzaty Kotuli-Balak) jest konieczne dla prawidłowej struktury komórek Leydiga i regulacji steroidogenezy. Wśród receptorów pokrewnych receptorom estrogenowym istnieją trzy izoformy: alfa, beta i gamma. Chociaż EER α i ERR β regulują metabolizm tkanki tłuszczowej, a EER γ metabolizm oksydacyjny mitochondriów, to właśnie EER α okazał się być niezbędny dla prawidłowego rozwoju gonady męskiej w trakcie organogenezy. Dodatkowo Zespół Badawczy Zakładu Endokrynologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, udowodnił znaczącą rolę EER dla steroidogenezy komórek Leydiga oraz ich status epigenetyczny (biogeneza miRNA, metylacja DNA). Dodatkowo wspomniany Zespół Badawczy udowodnił oddziaływanie pomiędzy GPER a izoformą alfa i gamma receptora aktywowanego przez proliferatory peroksosomów (PPAR α , PPAR γ), a interakcja ta jest dodatkowym mechanizmem kontrolującym steroidogenną funkcję gonady. Ligandem dla receptorów estrogenowych, oprócz estrogenów, mogą być tzw. metaloestrogeny, w tym np. selen. Zatem regulacja fizjologii komórek gonady jest niezwykle skomplikowana i aby ją lepiej poznać konieczne jest prowadzenie badań na modelu zwierzęcym (*in vivo*, *ex vivo*), a także na zwierzęcych, czy ludzkich liniach komórkowych (*in vitro*), co pozwoli stawiać i weryfikować nowe hipotezy, które będą miały przełożenie na poprawę jakości życia i zdrowia ludzi.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Michała Dulibana wpisuje się w przedstawione powyżej zagadnienia, które są aktualne i godne uwagi.

Ze względu na fakt, że zarówno strona merytoryczna, jak i wartość naukowa przedstawionych do oceny publikacji została potwierdzona przez Recenzentów i Edytorów czasopism, którzy zaakceptowali te prace do druku, oceniam je jedynie w aspekcie poznawczym i jako wkład w rozwój dyscypliny.

Dysertację rozpoczyna Streszczenie w języku polskim i angielskim, w którym Autor zwięźle nakreślił tematykę pracy doktorskiej, omawia cele, metodykę oraz najważniejsze osiągnięcia naukowe, opublikowane w zamieszczonych artykułach. Przedstawiony na kolejnych dziesięciu stronach Wstęp, zawiera wprowadzenie do tematyki badawczej. W rozdziale tym, będącym syntetycznym przeglądem literatury, Doktorant scharakteryzował histologiczną budowę gonady męskiej oraz hormonalną regulację jej funkcji. Omówił udział estrogenów w regulacji fizjologii jądra, przytoczył badania na transgenicznym zwierzętach (ERKO α , ERKO β , ERKO $\alpha\beta$) celem wyjaśnienia, jakie znaczenie w tej regulacji mają klasyczne, jądrowe receptory estrogenowe (ER α , ER β). Następnie scharakteryzował budowę i sposób oddziaływania nieklasycznych receptorów estrogenowych, czyli GPER, EER oraz PPAR γ oraz ich rolę w kontroli steroidogenezy, która nie tylko musi być inicjowana przez estrogeny, ale również przez inne ligandy, w tym jony metali (tzw. metaloestrogeny), a najkorzystniejszy wpływ na męskie funkcje rozrodcze, jak wykazano ma selen w odpowiedniej dawce. Wstęp stanowią zwięźle i logicznie uporządkowane informacje, które płynnie wprowadzają czytelnika w tematykę artykułów prezentowanych w dalszej części pracy i uzasadniają wybór podjętych badań oraz modelu badawczego (*in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*). Prezentowane zagadnienia są poparte adekwatną literaturą. W rozdziale Cel i hipotezy badawcze zostały poprawnie i jasno sformułowane zadania badawcze, które konsekwentnie zrealizowano w podjętych pracach badawczych. Rozdział Materiał i model badawczy został podzielony na 4 podrozdziały, które opisują metodykę każdej z czterech publikacji, zabieg ten zdecydowanie ułatwia zapoznanie się z użytą metodyką i różnorodną techniką badawczą (qRT-PCR, WB, ELISA, immunocytochemia, sekwencjonowanie nowej generacji wraz z bioinformatyczną analizą danych). Ta różnorodność wykonanych analiz świadczy o opanowaniu przez Doktoranta nowoczesnego i żmudnego warsztatu badawczego. Kolejny rozdział to Kopie oryginalnych prac badawczych, które zostały przejrzyście omówione na kolejnych 10 stronach rozdziału Rezultaty i dyskusja. Dodatkowo, Doktorant zastosował tu technikę, podkreślenia kluczowych zdań, co „uwypukla” otrzymany wynik i sugeruje jego wpływ w kontrolę funkcji komórek gonady.

W rozdziale Wnioski, Autor przedstawił sześć jasno i trafnie sformułowanych wniosków:

- 1). Modulacja aktywności nieklasycznych receptorów estrogenowych powoduje zmiany transkryptyczne w komórkach jądra niedojrzałego i dojrzałego. ← tu bym dodała, w których kom. gonady i z jakiego zwierzęcia/ czy mężczyzny
 - a. Zablockowanie EER α zwiększa ekspresję genów związanych z odpowiedzią immunologiczną, co może zredukować zdolność plemników do zapłodnienia.
 - b. Aktywacja ERR β /EER γ zwiększa ekspresję genów zaangażowanych w modyfikację (tu bym dodała – potranslacyjną) białek.
- 2). PPAR γ pełni nadrzędną rolę w gonadzie niedojrzałej i moduluje ekspresję genów związanych z metabolizmem (tu bym dodała – cukrów i aminokwasów), adhezją komórek i formowaniem kanalików.
 - a. Natomiast w tym okresie rozwojowym PPAR γ nie reguluje metabolizmu lipidów.
- 3). Zablockowanie GPER wpływa na zmianę ekspresji pojedynczych genów, w szczególności związanych ze stabilnością białek.
 - a. Co potwierdza, że transdukcja sygnału za pośrednictwem GPER odbywa się głównie na drodze niegenomowej.
- 4). W transkryptomie ludzkich guzów komórek Leydiga zaburzona jest ekspresja genów zaangażowanych w sygnalizację estrogenową oraz procesy apoptozy, rozwój naczyń krwionośnych i genów kodujących białka szoku cieplnego.
- 5). Nadmierna ekspozycja komórek Leydiga na metaloestrogen (tu bym dodała – selenin sodu) powoduje zmiany epigenetyczne (metylacja ← tu bym dodała DNA) w komórce oraz doprowadza do pęknięć podwójnej nici DNA.
 - a. Co może wzmacniać dalszy rozwój nowotworu.
 - b. Możliwe też, że zaindukowane zmiany w niedojrzałych funkcjonalnie komórkach Leydiga mogą manifestować się w wyraźny sposób na dalszych etapach rozwojowych.
- 6). Dodatkowo selen w odpowiedniej dawce (tu bym dodała – 4 μ M) pozytywnie wpływa na komórki Leydiga (rezerwy lipidów, sekrecję testosteronu i estradiolu).
 - a. Co sugeruje korzystny wpływ selenu na produkcję hormonów steroidowych. (ta informacja powinna być ujęta również w streszczeniu odpowiedniej publikacji)

Powyższe wnioski w jednoznaczny sposób pokazują na zrealizowanie postawionych celów pracy i stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę. Kolejne rozdziały: Finansowanie badań, Oświadczenia współautorów są

napisane w sposób prawidłowy dla tego typu prac naukowych. Rozdział Bibliografia zawiera 122 dobrze dobranych i aktualnych pozycji literaturowych.

SUGESTIE, UWAGI I PYTANIA

Po analizie ocenianej rozprawy doktorskiej nasunęły mi się następujące uwagi, sugestie i pytania:

Streszczenie:

- zarówno w języku polskim, jak i angielskim są one zbyt lakoniczne, i Autor używa za wielu skrótów myślowych:
 - przykładowo: str. 4, końcówka akapitu drugiego – powinno być podane w jakich stężeniach użyto selenin sodu; str. 5: powinno być dopisane, które hormony metodą ELISA były zbadane; kolejny akapit: powinno być napisane w komórkach jądra których myszy (szczep C57/BL/6) były zmienione transkryptomy,
 - informacje z Publikacji nr 2: powinno być dopisane, że badania były na niedojrzałych świniach, a zmiany w metabolizmie dotyczyły metabolizmu białek i aminokwasów, a nie lipidów,
 - informacje z Publikacji nr 3: powinno być również dopisane, że zmiany w transkryptomie zdrowych i guzowych ludzkich komórek Leydiga dotyczą również genów odpowiedzi na bodźce temperaturowe i w tym miejscu powinien być nawias z (Publikacją nr 3), bowiem kolejne informacje dotyczące zaburzonej ekspresji genów w transkryptomie komórek Leydiga, mysiej linii MA-10 traktowanej selenem dotyczą Publikacji nr 4,
 - informacje z Publikacji nr 4: dopisałabym również, że (...) selen-selenin sodu (...) oddziałuje na ekspresję GPER, ale nie na ER α i ER β (...) oraz dopisałabym również o zmianach poziomu testosteronu i progesteronu w medium z dodatkiem niskiego stężenia selenu,
 - w ostatnim akapicie w podsumowaniu ..."Metyloestrogeny oddziałują na epigenom i modułują ekspresję klasycznych (?) (...) receptorów estrogenowych – z Publikacji nr 4, Fig. 2. wynika, że nie ma istotnie statystycznych zmian w ekspresji ER α i ER β .

Wstęp:

- pierwszy paragraf – brak przypisów literaturowych,
- komórki nerwowe w interstycjum jądra? Jaka rolę one tu pełnią i czy rzeczywiście tu są?,
- w niektórych zdaniach zamiast średników sugerowałabym użycie przecinków (np. str. 18, 20),

- w nawiasach zawierających cytowaną literaturę, jej układ powinien być chronologiczny a nie alfabetyczny (np. str. 22), dodatkowo w przypisach cytowanej literatury powinny być one ujednoczone i podane powinno być tylko jedno nazwisko, a mianowicie pierwszego autora (np. str. 21, 73-75, 78) – dotyczy również rozdziału: Rezultaty i dyskusja
- inne drobne błędy: brak spacji, przecinków, nieodpowiedni wybór znaków interpunkcyjnych, pojedyncze błędy ortograficzne (np. str. 23).

Materiał i model badawczy:

Model badawczy:

Publikacja nr 1:

- powinno być podane piśmiennictwo, z którego zostały wzięte dawki antagonistów/ agonistów,
- powinien zostać podany producent DMSO,
- powinny zostać podane dane ile zwierząt było nastrzykiwanych antagonistą, a ile agonistą.

Publikacja nr 2:

- powinno być podane piśmiennictwo, z którego zostały wzięte stężenia użytych związków.

Publikacja nr 3: w tytule in vivo/in vitro powinno być napisane kursywą

Publikacja nr 4:

- w pierwszym zdaniu powinna być informacja, że chodzi o kom. Leydiga, linii MA-10
- drobne błędy stylistyczne, moim zdaniem lepiej brzmiałoby: „Po upływie 24h godzin, materiał zebrano i wykonano analizy ekspresji genów (dodałabym jaką technikę, czyli qRT-PCR?), lokalizacji białka (technikę IHC?), ekstrakcji białka (technikę ELISA?)

Techniki badawcze:

- podana w nawiasie Publikacja 4, powinna być ‘wybaldowana’ (dotyczy to również rozdziału: Rezultaty i dyskusja),
- brak kraju producenta aparatu do RT-PCR.

Rezultaty i dyskusja:

- drobne błędy interpunkcyjne,
- zamiast gonady męskiej myszy, proponuję używanie - gonady samca myszy,

- brak w wykazie Piśmiennictwa pozycji: EGW 2019, str. 79,
- str 79, trzeci akapit, „W Komórkach traktowanych selenem (...), nie odnotowano istotnych statystycznie zmian w ekspresji ER α .” – czy tylko alfa?, czy nie powinno być napisane, że również ER β ? – w oryginalnym Opracowaniu nr 4, na zdjęciu 2 jest wykres pokazujący to,
- Proszę o wyjaśnienie co Doktorant miał na myśli:
 - str 74, „Jak wykazała analiza funkcjonalna (czyli jaka?), białka kodowane przez te geny...”
 - str 77, „W wyniku analizy funkcjonalnej wyodrębnione zostały...” czym jest ta analiza funkcjonalna?
 - str 76, „Brak statystycznie istotnego wyniku dla grup traktowanych PPAR α i GPER sugeruje, że na tym etapie rozwojowym wymienione receptory pełnią mniej istotną rolę lub precyzyjnie oddziałują na ekspresję wybranych genów.”?
 - str 77, „Wymienione powyżej procesy są intensywnie badane w innych typach nowotworów”, czy mógłby Pan podać przykłady nowotworów?

Finansowanie badań:

- podane jest tylko jedno źródło finansowania OPUS 12 2016/23/B/NZ4/01788, natomiast wczytując się w oryginalne publikacje, będące podstawą tej dysertacji można odczytać, że badania były również finansowane z innych grantów NCN (Sonata Bis 5) oraz z dotacji Ministerstwa Edukacji i Nauki.

Oświadczenia współautorów:

- sumując procentowy współudział autorów w powstaniu publikacji wynika, że dla Publikacji nr 3 wynosi on 110%, a dla Publikacji nr 4 tylko 90%.
- dodatkowo wg. tych oświadczeń wkład Pana mgr Michała Dulibana to: 50%, 55%, 65% i 55%. Jednak moim zdaniem, w Publikacji nr 1 ten wkład powinien wynosić po 30% dla dwóch pierwszych autorów, w Publikacji nr 2 po 35%, a w Publikacji nr 3 po 37,5% bowiem w oryginalnych przedłożonych publikacjach jest zapis o „*equal contribution*” dwóch pierwszych autorów.

Powyższe drobne niedociągnięcia nie umniejszają w żaden sposób naukowej wartości recenzowanej dysertacji. Podsumowując, pragnę podkreślić, że Doktorant znakomicie wywiązał się ze wszystkich zadań, jakie zostały postawione w celach pracy, a otrzymane wyniki są oryginalne i interesujące. Rozprawę Pana Michała Dulibana oceniam bardzo wysoko. Stanowi ona oryginalne, interesujące i kompleksowe opracowanie, dostarczające nowych informacji na temat regulacji

funkcji gonady męskiej na drodze transdukcji sygnału poprzez różne (klasyczne i nieklasyczne) receptory estrogenowe. Podjęta tematyka jest aktualna i nowatorska, a uzyskane wyniki wzbogacają w znaczący sposób dotychczasową wiedzę z zakresu biologii rozrodu. Uzyskane wyniki badań stanowią nie tylko wartość poznawczą, ale mogą również stanowić podstawę do planowania i prowadzenia kolejnych interesujących eksperymentów. Należy podkreślić, że przeprowadzone badania wymagały od Doktoranta dużego zaangażowania i zastosowania złożonych, czasochłonnych procedur doświadczalnych, jak również wymagały szerokiej wiedzy z zakresu tematyki prowadzonych badań.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) stawiane kandydatom ubiegającym się o uzyskanie stopnia naukowego doktora. W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pan mgr Michała Dulibana do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

ADIUNKT
Katedry i Zakładu Histologii
i Embriologii PUM
Kolasa
dr hab. n. med. Agnieszka Kolasa

Dr hab. n. med. Agnieszka Kolasa