

Olsztyn, 2009-05-04

Prof. dr hab. Jadwiga Przała
Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii UWM
w Olsztynie

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Anny Michaluk
pt. „Stabilność i aktywność fizjologiczna cząsteczki gonadoliberyny po jej
skompleksowaniu z jonem miedzi”.**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Anny Michaluk została wykonana w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk, pod kierunkiem naukowym Pani dr hab. Aliny Gajewskiej.

Rozprawa dotyczy bardzo ważnego i aktualnego zagadnienia modyfikacji neurohormonu podwzgórzowego gonadoliberyny (GnRH). Analogi GnRH o przedłużonym działaniu są stosowane w terapii pacjentów chorych na nowotwory hormono-zależne: jajnika, trzonu macicy, sutka, prostaty oraz łagodnych guzów macicy. Badany przez Doktorantkę kompleks Cu-GnRH jest przykładem analogu GnRH, w którym nie została zmieniona sekwencja aminokwasów w cząsteczce, tak jak często ma to miejsce w preparatach komercyjnych. W badanym preparacie został tylko przyłączony jon miedzi do aminokwasu histydyny.

Kompleks Cu-GnRH został zsyntetyzowany kilkanaście lat temu, następnie badano jego wpływ na indukcję owulacji, sekrecję gonadotropin – LH i FSH oraz interakcje z receptorem. Dużo informacji o cząsteczce Cu-GnRH dostarczyły prace Pana prof. dr hab. Kazimierza Kochmana i zespołów z Nim współpracujących. Pewne zagadnienia wymagały jednak dalszych szczegółowych badań i podjęła je Pani mgr Anna Michaluk, stawiając sobie za cel określenie: stabilności kompleksu Cu-GnRH, tempa enzymatycznej degradacji, enzymów proteolitycznych zaangażowanych w degradację, profilu aminokwasów produktów degradacji oraz ścieżek transdukcji sygnału po związaniu liganda z receptorem.

Przedstawiona do oceny rozprawa jest właśnie przykładem poszukiwań mających na celu wyjaśnienie powyższych zagadnień, należy dodać, poszukiwań udanych.

Formalna ocena pracy doktorskiej

Oceniana praca jest napisana w klasycznym dla tego typu prac układzie. Wydruk komputerowy liczy 116 stron, został podzielony na rozdziały w tym jednostronicowe streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis rysunków i tabel – pięć stron. We **Wstępie** (15 stron) Autorka przedstawiła niezbędne dla zrozumienia pracy zagadnienia, w tym rolę miedzi w metabolizmie komórki i procesach rozrodu samic oraz szlaki sygnalizacji po aktywacji receptora GnRH w komórkach gonadotropowych. Ta część pracy jest ilustrowana pięcioma bardzo starannie wykonanymi rysunkami. Wstęp kończy podrozdział **Hipoteza badawcza i cel naukowy pracy**, w którym autorka przedstawiła zadania do realizacji. Rozdział **Materiał i metody** zawarty jest na 18 stronach w tym jedenaście rysunków i cztery tabele. Autorka przedstawiła materiał doświadczalny oraz metody: hodowli komórek pierwotnych przysadki, radioimmunologiczną, chromatografię jonowymiennej i chromatografię cieczowej z odwróconymi fazami. Każda z metod stosowanych w pracy została wyczerpująco i jasno opisana, ponadto zawiera informacje dotyczące stosowanych kontroli i liczby powtórzeń. Rozdział **Wyniki** zajmuje 33 strony w tym 43 rysunki i 2 tabele. Rysunki i tabele są bardzo staranne i przejrzyste, a uzyskane wyniki dokładnie opisane. Rozdział ten podobnie jak poprzedni w czytelny sposób prowadzi przez cały szereg uporządkowanych danych.

W dalszej części pracy uzyskane wyniki zostały przedyskutowane w rozdziale **Dyskusja**. Rozdział ten obejmuje 18 stron, zawiera szczegółową interpretację uzyskanych wyników i pokazuje, że Doktorantka jest bardzo dobrze zorientowana w omawianej problematyce. W mojej opinii dyskusja jest bardzo mocną stroną przedstawionej pracy.

Merytoryczna ocena pracy doktorskiej

Doktorantka stosując odpowiednio dobrane metody wykazała, że przyłączenie jonu miedzi do histydyny w cząsteczce GnRH zmniejsza tempo degradacji proteolitycznej kompleksu Cu-GnRH przez enzymy podwzgórza i przysadki. Stwierdziła, że enzymy

zaangażowane w degradację GnRH i Cu-GnRH występują głównie we frakcji cytozolowej. Zaobserwowała całkowitą odporność kompleksu Cu-GnRH na działanie enzymu aminopeptydazy piroglutaminowej, który jest aktywny podczas degradacji cząsteczki natywnej.

Wykazała, że kompleks Cu-GnRH aktywuje klasyczny dla receptora GnRH szlak IP_3 /PKC oraz cGMP/PKG w komórkach przysadki szczura i dodatkowo szlak cAMP/PKA. Stosując selektywne inhibitory kinaz białkowych A i C zaobserwowała, że w komórkach przysadki ma miejsce *cross-talk* między szlakami IP_3 /PKC a cGMP/PKG oraz szlakiem cAMP/PKA a cGMP/PKG, gdyż zahamowanie aktywności odpowiedniej kinazy białkowej C lub A blokowało syntezę cGMP.

Na podkreślenie zasługuje oszczędne gospodarowanie wnioskami, Doktorantka oparła się pokusie mnożenia ich i wprowadziła **Podsumowanie wyników**. Jest to bardzo dobry pomysł tylko lepiej żeby był po wynikach a nie dyskusji.

Oceniana rozprawa dostarcza nowych danych, które wzbogacają już istniejącą wiedzę z zakresu endokrynologii, a szczególnie metabolizmu Cu-GnRH i aktywacji przez tą cząsteczkę dróg sygnalizacji wewnątrzkomórkowej.

Uwagi

Z obowiązku recenzenta pragnę Autorce zwrócić uwagę na pewne uchybienia i przekłamania komputerowe:

1. zamiast „uwalniająca aktywność kompleksu” – str. 8
lepiej brzmi „*aktywność uwalnianego kompleksu*”
2. po „skompleksowaniu z jonem miedzi” – str. 8
osobiście preferuję zapis „*po połączeniu z jonem miedzi*”
3. dwa ostatnie zdania na str. 11 są niepełne.
4. przedostatnie zdanie przed akapitem na str. 13 jest błędne, powinno być „*na jakie działa GnRH*”, a nie „na jakie działa receptor”
5. w rozdziale Materiały i metody stosowano potoczne zwroty laboratoryjne np. zalewają, zalano, wyhodowane, aminokwasy upochodniano, nieskompleksowany GnRH itp.

6. w rozdziale Wyniki, ostatnie zdanie na str. 60 oraz pierwsze zdanie na str. 62 są niepoprawne stylistycznie.
7. Uważam za zbędne podawanie na końcu pracy spisu rysunków i tabel, to tylko pomnaża strony. Z kolei streszczenie w języku polskim i angielski umieściłabym na początku.

Przedstawione powyżej uwagi/sugestie nie pomniejszają wysokiej merytorycznej wartości pracy a mogą być przydatne przy przygotowaniu pracy do druku.

Podsumowanie

Rozprawę doktorską mgr Anny Michaluk oceniam wysoko, ponieważ poświęcona jest bardzo ważnemu i aktualnemu zagadnieniu, wnosi do nauki nowe informacje o związku, który może być wykorzystany w celach praktycznych. Autorka wykazała się bardzo dobrym opanowaniem nowoczesnego warsztatu badawczego, jakością i sposobem prezentacji uzyskanych wyników, ostrożnością i krytycyzmem w prowadzeniu dyskusji.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Anny Michaluk pt. **„Stabilność i aktywność fizjologiczna cząsteczki gonadoliberyny po jej skompleksowaniu z jonem miedzi”** spełnia wymogi stawiane przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dziennik Ustaw na str. 65 pozycja 595 z 2003 roku) i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonnej o dopuszczenie Pani Anny Michaluk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc powyższe pod uwagę proszę Wysoką Radę o rozważenie możliwości wyróżnienia pracy stosowną nagrodą.

