

Prof.dr hab. Krystyna Pierzchała-Koziec
Katedra Fizjologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy
Kraków

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Michaluk
pt. „Stabilność i aktywność fizjologiczna cząsteczki gonadoliberyny po
jej skompleksowaniu z jonem miedzi ” wykonanej w Instytucie Fizjologii i
Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w
Jabłonie pod kierunkiem Pani Doc. dr hab. Aliny Gajewskiej

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera 116 stron maszynopisu, 60 rysunków, 6 tabel i 290 cytowanych naukowych publikacji, z których prawie 50% napisane zostało w ostatnich 8 latach, a ich wybór był przemyślany i świadczący o wszechstronnej znajomości badanej problematyki oraz ogólnej wiedzy fizjologicznej Doktorantki.

Praca jest przygotowana według obowiązujących zasad dla tego typu rozpraw i składa się z rozdziałów: Wstęp, Hipoteza badawcza i cel naukowy pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie wyników, Wnioski, Literatura. Ponadto, do pracy dołączono spisy rysunków i tabel, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz objaśnienia skrótów.

We wstępie liczącym 15 stron Autorka najpierw obszernie omawia rolę miedzi w organizmie, metabolizmie komórki ze szczególnym uwzględnieniem specyficznych enzymów i białek transportujących ten mikroelement. W drugiej części Wstępu Pani mgr inż. Anna Michaluk przedstawia wyniki badań innych autorów, także pochodzących z macierzystej jednostki, dotyczących udziału miedzi i jej kompleksów z GnRH w regulacji procesu rozrodu samic. W ostatnim podrozdziale Wstępu Autorka opisała efekty aktywacji receptora GnRH i przebieg wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnału do układów efektorowych: kinaz białkowych, cAMP, cGMP oraz IP₃.

Proces aktywności szlaków sygnałowych wewnątrz komórki po pobudzenia receptora jest niezwykle skomplikowany, a w przypadku zsyntetyzowanych ligandów może przebiegać odmiennie niż w przypadku natywnych cząsteczek. Pomimo wielu lat badań nad różnorodnymi związkami imitującymi działanie gonadoliberyny nie ma jednoznacznych danych charakteryzujących wszechstronnie efekty przez nie wywierane. Dodatkowych kłopotów przysparzają publikacje zamieszczające wyniki, które niezaprzeczalnie mogą być interesujące, aczkolwiek trudne bądź nawet niemożliwe do

prawidłowej interpretacji. Wynika to przede wszystkim z mało precyzyjnych metodyk, braku właściwych prób kontrolnych lub stosowania różnych gatunków zwierząt jako modeli eksperymentalnych.

Dlatego też uważam za interesujące podjęcie badań nad określeniem nie tylko stabilności zsyntetyzowanego kompleksu Cu-GnRH, ale także jego fizjologicznego oddziaływania na receptory w komórkach przysadki. Warte podkreślenia jest także to, że obecna rozprawa doktorska stanowi kolejny etap badań zapoczątkowanych przez Pana Profesora Kochmana i kontynuowanych przez Panią Doc. dr hab. Alinę Gajewską, Promotora pracy. Analizując kolejne osiągnięcia Zespołu można prześledzić wzbogacanie badań o nowoczesne metody biochemiczne, a co za tym idzie ugruntowanie unikatowej fizjologicznej szkoły naukowej.

Pani Michaluk poczyniła słuszne założenie, że przyłączenie miedzi w odpowiednim miejscu peptydu zmieni konformację cząsteczki i musi wpłynąć na aktywność receptora i pobudzenie szlaków sygnalizacyjnych w komórce. Stabilność takiego kompleksu mogłaby być w centrum zainteresowania nie tylko naukowców badających regulację osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadowej, ale także i firm farmaceutycznych wciąż poszukujących lepszych preparatów GnRH do stosowania w osteoporozie, menopauzie, chorobach neurologicznych czy nowotworowych.

Opierając się na wynikach innych autorów i swoich własnych Doktorantka postawiła dwie hipotezy badawcze dotyczące: 1. zwiększenia stabilności zmodyfikowanej cząsteczki GnRH na skutek zmiany jej konformacji; 2. wpływu zmienionej konformacji kompleksu Cu-GnRH na rodzaj aktywowanych dróg transdukcji sygnału w komórkach gonadotropowych. Autorka nakreśliła także niezbędne dla weryfikacji hipotez zadania badawcze, które można podzielić na 4 grupy:

1. określenie stopnia degradacji GnRH i jego kompleksu miedziowego w podwzgórz i przysadce w warunkach *in vitro* oraz scharakteryzowanie enzymów i składu aminokwasowego produktów rozpadu badanych związków;

2. porównanie wpływu GnRH i Cu-GnRH na aktywność szlaków IP_3 /PKC i cAMP/PKA w komórkach przysadki w warunkach podstawowych i w obecności inhibitorów kinaz białkowych A lub C;

3. określenie aktywności szlaku cGMP/PKG w przysadce po inkubacji z GnRH i jego miedziowym kompleksem oraz po zahamowaniu szlaków IP_3 /PKC i cAMP/PKA;

4. porównanie stopnia uwalniania LH z komórek traktowanych GnRH lub Cu-GnRH przed i po działaniu inhibitorów kinaz białkowych A i C.

Materiały i metody opisano na 18 stronach wzbogacając je zdjęciami hodowli komórek przysadki, rysunkami krzywych standardowych, chromatogramami oraz tabelami przedstawiającymi schemat doświadczeń.

Doświadczenia zostały przeprowadzone w warunkach *in vitro* na przysadkach samic szczura oraz podwzgórzach i przysadkach samców szczura. Tkanki samców posłużyły do sporządzenia preparatów cytozolu i frakcji błonowej używanych w dalszych doświadczeniach. Komórki przysadek samic (5×10^5 /ml) utrzymywano w hodowli pierwotnej przez 72 godziny, a następnie traktowano GnRH lub jego miedziowym kompleksem w obecności inhibitorów kinaz, bacytracyny lub bez czynników hamujących enzymy przez 30 minut, 3 i 5 godzin.

Doktorantka wykonała doświadczenia umożliwiające ocenę degradacji GnRH i Cu-GnRH przez enzymy cytozolu i frakcji błonowej podwzgórza i przysadki, identyfikację aminokwasów w produktach degradacji, aktywność trzech szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, wpływu inhibitorów kinaz A i C na stężenie wybranych wskaźników w przysadce oraz określiła ilość uwolnionego LH z komórek przysadki.

Pani mgr inż. Michaluk zastosowała nowoczesne metody badawcze: hodowli komórek, krótkotrwałej inkubacji, chromatografię jonowymienną, radioimmunologiczne, znakowania izotopem jodu, chromatografię kolumnową chromatografię cieczową z odwróconymi fazami, HPLC. Wyniki poddano analizie statystycznej używając pakietu Statistica oraz testów-U Mann'a-Whitney'a i Wilcoxon.

Wyniki zostały przedstawione w dwóch tabelach oraz na 43 wykresach poprzedzonych zwięzłym opisem badanych zmian zachodzących podczas inkubacji komórek z GnRH lub Cu-GnRH.

Dynamikę degradacji GnRH i Cu-GnRH przedstawiono jako stężenie związku w $\mu\text{g}/550\mu\text{l}$, natomiast zmiany pozostałych badanych parametrów określano w stosunku do kontroli przyjętej za 100%.

Ten rozdział przysporzył Doktorantce sporo trudu ze względu na mnogość wyników i wielokierunkowość zmian badanych parametrów, których przyczyny mogły mieć różne źródła. Uważam, że pomimo tych trudności Autorka usystematyzowała dane i przedstawiła je obiektywnie. Należy podkreślić dobrą dokumentację wyników i przejrzyste wykresy.

Otrzymane wyniki Doktorantka dyskutuje na 18 stronach wykazując dogłębną wiedzę z zakresu fizjologii, biochemii i endokrynologii. Należy tutaj podkreślić, iż część otrzymanych wyników była obserwowana przez Autorkę po raz pierwszy. Było to duże utrudnienie dla Doktorantki, która nie mogła swojej interpretacji w pełni porównać z oceną innych autorów. Należy podkreślić, iż Doktorantka odważnie broni swoich wyników logicznie je argumentując, ale także wykazując potrzebę pełniejszych badań, których wyniki mogłyby potwierdzić tezę o większej stabilności kompleksu. Pomimo tych trudności Pani mgr inż. Michaluk omówiła wszystkie uzyskane wyniki i starała się je usystematyzować podkreślając znaczenie zmiany konformacji GnRH po połączeniu z miedzią i jej wpływ na fizjologiczną aktywność kompleksu.

Autorka podsumowała pracę w 12 punktach ukazujących wyniki z kolejnych doświadczeń nad stabilnością kompleksu miedziowego, rodzajem enzymów proteolitycznych i ich pochodzeniem, aktywacją i interakcją trzech badanych szlaków transdukcji sygnału wewnątrz komórki.

Pani mgr inż. Anna Michaluk wysnuła trzy wnioski, z których za najważniejszy uważam pierwszy dotyczący oporności kompleksu miedziowego GnRH na działanie enzymów.

Biorąc pod uwagę postawione hipotezy i uzyskane wyniki za najważniejsze osiągnięcia tej pracy uważam:

1. Kompleksowe opracowanie metodyki badającej stabilność i fizjologiczną aktywność kompleksu miedziowego GnRH w warunkach *in vitro*.
2. Jednoczesne pomiary stabilności kompleksu Cu-GnRH metodą radioimmunologiczną i chromatografii wysokociśnieniowej.
3. Wykazanie interakcji szlaków IP_3 /PKC i cAMP/PKA ze szlakiem cGMP/PKG w komórkach przysadki .
4. Stwierdzenie odmienności w aktywowaniu szlaku cAMP/PKA przez Cu-GnRH i GnRH.

UWAGI

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę Autorki na kilka spraw:

1. Nieprecyzyjny jest opis ilości użytych szczurów samców w doświadczeniu.
2. Synteza kompleksu Cu-GnRH nie była celem badawczym rozprawy doktorskiej, tym bardziej, że wykonano go poza macierzystą Jednostką.
3. Niedokładny jest opis metody oznaczania frakcji inozytoli.
4. Opisy rysunków 4-10 i 4-11 są mylące dla czytelnika.
5. Wniosek trzeci jest oparty na logicznym następstwie modyfikacji aktywności receptora GnRH przez Cu-GnRH co zostało zapisane we wniosku drugim i w związku z tym nie powinien być w takiej formie zapisany jako oddzielny punkt.
6. Listę nielicznych błędów literowych i stylistycznych przekażę Autorce przed skierowaniem pracy do druku.

PODSUMOWANIE

Podsumowując ocenę pracy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Michaluk stwierdzam, że rozprawa ta jest oryginalną, samodzielną, nowatorską, o dużej wartości poznawczej pozycją w literaturze. Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską oceniam jako przydatną dla badaczy zajmujących się problematyką

procesów zachodzących podczas przekazywania sygnału z receptora do wnętrza komórki i aktywność szlaków sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Uwagi, które umieściłam w recenzji wynikały z obowiązku recenzenta, nie umniejszają one mojej wysoce pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej.

Uważam, że oceniana praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie nr 595 o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych oraz Tytule i Stopniach Naukowych w Dziedzinie Sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U.Nr 65 z dnia 14.04.2003r.) wraz z późniejszymi zmianami.

Dlatego też zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jabłonie z prośbą o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Michaluk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę trudności, które musiała przezwyciężać Doktorantka decydując się na podjęcie żmudnych i pracochłonnych badań oraz problemy, z którymi zetknęła się przy interpretacji wyników wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jabłonie o uznanie ocenianego dzieła za wyróżniającą się rozprawę doktorską.

Urszula Ploniec

Kraków 5.05.2008r.