

Prof. dr hab. Stanisław Okrasa
Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
UWM w Olsztynie
10-718 Olsztyn
ul. Oczapowskiego 1A

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Kotarby

pt.: "Ośrodkowy wpływ kompleksu Cu-gonadoliberyna na aktywność transkrypcyjną wybranych genów sieci gonadotropowej w przednim płacie przysadki samicy szczura"

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona do oceny praca została wykonana w Zakładzie Neuroendokrynologii Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonie, pod kierunkiem dr hab. Aliny Gajewskiej. Opracowanie to obejmuje 103 strony maszynopisu, 45 rycin i 5 tabel. Praca zawiera typowe dla rozprawy doktorskiej rozdziały, opracowane z zachowaniem właściwych wzajemnych proporcji. Pracę rozpoczyna wstęp, przedstawiający aktualny stan wiedzy w zakresie podjętego tematu badawczego, po którym przedstawiono hipotezę badawczą i cel naukowy pracy. W kolejnych rozdziałach opisano stosowane materiały i metody badawcze oraz uzyskane wyniki, a następnie przedstawiono dyskusję dotyczącą uzyskanych wyników, podsumowanie i wnioski oraz wykaz cytowanego piśmiennictwa, obejmujący 193 pozycje. Praca zawiera także spis treści, tabel i rysunków oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Oceniana rozprawa doktorska w znacznej mierze dotyczy molekularnych aspektów oddziaływania kompleksu Cu-gonadoliberyna (Cu-GnRH) na komórki gonadotropowe u samic szczura. Wcześniejsze badania m.in. wykazały, że kompleks ten – w porównaniu do naturalnego GnRH – charakteryzuje wyższe powinowactwo do receptora GnRH i mniejsza podatność na działanie podwzgórzowych i przysadkowych enzymów proteolitycznych, a w komórkach przedniego płata przysadki aktywuje on szlak cAMP/PKA i skuteczniej stymuluje uwalnianie LH i FSH w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Kompleks Cu-GnRH jest uzyskiwany w drodze laboratoryjnej syntezy chemicznej, a możliwość jego wytwarzania w warunkach *in vivo* nie została do tej pory rozstrzygnięta. Badania podjęte w ocenianej pracy doktorskiej stanowią w pełni uzasadnioną próbę głębszego poznania mechanizmu działania powyższego kompleksu na komórki przedniego płata przysadki m.in. z uwzględnieniem możliwości jego oddziaływania na aktywność transkrypcyjną wybranych genów sieci gonadotropowej.

We *Wstępie* pracy, który jest napisany bardzo zwięźle, Autor szczegółowo opisuje sposób działania gonadoliberyny (GnRH) i polipeptydu aktywującego przysadkową cyklazę adenylanową (PACAP; *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*) na komórki gonadotropowe, zwracając szczególną uwagę na geny „podpisu gonadotropowego” (tj. *Cga*, *Lhb*, *Fshb* i *Gnrhr*) oraz inne geny (takie jak: *Egr1*, *Dusp4*, *Nr5a1* i *Adcyap1r1*), których produkty ekspresji (odpowiednio: białko transkrypcyjne EGR-1, fosfataza -2 MAPK, czynnik transkrypcyjny SF-1 i receptor PAC1) uczestniczą w regulacji wydzielania hormonów gonadotropowych, a także na wewnątrzkomórkowe szlaki przekazywania informacji, ulegające aktywacji pod wpływem GnRH i PACAP-u w gonadotropach (odpowiednio: PLC β /IP3/PKC/MAPK i cAMP/PKA). We *Wstępie*, przedstawiono również, w ujęciu historycznym, badania dotyczące wpływu miedzi na funkcje rozrodcze ssaków, głównie zaś

odnoszące się do roli kompleksu jonu miedzi z histydyną w regulacji uwalniania GnRH oraz wskazujące na udział tego pierwiastka w dojrzewaniu 92-aminokasowego prekursora gonadoliberyny. Przedstawiono także wyniki wcześniejszych badań, w których wykorzystano kompleks Cu-GnRH (wytworzony przez zespół prof. Henryka Kozłowskiego z Uniwersytetu Wrocławskiego) i m.in. stwierdzono zwiększoną jego gonadotropową aktywność. Kompleks ten, podobnie jak PACAP, wykazywał stymulujący wpływ na szlak cAMP/PKA, jednakże konsekwencje tego oddziaływania na ekspresję genów sieci gonadotropowej nie były wcześniej badane. W związku z tym, w pracy doktorskiej podjęto badania, które miały na celu uzupełnienie tej luki. Doktorant przyjął hipotezę badawczą, która zakładała wpływ kompleksu Cu-GnRH na ekspresję genów sieci gonadotropowej za pośrednictwem szlaku cAMP/PKA (aktywowanego również przez PACAP). Weryfikacja powyższej hipotezy obejmowała doświadczenia, przeprowadzone na samicach szczura, które zmierzały do wyjaśnienia:

- zdolności Cu-GnRH i PACAP-u do aktywacji szlaku cAMP/PKA w przednim płacie przysadki w warunkach *ex vivo*;
- wpływu Cu-GnRH – podawanego do III komory mózgu przez 5 godz. z częstotliwością jednego i dwóch pulsów/godz. – na ekspresję w przednim płacie przysadki mRNA dwunastu genów: *Egr1*, *Nr5a1*, *Ctnnb1*, *Lhb*, *Fshb*, *Gnrhr*, *Adcyap1r1*, *Prkaca*, *Prkg1*, *Nos1*, *Fst* i *Nr4a1*;
- wpływu PACAP-u – podawanego do III komory mózgu w postaci jednorazowej infuzji oraz 5-godzinnej infuzji z częstotliwością jednego pulsu/godz. – na ekspresję mRNA w/w genów w przednim płacie przysadki;
- wpływu dokomorowych infuzji Cu-GnRH na ekspresję mRNA w/w genów w przednim płacie przysadki po zablokowaniu receptorów GnRH;
- wpływu dokomorowych infuzji Cu-GnRH na ekspresję mRNA w/w genów w przednim płacie przysadki po zablokowaniu receptorów PACAP-u (PAC1);
- wpływu kompleksu Cu-GnRH (podawanego osobno i po zablokowaniu w/w receptorów) oraz PACAP-u na wydzielanie LH i FSH.

Ogólnie można stwierdzić, że *Wstęp* stanowi bardzo dobre wprowadzenie do problemu badawczego podjętego w pracy doktorskiej i w pełni uzasadnia przyjętą hipotezę naukową. Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres podjętych badań, które uwzględniają doświadczenia prowadzone w warunkach *in vivo* i *ex vivo*, stymulację i blokowanie określonych receptorów, jak również analizę ekspresji wybranych genów sieci gonadotropowej w przednim płacie przysadki oraz oznaczanie stężenia gonadotropin we krwi obwodowej.

W kolejnym rozdziale *Materiały i metody* podano informacje o zwierzętach doświadczalnych i postępowaniu z nimi, procedurach doświadczalnych, stosowanych metodach analitycznych oraz sposobie statystycznego opracowania wyników. W badaniach użyto 107 dojrzałych płciowo samic szczura Wistar (w wieku 3-4 miesięcy). Przeprowadzono trzy niezależne doświadczenia, w tym jedno na modelu *ex vivo* – polegające na inkubacji przednich płatów przysadek izolowanych od samic w fazie diestrus oraz dwa na modelu *in vivo* – z podawaniem owarietomizowanym samicom substancji doświadczalnych w formie infuzji do trzeciej komory mózgu. W badaniach starano się – w miarę możliwości – uwzględnić pulsacyjny charakter uwalniania GnRH w warunkach fizjologicznych, stosując dokomorowe infuzje kompleksu Cu-GnRH o różnej częstotliwości pulsów. Jakkolwiek zakres częstotliwości zastosowanych pulsów mógł być niewystarczający aby ujawnić pełne spektrum działania Cu-GnRH, jak również PACAP-u, czego Doktorant jest świadomy i daje temu wyraz w podsumowaniu pracy. Na podkreślenie zasługują odpowiednio dobrane metody analityczne, które wykorzystano w badaniach, takie jak: a/ qRT-PCR – do analizy ekspresji wybranych genów, b/ ELISA – do badania aktywności kinazy białkowej A w przednich płatach przysadek zwierząt doświadczalnych oraz c/ RIA – do oznaczenia stężenia gonadotropin (LH i FSH) w osoczu. W badaniach uwzględniono analizę ekspresji 12 genów należących do sieci gonadotropowej, kodujących: białko *Egr1* (*Egr1*; *ang. early-growth*

response), czynnik transkrypcyjny SF-1 (*Nr5a1*; ang. nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1), β -kateninę (*Cttnb*; ang. catenin beta 1), podjednostkę β hormonu luteinizującego (*Lhb*, ang. luteinizing hormone beta polypeptide), podjednostkę β hormonu stymulującego rozwój pęcherzyków jajnikowych (*Fshb*; ang. follicle stimulating hormone beta polypeptide), receptor hormonu uwalniającego gonadotropiny (*Gnrhr*; ang. gonadotropin releasing hormone receptor), receptor PAC1 (*Adcyap1r1*; ang. adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor type 1), kinazę białkową zależną od cAMP (*Prkaca*), kinazę białkową zależną od cGMP (*Prkg1*), syntazę tlenku azotu (*Nos1*), folistatynę (*Fst*) i receptor jądrowy 4a1 (*Nr4a1*) znany również jako czynnik wzrostu nerwów IB (NGFI-B) lub Nur77. Stosowane metody analityczne uwiarygodniono uwzględniając odpowiednie próby kontrolne, jak również w odniesieniu do RT-PCR – poprzez wyznaczenie krzywych topnienia uzyskanych produktów amplifikacji, ich rozdział elektroforetyczny i sekwencjonowanie, a w odniesieniu do analiz radioimmunologicznych – określenie poziomu zmienności wewnątrzseryjnej i międzyseryjnej dla oznaczanych hormonów. Dodać należy, że stosowane metody analityczne opisano poprawnie i przystępnie.

W kolejnej części pracy, uzyskane wyniki badań zostały przedstawione na 42 rycinach. Wyniki te wskazują na zróżnicowane reakcje badanych parametrów, powiązanych z aktywnością gonadotropową przysadek samic szczura, w odniesieniu do badanych czynników doświadczalnych. W przeprowadzonych badaniach m.in. stwierdzono:

- stymulujący wpływ Cu-GnRH i PACAP-u 1-38 na aktywność PKA w przednim płacie przysadki samicy szczura po 1-godzinnej inkubacji (nie obserwowano wpływu po 3-godzinnej inkubacji);
- zróżnicowaną skuteczność oddziaływania pulsacyjnych infuzji Cu-GnRH i PACAP-u 1-38 na ekspresję badanych genów w przednim płacie przysadki samicy szczura;
- oraz zmiany w wydzielaniu gonadotropin pod wpływem pulsacyjnych infuzji Cu-GnRH i PACAP-u 1-38.

Spośród badanych genów, najbardziej podatnymi na działanie Cu-GnRH okazały się geny kodujące białko *Egr1* (*Egr1*), czynnik transkrypcyjny SF-1 (*Nr5a1*), syntazę tlenku azotu (*Nos1*) oraz kinazę białkową zależną od cAMP (*Prkaca*), reagujące wzrostem ekspresji, przy czym odpowiedź na mniejszą częstotliwość pulsów Cu-GnRH (1 puls/h/5 h) odnotowano tylko w przypadku genu *Egr1*. Ekspresja wymienionych powyżej genów, z wyjątkiem genu kodującego kinazę białkową zależną od cAMP była także stymulowana przez PACAP 1-38 w zależności od zastosowanej częstotliwości pulsów (1 puls/h/5 h lub 1 puls/5 h). Z kolei, ekspresja genu receptora jądrowego 4a1 (*Nr4a1*) zwiększała się pod wpływem PACAP-u, ale nie zmieniała się po podaniu Cu-GnRH. Zarówno Cu-GnRH jak i PACAP 1-38 nie spowodowały istotnych zmian w ekspresji genów: *Lhb*, *Fshb*, *Gnrhr* i *Adcyap1r1* (gen receptora PAC1) w porównaniu z wartościami stwierdzonymi u zwierząt kontrolnych, przy czym ekspresja tych genów była istotnie wyższa po zastosowaniu wyższej częstotliwości pulsów Cu-GnRH (2 pulsów/h) w porównaniu z niższą ich częstotliwością (1 puls/h). Z kolei, w ogóle nie stwierdzono wpływu Cu-GnRH i PACAP-u na ekspresję genów kodujących folistatynę (*Fst*), kinazę białkową zależną od cGMP (*Prkg1*) oraz β -kateninę (*Cttnb1*). Co ciekawe, mimo braku zmian w ekspresji genów kodujących podjednostki β obu gonadotropin po zastosowaniu Cu-GnRH i PACAP-u, odnotowano wzrost stężenia LH i FSH we krwi obwodowej pod wpływem tych substancji. Ta różnica wskazuje możliwość znaczącego oddziaływania Cu-GnRH i PACAP-u na innych (niż transkrypcja) etapach regulacji wytwarzania/wydzielania gonadotropin. Na podkreślenie zasługuje wnikliwa analiza i interpretacja uzyskanych wyników przedstawiona w *Dyskusji* oraz ich podsumowanie w formie wykazu najważniejszych zależności stwierdzonych podczas badań. Główną część pracy kończą trzy ogólne wnioski mające potwierdzenie w prezentowanych wynikach badań.

Reasumując, badania przeprowadzone przez mgr. Grzegorza Kotarbę w ramach pracy doktorskiej, wykazały zbliżony zakres oddziaływania Cu-GnRH i PACAP-u na przedni płat przysadki samic szczura, obejmujący stymulację aktywności PKA i aktywności transkrypcyjnej niektórych genów należących do sieci gonadotropowej oraz wzrost sekrecji LH i FSH. Efekt działania testowanych peptydów na aktywność transkrypcyjną tych genów był uzależniony od zastosowanego wzorca pulsacyjnego ich podawania. Ponadto, oddziaływanie Cu-GnRH na ekspresję badanych genów w przysadce samic szczura podlegało modyfikacji pod wpływem blokowania receptorów GnRH oraz PACAP-u (PAC1) przy pomocy odpowiednich antagonistów (antide i PACAP-u 6-38).

UWAGI i PYTANIA

Podczas czytania ocenianej rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka uwag i pytań, które przedstawiam poniżej i proszę Doktoranta o odniesienie się do nich.

1. W opisie *Doświadczenia II* (str. 16) dotyczącym Grupy VI niejasno wyrażono informację na temat stężenia podawanej substancji (PACAP-u).
2. Czym różni się grupa III w *Doświadczeniu II* od grupy II w *Doświadczeniu III*? Opisy tych grup są bardzo podobne.
3. W podpisach rycin ilustrujących wpływ PACAP-u na ekspresję badanych genów (Ryc. 8, 12, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 39, 42 i 43) powinna być także uwzględniona infuzja tej substancji z zastosowaniem 1 pulsu/5 h.
4. Czy rzeczywiście PACAP zastosowany w formie 1 pulsu/5 h nie wpłynął istotnie na ekspresję *Egr1* mRNA w przednim płacie przysadki (Ryc. 8) i stężenie LH we krwi obwodowej samic szczura (Ryc. 42) w porównaniu do wartości kontrolnych (po zastosowaniu fizjologicznego roztworu NaCl)?
5. Czytając zdanie zamieszczone w *Dyskusji* (str. 61, wiersze 7-8 od góry), można odnieść wrażenie, że kompleks Cu-GnRH istotnie stymulował ekspresję genu *Fshb*, co nie byłoby zgodne z Ryc. 18 i jej opisem (str. 39), w którym stwierdzono „...jednak wzrost ten, o 11%, nie osiągnął pułapu istotności statystycznej”. Kwestionowane zdanie zamieszczone w *Dyskusji* brzmi: „Natomiast w stosunku do grupy kontrolnej, stymulacyjne oddziaływanie we wzorze dwóch pulsów/godz. dotyczyło ekspresji genu *Fshb* (doświadczenie III).
6. Dokomorowe podawanie testowanych substancji w *Doświadczeniu II* i *III*, oprócz bezpośredniego wpływu na komórki przedniego płata przysadki (po dotarciu do niego), teoretycznie umożliwia tym substancjom także pośredni wpływ poprzez działanie na podwzgórze i modulowanie neurosekrecyjnej aktywności tej struktury. Zatem, jaki związek – zdaniem Doktoranta – może mieć ewentualne działanie badanych substancji na poziomie podwzgórza z wynikami uzyskanymi w *Doświadczeniu II* i *III*?
7. Z obowiązku recenzenta wskazuję także drobne błędy redakcyjne zauważone w pracy, które w żaden sposób nie obniżają jej poziomu merytorycznego, takie jak:
 - str. 8 (5. wiersz od dołu) – nazwa enzymu PAL zawiera błąd literowy (powinno być „liazy peptydyloglicyno α -hydroksyglicyno α -amidującej”);
 - str. 9 (14. wiersz od dołu) – powinno być „w fazie przedowulacyjnej”;
 - str. 11 (15. wiersz od góry i niżej) – wystarczy napisać „wpływ ...na ekspresję mRNA...”, ponieważ „zmiany” mogą wystąpić (lub nie) dopiero jako następstwo działania testowanego czynnika;
 - str. 13 (2. wiersz od góry i w wielu innych miejscach) – skrót dla minuty pisany jest bez kropki (tj. „min”);
 - str. 14 (4. wiersz od dołu) – powinno być „...na...”;
 - str. 15 (14. wiersz od góry) – powinno być „...przedinkubacyjnej...”;

- str. 23 (10. wiersz od dołu) – powinno być „...denaturowano w zakresie”;
- str. 63 (4. wiersz od góry) – powinno być „...badania *in vitro* z wykorzystaniem...” lub „...badania *in vitro* prowadzone z wykorzystaniem...”;
- str. 67 (5. wiersz od góry) – powinno być „...indukcja syntezy cAMP obserwowana po...”;
- str. 68 (wiersze 11-13 od dołu) – w zdaniu brakuje „jakiegoś” wyrazu;
- str. 70 (6. wiersz od dołu) – powinno być „...i w konsekwencji...”.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu należy stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr. Grzegorza Kotarby zawiera nowe i wartościowe dane, które opisują – w ujęciu porównawczym względem polipeptydu aktywującego przysadkową cyklazę adenylanową (PACAP) – wpływ kompleksu Cu-GnRH na funkcje gonadotropowe przedniego płata przysadki samicy szczura z uwzględnieniem poziomu molekularnego, tj. zmian aktywności kinazy białkowej A oraz aktywności transkrypcyjnej wybranych genów. Zastosowane rozwiązania metodyczne w realizacji podjętego tematu badawczego należy uznać za bardzo pomysłowe i interesujące. Przeprowadzenie tych badań wymagało opanowania złożonych procedur doświadczalnych i dużego nakładu pracy. Jestem przekonany, że Doktorant w pełni osiągnął zamierzony cel naukowy i wykazał się umiejętnością prowadzenia badań na wysokim poziomie naukowym. Zauważone przeze mnie w pracy nieścisłości i usterki, głównie o charakterze redakcyjnym, nie obniżają jej wysokiej wartości merytorycznej.

WNIOSEK KOŃCOWY

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa zatytułowana *”Ośrodkowy wpływ kompleksu Cu-gonadoliberyna na aktywność transkrypcyjną wybranych genów sieci gonadotropowej w przednim płacie przysadki samicy szczura”* spełnia wszystkie wymagania – określone w Ustawie nr 595 o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14. 03.2003 r. (wraz z późniejszymi zmianami) – stawiane rozprawom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonie z wnioskiem o **dopuszczenie mgr. Grzegorza Kotarby do dalszych etapów przewodu doktorskiego**. Ponadto, biorąc pod uwagę złożoność procedur doświadczalnych i ich pracochłonność oraz efekt naukowy przeprowadzonych badań, sugeruję rozważenie możliwości wyróżnienia ocenianej pracy.

Olsztyn 20.10.2016 r.

Stanisław Okrasa

S Okrasa