

Prof. dr hab. n. med. Marlena Juszcak
Zakład Patofizjologii i Neuroendokrynologii Doświadczalnej
Katedry Patologii Ogólnej i Doświadczalnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Kotarby
z Zakładu Neuroendokrynologii Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN w Jabłonie**

Tytuł pracy: „Ośrodkowy wpływ kompleksu Cu-Gonadoliberyna na aktywność transkrypcyjną wybranych genów sieci gonadotropowej w przednim płacie przysadki samicy szczura”

Promotor pracy: Dr hab. Alina Gajewska

Rozprawa doktorska przedłożona przez mgr Grzegorza Kotarbę pochodzi z Zakładu Neuroendokrynologii IFiZZ PAN w Jabłonie, placówki znanej i cenionej od wielu lat z powodu prowadzenia szeroko zakrojonych badań dotyczących różnych aspektów fizjologii rozrodu zwierząt i znaczenia w tym procesie gonadoliberyny (GnRH), a ostatnio także jej kompleksu z miedzią (Cu-GnRH). Tematyka pracy jest niezwykle interesująca i bardzo aktualna, skupia się bowiem na próbie określenia roli kompleksu Cu-GnRH w regulacji aktywności transkrypcyjnej wybranych genów sieci gonadotropowej, udziału w tym procesie receptora gonadoliberyny - GnRHR oraz receptora polipeptydu PACAP (ang. *pituitary adenylate cyclase activating polypeptide*) - PAC1 w części gruczołowej przysadki samicy szczura, a także zbadania czy wewnątrzkomórkowy szlak przekazu informacji, w którym istotną rolę odgrywa zależna od cAMP kinaza białkowa A (tj. szlak cAMP/PKA), jest zaangażowany w zależną od kompleksu Cu-GnRH regulację ekspresji badanych genów.

Wcześniejsze badania (wykonane m.in. przez zespół kierowany przez prof. Kazimierza Kochmana – wieloletniego kierownika placówki naukowej, z której pochodzi praca, a obecnie przez dr hab. Alinę Gajewską) wykazały, iż kompleks Cu-GnRH nie tylko istotnie zwiększa wydzielanie LH i FSH z przysadki, ale jest nawet silniejszym od gonadoliberyny stymulatorem uwalniania obydwu gonadotropin, prawdopodobnie dzięki zwiększonemu powinowactwu do receptora GnRH oraz jego zdolności do aktywacji szlaku cAMP/PKA w komórkach przedniego płata przysadki. Natomiast, aktywność tego kompleksu na poziomie transkrypcji nie była dotychczas badana, a wiadomym jest, że gonadoliberyna reguluje aktywność wielu genów, wśród których cztery najważniejsze, tj. *Cga*, *Lhb*, *Fshb* i *Gnrhr*, zajmujące pozycję genów trzeciego rzędu, określane są mianem „genów podpisu

gonadotropowego”. Aktywacja ich promotorów wymaga uprzedniej, indukowanej przez GnRH, transkrypcji genów pierwszej i drugiej odpowiedzi, które kodują specyficzne dla nich białka transkrypcyjne. Dlatego uważam, iż podejmując się oceny wpływu kompleksu Cu-GnRH na ekspresję mRNA wybranych, z hierarchicznie zorganizowanej sieci, genów odpowiedzialnych za czynność komórek gonadotropowych przysadki oraz tych zależnych od szlaku cAMP/PKA w komórkach płata przedniego przysadki samicy szczura, Doktorant podjął bardzo aktualny i ciekawy temat o istotnym znaczeniu poznawczym. Te oryginalne badania, mogą w przyszłości mieć również znaczenie praktyczne, ze względu na potencjalne zastosowanie analogów gonadoliberyny (kompleks Cu-GnRH może pełnić rolę analogu GnRH) w terapii niektórych nowotworów złośliwych, a także ze względu na fakt, iż substancje o własnościach agonistów lub antagonistów GnRH od lat stosowane są w leczeniu zaburzeń płodności.

Przedłożona mi do oceny praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich. Zawarta jest na 103 stronach obejmujących 10 stron wstępu, hipoteza i cel pracy, materiały i metody oraz opis poszczególnych doświadczeń zawarte są na 20 stronach, graficzne przedstawienie wyników i ich omówienie zajmuje 25 stron, dyskusja jest na 17 stronach, natomiast piśmiennictwo, obejmujące 193 pozycje, na 20 stronach. Praca zawiera ponadto podsumowanie wyników i wnioski, spis tabel i rysunków oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Niestety, brakuje wykazu stosowanych skrótów, który znacznie ułatwia lekturę tekstu, w którym skrótów jest wiele. Praca napisana jest bardzo poprawnym, eleganckim językiem, a całość rozprawy charakteryzuje się starannym wykończeniem edytorskim oraz pieczołowitym opracowaniem graficznym z konsekwentnym wykorzystaniem koloru w rycinach, ułatwiającym analizę prezentowanych wyników badań.

Bardzo zwięzły wstęp napisany jest rzeczowo z uwzględnieniem najistotniejszych pozycji piśmiennictwa. Autor omawia w nim mechanizmy odpowiedzialne za regulację uwalniania gonadotropin (podkreślając istotne znaczenie częstotliwości i amplitudy pulsów GnRH w tym procesie) oraz wewnątrzkomórkowe szlaki przekazu sygnału, za pośrednictwem których GnRH wywiera biologiczne działanie na komórki gonadotropowe. Dokładnie przedstawia kluczowe elementy sieci transkrypcyjnej zależnej od GnRH, tj. geny pierwszej, drugiej i trzeciej odpowiedzi, oraz liczne białka transkrypcyjne, jak również szlaki sygnałowe odpowiedzialne za efekty transkrypcyjne gonadoliberyny. Następnie, omawia rolę peptydu PACAP i jego receptora w regulacji czynności gonadotropów oraz wpływ tego peptydu na poziom ekspresji odpowiednich genów. W dalszej kolejności przedstawia historię badań dotyczących wpływu miedzi oraz kompleksu Cu-GnRH na funkcje rozrodcze ssaków, kończąc ten rozdział przedstawieniem najnowszych wyników badań dotyczących zależnej od

Cu-GnRH aktywacji szlaku cAMP/PKA. Ze względu na obszerność tematu rozdział Wstęp wymagał omówienia i analizy szerokiego zakresu wiedzy i dlatego, moim zdaniem, powinien być podzielony na kilka podrozdziałów, które usystematyzowałyby omawiane zagadnienia. Co więcej, ponieważ rozdział ten stanowi zaledwie 1/10 część całości rozprawy uważam, że w tej części pracy można było zamieścić fragment dyskusji omawiający strukturę i molekularne mechanizmy funkcjonowania receptorów GnRH (str.68-70), ponieważ Autor nie odnosi się w nim do wyników badań własnych stanowiących przedmiot rozprawy, a tylko prezentuje dane z piśmiennictwa. W doświadczeniu II i III Doktorant badał wpływ antide-antagonisty GnRH, na uwalnianie gonadotropin oraz zmiany ekspresji mRNA wybranych genów w przednim płacie przysadki samic szczura, w związku z tym odczuwam pewien niedosyt brakiem w tej części rozprawy podrozdziału omawiającego, choćby pokrótce, zagadnienie analogów (tj. agonistów i/lub antagonistów) gonadoliberyny i, w dalszej kolejności, wyjaśnienia powodu wyboru do badań tego właśnie antagonisty i jego stężenia. Ta sama uwaga dotyczy antagonisty receptora PAC1.

Hipoteza i sześć celów pracy, wytyczonych przez Doktoranta do weryfikacji przyjętej hipotezy badawczej, sformułowane są jasno i logicznie wynikają z przedstawionych we wstępie informacji. Aby zweryfikować przyjętą hipotezę badawczą sformułowaną w sposób następujący: „(i) Cu-GnRH reguluje aktywność transkrypcyjną genów sieci gonadotropowej *in vivo*, a jego wpływ jest konsekwencją aktywacji receptorów GnRHR oraz PAC1 w przednim płacie przysadki, (ii) Cu-GnRH i PACAP₁₋₃₈, działając przez szlak cAMP/PKA, generują zbliżone profile aktywności transkrypcyjnej w sieci gonadotropowej *in vivo*” Doktorant wykonał oznaczenia ekspresji mRNA 12 wybranych genów (tj. *Egr1*, *Nr5a1*, *Ctnnb1*, *Lhb*, *Fshb*, *Gnrhr*, *Adecyap1r1*, *Prkaca*, *Prkg1*, *Nos1*, *Fst* i *Nr4a1*), co świadczy o kompleksowym i rzetelnym podejściu Doktoranta do badanego zagadnienia oraz jego znakomitej orientacji w bieżącym piśmiennictwie i aktualnym stanie wiedzy o złożonych wzajemnych relacjach i skomplikowanych mechanizmach odpowiedzialnych za regulację ekspresji genów istotnych w procesie rozrodu.

Mgr Grzegorz Kotarba w obszernym rozdziale Materiał i Metody szczegółowo charakteryzuje metodykę badań z uwzględnieniem omówienia stosowanych odczynników i roztworów. Doktorant omawia w nim m.in. procedury chirurgiczne i doświadczalne (tj. owariektomię, sposób implantacji kaniuli do komory bocznej mózgu, infuzje dokomorowe czy pobieranie płata przedniego przysadki; nie muszę podkreślać, iż procedury te wymagają dużej dokładności i precyzji), a także syntezę kompleksu Cu-GnRH, techniki analityczne, oznaczenie stężenia gonadotropin metodą radioimmunologiczną (RIA), oznaczenie aktywności PKA metodą ELISA oraz schematy doświadczeń. Zastosowane metody badawcze

(tj. izolacja całkowitego RNA, ilościowa reakcja odwrotnej transkrypcji, łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym - qRT-PCR czy ELISA) są bardzo nowoczesne i dobrane właściwie. Opis postępowania metodycznego pozwala na zapoznanie się z tokiem prowadzenia pracy oraz dokładną analizę stosowanych technik badawczych. Analiza statystyczna wyników dokonana jest w sposób właściwy, przy wykorzystaniu narzędzi statystycznych starannie dobranych do testowania założonych celów.

Badania, zarówno *in vivo*, jak *ex vivo*, przeprowadzono na 107 dojrzałych płciowo 3 – 4 miesięcznych samicach szczura Wistar o masie ciała 250 – 290 g, przebywających w kontrolowanych warunkach temperatury (24 ± 1 °C) i oświetlenia (LD 14:10). Doktorant podjął się wykonania trzech precyzyjnie zaplanowanych i, co należy podkreślić, niezwykle pracochłonnych doświadczeń, co mogę ocenić na bazie moich doświadczeń w pracy eksperymentalnej. Doświadczenie I, wykonane na modelu *ex vivo*, polegało na inkubacjach wyizolowanego przedniego płata przysadki, a w doświadczeniach II i III (model *in vivo*) samicom, poddanym wcześniej zabiegowi obustronnej resekcji jajników, infundowano do trzeciej komory mózgu (*icv*) badane substancje. Szczególnie podkreślić i docenić należy fakt, iż Doktorant uwzględnił w tych badaniach niezwykle istotne znaczenie pulsacyjnej aplikacji Cu-GnRH (stosując zróżnicowany pulsacyjnie wzór stymulacji przysadki), ponieważ częstotliwość i amplituda pulsów GnRH pełni kluczową rolę w procesie aktywacji lub inaktywacji (stymulacji/desensytyzacji) receptora GnRH (gonadoliberyna reguluje ekspresję genu receptora GnRH - *Gnrhr*), a tym samym, regulacji czynności osi przysadka-gonady u samic ssaków.

W doświadczeniu I badano wpływ jedno- lub trzygodzinnej inkubacji wyizolowanych przednich płatów przysadek w obecności kompleksu Cu-GnRH lub peptydu PACAP₁₋₃₈ na aktywność PKA w tej tkance. Po zakończeniu inkubacji, tkanki natychmiast zamrażano i przechowywano w temp. -80°C aż do oznaczenia w zebranych materiale aktywności PKA. W doświadczeniu tym wyodrębniono sześć grup eksperymentalnych po 5 przysadek w każdej z nich. Tak mała liczba próbek w grupie może jednak stwarzać pewne trudności w analizie statystycznej i, przede wszystkim, w interpretacji otrzymanych wyników. Doświadczenie II i III miało na celu określenie wpływu dokomorowych infuzji kompleksu Cu-GnRH lub peptydu PACAP₁₋₃₈, bądź kompleksu Cu-GnRH po uprzednim, także *icv*, podaniu antagonisty GnRH - antide lub antagonisty receptora PAC1 - PACAP₆₋₃₈, aplikowanych z częstotliwością 1 lub 2 pulsów na godzinę przez 5 godzin, na uwalnianie gonadotropin oraz ekspresję mRNA wybranych genów w przednim płacie przysadki samic szczura. W doświadczeniu II wyodrębniono siedem grup, zaś w doświadczeniu III cztery grupy eksperymentalne, po 7 zwierząt w każdej z nich. Stężenie wyjściowe i objętość

podawanych substancji były dobierane do częstotliwości pulsacji (tj. 1 puls/godz., objętość pulsu 10 μ l lub 2 pulsy/godz., objętość pulsu 5 μ l, lub 2x2 pulsy/godz., objętość pulsu 2,5 μ l). W grupach, w których zwierzęta otrzymywały *icv* po dwie substancje, tj. antide plus kompleks Cu-GnRH lub PACAP₆₋₃₈ plus Cu-GnRH, zastosowano naprzemienny cykl ich podawania w taki sposób, aby każdy puls antide lub PACAP₆₋₃₈ poprzedzał o 30 (lub 15) minut każdy puls Cu-GnRH. 60 minut po ostatniej *icv* infuzji badanych substancji, zwierzęta skrwawiano i pobierano krew krążenia ogólnego (celem otrzymania surowicy, w której następnie oznaczano stężenia LH i FSH metodą RIA) oraz przedni płąt przysadki, który zamrażano i przechowywano w temp. -80°C do dalszych analiz.

Uzyskane wyniki badań Doktorant przedstawił w sposób poprawny i przejrzysty, a ich interpretację ułatwiają starannie przygotowane tabele (łącznie 5) oraz ryciny (łącznie 45). Liczba wykonanych oznaczeń i uzyskanych wyników (a tym samym liczba rycin) jest imponująca i dlatego uważam, że przesunięcie podrozdziału III.4., tj. Schematy Doświadczeń, na koniec rozdziału III, tj. Materiały i Metody, i połączenie go z prezentacją wyników następującą zaraz po opisie danego doświadczenia, jeszcze bardziej ułatwiłoby analizę prezentowanych wyników badań.

Otrzymane przez Doktoranta wyniki wykazały, iż kompleks Cu-GnRH z taką samą efektywnością jak peptyd PACAP₁₋₃₈ aktywuje PKA po jednogodzinnej stymulacji przysadki *ex vivo*. Ponadto, badania *in vivo* ujawniły, że wpływ kompleksu na aktywność transkrypcyjną genów sieci gonadotropowej zależy od wzoru stymulacji przysadki. Po infuzjach Cu-GnRH podawanych z częstotliwością 2 pulsów na godzinę dochodzi do jednoczesnej stymulacji ekspresji mRNA genów *Egr1* oraz *Nr5a1*, jak też ekspresji mRNA genów zależnych od szlaku cAMP/PKA, tj. *Nos1* i *Prkaca*. Zmiana aktywności receptora GnRH zmniejszyła stymulacyjny wpływ Cu-GnRH na ekspresję mRNA genów *Egr1*, *Prkaca* i *Nr4a1*, natomiast zmiana aktywności receptora PAC1 obniżyła indukowaną przez kompleks Cu-GnRH ekspresję mRNA genów *Egr1*, *Nr5a1*, *Nos1*, *Prkaca* i *Nr4a1*. Peptyd PACAP₁₋₃₈ indukował wzrost ekspresji mRNA genów *Egr1* i *Nr5a1*, jednak efekt ten nie zależał od wzoru stymulacji przysadki. W sposób zależny od wzoru stymulacji przysadki PACAP₁₋₃₈ genowo-specyficznie wpłynął na ekspresję mRNA genów *Nos1* i *Nr4a1*. Zwiększenie poziomu ekspresji mRNA genu *Nos1* wystąpiło tylko po podawaniu peptydu PACAP₁₋₃₈ w sposób pulsacyjny, podczas gdy po jednorazowym podaniu PACAP-u₁₋₃₈ wzrost ekspresji mRNA dotyczył tylko genu *Nr4a1*. Indukowaną przez PACAP₁₋₃₈ stymulację uwalniania LH stwierdzono tylko po jednorazowej infuzji tego neuropeptydu, natomiast pulsacyjna infuzja PACAP-u₁₋₃₈ nasilała uwalnianie FSH do krwi. W obecności antagonisty GnRH (antide) lub antagonisty receptora PAC1 (PACAP₆₋₃₈) stymulujący wpływ kompleksu Cu-GnRH na

uwalnianie LH do krwi był istotnie ograniczony, natomiast w odniesieniu do FSH taki efekt dotyczył tylko antide. Autor stwierdza, iż otrzymane wyniki wskazują, że kompleks Cu-GnRH jest analogiem gonadoliberyny o stymulacyjnym oddziaływaniu na aktywność transkrypcyjną wybranych genów sieci gonadotropowej, a wewnątrzkomórkowa efektywność kompleksu Cu-GnRH wymaga stymulacji receptorów GnRH i PAC1 przez pulsy o wysokiej częstotliwości. Pro-transkrypcyjna aktywność kompleksu Cu-GnRH oraz peptydu PACAP₁₋₃₈ w komórkach przysadki samic szczura *in vivo* wynika z aktywacji ścieżki cAMP/PKA, czego wyrazem jest taki sam zestaw genów aktywowanych przez każdy z badanych peptydów.

Dyskusja wyników jest prowadzona prawidłowo, z właściwym ustosunkowaniem się do badań własnych i krytyczną ich konfrontacją z badaniami innych autorów. Dowodzi szerokiej i rzetelnej wiedzy Doktoranta dotyczącej poruszanych zagadnień, umiejętności wykorzystania aktualnych danych z piśmiennictwa, jak również umiejętności krytycznego rozpatrywania argumentów przemawiających za wnioskami. Pracę wieńczą trzy wnioski:

1. Pro-transkrypcyjna aktywność kompleksu odbywa się przez aktywację receptorów GnRH i PAC1 oraz zależy od pulsacyjnego wzoru stymulacji przysadki.
2. Kompleks Cu-GnRH reguluje aktywność transkrypcyjną wybranych genów sieci gonadotropowej w przednim płacie przysadki samic szczura *in vivo*.
3. Taki sam zestaw genów stymulowanych przez egzogennie podawany Cu-GnRH lub PACAP₁₋₃₈ wskazuje na udział szlaku cAMP/PKA w transdukcji sygnału od kompleksu do jądra komórkowego.

Pierwsze dwa wnioski znajdują dobre oparcie w uzyskanych wynikach i całości wywodów Autora. Wniosek trzeci, choć ma uzasadnienie w wynikach przeprowadzonych badań, to jest to wnioskowanie pośrednie, przez analogię. Dlatego uważam, że o wiele silniejszym argumentem za stwierdzeniem, iż „w transdukcji sygnału od kompleksu Cu-GnRH do jądra komórkowego uczestniczy szlak cAMP/PKA” byłoby zastosowanie w badaniach swoistego inhibitora PKA. Wiadomo bowiem, iż do zablokowania szlaku sygnałowego cAMP/PKA stosuje się powszechnie substancje pełniące rolę inhibitorów PKA (np. cAMPS-Rp), które w wybiórczy sposób hamują aktywność tej kinazy i niwelują efekty stymulatorów szlaku cAMP/PKA, takich jak forskolina, PACAP, czy analogi cAMP, w różnych modelach eksperymentalnych. Dlatego niezwykle ciekawe byłoby rozszerzenie badań nad rolą szlaku cAMP/PKA w regulacji niektórych genów sieci gonadotropowej o kolejne doświadczenie, w którym do zablokowania szlaku cAMP/PKA użyta by została substancja (lub kilka z nich) pełniąca rolę inhibitora PKA.

Dobrze dobrane piśmiennictwo liczy 193 pozycje, w tym od roku 2010 – 30, z ostatnich 10 lat, tj. od roku 2006 – 68 (co stanowi 35% całości) oraz kilka pozycji

historycznych, np. z roku 1922, 1936, 1963 czy 1965. Są to prace opublikowane w języku angielskim w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, wśród nich także prace autorów polskich, co świadczy o bardzo dobrej znajomości krajowego i światowego piśmiennictwa z zakresu prowadzonych przez Doktoranta badań.

Dla pełnej oceny pracy, z obowiązku recenzenta, wypada mi zwrócić uwagę, że w tekście rozprawy znalazły się nieliczne błędy literowe i interpunkcyjne. Drobną uwagą jest też wskazanie na kilkakrotne użycie w tekście rozprawy zwrotu „odporność” zamiast „oporność” (np. na stronie 10 wiersz 3). W zdaniu: „Kompleks Cu-GnRH charakteryzuje się także zmienioną odpornością na działanie enzymów proteolitycznych” należy użyć słowa oporność, którą rozumie się jako brak lub obniżenie wrażliwości na jakiś czynnik, a o to przecież w tym zdaniu chodzi. Kolejna uwaga dotyczy wielokrotnego używania przy opisie wyników zwrotu „zmiana (wzrost lub spadek) nie osiągnęła pułapu istotności statystycznej”. Jestem zdecydowanym zwolennikiem poglądu, że jeśli jakaś zmiana nie jest statystycznie istotna, to uznaje się, że takiej zmiany nie ma. Te ostatnie uwagi nie umniejszają w niczym mojej bardzo wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Kotarby.

W podsumowaniu stwierdzam, iż rozprawa doktorska mgr Grzegorza Kotarby stanowi bardzo wartościową pozycję naukową. Jego wiedza teoretyczna oraz perfekcyjne opanowanie skomplikowanego warsztatu eksperymentalnego i jego trafne wykorzystanie do badań przyniosły oryginalne wyniki, które są istotną częścią w badaniach podstawowych, mających na celu wyjaśnienie zintegrowanych mechanizmów kierujących ekspresją określonych genów w procesie rozrodu. Doktorant wykazał się umiejętnością samodzielnego zdefiniowania problemu, wyboru właściwych metod badawczych, opracowania wyników oraz wnikliwą ich analizą. Obszerne omówienie wyników badań własnych oraz opublikowanych w piśmiennictwie światowym dowodzi umiejętności krytycznego rozpatrywania argumentów przemawiających za zbiorczymi wnioskami. Uważam, że recenzowana praca, stanowiąc samodzielny dorobek naukowo-badawczy Doktoranta, odpowiada wszelkim wymogom stawianym rozprawom doktorskim.

Na tej podstawie, mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt *im. Jana Kielanowskiego* PAN wniosek o dopuszczenie mgr Grzegorza Kotarbę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź, dnia 11.10.2016 r.

KIEROWNIK
Zakładu Patofizjologii
i Neuroendokrynologii Doświadczalnej
Katedry Patologii Ogólnej i Doświadczalnej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Prof. dr hab. n. med. *M. Kuszczał*