

Prof. dr hab. Władysław Kordan, prof. zw.
Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Przemysława Sołka

pt. „Wykorzystanie komórkowego modelu do badań *in vitro* mechanizmów toksyczności leków przeciwdepresyjnych o różnym profilu działań niepożądanych” wykonanej w Katedrze Fizjologii i Rozrodu Zwierząt Uniwersytetu Rzeszowskiego (promotor: Prof. dr hab. Marek Koziorowski, promotor pomocniczy: dr n med. Magdalena Sowa-Kućma)

Procesy rozrodu są przedmiotem zainteresowania wielu zespołów badawczych. Zachowanie fizjologicznego stanu organizmu stanowi jeden z głównych elementów decydujących o prawidłowej płodności męskiej. Sprawne funkcjonowanie rozrodu związane jest ze złożonym i powiązanim ze sobą systemem regulacji przebiegającym na poziomie molekularnym, komórkowym, narządowym i całego organizmu.

Wyjaśnienie niektórych zjawisk towarzyszących procesom reprodukcyjnym, również w aspekcie molekularnym, pozwoli na podniesienie męskiej wydajności rozrodczej. Bez wątpienia jednym z głównych czynników warunkujących odpowiednią płodność jest prawidłowy przebieg procesu spermatogenezy. Zakłócenia tego procesu poprzez różnego rodzaju czynniki środowiskowe skutkują obniżeniem wartości biologicznej plemników, co w końcowym efekcie obniża płodność. Czynnikiem wpływającym negatywnie na przebieg spermatogenezy są, między innymi, różnego rodzaju środki farmakologiczne, w tym leki antydepresyjne. W tym właśnie obszarze nauki mieści się dysertacja mgr Przemysława Sołka.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska zawiera 154 strony maszynopisu, w tym 61 rycin, 5 tabel i 161 pozycji piśmiennictwa, z czego tylko 1 to publikacja polskojęzyczna. Większość prac opublikowano w ostatnich kilku latach w renomowanych czasopismach naukowych.

Praca doktorska mgr Przemysława Sołka posiada typowy charakter dla tego rodzaju opracowań naukowych i podzielona jest na następujące rozdziały: Streszczenie (4 strony- w języku polskim i angielskim), Wykaz skrótów (3 strony), Wstęp (9 stron), Cel i hipoteza

badawcza (1 strona) Materiały i metody (24 strony), Wyniki (79 stron), Dyskusja (15 stron), Wnioski (1 strona), Piśmiennictwo (12 stron).

We **wstępie** dysertacji, podzielonym na 3 podrozdziały, Autor w sposób jasny wprowadza czytelnika w zagadnienia będące przedmiotem rozprawy doktorskiej. W rozdziale tym przedstawił, między innymi, definicję depresji, scharakteryzował leki przeciwdepresyjne opisując ich mechanizm działania oraz opisał skutki uboczne działania leków przeciwdepresyjnych. W mojej opinii rozdział ten powinien być uzupełniony o opis procesu spermatogenezy, gdyż zaburzenia tego procesu przez leki antydepresyjne były głównym celem niniejszego opracowania. Autor jedynie bardzo zdawkowo wspomina o tym procesie w rozdziale dyskusja na stronach 127, 134 i 135. Uwaga ta nie obniża jednak wysokiej wartości merytorycznej dysertacji. Proponuję jej uwzględnienie przy przygotowywaniu pracy do druku.

Na zakończenie tego rozdziału Autor określa precyzyjnie hipotezę badawczą oraz, zgodny z tytułem dysertacji, cel pracy, który konsekwentnie realizuje poprzez zastosowanie bardzo nowoczesnych metod i technik analitycznych.

Tę część pracy, podobnie jak pozostałe, oceniam wysoko, co świadczy o doskonałym przygotowaniu Autora do prowadzenia badań w prezentowanym obszarze nauki.

Rozdział **Materiały i metody** obejmuje bardzo szczegółowy opis kilkunastu eksperymentów doskonale przemyślanych i przeprowadzonych, które dobrze korespondują z celami badawczymi postawionymi przez doktoranta. Badania obejmują eksperymenty *in vitro* (hodowle komórkowe).

Bezdiskusyjną zaletą ocenianej pracy jest zastosowanie w niej bardzo nowoczesnych technik analitycznych takich jak: ocena aktywności metabolicznej komórek, oznaczanie równowagi redoks, ocena zmian morfologicznych i przemian energetycznych komórek, analiza profilu cyklu komórkowego, analiza ekspresji genów na poziomie mRNA (Real – Time PCR), analiza poziomu syntezy wybranych białek (technika Western Blot), analiza uszkodzeń DNA komórek (metoda Tunel), ocena żywotności komórek (barwienie fluorescencyjne), lokalizacja receptora alfa-2-adrenergicznego oraz transportera serotoniny metodą immunohistochemiczną oraz immunofluorescencyjną. Na uwagę zasługuje również zastosowanie unikalnej aparatury badawczej, szczególnie cytometru obrazowego InCell Analyzer 20000.

Zastosowane metody statystyczne nie budzą zastrzeżeń.

Posługując się wymienionymi metodami i technikami laboratoryjnymi, w najobszerniejszym rozdziale dysertacji **Wyniki**, doktorant w sposób bardzo szczegółowy, jasny i przejrzysty przedstawił otrzymane rezultaty, udokumentowane starannie opracowanymi

graficznie, bardzo czytelnymi rycinami. Sposób dokumentacji otrzymanych wyników zasługuje na uznanie i nie budzi żadnych wątpliwości.

W rozdziale **Dyskusja** doktorant dokonał precyzyjnej analizy uzyskanych wyników badań, porównując je z rezultatami badań innych autorów oraz w oparciu o własną wiedzę. Autor pracy wykazał się doskonałą znajomością cytowanej literatury przedmiotu, a także umiejętnością swobodnego jej wykorzystania w konfrontacji z wynikami badań własnych. Niewątpliwą zaletą tej części pracy jest wyjaśnienie molekularnych mechanizmów dotyczących nieodwracalnych zaburzeń w przebiegu spermatogenezy poprzez uszkodzenie komórek plemnikotwórczych pod wpływem wybranych leków antydepresyjnych, co w końcowym efekcie skutkuje obniżeniem płodności męskiej.

Na zakończenie pracy, w rozdziale **Wnioski** doktorant w sposób syntetyczny prezentuje otrzymane wyniki w postaci 6 wniosków, które w pełni odzwierciedlają otrzymane wyniki. Według recenzenta niektóre z nich wymagają jednak przeredagowania bądź uzupełnienia. We wnioskach 1 i 2 (str. 141) należałoby podać jakich komórek dotyczą przedstawione zaburzenia. Z kolei we wniosku nr 4 doktorant napisał „Wykazano, że następstwem utrzymującego się stresu oksydacyjnego jest upośledzenie funkcji mitochondriów...”. Pragnę zaznaczyć, że doktorant nie określał statusu mitochondriów, a oznaczał jedynie zawartość ATP w analizowanych komórkach. Te dwa parametry nie zawsze ze sobą korelują. Dopiero zastosowanie odpowiedniej metody określania statusu mitochondriów (np. barwienie komórek z zastosowaniem kombinacji fluorochromów J-C1/PI) dałoby odpowiedź, czy rzeczywiście doszło do upośledzenia funkcji mitochondriów. Uwaga ta dotyczy również sformułowania użytego w rozdziale dyskusja (str. 131), gdzie autor napisał „Uzyskane wyniki mogą świadczyć o postępującym upośledzeniu funkcji mitochondriów...”

W trakcie studiowania pracy nasunęły mi się następujące uwagi i pytania, które dotyczą głównie rozdziału **Dyskusja**:

1. Na stronie 129 (7 wiersz od dołu) doktorant użył sformułowania „uszkodzenia DNA nasienia”, chyba chodziło to o uszkodzenia DNA plemników, ponieważ nasienie stanowią męskie komórki rozrodcze i wydzieliny jąder i dodatkowych gruczołów płciowych. Na tej samej stronie użyto sformułowania „reakcja akrosomalna”, prawidłowo powinno być reakcja akrosomowa.
2. Na stronie 129 (koniec strony) i 130 (początek strony) doktorant napisał „Ponadto wykazano, że RTF oraz RFA inaktywują kilka kluczowych enzymów związanych z obroną antyoksydacyjną plemników (peroksydaza glutationowa, dysmutaza ponadtlenkowa i dehydrogenaza glukozy-6-fosforanowa)...” Pragnę wyjaśnić, że do

triady enzymów antyoksydacyjnych chroniących plemniki przed uszkodzeniami obok dysmutazy ponadtlenkowej oraz peroksydazy glutationowej należy także katalaza. Udział dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w tych procesach jest drugorzędny, a zasadniczą funkcją tego enzymu jest przekształcanie glukozy-6-fosforanu w 6-fosfoglukonian w cyklu pentozo-fosforanowym.

3. Na str. 130 (13 wiersz od góry) doktorant napisał: „Zredukowany glutation to główny mechanizm antyoksydacyjny...” Pragnę wyjaśnić, glutation jest naturalnym tripeptydem biorącym udział o ochronie antyoksydacyjnej różnego rodzaju komórek, tak więc nie może być on mechanizmem
4. Na stronie 131 doktorant niefortunnie użył sformułowań „trójfosforanu adenozy (ATP)” - powinno być adenozytrifosforanu (ATP) raz „utleniającej fosforylacji” - powinno być fosforylacji oksydacyjnej. Przypomnę, że jest to proces syntezy ATP w łańcuchu oddechowym.
5. Nie jasne jest zdanie na str. 135 (7 wiersz od dołu) „Podobnie, Chen Chuang (1999) silnie sugerują, że indukowany litem (stosowany w leczeniu choroby afektywnej dwubiegunowej) wzrost regulacji Bcl-2 oraz obniżenie p53 i Bax odgrywają znaczącą rolę w neuroprotekcji przeciwko cytotoksyczności”. Myślę, że doktorant zastosował tu skrót myślowy.
6. Na str. 136 (7 wiersz od dołu) znalazło się nieuprawnione zdanie „Nasze wyniki wykazały sumaryczny wzrost aktywności wszystkich trzech białek pod wpływem leków przeciwdepresyjnych”. Doktorant nie badał aktywności tych białek, a dokonał jedynie ich identyfikacji (**Materiał i metody** str. 38). W tym przypadku można mówić jedynie o zawartości białek, co doktorant przedstawił obszernie w rozdziale **Wyniki**.
7. Na str. 139 (7 wiersz od dołu) użyto sformułowania „wyglądu morfologicznego”, już samo słowo morfologia, która jest nauką o kształtach i budowie mówi nam o wyglądzie komórki.
8. Ostatnia uwaga dotyczy rozdziału **Piśmiennictwo**. Moim zdaniem przy tak obszernym opracowaniu lepiej byłoby przedstawić wykaz piśmiennictwa alfabetycznie i chronologicznie, wymieniając w tekście dysertacji nazwisko pierwszego autora publikacji, co znacznie ułatwiłoby merytoryczną ocenę tej części pracy.

Przedstawione uwagi mają raczej charakter redakcyjny i dyskusyjny, nie umniejszają w żadnym stopniu bardzo wysokiej wartości merytorycznej ocenianej pracy.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wnosi nowe elementy do dziedziny biologii rozrodu i stanowi jednocześnie oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Zastosowane w pracy bardzo nowoczesne i precyzyjne metody i techniki badawcze, zasługują na uznanie. Uzyskane wartościowe wyniki w znacznym stopniu wyjaśniają wpływ wybranych leków przeciwdepresyjnych na przebieg procesu spermatogenezy. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska **Pana mgr Przemysława Solka pt. „Wykorzystanie komórkowego modelu do badań *in vitro* mechanizmów toksyczności leków przeciwdepresyjnych o różnym profilu działań niepożądanych”** spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim zawarte w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789), zwana dalej ustawą, w zw. z art. 179 ust. 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669).

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie **mgr Przemysława Solka** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę nowatorski charakter i wysoką wartość merytoryczną pracy stawiam wniosek o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

Olsztyn, 2019-07-26

Prof. dr hab. Władysław Kordan, prof. zw.

