

**Formularz recenzji rozprawy doktorskiej
Wydziału Biologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego**

Imię i nazwisko kandydata: Eliza Drwal

Tytuł rozprawy doktorskiej: **Określenie mechanizmów działania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych na funkcje łożyska ludzkiego**

Promotor: prof. dr hab. Ewa Łucja Gregoraszczyk

Promotor pomocniczy/~~drugi promotor~~/~~kopromotor~~: dr hab. Agnieszka Rak, prof. UJ

Recenzent: prof. dr hab. Agnieszka Blitek

1. Wartość naukowa rozprawy

a. Oryginalność badań (25-200 słów):

Rozprawa doktorska dotyczy niezwykle aktualnej tematyki wpływu zanieczyszczeń środowiska na procesy związane z rozrodem człowieka. Kandydatka do stopnia doktora badała mechanizmy działania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) na komórki ludzkiego łożyska. WWA zaliczane są do powszechnych zanieczyszczeń organicznych charakteryzujących się tendencją do bioakumulacji i długim okresem półtrwania w środowisku oraz łatwością przenikania do organizmu ludzi i zwierząt. Ze względu na swoje potencjalne właściwości genotoksyczne, mutagenne i kancerogenne budzą duże zainteresowanie naukowców i są przedmiotem intensywnych badań. Najlepiej poznanym i opisanym WWA jest benzo(a)piren, który został uznany przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem za główny ludzki kancerogen. Zdecydowanie mniej uwagi poświęcono w literaturze naukowej działaniu na organizm innych niż benzo(a)piren związków należących do grupy WWA. Ponadto, dotychczas prowadzone badania uwzględniały w głównej mierze wpływ pojedynczych WWA. W tym też kontekście, oryginalność zawartych w rozprawie badań dotyczy określenia wpływu na komórki łożyska nie tylko pojedynczych, niskocząsteczkowych WWA wybranych w oparciu o ich rzeczywiste stężenia w organizmie, ale przede wszystkim wpływu mieszanin różnych WWA. Kandydatka najpierw dokonała analizy poziomu 16 tzw. znacznikowych WWA we krwi matek i tkance łożysk, by następnie, w zależności od eksperymentu, zbadać 4 spośród nich osobno i w mieszaninach (publikacja I) oraz mieszaniny wszystkich 16 (publikacja III). Jest to niezwykle istotne, ponieważ stanowi próbę odzwierciedlenia takiej koncentracji i formy działania badanych WWA na jaki narażone mogą być komórki łożyska. Jak powszechnie wiadomo, WWA występują w środowisku zawsze w formie mieszaniny i jako mieszanina przedostają się do organizmu.

Uważam, że wyniki zawarte w przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej stanowią oryginalny wkład naukowy i są cennym źródłem wiedzy na temat mechanizmów i efektów działania WWA na komórki łożyska ludzkiego.

b. Wartość naukowa ~~rozdziałów~~/artykułów (25-200 słów):

Podstawą ocenianej rozprawy doktorskiej są cztery wieloautorskie publikacje naukowe, które ukazały się w recenzowanych międzynarodowych czasopismach znajdujących się na liście *Journal Citation Reports* oraz liście czasopism MNiSW z przypisaną im punktacją (wg. Załącznika do komunikatu MNSiW z dnia 19 lipca 2019 r.). Są to: (I.) *Toxicology Letters*, wskaźnik cytowań $IF_{5-letni}=3,75$ i 100 pkt., (II.) *Cytotechnology*, $IF_{5-letni}=1,89$ i 40 pkt., (III.) *Reproductive Toxicology*, $IF_{5-letni}=3,31$ i 70 pkt. oraz (IV.) *Toxicology*, $IF_{5-letni}=3,8$ i 100 pkt. Trzy spośród artykułów stanowiących

podstawę ubiegania się o stopień doktora to prace eksperymentalne, a jedna jest pracą przeglądową. We wszystkich pracach Kandydatka do stopnia doktora jest pierwszym autorem. Wszystkie prace są spójne tematycznie, a prace eksperymentalne również metodycznie. Jako całość dostarczają istotnej wiedzy z zakresu negatywnego oddziaływania zanieczyszczeń środowiska na funkcje rozrodcze.

W pierwszej publikacji, wykazano odmienny, zależny od typu komórek łożyska, efekt działania WWA, ich wpływ na apoptozę, cykl komórkowy i sekrecję steroidów. W kolejnej publikacji, zastosowano model *in vitro*, w którym komórki H295R hodowano wraz z komórkami linii JEG-3, BeWo lub zróżnicowanymi BeWo i wykazano przydatność takich kokultur komórkowych do badań nad wpływem WWA na steroidogenezę i metabolizm łożyskowy. W trzeciej pracy, wykazano zależny od typu komórek łożyska metabolizm WWA, tj. jego aktywację za pośrednictwem AhR w komórkach JEG-3 oraz możliwą interakcję AhR z NFκB lub ERα skutkującą zahamowaniem detoksykacji w komórkach BeWo. W czwartej pracy opisano, w oparciu o dostępną literaturę i wyniki badań własnych, możliwe mechanizmy działania różnych WWA na funkcje łożyska ludzkiego, ze szczególnym uwzględnieniem różnicowania łożyska, angiogenezy, sygnalizacji hormonalnej oraz konsekwencji ekspozycji na WWA w dzieciństwie i w życiu dorosłym.

W trakcie lektury artykułów nie znalazłam elementów problematycznych. Są one napisane zrozumiale, z jasno postawionymi celami, szczegółowym opisem układów doświadczalnych i metod analitycznych oraz prawidłowo poprowadzoną dyskusją.

2. Wartość merytoryczna rozprawy

(umiejętność wprowadzenia w tematykę badawczą i jasność sformułowanych hipotez badawczych, dobór metod badawczych i narzędzi statystycznych do analizy danych, sposób przedstawienia wyników, krytyczna analiza wyników i umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu, jasność i poprawność wniosków) (25-200 słów):

Wysoko oceniam wartość merytoryczną rozprawy. Autorka umiejętnie wprowadza Czytelnika w tematykę badawczą, przedstawiając we *Wstępie* dostępną wiedzę na temat możliwych źródeł, mechanizmu działania i metabolizmu WWA, roli łożyska i etapów różnicowania komórek łożyska, a także potencjalnego szkodliwego wpływu WWA na funkcje łożyska. Ta część jest napisana logicznie, prowadzi od ogólnych wiadomości do coraz głębszych szczegółów, a jej zrozumienie ułatwiają 4 ryciny i 1 tabela. Następnie, Autorka stawia *hipotezę badawczą*, której weryfikacji dokonała oraz wymienia 3 główne *cele badawcze*. Zarówno hipoteza, jak i cele są dobrze sformułowane i zasadne. W podrozdziale *Model badawczy*, Autorka wymienia linie komórkowe, które wykorzystywała w badaniach oraz krótko opisuje warunki ich hodowli dołączając zdjęcia komórek. Zastosowane metody badawcze i układ doświadczalny zostały prawidłowo opisane, zarówno w polskojęzycznym opracowaniu, jak i w poszczególnych pracach. Na ich podstawie można stwierdzić, że Kandydatka opanowała różnorodny warsztat badawczy, w tym hodowlę komórek i ich przygotowanie do eksperymentów, analizy cytotoksyczności, proliferacji i żywotności komórek, techniki Western blot i Real-time PCR oraz metodę analizy zawartości hormonów steroidowych i białkowych w płynach biologicznych testem ELISA. Dobór metod statystycznych uważam za adekwatny.

Doceniam również wykorzystanie modelu kokultur komórkowych do badania wpływu WWA (publikacje II i III). Pani mgr Eliza Drwał przystosowała model badawczy *in vitro*, w którym komórki linii H295R były hodowane w układzie przestrzennym z komórkami JEG-3 lub BeWo. Następnie, wykorzystywała ten model do badań nad wpływem mieszaniny WWA na syntezę steroidów. Zdaję sobie sprawę, że wykorzystanie tego modelu było po części koniecznością, ponieważ komórki łożyska nie wykazują aktywności 17β-hydroksylazy/17,20-liazy. Nie mniej jednak, wykorzystanie modeli kokultur komórkowych do badań różnych procesów, w tym tych związanych z rozrodem, zyskuje coraz większe grono zwolenników wśród naukowców i zasługuje na podkreślenie.

Zarówno forma prezentacji wyników, jak i ich interpretacja zostały już poddane ocenie przez recenzentów czasopism, w których ukazały się prace. Wyniki przedstawione w publikacjach w formie wykresów są czytelne i opatrzone wyczerpującymi opisami. W rozdziale *Podsumowanie załączonych*

publikacji, Autorka rozprawy opisuje najważniejsze wyniki poszczególnych prac oraz formułuje wnioski w odniesieniu do każdej z nich. *Dyskusja* nie budzi zastrzeżeń, jest poprowadzona prawidłowo, zrozumiale, obejmuje interpretację i ocenę uzyskanych wyników na tle danych literaturowych. Świadczy o dojrzałości naukowej Kandydatki. Pochwalam i doceniam umiejętność wskazania mocnych i słabych stron własnych badań, co zostało zawarte w rozdziale *Podsumowanie*.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

(układ pracy, jasność stylu, szata graficzna itp.) (25-200 słów):

Rozprawa doktorska została przygotowana prawidłowo i zawiera wszystkie elementy wyszczególnione w wytycznych Rady Wydziału Biologii UJ dotyczące konstrukcji rozprawy doktorskiej przygotowywanej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów. Załączone publikacje naukowe zostały poprzedzone 50-stronicowym opracowaniem podzielonym na rozdziały. Opracowanie rozpoczynają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz publikacji zawartych w rozprawie. *Wstęp* liczy 15 stron i zawiera wprowadzenie w tematykę rozprawy, *hipotezę badawczą*, *cele pracy*, opis modelu badawczego, wykaz związków chemicznych, których wpływ badano wraz z uzasadnieniem ich wyboru, opis przeprowadzonych eksperymentów oraz stosowanych metod analitycznych i statystycznych. W dalszej części Autorka rozprawy krótko opisuje wyniki uzyskane w poszczególnych pracach eksperymentalnych i przedstawia najważniejsze elementy pracy przeglądowej. W prawie 7-stronicowej *Dyskusji*, Pani mgr Eliza Drwał wnikliwie i umiejętnie dyskutuje uzyskane wyniki zestawiając je z danymi dostępnymi w literaturze. Rozdział *Podsumowanie* zawiera uzasadnienie nowatorskiego charakteru badań, wniosek końcowy oraz mocne i słabe strony prezentowanych badań. Dołączono informację o źródłach finansowania badań, oświadczenia współautorów oraz bibliografię liczącą 80 pozycji. W rozprawie pojawiły się drobne błędy gramatyczne (str. 16 użyto „suplementowanej” zamiast „suplementowanego” w odniesieniu do medium), interpunkcyjne (brak przecinka lub niepotrzebne użycie), czy składniowe (str. 35 użyto „Przeprowadzone badania w ramach...” zamiast „Badania przeprowadzone w ramach...”), ale jest ich stosunkowo niewiele i nie wpływają na jakość rozprawy.

W mojej opinii, Pani mgr Eliza Drwał dokonała przejrzystego połączenia artykułów składających się na rozprawę doktorską. Cała rozprawa jest przemyślanym i konsekwentnie realizowanym pomysłem badawczym.

4. Uwagi krytyczne

- 1) Pomimo dobrze napisanego *Wstępu*, brakuje płynnego przejścia od problemu badawczego do postawionej hipotezy i celów badawczych; jako Czytelnik odniosłam wrażenie, jakby cały, w gruncie rzeczy bardzo logiczny wywód zmierzający do uzasadnienia konieczności przeprowadzenia badań urwał się po opisie różnicowania komórek łożyska (str. 13). Zabrakło jednoznacznego wskazania na potrzebę takich analiz.
- 2) Na str. 18 oraz w pracach I i III, Autorka opisuje testy użyte do analizy cytotoksycznego wpływu WWA, w tym analizy żywotności komórek. W mojej opinii każda z tych analiz powinna zawierać kontrolę pozytywną testu. Taka kontrola pokazuje, że ewentualny brak wpływu badanych związków nie jest wynikiem niewłaściwego doboru warunków eksperymentu.
- 3) Nie jest jasne dlaczego cele pracy III były realizowane tylko częściowo przy użyciu kokultury komórkowych. Analizę zawartości steroidów w medium wykonano przy użyciu kokultury, ale już ekspresję receptorów oraz enzymów metabolizmu wykonano w komórkach JEG-3 i BeWo hodowanych jako monokultury.
- 4) Ekspresję mRNA syncytyny-1 w komórkach BeWo hodowanych w obecności forskoliny użyto jako markera różnicowania. Moim zdaniem, należało pokazać obecność białka syncytyny-1, np. metodą barwienia immunofluorencyjnego.

5) Inne drobne uwagi:

- a. na str. 19 Kandydatka wymienia białka analizowane metodą Western blot – zabrakło informacji, że tą metodą analizowano również ekspresję cykliny D1 i A2, kinaz cdk2 i cdk4 oraz białek bax, bcl-xl i kaspazy 3;
- b. zarówno we *Wstępie*, jak i w publikacji II zabrakło szczegółów dotyczących sondy użytej do analizy ekspresji mRNA syncytyny-1 metodą real-time PCR.

5. **Ocena końcowa** (uzasadnienie 25-200 słów):

Rozprawę doktorską Pani mgr Elizy Drwal oceniam jako wartościowe dzieło naukowe zawierające pionierskie wyniki i wnoszące istotny wkład w poszerzenie wiedzy z zakresu biologii rozrodu. Rozprawa wskazuje na dużą wiedzę i odczytanie Kandydatki, co potwierdzone zostało umiejętnym i wyczerpującym prowadzeniem dyskusji wyników własnych w każdej z prac eksperymentalnych, jak i analizą dostępnych danych literaturowych przedstawioną w pracy przeglądowej. Uznanie budzi ważna tematyka i rozbudowany warsztat metodyczny. Postawione przez Kandydatkę cele badawcze zostały zrealizowane, a wyniki poddane krytycznej analizie.

Uwagi zawarte w niniejszej recenzji są zachętą do naukowej dyskusji i nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **Pani mgr Elizy Drwal** spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **Pani mgr Elizy Drwal** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

TAK

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.
Uzasadnienie wniosku (25-200 słów)

TAK

Ze względu na znaczne walory poznawcze rozprawy potwierdzone opublikowaniem wyników w uznanych międzynarodowych czasopismach wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. O wysokiej jakości rozprawy świadczą: aktualna i ważna dla zdrowia ludzi tematyka, przemyślany i logicznie zaplanowany ciąg eksperymentów, szeroki wachlarz metod analitycznych, oryginalność i wysoka wartość merytoryczna uzyskanych wyników.

05.11.2018 r.

data sporządzenia recenzji



podpis recenzenta