



Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt



ul. M. Oczapowskiego 1A, 10-718 Olsztyn, tel. 89-5233201, fax 89-5233937

Olsztyn, 16 listopada 2019 r.

Prof. dr hab. Renata Ciereszko
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii UWM
Olsztyn, ul. Oczapowskiego 1A

Ocena pracy doktorskiej mgr Elizy Drwal

pt. "Określenie mechanizmów działania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych na funkcje łożyska ludzkiego"

Cykl wymienionych poniżej trzech oryginalnych publikacji naukowych oraz jednej pracy przeglądowej (sumaryczny impact factor IF₂₀₁₇₋₂₀₁₉: 10,472; suma punktów MNiSzW₂₀₁₇₋₂₀₁₉: 130), opatrzonych tytułem „Określenie mechanizmów działania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych na funkcje łożyska ludzkiego”, stanowi pracę doktorską Pani mgr Elizy Drwal. We wszystkich tych wielo-autorskich (od 3 do 5 autorów) publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Zgodnie z oświadczeniami dostarczonymi przez współautorów i według własnej oceny przedstawionej w polskojęzycznym opracowaniu tezy doktoratu, Jej udział w powstaniu publikacji był znaczący, w trzech artykułach wynosił 65%, a w jednym 45%. Publikacje cyklu to:

1. Drwal E., Rak A., Grochowalski A., Milewicz T., Gregoraszczyk E. (2017). Cell-specific and dose-dependent effects of PAHs on proliferation, cell cycle and apoptosis protein expression and hormone secretion by placental cell lines. *Toxicology Letters* 280:10-19.

IF₂₀₁₇: 3,166; punkty MNiSW₂₀₁₇: 35; udział Doktorantki: **45%**.

2. Drwal E., Rak A., Gregoraszczyk E. (2018). Co-culture of JeG-3, BeWo and syncBeWo cell lines with adrenal H295R cell line: an alternative model for examining endocrine and metabolic properties of the fetoplacental unit. *Cytotechnology* 70:285-297.

IF₂₀₁₈: 1,461; punkty MNiSW₂₀₁₈: 20; udział Doktorantki: **65%**.

3. Drwal E., Rak A., Gregoraszczyk E. (2019). Differential effects of ambient PAH mixtures on cellular and steroidogenic properties of placental JEG-3 and BeWo cells. *Reproductive Toxicology* 86:14-22.

IF₂₀₁₉: 2,580; punkty MNiSW₂₀₁₉: 35/100; udział Doktorantki: **65%**.

4. Drwal E., Rak A., Gregoraszczyk E. (2019). Review” Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) – action on placental function and health risks in future life of newborns. *Toxicology* 411:133-142. IF₂₀₁₉: 3,265 punkty MNiSW₂₀₁₉: 40/100; udział Doktorantki: **65%**.

W trzech pierwszych pracach, opublikowanych w czasopismach *Journal Citation Reports* z listy (*JCR*) ze współczynnikiem wpływu (IF, *impact factor*) mieszczącym się w zakresie od 1,461 do 3,166, Doktorantka przedstawiła wyniki swoich badań poświęconych działaniu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w komórkach łożyska człowieka. Związki te (dwa lub więcej pierścieni aromatycznych, bez podstawników) powstają w czasie niecałkowitego spalania materiałów zawierających węgiel i wodór np. węgla, ropy naftowej, drewna, polipropylenu czy polistyrenu a także spalania odpadów domowych i przemysłowych. Wydzielają się w czasie palenia papierosów, produkcji asfaltu, pracy pieców koksowniczych. Są także obecne w spalinach samochodowych, a po zmieszaniu z cząsteczkami pary wodnej stają się częścią smogu. Do organizmów dostają się z powietrzem, pokarmem i przez skórę. Wśród ponad 200 znanych obecnie WWA, wiele uważanych jest za kancerogeny; mutagenne mogą być także metabolity tych WWA, które same nie wykazują takich właściwości. Zdecydowana większość dotychczasowych badań związanych z WWA dotyczyła jednego węglowodoru – benzo(a)pyrenu (BaP). W recenzowanej pracy doktorskiej badane są WWA inne niż BaP, ponadto, analizowane są również mieszaniny tych węglowodorów. Substancje toksyczne są szczególnie szkodliwe w okresie rozwoju młodych organizmów, wpływając na rozwój płodu zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio, przyczyniając się do pojawienia się takich patologii jak rzucawka, wewnątrzmaciczne ograniczenie wzrostu płodu (IUGR) czy zaburzenia rozwojowe płodu. Z tych powodów zagadnienia poruszane przez Doktorantkę w Jej pracy doktorskiej są jak najbardziej aktualne i warte zainteresowania. Głównym modelem w badaniach Pani magister były dwie linie komórkowe wyprowadzone z ludzkich trofoblastów: linia JEG-3 (model cytotrofoblastu zewnętrznego) i linia BeWo (model cytotrofoblastu wewnętrznego) oraz wyprowadzona z komórek raka kory nadnerczy linia H295R. Linie te stanowią dobre modele *in vitro* w badaniach biomedycznych i toksykologicznych. Czwarta publikacja cyklu jest pracą przeglądową i podsumowuje aktualną wiedzę na temat wpływu WWA na funkcje łożyska.

OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

W pierwszej z powyższych publikacji opisano wpływ czterech WWA (naftalen, fenantren, antracen i pyren) i ich dwóch mieszanin na żywotność (aktywność enzymów mitochondrialnych), proliferację, integralność błon komórkowych, aktywność lizosomalną komórek i steroidogenezy, a także ekspresję wybranych białek związanych z regulacją apoptozy i cyklu komórkowego w komórkach linii JEG-3 i linii BeWo. W tym doświadczeniu zmierzono również we krwi i łożyskach 20 kobiet stężenie 16 WWA uznanych przez Komisję Europejską i amerykańską EPA za priorytetowe. Na tej podstawie, do dalszego etapu badań wybrano cztery w/w WWA, wykazujące najwyższe stężenia w analizowanych tkankach. Oprócz badania

wpływu każdego z czterech węglowodorów osobno, analizowano również wpływ mieszaniny tych czterech związków w dwóch różnych stężeniach. W mieszaninie nr 1 (Mix 1) zastosowano stężenia wykryte we krwi matek (~2-10 razy wyższe stężenia w porównaniu ze stężeniami łożyskowymi), a w mieszaninie nr 2 (Mix 2) użyto stężeń, które zostały oznaczone w łożyskach (niższe stężenia). Stężenia WWA w badanych mieszaninach nie były cytotoksyczne (test dehydrogenazy mleczanowej [LDH]) i nie wpływały na proliferację komórek (test AlamarBlue) obu badanych linii. Wyniki porównawczych analiz pozostałych parametrów wskazują, że: i/ komórki JEG-3 są bardziej wrażliwe na działanie WWA niż komórki BeWo, ii/ stężenia WWA charakterystyczne dla łożysk (niższe stężenia) są bardziej efektywne niż stężenia „matczyne” (wyższe stężenia), a iii/ dłuższy czas hodowli (72 godz.) daje bardziej wyraziste efekty niż krótszy (24 godz.). Na uwagę zasługuje stymulacja aktywności mitochondrialnej przez „łożyskowe stężenia” trzech pojedynczo stosowanych WWA tj. antracenu, fenantrenu i pyrenu w komórkach BeWo hodowanych przez 72 godziny przy zauważonym hamującym działaniu mieszaniny nr 2 na tę aktywność. Proszę Doktorantkę o przedstawienie swojej opinii na temat potencjalnych molekularnych mechanizmów leżących u podstaw takiego zjawiska. Interesujący jest także obserwowany w komórkach JEG-3 hamujący wpływ fenantrenu (w „łożyskowych” stężeniach) i naftalenu (w „matczyńskich stężeniach”) na sekrecję progesteronu (P4) oraz pyrenu (w „łożyskowych” stężeniach) i Mix 2 na sekrecję estradiolu (E2) przez komórki JEG-3, czemu towarzyszyło inhibujące działanie „łożyskowych” stężeń WWA na ekspresję enzymów steroidogenezy. Badane czynniki nie wpływały na sekrecję hormonów steroidowych w komórkach BeWo. Ponadto, „łożyskowe” stężenia wszystkich badanych WWA zmniejszały ekspresję proapoptotycznego białka Bax w komórkach JEG-3 i zwiększały tę ekspresję w komórkach BeWo. Interpretację części uzyskanych wyników utrudniają niezgodności w opisie cech dwóch badanych linii komórkowych. Przykładowo, na stronie tytułowej publikacji nr 1 (abstrakt graficzny) i na stronach 11 i 18 tej publikacji, komórki JEG-3 są opisane jako komórki cytotrofoblastu kosmówkowego, a komórki BeWo jako komórki cytotrofoblastu pozakosmówkowego. W podobny sposób komórki te są opisane w publikacji nr 2 na stronie 295 i publikacji nr 3 na stronie 19. Przeciwnie, w publikacji nr 2 na stronie 286 i w publikacji nr 3 na stronie 14 jest napisane, że komórki BeWo reprezentują łożyskowe komórki kosmówkowe, a komórki JEG-3 reprezentują komórki pozakosmówkowe. Proszę więc o wyjaśnienie tej kwestii w trakcie obrony pracy doktorskiej a także o omówienie podobieństw i różnic istniejących między liniami JEG-3 i BeWo, a następnie, w oparciu o to istotne uzupełnienie, proszę spróbować wyjaśnić niektóre z otrzymanych różnic w reakcji komórek tych linii na dodane do hodowli WWA.

Celem drugiej publikacji cyklu było porównanie wybranych endokrynych i biochemicznych cech trzech linii wyprowadzonych z komórek ludzkiego trofoblastu różniących się m.in. stopniem zróżnicowania co mogłoby pomóc ocenić ich przyszłą przydatność do określonego typu badań. W opisywanym doświadczeniu porównywano nie tylko pojedyncze linie komórkowe, ale także wspólne hodowle tych linii z komórkami H295R (tzw. kokultury) wyprowadzonymi z komórek raka nadnerczy, produkującymi

androgeny. Ponieważ komórki łożyskowe nie mają zdolności do produkcji androgenów, takie kokultury lepiej odzwierciedlają funkcjonowanie jednostki płodowo-łożyskowej. Badanymi parametrami była sekrecja P4, E2 i ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej (hCG) przez porównywane komórki oraz ekspresja białek enzymów steroidogenezy (3 β -hydroksysteroidowa dehydrogenaza [3 β HSD], aromataza [P450arom]), receptorów hormonów steroidowych (progesteronowego [PR] i estrogenowych [ER α , ER β]), a także białek związanych z mechanizmem działania węglowodorów aromatycznych (receptor węglowodorów aromatycznych [AhR], cytochrom P450 1A1 [CYP1A1], katecholo-o-metylotransferaza [COMT]) w tych komórkach. Niezależnie od opisanych w pracy podobieństw i różnic między badanymi liniami, w mojej opinii, szczególnie interesujące jest to, jak dodanie komórek H295R (które może być w uproszczeniu interpretowane jako dodanie androgenów) do komórek linii łożyskowych wpływa na analizowane w pracy parametry. Tak więc dodanie androgenów powodowało wzrost sekrecji P4 przez kokultury H295R z komórkami JEG-3 i BeWo we wszystkich czasach hodowli oraz spadek sekrecji P4 przez kokulturę z komórkami syncBeWo (48- i 96-godz. hodowle). W większości przypadków wspólna hodowla komórek łożyskowych z komórkami nadnerczy owocowała wzrostem syntezy E2, szczególnie widocznym w 72 godzinie hodowli, w stosunku do hodowli komórek reprezentujących pojedyncze linie. Te zmiany w sekrecji hormonów steroidowych nie były wsparte zmianami w ekspresji białek 3 β HSD i P450arom. Nie jest wykluczone, że wyniki byłyby inne gdyby badano aktywność enzymów a nie ich ekspresję. Jestem ciekawa opinii Doktorantki na temat obserwowanych różnic we wpływie androgenów na sekrecję progesteronu i hCG przez komórki linii łożyskowych. Obniżona sekrecja P4 w kokulturach komórek syncBeWo i H295R (Fig. 2ACE) nie może być raczej tłumaczona wzrostem sekrecji E2 w badanym układzie, ponieważ taki wzrost miał miejsce także w kokulturach linii nadnerczowej z komórkami JEG-3 i BeWo (Fig. 3ACE). Wyjaśnienia nie dostarczają także zmiany w ekspresji PR, ponieważ hamujący wpływ dodania komórek H295R na ekspresję PR był obserwowany zarówno w kokulturach z komórkami syncBeWo, jak i BeWo (Fig. 5ABC). Może w interpretacji wyników pomogłaby znajomość różnic w – nie analizowanej w pracy – ekspresji receptora androgenowego w komórkach linii łożyskowych. Jeśli zaś chodzi o zmiany w sekrecji hCG, to efekt kokultury był inny w przypadku każdej z badanych linii łożyskowych: i/ brak wpływu w kokulturach z komórkami JEG-3, ii/ stymulacja w kokulturach z komórkami BeWo, i iii/ hamowanie w kokulturach z komórkami syncBeWo (Fig. 4).

W trzeciej publikacji stanowiącej rozprawę doktorską przedstawiono wyniki doświadczenia, w którym porównywano wpływ dwóch mieszanin 16 WWA, tzn. Mix 1 i Mix 2, na proliferację komórek linii JEG-3 i linii BeWo oraz na ekspresję białek AhR, ER α , NF κ B (receptory i/lub czynniki transkrypcyjne), CYP1A1, CYP1B1 i COMT (enzymy I i II fazy biodegradacji) w tych komórkach. Ponadto, badano także wpływ tych mieszanin na sekrecję P4, E2, estronu (E1) i estriolu (E3) przez wspólne hodowle komórek linii łożyskowych z komórkami H295R. Badane mieszaniny zostały utworzone w podobny sposób jak opisano w publikacji pierwszej, z tą różnicą, że tam w skład mieszanin wchodziły 4 WWA, a w tej publikacji w każdej

mieszanie jest 16 WWA. Zarówno Mix 1, jak i Mix 2 zwiększały proliferację komórek JEG-3 oraz ekspresję białek enzymów odpowiedzialnych za biodegradację ksenobiotyków w tych komórkach i zmniejszały te parametry w komórkach BeWo. Działanie węglowodorów na badane czynniki transkrypcyjne było bardziej zróżnicowane i trudne do jednoznacznego zdefiniowania, z reguły jednak działanie to w linii JEG-3 było przeciwne do działania w linii BeWo. Z kolei, w żadnym z badanych układów Mix 1 i Mix 2 nie wpływały na sekrecję hormonów steroidowych. Przy interpretacji tego ostatniego wyniku, pragnęłabym zauważyć, że różnice w sekrecji P4 i estrogenów między tym doświadczeniem i doświadczeniem opisanym w publikacji nr 1 (gdzie zanotowano wpływ na sekrecję steroidów) mogą wynikać nie tylko z różnej liczby WWA (16 vs. 4), jak to przedstawiono i w publikacji, i w polskojęzycznym opracowaniu, ale także z tego, że w jednym przypadku mierzono ten parametr w monokulturach (JEG-3 lub BeWo), a w drugim w kokulturach (JEG-3+H295R lub BeWo+H295R). Druga uwaga, która mi się narzuciła przy czytaniu tej pracy wiąże się z obserwowanym stymulacyjnym wpływem mieszaniny 1 i 2 na ekspresję CYP1A1 i CYP1B1 w komórkach JEG-3 i hamującym wpływem tych mieszanin na ekspresję obu CYPów w komórkach BeWo. Ponieważ Doktorantka nie mierzyła w swoim doświadczeniu stężenia metabolitów badanych WWA, byłabym ostrożniejsza w tworzeniu hipotez na temat ewentualnej akumulacji czy powstawania metabolitów. Tym bardziej, że powodem zwiększonej ekspresji CYP1A1 w komórkach może być na przykład zablokowanie wyjścia ksenobiotyku z centrum aktywnego cytochromu i/lub nie utworzenie się odpowiedniego kanału wyjścia.

W pracy przeglądowej, Doktorantka dokonała próby podsumowania aktualnej wiedzy na temat wpływu WWA na funkcjonowanie łożyska. Na początku przedstawiła wartości stężeń WWA jakie zostały znalezione w tkankach i płynach biologicznych ludzi i zwierząt. Następnie, opisała mechanizm działania WWA w komórkach łożyska oraz wpływ WWA na tworzenie się łożyska, łożyskową angiogenezę i rozwój płodu. Na końcu opisała zagadnienia związane z transdukcją sygnału indukowaną przez WWA w łożysku oraz konsekwencje działania WWA w życiu postnatalnym.

OMÓWIENIE OPRACOWANIA W JEZYKU POLSKIM

Opracowanie w języku polskim, towarzyszące publikacjom stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr Elizy Drwal, obejmuje 50 stron, w tym streszczenie w j. polskim i w j. angielskim, wykaz publikacji, wstęp, hipotezę i cele badawcze oraz część metodyczną, podsumowanie wyników otrzymanych w każdej z publikacji, a także ich krótką dyskusję zakończoną podsumowaniem i bibliografią (80 pozycji).

Opracowanie to zawiera również informacje na temat finansowania badań i oświadczenia współautorów, z których wynika, że udział Doktorantki w omawianych publikacjach był dominujący. Część metodyczna opis modelu badawczego, przedstawia badane związki, i stosowane metody oraz układ doświadczenia w każdym z trzech artykułów oryginalnych. W ogólnym zarysie, treść poszczególnych części polskojęzycznego opracowania jest zgodna z zawartością publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Bardzo brakowało mi

w Opracowaniu krótkiej chociażby charakterystyki linii komórkowych BeWo i JEG-3, zawierającym między innymi jednoznaczne wyjaśnienie które komórki łożyska ludzkiego te linie najbardziej przypominają. Dostarczyłoby to szerszej perspektywy dla wyników prezentowanych w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską i ułatwiłoby ich percepcję. Ponadto, według mnie, polski tytuł rozprawy zawiera błąd frazeologiczny: możemy mówić o wpływie WWA na funkcje łożyska lub mechanizmie działania WWA w komórkach łożyska, ale nie o mechanizmie działania czegokolwiek na funkcje łożyska.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu "Oceny pracy" należy stwierdzić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki wzbogacają naszą wiedzę w nowe informacje na temat działania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w komórkach łożyska ludzkiego. Wartość ocenianej rozprawy polega na tym, że podejmuje ona problematykę związaną ze związkami, które powszechnie występują w środowisku człowieka i jego tkankach i które wykazują u ludzi i zwierząt działania teratogenne i kancerogenne. Działanie ksenobiotyków jest szczególnie niebezpieczne dla organizmów rozwijających się, dlatego łożysko jako narząd o istotnym wpływie na płód jest doskonałym modelem dla tego typu badań. Należy też zauważyć, że zdecydowana większość dotychczasowych badań nad działaniem WWA w organizmach żywych dotyczyła BaP, a w swojej pracy, Pani mgr Eliza Drwal badała wpływ nie pojedynczego związku, ale kilku lub kilkunastu WWA jednocześnie, przybliżając swój model doświadczalny do realnie występujących sytuacji; co więcej badała działanie WWA w stężeniach występujących w ludzkich tkankach. Także zastosowanie kokultur komórek łożyskowych – niezdolnych do produkcji androgenów – z komórkami linii nadnerczowej – produkującymi DHEA i DHEAS – przyczyniło się do powstania modelu badawczego lepiej odzwierciedlającego rzeczywistość. Oceniana rozprawa nie tylko dostarcza nowych danych, ale również prezentowane tu wyniki stanowią podstawę do dalszych badań, zmierzających, w dalszej perspektywie, do pełnego poznania oddziaływania aromatycznych węglowodorów na łożysko i płód.

W ocenianej pracy Doktorantka wykazała się dobrym opanowaniem pracy laboratoryjnej i całego warsztatu badawczego. W doświadczeniach przedstawionych w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską Pani mgr Elizy Drwal wykorzystano takie klasyczne metody jak chromatografia gazowa i spektrometria mas, hodowle komórkowe (monokultury i kokultury), testy żywotności i proliferacji komórek, test cytotoksyczności i aktywności lizosomalnej, Western blotting, ELISA oraz real-time PCR. Przygotowując publikacje do druku, musiała też wykazać się zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka posiada cechy tak ważne w pracy badawczej jak pracowitość i wytrwałość.

Rola recenzenta rozprawy doktorskiej prezentowanej jako zbiór opublikowanych już artykułów naukowych nie jest jednoznaczna. Przed opublikowaniem, artykuły naukowe musiały być recenzowane

przez co najmniej dwóch recenzentów wybieranych przez redaktora czasopisma naukowego spośród światowych ekspertów w danej dziedzinie. Wszystkie doświadczenia ocenianej rozprawy zostały opisane w czterech pracach opublikowanych w czasopismach naukowych z listy JCR. Z tego powodu, prezentowane powyżej uwagi i pytania są jedynie moim głosem w dyskusji nad interpretacją i znaczeniem otrzymanych przez Doktorantkę wyników. Przyczyni się to, mam nadzieję, do rozszerzenia dyskusji tychże wyników, która to dyskusja z reguły jest ograniczona pojemnością pojedynczego artykułu naukowego i nie może obejmować wszystkich aspektów badanego problemu.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny praca pt. "Określenie mechanizmów działania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych na funkcje łożyska ludzkiego" spełnia wymagania – określone w aktualnie obowiązującej Ustawie o Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych – stawiane pracom doktorskim i w związku z powyższym **zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Elizy Drwał do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Renata Cienciel