

Prof. dr hab. inż. Anna Hrabia  
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt  
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt  
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków  
Tel.: 662-40-47; anna.hrabia@urk.edu.pl

Kraków, 05.08.2021 r.

### **Recenzja rozprawy doktorskiej**

**mgr Justyny Gogoli-Mruk**

pod tytułem

### **"Molekularny mechanizm działania egzogennych związków hormonalnie czynnych w biologii ludzkich ziarniszczyków jajnika"**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Anny Ptak, profesora UJ, dotyczy aktualnego problemu naukowego i aplikacyjnego jakim jest poznanie biologii ziarniszczyków jajnika oraz udziału zakumulowanych w płynie pęcherzykowym kobiet, wybranych trwałych zanieczyszczeń środowiska, będących związkami zaburzającymi funkcje endokryne, w progresji tych nowotworów. Badania zrealizowano w ramach projektu badawczego OPUS 11 (2016/21/B/NZ7/01080) finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Rozprawa składa się z ośmiu rozdziałów obejmujących Streszczenie (3 strony), Streszczenie w języku angielskim (3 strony), Wykaz publikacji zawartych w rozprawie doktorskiej (1 strona), Wstęp (16 stron), Publikacje (60 stron), Oświadczenia współautorów (4 strony), Dyskusję (11 stron) i Bibliografię (123 pozycje).

We Wstępie Autorka jasno wprowadza czytelnika w temat, krótko omawiając pochodzące ze środowiska związki zaburzające funkcje endokryne (EDCs), źródła narażenia, oraz charakteryzuje te, które występują w największym stężeniu w płynie pęcherzykowym i mogą mieć wpływ na funkcje komórek pęcherzyka jajnikowego i rozwój czy progresję nowotworów. Następnie dokonuje przeglądu dotychczasowej wiedzy na temat ziarniszczyków jajnika, ścieżek sygnałowych w tych nowotworach i molekularnego mechanizmu działania EDCs, takich jak związki perfluorowane, tj. kwas perfluorooktanowy (PFOA) i sulfonian perfluorooktanu (PFOS), pestycydy takie jak 2,2-

dichlorodifenylodichloroetylen (p,p'-DDE) i heksachlorobenzen (HCB) oraz polichlorowane bifenyle w tym kongener 153 (PCB153). Te dane dały podstawę do sprecyzowania hipotezy badawczej zakładającej, że *"trwale zanieczyszczenia środowiska, należące do EDCs, zakumulowane w płynie pęcherzykowym jajnika kobiet, działając poprzez bezpośrednią aktywację receptorów estrogenowych (ER $\alpha$ , ER $\beta$  lub GPR30) i/lub receptora insulino-podobnego czynnika wzrostu 1 (IGF1R), a także działając pośrednio poprzez zmiany sekrecji estradiolu (E2) i/lub IGF1, wpływają na progresję raka jajnika, wywodzącego się z komórek ziarnistych"*, a także uzasadnienia cele podjętych badań. Autorka formułuje cztery cele:

1. *Określenie czy mieszanina trwałych zanieczyszczeń środowiska, należących do EDCs (PFOA, PFOS, p,p'-DDE, HCB i PCB153) w dawkach odzwierciedlających ich poziom w płynie pęcherzykowym stymuluje bezpośrednio progresję ziarniszczków jajnika poprzez wpływ na proliferację, angażując w to działanie receptory estrogenowe i/lub IGF1R.*

2. *Określenie czy mieszanina wpływa na procesy migracji oraz inwazji związane ze zdolnością do tworzenia przerzutów, aktywując ścieżki sygnałowe dla receptorów estrogenowych i/lub IGF1R, przyczyniając się bezpośrednio do progresji ziarniszczków jajnika.*

3. *Zbadanie czy mieszanina, poprzez wpływ na sekrecję E2 (jednego z markerów diagnostycznych ziarniszczków jajnika manifestującego wczesne objawy choroby), angażując receptory estrogenowe i/lub IGF1R, pośrednio przyczynia się do progresji tego nowotworu.*

4. *Zbadanie czy mieszanina, wykorzystując receptory estrogenowe i/lub IGF1R, może działać w sposób pośredni na progresję raka poprzez wpływ na sekrecję IGF1 przez ziarniszczaki jajnika, który jest opisanym czynnikiem mitogennym.*

Dalej we Wstępie, w podrozdziałach zatytułowanych "Model badawczy" i "Zadania badawcze", Doktorantka charakteryzuje zastosowane w badaniach linie komórek nowotworowych (COV434 reprezentującą formę młodzieńczą i KGN reprezentującą formę dojrzałą ziarniszczaka jajnika), linię komórek granulozy (HGrC1; kontrolną) i linię komórek endotelialnych naczyń limfatycznych (HLEC), a także podaje stosowane stężenia badanych związków zaburzających funkcje endokrynne i ich mieszanin takich jak PFOA, PFOS, p,p'-DDE, HCB i PCB153 oraz zastosowane inhibitory receptorów estrogenowych, receptora

IGF1R i receptora aktywowanego proliferatorami peroksosomów gamma (PPAR $\gamma$ ). W celu weryfikacji założonej hipotezy i realizacji ambitnych celów, Autorka precyzyjnie zaplanowała i wykonała z sukcesem 8 zadań badawczych, w których określiła: (1) wpływ pojedynczych EDCs oraz ich mieszanin na proces proliferacji ziarniszcaków jajnika, (2) molekularny mechanizm działania mieszaniny EDCs na proliferację ziarniszcaków jajnika, (3) wpływ pojedynczych związków EDCs oraz ich mieszanin na proces migracji oraz inwazji ziarniszcaków jajnika, (4) molekularny mechanizm działania mieszaniny EDCs w procesach migracji oraz inwazji ziarniszcaków jajnika, (5) rolę pojedynczych związków EDCs oraz ich mieszanin na poziom estradiolu wydzielanego przez ziarniszcaki jajnika, (6) molekularny mechanizm działania mieszaniny EDCs na sekrecję E2 przez ziarniszcaki jajnika, (7) sekrecję IGF1 przez ziarniszcaki jajnika pod wpływem pojedynczych EDCs oraz ich mieszanin i (8) molekularny mechanizm działania mieszaniny EDCs na sekrecję IGF1 przez ziarniszcaki jajnika.

Cały rozdział jest bardzo starannie przygotowany, a zamieszczone ryciny i tabele ułatwiają zrozumienie omawianej tematyki czy odnalezienie odpowiednich informacji. Jedna moja uwaga techniczna: należało "Model badawczy" i "Zadania badawcze" podać jako odrębne rozdziały, a nie podrozdziały we Wstępie lub jako jeden rozdział "Materiały i metody".

W badaniach przeprowadzonych *in vitro* zastosowano szeroki wachlarz nowoczesnych i pracochłonnych metod badawczych w tym immunoenzymatyczną do oznaczenia stężenia cAMP, estradiolu i jego metabolitów oraz IGF1, Western blot do oznaczania ekspresji 16. różnych białek, qRT-PCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem sond TaqMan do oznaczenia ekspresji 22. rodzajów genów na poziomie mRNA, test fluorescencyjny CCID (*ang.: Circular Chemorepellent-Induced Defects*) do pomiaru zdolności przechodzenia komórek ziarniszcaków do naczyń limfatycznych, testy rany i inwazji do analizy migracji i inwazji komórek, testy luminescencyjne do określenia aktywności kaspazy 3/7, aromatazy i metaloproteinazy 2, a także przeprowadzono wyciszenie genów za pomocą małego interferującego RNA, oraz analizowano proliferację komórek. Doświadczenia zostały precyzyjnie zaplanowane i wykonane.

Kolejny rozdział to reprodukcje czterech publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i dodane po każdej z nich krótkie podsumowanie zawierające cel pracy, najważniejsze wyniki, wnioski i rycinę obrazującą wykazany mechanizm działania mieszaniny badanych EDCs w komórkach ziarniszcaków jajnika. Wchodzące w skład

rozprawy oryginalne prace naukowe zostały opublikowane w latach 2019-2021 w prestiżowych czasopismach, tj. *Chemosphere*, *Toxicology*, *Molecular and Cellular Endocrinology* i *Toxicology In Vitro*. Cytowania tych prac można już znaleźć w literaturze światowej, co świadczy o ich wysokim poziomie naukowym. Sumaryczna liczba punktów według listy MNiSW z grudnia 2019 r. wynosi 400, a łączny aktualny IF = 17,601. Pani mgr Justyna Gogola-Mruk jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach, a jej udział w ich przygotowaniu jest wiodący, wynosi 60 lub 65%, co potwierdzają stosowne oświadczenia dwóch lub trzech współautorów. Ze względu na fakt, że przedstawione do recenzji prace były już oceniane przez co najmniej ośmiu recenzentów oceniam je w aspekcie poznawczym i jako wkład w rozwój dyscypliny naukowej.

W pierwszej publikacji badano wpływ mieszaniny EDCs na proliferację ziarniszczków jajnika i analizowano ścieżki sygnałowe receptorów estrogenowych i IGF1R oraz ich potencjalne zaangażowane w mediowanie działania mieszanin. Wykazano między innymi iż odpowiedź dojrzałego typu ziarniszczaka jajnika na działanie mieszanin jest wyższa niż typu młodzieńczego, co jest wynikiem różnic w ekspresji klasycznych receptorów estrogenowych i receptora IGF1R. Z kolei mieszanina EDCs aktywując ścieżki sygnałowe błonowego receptora estrogenowego GPR30 oraz IGF1R stymuluje proliferację ziarniszczków jajnika bezpośrednio przyczyniając się do progresji tego nowotworu.

W drugiej pracy udokumentowano wpływ mieszanin EDCs na proces migracji i inwazji ziarniszczków jajnika, stanowiących istotny etap tworzenia przerzutów nowotworowych. Stwierdzono, że mieszanina EDCs stymuluje migrację i inwazję dojrzałego typu ziarniszczaka jajnika, zwiększając ekspresję oraz aktywność metaloproteinazy 2 przez ścieżkę sygnałową receptora IGF1R, co bezpośrednio prowadzi do progresji tego nowotworu. Ponadto wykazano, że linia COV434 reprezentująca typ młodzieńczy ziarniszczaka jajnika, charakteryzujący się lepszymi rokowaniami, nie posiada zdolności migracyjnych i inwazyjnych oraz nie jest "wrażliwa" na działanie mieszaniny EDCs w tych procesach.

W kolejnej pracy wykazano między innymi, że mieszanina EDCs aktywując ścieżki sygnałowe receptorów estrogenowych ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ , GPR30) zwiększa sekrecję estradiolu przez dojrzały typ ziarniszczaka jajnika, co może prowadzić do powstania zaburzeń towarzyszących, takich jak endometrioza czy rak endometrium. Z kolei w młodzieńczym typie ziarniszczaka, charakteryzującym się większym potencjałem metabolicznym estradiolu w porównaniu do typu dojrzałego, mieszanina EDCs obniża sekrecję estradiolu, przez co maskuje wczesne objawy towarzyszące temu nowotworowi i prowadzi do opóźnienia

zdiagnozowania choroby. Zatem mieszanina EDCs zaburzając sekrecję estradiolu przez ziarniszczeniaki jajnika przyczynia się poórednio do progresji tego nowotworu.

W czwartej publikacji okreóono wpływ mieszaniny EDCs na sekrecję IGF1 przez komórki ziarniszczeniaków jajnika oraz wskazano molekularny mechanizm zaangażowany w to działanie. Wykazano po raz pierwszy, zdolność ziarniszczeniaków jajnika do sekrecji IGF1. Ponadto stwierdzono, że mieszanina EDCs, aktywując szlak sygnałowy ER $\alpha$ , zwiększa sekrecję IGF1 (czynnika mitogennego) przez komórki KGN reprezentujące dojrzaly typ ziarniszczeniaka jajnika, prowadząc poórednio do progresji raka oraz przyczyniając się do zwiększenia proliferacji prawidlowych komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego.

Przedstawione prace badawcze zostały zaopatrzone dodatkowo wspólną dyskusją, która jest napisana bardzo dobrze, w logiczny sposób przedstawia analizę wszystkich uzyskanych wyników, porównanie ich z danymi zawartymi w aktualnym ówiatowym piósmiennictwie w sposób wyczerpujący, co wskazuje na pełną znajomość tematu przez Doktorantkę. Dodane podsumowujące ryciny, przedstawiające bezpośredni i poóredni mechanizm działania mieszaniny EDCs w komórkach ziarniszczeniaków jajnika, ułatwiają zrozumienie omawianych problemów naukowych. Trudne i złożone zagadnienia Autorka przedstawiła w prosty i przejrzysty sposób. Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto 7 wniosków odpowiadających na postawione cele. Uzyskane dane wnoszą nowe informacje, pozwalające lepiej zrozumieć biologię ziarniszczeniaków jajnika oraz wyjaśniają bezpośrednie i poórednie mechanizmy działania mieszanin EDCs w komórkach dwóch typów ziarniszczeniaków jajnika, w tym zaangażowanie receptorów estrogenowych i receptora IGF1R w proliferację, migrację, inwazję oraz sekrecję hormonów. Należy podkreólić, że uzyskane wyniki mają nie tylko istotny wkład w aktualny stan wiedzy, ale także mogą mieć znaczenie praktyczne dla opracowania strategii leczenia ziarniszczeniaków jajnika. Szkoda, że po omówieniu własnych wyników, Doktorantka nie postawiła pytań, stanowiących swoisty drogowskaz dla przyszłych badań w omawianym temacie. Zachęcam Autorkę do wyjaśnienia podczas obrony rozprawy doktorskiej, czy przewiduje dalsze badania, których celem będzie ustalenie kolejnych dotychczas niezbadanych mechanizmów progresji ziarniszczeniaków jajnika.

Podsumowując, przedstawioną do oceny rozprawę oceniam bardzo wysoko. Jest ona obszernym i wszechstronnym opracowaniem zawierającym oryginalne wyniki co potwierdza ich opublikowanie w bardzo dobrych czasopismach naukowych o wysokim IF. Autorka wykazała duże predyspozycje i umiejętność wykorzystywania różnorodnych technik badawczych, znajomość przedmiotowego piósmiennictwa, opracowania i prezentacji wyników,

poprawnego wnioskowania i przygotowywania publikacji do druku co predysponuje Ją do dalszej pracy naukowej.

Z pełnym przekonaniem uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska i indywidualny wkład Kandydatki w powstanie tej pracy spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami) i przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Justyny Gogoli-Mruk do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ze względu na wysoką wartość merytoryczną rozprawy, oryginalność uzyskanych wyników, doskonale ich zaprezentowanie i opublikowanie w czasopismach o światowym zasięgu, przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie wniosek o wyróżnienie pracy doktorskiej.

A handwritten signature in purple ink, consisting of a stylized first name and a last name with a flourish.