



Prof. dr hab. Renata Ciereszko

12 października 2020 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr Karoliny Zajdy

pt. "Określenie mechanizmu działania mieszaniny węglowodorów aromatycznych (WWA) w prawidłowych i nowotworowych komórkach warstwy ziarnistej"

Praca doktorska Pani mgr Karoliny Zajdy składa się z trzech oryginalnych publikacji naukowych (sumaryczny impact factor IF: 9,648; suma punktów MNiSzW: 270), opatrzonych wspólnym tytułem „Określenie mechanizmu działania mieszaniny węglowodorów aromatycznych (WWA) w prawidłowych i nowotworowych komórkach warstwy ziarnistej”. Doktorantka opublikowała wyniki swoich badań, poświęconych działaniu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w komórkach ziarnistych człowieka, w czasopiśmie z listy *Journal Citation Reports (JCR)* ze współczynnikiem wpływu (IF, *impact factor*) mieszczącym się w zakresie od 2,171 do 3,908. We wszystkich trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Zgodnie z oświadczeniami dostarczonymi przez współautorów tych publikacji – a jest ich w poszczególnych publikacjach, odpowiednio, siedmiu, czterech i dwóch – Jej udział w powstaniu publikacji był znaczący i wynosił od 55% do 85%. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Zajdy to:

1. Zajda K., Ptak A., Rak A., Fiedor E., Grochowalski A., Milewicz T., Gregoraszcuk EL. (2017). Effects of human blood levels of two PAH mixtures on the AhR signalling activation pathway and CYP1A1 and COMT target genes in granulosa non-tumor and granulosa tumor cell lines. *Toxicology* 389:1-12. IF: 3,908; punkty MNiSW: 35/100; udział Doktorantki: **55%**.
2. Zajda K., Rak A., Ptak A., Gregoraszcuk EL. (2019). Compounds of PAH mixtures dependent interaction between multiple signaling pathways in granulosa tumour cells. *Toxicology Letters* 310:14-22. IF: 3,569; punkty MNiSW: 100; udział Doktorantki: **60%**.

3. Zajda K., Gregoraszczyk EL (2020). Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons mixture, in human blood levels, decreased oestradiol secretion by granulosa cells *via* *ESR1* and *GPER1* but not *ESR2* receptor. *Human and Experimental Toxicology* 39:276-289.
IF: 2,171; punkty MNiSW: 70; udział Doktorantki: **85%**.

Do WWA zalicza się związki organiczne, które zbudowane są z dwóch lub z większej liczby sprzężonych ze sobą pierścieni aromatycznych. Związki te powstają w czasie niepełnego spalania materii organicznej w procesach naturalnych (pożary lasów, wybuchy wulkanów), ale przede wszystkim w procesach antropogenicznych. Do tych ostatnich procesów zaliczamy spalanie paliw kopalnianych (węgla i ropy naftowej); WWA powstają w elektrowniach, hutach, koksowniach i ciepłowniach. Źródłem emisji WWA jest także spalanie paliw w silnikach samochodowych oraz palenie odpadów domowych i przemysłowych. WWA wydzielane są również w czasie produkcji asfaltu czy palenia papierosów; po zmieszaniu z cząsteczkami pary wodnej związki te stają się częścią smogu. Wreszcie, produkowane są one w czasie obróbki termicznej żywności – w czasie pieczenia, wędzenia, grillowania czy prażenia. WWA są trwałymi i wszechobecnymi zanieczyszczeniami środowiskowymi, występują w powietrzu, glebie i wodzie. W Polsce w większości województw (wyjątek to województwa: lubelskie i podlaskie) zanotowano ilości WWA znacznie przekraczające dopuszczalne normy. Do organizmów zwierzęcych dostają się przede wszystkim z pokarmem i wdychanym powietrzem. Wśród ok. 200 znanych obecnie WWA (licząc tylko te, w cząsteczkach których nie występują podstawniki), wiele to związki toksyczne, mutagenne i kancerogenne. Te szkodliwe działania są najprawdopodobniej związane ze zdolnością lipofilnych WWA do akumulacji w organizmach żywych i do stymulacji komórkowej syntezy reaktywnych form tlenu (ROS), które to formy uszkadzają cząsteczki kwasów nukleinowych i białek. Ponadto, WWA, w wyniku metabolicznej aktywacji przez enzymy detoksykacyjne mogą być przekształcane do epoksydów i ich dioli, zdolnych do tworzenia aduktów DNA, co sprzyja powstawaniu zmian nowotworowych. Zdecydowana większość dotychczasowych badań nad WWA dotyczy tylko jednego węglowodoru, tzn. benzo(a)pyrenu (BaP). Ekspozycja na BaP jest silnie związana z występowaniem kilku chorób o naturze metabolicznej, zapalnej i nowotworowej, takich jak na przykład rak płuc i miażdżycę tętnic. Jednak danych na temat działania innych niż BaP wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych jest znacznie mniej; podobnie, niewiele jest informacji dotyczących mechanizmu działania WWA w żeńskim układzie rozrodczym ssaków, jeszcze mniej jest takich informacji w odniesieniu do ludzi. Dotychczasowe badania sugerują istnienie zależności pomiędzy ekspozycją na WWA a ryzykiem występowania zespołu policystycznych jajników, przedwczesnym wygasaniem czynności jajnika czy wewnątrzmacicznym zahamowaniem wzrostu płodu. Można także znaleźć doniesienia wskazujące na korelację między paleniem papierosów a obniżeniem płodności u ludzi. Na uwagę zasługuje na pewno ograniczona liczba publikacji opisująca doświadczenia uwzględniające jednoczesne działanie kilku lub więcej czynników zanieczyszczających środowisko. Jest to o tyle istotne, że nawet jeżeli pojedynczy czynnik o niskiej koncentracji jest nieszkodliwy, to ze względu na addytywny potencjał lub efekty synergistyczne, może on wykazywać niekorzystne długotrwałe skutki

wtedy, kiedy jest składnikiem mieszaniny kilku/wielu związków zanieczyszczających środowisko. Doświadczalna analiza sposobu działania mieszaniny przybliżyła nas do badania sytuacji rzeczywistych, w których często narażeni jesteśmy na działanie wielu zanieczyszczeń jednocześnie. W 2019 roku European Food Safety Authority podjęła czynności mające doprowadzić do intensyfikacji badań nad działaniem mieszanin związków na organizmy żywe. Z tych wszystkich powodów zagadnienia poruszane przez Panią mgr Karolinę Zajdę w Jej pracy doktorskiej są bardzo aktualne i godne uwagi. We wszystkich publikacjach wchodzących w skład recenzowanej pracy doktorskiej, Doktorantka badała wpływ dwóch różnych mieszanin WWA (mieszanina 1 – M_1 i mieszanina 2 – M_2) na jajnikowe komórki ziarniste człowieka. Modelem eksperymentalnym w badaniach Pani magister były dwie linie komórek ziarnistych: linia HGrC1 (linia prawidłowych komórek ziarnistych wyprowadzona z ludzkich komórek pochodzących z małych antralnych pęcherzyków jajnikowych) i linia COV434 (linia komórek ziarnistych wyprowadzona z nowotworowych komórek jajnika). Linie te stanowią dobre modele *in vitro* w badaniach biomedycznych i toksykologicznych; komórki tych linii posiadają receptory FSH (FSHR) i odpowiadają na FSH zwiększoną produkcją estradiolu (E_2), nie posiadają natomiast, lub posiadają niewiele, receptorów LH i nie są zdolne do luteinizacji.

OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

W celu ustalenia składu ilościowego dwóch mieszanin WWA wykorzystywanych w następnych etapach badań, w **pierwszej publikacji**, we krwi 20 kobiet w okresie okołoporodowym i we krwi pępowinowej zmierzono stężenia 16 WWA, uznanych przez Komisję Europejską i amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (EPA) za szczególnie niebezpieczne. Wśród tych szesnastu wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, siedem to były węglowodory wysokocząsteczkowe (tzw. węglowodory „ciężkie”), zbudowane z czterech lub więcej pierścieni aromatycznych (chrysen, benzo(a)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(a)piren, indeno(1,2,3-cd)piren, dibenzo(ah)antracen, benzo(ghi)perylene), natomiast dziewięć stanowiły węglowodory niskocząsteczkowe (tzw. węglowodory „lekkie”: naftalen, acenaftylen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, piren, benz(a)antracen). Te ostatnie są mniej toksyczne od węglowodorów ciężkich, nie są uznane za związki kancerogenne, i stanowią mniejsze zagrożenie dla ludzi i zwierząt. Wszystkie 16 WWA zostały wykryte w badanych próbach krwi, stwierdzono niewielkie różnice w stężeniach badanych WWA pomiędzy krwią matczyną i pępowinową. W skład mieszaniny nr 1 (M_1) weszła cała szesnastka badanych WWA w stężeniach znalezionych we krwi pępowinowej, a w skład mieszaniny nr 2 (M_2) weszło tylko pięć „lekkich” WWA (naftalen, fenantren, antracen, fluoranten, piren). Główną częścią tej publikacji było zbadanie wpływu każdej z tych dwóch mieszanin WWA na ekspresję mRNA i białka: 1/ trzech cząsteczek sygnałowych klasycznego, genomowego szlaku receptora węglowodorów aromatycznych (AhR) oraz 2/ dwóch wybranych enzymów I i II fazy biotransformacji zarówno w komórkach HGrC1, jak i COV434 w kilku punktach czasowych. W tej pracy

badano również wpływ mieszanin WWA na aktywność wspomnianych enzymów oraz kaspazy 3 (marker apoptozy) oraz na proliferację komórek ziarnistych. Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wysunęła interesującą hipotezę dotyczącą sposobu w jaki badane mieszaniny WWA mogą oddziaływać na prawidłowe i na nowotworowe komórki ziarniste człowieka. Zgodnie z tą hipotezą, obserwowany w prawidłowych komórkach ziarnistych (HGrC1) traktowanych mieszaniną WWA, wzrost ekspresji białka AhR, jego jądrowego przenośnika (ARNT) oraz enzymów I (CYP1A1) i II (katechoło-O-metylotransferaza – COMT) fazy biotransformacji w połączeniu z obniżeniem ekspresji białka represora AhR (AhRR) prowadzi do wzrostu proliferacji badanych komórek; dzieje się tak, prawdopodobnie, z powodu powstawania, w czasie biotransformacji, kancerogennych metabolitów WWA. Hipoteza ta, opierająca się przede wszystkim o wyniki z 72 godziny inkubacji, wskazuje na udział w działaniu WWA na komórki HGrC1 – klasycznego szlaku sygnalizacyjnego receptora Ah, i wydaje się uzasadniona w odniesieniu do mieszaniny M₁. Z kolei, w nowotworowych komórkach ziarnistych (COV434) traktowanych mieszaniną WWA, nie stwierdzono ani wzrostu ekspresji/aktywności enzymów detoksyfikacyjnych, ani zwiększonej proliferacji, co, prawdopodobnie, wiąże się z brakiem aktywacji metabolicznej WWA. Ponadto, w przypadku działania M₁ na komórki nowotworowe, wzrostowi ekspresji białka ARNT towarzyszył wzrost ekspresji AhRR, co może sugerować nieklasyczny sposób działania WWA. To bardzo interesująca hipoteza, chciałabym jednak poznać opinię Pani magister na temat braku wpływu obu mieszanin WWA na aktywność enzymów CYP1A1 i COMT w komórkach HGrC1 w kontekście powyższej hipotezy. Chciałabym także prosić Panią Karolinę o szersze przedstawienie, w oparciu o najnowszą literaturę, koncepcji kanonicznego i niekanonicznego szlaku sygnalizacyjnego AhR, a właściwie szlaków niekanonicznych, bo na pewno jest ich więcej niż jeden.

W drugiej publikacji, Doktorantka kontynuowała badania nad aktywacją przez mieszaniny WWA nieklasycznej ścieżki sygnalizacyjnej AhR w nowotworowych komórkach ziarnistych linii COV434. W komórkach tych geny *AhRR* i *NFκB* zostały wyciszone do 20% i 40% wielkości ekspresji odpowiednich białek w komórkach kontrolnych (tj. komórkach typu dzikiego, WT). Wyciszenie genu *AHRR* znosiło hamujące działanie M₁ na ekspresję białka AhR i CYP1A1 oraz stymulujące działanie M₁ na ekspresję białka ARNT. Podobnie, wyciszenie genu *NFκB* znosiło hamujące działanie M₁ na ekspresję białka AhR i CYP1A1; ponadto, znosiło również stymulujące działanie M₁ na ekspresję białka AHRR. Wyniki te sugerują, że w działaniu M₁ na komórki COV434 pośredniczą represor AHRR i czynnik transkrypcyjny NFκB. Każdy z nich może dimeryzować z ARNT, co stwarza konkurencję dla tworzenia heterodimeru AhR-ARNT i nie prowadzi do indukcji CYP1A1, a więc ogranicza metaboliczną biotransformację WWA i proliferację.

W przypadku mieszaniny M₂, wyciszenie genu *NFκB* także znosiło jej hamujące działanie na ekspresję białka AhR i CYP1A1. Jednak inaczej niż to stwierdzono dla M₁, wyciszenie genu *AHRR* nie znosiło wpływu M₂ na ekspresję AhR, ARNT i CYP1A1. Należy tu dodać, że obie mieszaniny WWA

zwiększały ekspresję białka NFκB. Wyniki te sugerują, że w hamującym działaniu M₂ na ekspresję CYP1A1 w komórkach COV434, pośredniczy czynnik transkrypcyjny NFκB, ale nie pośredniczy represor AHRR. Czy ma Pani jakieś dane by sądzić, że te mechanizmy są uniwersalne dla komórek ziarnistych czy też funkcjonują one tylko w komórkach człowieka? Poza tym, zastanawiam się dlaczego nie badała Pani proliferacji w komórkach COV434 z wyciszonym genem *AHRR*. I na koniec tej części uwag: nie mogłam znaleźć w publikacji informacji dotyczącej czasu trwania inkubacji komórek COV434 z M₁ i M₂.

W publikacji nr 2, Pani mgr K. Zajda próbowała także odpowiedzieć na pytanie czy i jak wyciszenie genu *AhR* zmieni wpływ M₁ i M₂ na ekspresję białek receptora estrogenowego α (ERα) i receptora androgenowego (AR) oraz czy, i jak, wyciszenie genu *ESR1* zmieni wpływ M₁ i M₂ na ekspresję białek AhR i CYP1A1 w nowotworowych komórkach ziarnistych. Otrzymane wyniki wskazują na istnienie komunikacji (tzw. „cross-talk”) pomiędzy szlakiem sygnalizacyjnym AhR i szlakami badanych receptorów hormonów steroidowych (ERα i AR). Jednak określenie natury tych związków wymaga dalszych badań. Doktorantka badała również wpływ wyciszenia czterech genów – *AhR*, *ESR1*, *AR*, *NFκ-B* – na to jak mieszaniny WWA działają na proliferację komórek COV434. Stymulacyjny wpływ M₁ na proliferację badanych komórek był zniesiony przez wyciszenie genu *AhR*, *AR* oraz *NFκ-B*. Natomiast wyciszenie genów *AhR* i *ESR1* ujawniło stymulacyjne działanie M₂ na proliferację komórek. Nie znalazłam w publikacji interpretacji tych ostatnich wyników. Czy brak stwierdzenia wzrostu proliferacji pod wpływem M₂ w komórkach z wyciszonym genem *NFκ-B* nie obniża siły hipotezy mówiącej o sposobie działania M₂ w nowotworowych komórkach ziarnistych?

W trzeciej publikacji, Doktorantka analizowała wpływ mieszanin WWA na funkcje prawidłowych komórek ziarnistych linii HGrC1. W komórkach tych wyciszone zostały geny receptorów estrogenowych i gen receptora Ah. Geny *ESR1*, *ESR2*, *GPER1* i *AhR* zostały wyciszone do 35-40% wielkości ekspresji odpowiednich białek w komórkach kontrolnych (tj. komórkach typu dzikiego, WT). Obie mieszaniny WWA zmniejszały zarówno podstawową, jak i stymulowaną przez FSH sekrecję E₂ oraz ekspresję białka enzymu aromatazy, przekształcającego testosteron w estradiol. Ponadto, M₁ i M₂ zwiększały ekspresję białek FSHR i ERα w komórkach HGrC1, wskazując na bezpośrednią drogę oddziaływania WWA na pęcherzykową steroidogenezę. Skutki wyciszenia genów trzech receptorów estrogenowych, tzn. *ESR1*, *ESR2* i *GPER1* pokazują, że antyestrogenowy wpływ mieszanin WWA na komórki ziarniste wynika, między innymi, z ich działania na jądrowy receptor ERα i błonowy receptor GPR30. Ponadto, efekt wyciszenia genu *AhR* sugeruje udział tego receptora w regulacji ekspresji aromatazy przez WWA.

OMÓWIENIE OPRACOWANIA W JEZYKU POLSKIM

Opracowanie w języku polskim, towarzyszące publikacjom stanowiącym rozprawę doktorską Pani mgr Karoliny Zajdy obejmuje 45 stron, i zawiera Spis treści, Streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, Wstęp, Hipotezę badawczą i Cele badawcze oraz część metodyczną krótko opisującą plany

doświadczeń poszczególnych publikacji i zawierającą czytelne schematy pojedynczych eksperymentów, co znacznie ułatwia rozeznanie się w całości przedsięwzięcia. W polskojęzycznym Opracowaniu można także znaleźć Podsumowanie wyników otrzymanych w każdej z publikacji oraz Dyskusję wyników zakończoną ostatecznym Podsumowaniem, Wnioskiem i Wykazem publikacji (126). Opracowanie 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 chemiczne i linie komórkowe oraz stosowane metody. W ogólnym zarysie, treść poszczególnych części polskojęzycznego opracowania jest zgodna z zawartością publikacji stanowiących rozprawę doktorską. We Wstępie brakowało mi tylko bardziej szczegółowego przedstawienia wszystkich znanych dziś dróg sygnalizacyjnych, które mogą być indukowane w komórce przez aktywację AhR. Takie przedstawienie ułatwiłoby percepcję, niełatwych w prezentacji i interpretacji, wyników pokazanych w publikacjach, stanowiących rozprawę doktorską.

PODSUMOWANIE

W podsumowaniu "Oceny pracy" należy podkreślić, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki wzbogacają naszą wiedzę w nowe informacje na temat działania wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w komórkach ziarnistych. Wartość ocenianej rozprawy polega na tym, że podejmuje ona problematykę związaną ze związkami, które powszechnie występują w środowisku człowieka i w jego tkankach, i które wykazują u ludzi i zwierząt działania toksyczne, teratogenne i kancerogenne. Należy też zauważyć, że zdecydowana większość dotychczasowych badań nad działaniem WWA w organizmach żywych dotyczyła BaP, a w swojej pracy, Pani mgr Karolina Zajda badała wpływ także innych, niż BaP, wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Ponadto, przedmiotem badań Pani magister nie był pojedynczy związek chemiczny, ale kilka (M_2) lub kilkanaście (M_1) WWA badanych jednocześnie w postaci mieszaniny, co przybliża model doświadczalny Doktorantki do realnie występujących sytuacji. Niezmiernie istotne jest także to, że koncentracje poszczególnych węglowodorów w badanych mieszaninach odzwierciedlają stężenia występujące w organizmie człowieka. Nie można również zapomnieć o małej ilości dostępnych obecnie informacji na temat dróg sygnalizacyjnych indukowanych przez WWA w komórkach żeńskiego układu rozrodczego. Prezentowane w rozprawie wyniki, poza tym, że dostarczają nowych danych, stanowią również podstawę do dalszych badań, zmierzających do pełnego poznania mechanizmu działania węglowodorów aromatycznych na komórki ziarniste, a także inne steroidogeniczne komórki jajnika. Wiedza na ten temat, w dalszej perspektywie, może się okazać przydatna do wykorzystania, w szeroko rozumianej, ochronie przed zanieczyszczeniami środowiska.

W doświadczeniach przedstawionych w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską Pani mgr Karolina Zajda wykorzystwała takie klasyczne metody jak hodowle komórkowe, testy proliferacji komórek, aktywności lizosomalnej i ELISA, oznaczanie aktywności enzymatycznej kaspazy 3, CYP1A1 i COMT oraz

chromatografię gazową i spektrometrię mas, a także metody biologii molekularnej, takie jak wyciszanie genów przy pomocy siRNA, Western blotting i real-time PCR. Przy pracy z tak różnymi metodami i wykonując tak dużą liczbę analiz, Doktorantka musiała się wykazać bardzo dobrym opanowaniem technik pracy laboratoryjnej i, w trakcie wykonywania pracy doktorskiej, znacznie wzbogacić swój warsztat badawczy. Przy przygotowywaniu publikacji do druku w renomowanych czasopismach naukowych, musiała się, z kolei, wykazać dobrą znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań i zrozumieniem niełatwych do interpretacji wyników. Na podstawie ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka posiada takie cechy dobrego badacza jak pracowitość i wytrwałość.

Zadanie recenzenta rozprawy doktorskiej prezentowanej jako zbiór opublikowanych już artykułów naukowych jest stosunkowo łatwe, bo wyniki rozprawy zostały już wcześniej opisane w pracach opublikowanych w czasopismach naukowych, w tym przypadku, o dużym współczynniku wpływu. Artykuły naukowe, zanim zostały zaakceptowane do druku, musiały być zrecenzowane przez co najmniej dwóch recenzentów wybieranych przez redaktora czasopisma naukowego spośród światowych ekspertów w danej dziedzinie. Tym nie mniej, w trakcie czytania rozprawy nasunęły mi się różne pytania i uwagi, które powinny przyczynić się do poszerzenia dyskusji nad interpretacją i znaczeniem otrzymanych przez Doktorantkę wyników. Szczególnie, że problematyka związana z czynnikami zanieczyszczającymi środowisko i mechanizmami ich oddziaływania na organizmy żywe jest tak obszerna, że nie sposób jej wyczerpać w dyskusji ograniczonej pojemnością kilku artykułów naukowych.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny praca pt. "Określenie mechanizmu działania mieszaniny węglowodorów aromatycznych (WWA) w prawidłowych i nowotworowych komórkach warstwy ziarnistej" spełnia wszystkie wymagania – określone w Ustawie 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 2005 r. Nr 164, poz. 1365; z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228; z 2011 r. Nr 84, poz. 455) – stawiane pracom doktorskim, i w związku z powyższym **zwracam się do** – stawiane pracom doktorskim, i w związku z powyższym **zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Zajdy do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie, w pełni uzasadniony moim zdaniem, wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.**

Renata Cieciuch