

Dr hab. Bożena Witek, prof. UJK
Zakład Biologii Medycznej
25-406 Kielce
ul. Uniwersytecka 7

Kielce, 18.08. 2022.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Wiktorii Kozłowskiej pt. „Konsekwencje oddziaływania pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości na steroidogenezę i profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy", wykonanej w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt, Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Anity Franczak oraz dr Agaty Żmijewskiej, promotora pomocniczego

Tematyka dysertacji zaproponowana przez Doktorantkę wydaje się wysoce uzasadniona i ważna z praktycznego punktu widzenia, ponieważ środowisko w którym żyje człowiek wywiera istotny wpływ na wiele funkcji życiowych. Nieodłącznym elementem środowiska naturalnego jest pole elektromagnetyczne (PEM), nierozerwalnie związane z rozwijającym się na przestrzeni milionów lat wszechświatem. PEM towarzyszy człowiekowi od początków jego historii, ale istniało już przed jego pojawieniem się na Ziemi. Wraz z rozwojem nowych technologii pojawiło się wiele sztucznych źródeł PEM, które emitując promieniowanie elektromagnetyczne potencjalnie mogą być przyczyną ujawnienia się chorób nowotworowych, układu sercowo-naczyniowego, nerwowego, immunologicznego, mogą generować stres oksydacyjny lub mieć negatywny wpływ na możliwości reprodukcyjne organizmów. Mimo, że badania nad PEM prowadzone są od kilkudziesięciu lat, uzyskane dotąd wyniki nie są jednoznaczne, często budzą kontrowersje, a problem wpływu PEM na organizm człowieka pozostaje nierozwiązany. Osiągnięciem naukowym będącym przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr inż. Wiktorii Kozłowskiej jest cykl trzech spójnych tematycznie prac opublikowanych pod wspólnym tytułem „Konsekwencje oddziaływania pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości na steroidogenezę i profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy".

[1] **Kozłowska W**. Drzewiecka EM. Żmijewska A. Koziorowska A. Franczak A. 2021. Effects of electromagnetic field (EMF) radiation on androgen synthesis and release from the pig endometrium during the fetal peri-implantation period. Animal Reproduction Science, doi. org/10.1016/j.anireprosci.2021.106694.

[2] **Kozłowska W**. Drzewiecka EM. Żmijewska A. Franczak A. 2022. Electromagnetic field exposure alters in vitro estrogen biosynthesis and its release by the porcine endometrium in the peri-implantation period. Reproductive Biology, doi.org/10.1016/j.repbio.2022.100642.

[3] **Kozłowska W**. Drzewiecka EM. Paukszto L. Żmijewska A. Wydorski PJ. Jastrzębski JP. Franczak A. 2021. Exposure to the electromagnetic field alters the transcriptomic profile in the porcine endometrium during the peri-implantation period. Journal of Physiology and Pharmacology, doi: 10.26402/jpp.2021.6.04.

Praca 1 – Autorzy przyjęli tezę, że PME o niskiej częstotliwości ma wpływ na syntezę i uwalnianie androgenów z endometrium świni pobranym w okresie okołoimplantacyjnym

Badania przeprowadzono na 5 świniach (Sus scrofa domestica L.) rasy polska biała zwisłoucha (PBZ) x polska wielka biała (PWB), poddanych naturalnemu kojarzeniu w 1 i 2 dniu okresu rujowego. Po 15-16 dniach potwierdzonej ciąży zwierzęta uśmiercano, zgodnie ze standardowymi procedurami uboju w profesjonalnej ubojni. Dzień ciąży ustalano, między innymi na podstawie morfologii jajników. Eksperyment zakładał wykonanie badań na tkankach pobranych od zwierząt, dlatego do jego przeprowadzenia nie była potrzebna zgoda komisji etycznej (Dyrektywa 2010/63/UE Unii Europejskiej). Do badań pobierano fragmenty endometrium świni w okresie okołoimplantacyjnym. Umieszczano je w medium inkubacyjnym, wystawiając na działanie PEM o częstotliwości 50 i 120 Hz, indukcji pola magnetycznego 8 mT (miliTesla), w okresie 2 i 4 godzin. Kontrolne fragmenty endometrium inkubowano osobno i nie eksponowano na PEM. Dodatkowo wybrane skrawki endometrium inkubowano w medium hodowlanym w obecności progesteronu (P4), inne bez dodatku P4.

Wprowadzenie P4 do środowiska inkubacyjnego miało na celu wykazanie, czy P4 może być czynnikiem wykazującym protekcyjny wpływ na endometrium w okresie okołoimplantacyjnym, przed skutkami oddziaływania PEM (wcześniejsze wyniki badań Zespołu dotyczyły cyklu rujowego).

Po inkubacji skrawki endometrium utrwalano w ciekłym azocie (-193^{0}C), potem przechowywano w temperaturze -80^{0}C do czasu wykonania analiz ekspresji mRNA oraz oznaczenia aktywności cytochromu P450c17 i dehydrogenazy 3ß-hydroksysteroidowej. Media inkubacyjne przeznaczone do oznaczeń stężenia androgenów przechowywano w temperaturze -20^{0}C. Analogiczną procedurę metodologiczną zastosowano w pracach 2 i 3.

Analizie poddano – 1 /ekspresję mRNA (CYP17A1 i HSD3B1), 2/ syntezę i uwalnianie androstendionu (A4) i testosteronu (T), 3/ koncentrację hydroksylazy/liazy cytochromu P450 (P450c17) i aktywność dehydrogenazy 3ß-hydroksysteroidowej (3ßHSD). Uzyskane wyniki potwierdziły tezę Doktorantki, że PEM miało znamienny wpływ na syntezę i sekrecję androgenów z endometrium, poziom ekspresji mRNA oraz koncentrację cytochromu P450c17 i aktywności dehydrogenazy 3ß-hydroksysteroidowej, zależnie od czasu ekspozycji,

częstotliwości PEM oraz obecności w medium inkubacyjnym progesteronu (P4) lub jego braku. Wykazano interakcje pomiędzy ekspozycją na PEM, czasem wystawienia na PEM oraz obecnością P4 – w odniesieniu do poziomu ekspresji mRNA CY17a1 i HSD3B1 i koncentracji białek kodowanych przez te geny, koncentracji cytochromu P450c17 i aktywności dehydrogenazy 3ß-hydroksysteroidowej. I tak, 1/ekspozycja endometrium na obie częstotliwości PEM (50 i 120 Hz) spowodowała obniżenie sekrecji testosteronu (T) w obecności progesteronu (P4). Obniżenia sekrecji T nie wykazano w hodowli endometrium bez dodatku P4. Jak przypuszcza Doktorantka, P4 jest czynnikiem uwrażliwiającym endometrium na działanie PEM, 2/nie wykazano zmian sekrecji androstendionu (A4) po 2 godzinnej ekspozycji na PEM o częstotliwości 120 Hz w obecności P4. Według Doktorantki fakt ten potwierdza protekcyjne działanie P4 na endometrium w wyniku ekspozycji na PEM. Wskazuje jednocześnie, że P4 może pełnić nie tylko rolę ochronną ale może też uwrażliwiać endometrium na działanie PEM, a to jaką rolę w stosunku do tkanki będzie pełnić P4, zależy od czasu ekspozycji. Większe zmiany syntezy i sekrecji androgenów wykazano po 4 godzinach ekspozycji na PEM i częstotliwości 50 Hz; 3/ ekspresja mRNA CYP17A1 była niższa zarówno po 2 i 4 godzinach ekspozycji na PEM o częstotliwościach 50 i 120 Hz z dodatkiem P4. Ekspresja mRNA HSD3B1 była wyższa po 2 i 4 godzinach ekspozycji na PEM o częstotliwości 50 Hz, wobec kontroli z P4; 4/ koncentracja cytochromu P450c17 po 4 godzinach ekspozycji na PEM (50Hz) była niższa, wobec kontroli z P4; 5/ aktywność dehydrogenazy 3ß-hydroksysteroidowej była wyższa po 4 godzinnej ekspozycji na PEM o częstotliwości 120 Hz.

Pytania

1/ Wiadomo, że na sukces hodowcy, zwieńczony implantacją zarodka w jamie macicy i przeżyciem embrionu składa się wiele czynników, między innymi jakość gamet, czy stężenie P4. Gamety złej jakości mogą powodować zaburzenia procesu zapłodnienia lub powstanie zarodków obarczonych wadami genetycznymi i morfologicznymi. Z kolei zbyt niskie lub zbyt wysokie stężenie P4 może prowadzić do zakłócenia funkcji macicy lub nadmiernej sekrecji niektórych hormonów, np. estradiolu. Skutkiem tego będzie obniżona jakość komórek jajowych lub zaburzenie prawidłowego rozwoju zarodków. Czy brano pod uwagę stężenie P4 inne niż 10^{-5}?

2/ Nie podano wieku badanych świń, napisano jedynie świnie po okresie dojrzewania?

3/ Czy była to pierwsza ciąża świń?

Praca 2 – Autorzy przyjęli tezę, że PME o niskiej częstotliwości może zmienić molekularne mechanizmy syntezy i sekrecji estrogenów w endometrium świni pobranym w okresie okołoimplantacyjnym

Analizie poddano – 1/poziom ekspresji mRNA (CYP19A3 i HSD17B4), 2/ koncentrację aromatazy cytochromu P450 (aromatazy) i dehydrogenazy 17ß hydroksysteroidowej (17ßHSD), 3/stężenie estronu (E1) i estradiolu-17ß (E2). Uzyskane wyniki wskazują, że

ekspozycja endometrium na PME miała istotny wpływ na poziom ekspresji mRNA CYP19A3 i HSD17B4, koncentrację aromatazy cytochromu P450, dehydrogenazy 17β hydroksysteroidowej oraz na sekrecję estronu (E1) i estradiolu-17ß (E2). Zmiany analizowanych parametrów endometrium w odpowiedzi na działanie PME nie były jednoznaczne. Zakres tych zmian był zależny od interakcji między czasem ekspozycji na PME (2 lub 4 godziny), od częstotliwości PME (50 lub 120 Hz) oraz od obecności lub braku P4. Jak wskazują wyniki, ekspozycja na PME może mieć wpływ na mechanizm wewnątrzmacicznej konwersji androgenów do estrogenów, a w związku z tym wpływ na przebieg tego procesu podczas procesu implantacji *in vivo*.

Praca 3 – Autorzy przyjęli tezę, że 2-godzinna ekspozycja PEM o niskiej częstotliwości (50 Hz) zmienia profil transkryptomiczny endometrium świni pobranym w okresie okołoimplantacyjnym

Dzięki analizie sekwencjonowania następnej generacji (NGS) wykazano, że ekspozycja endometrium na PEM spowodowała zmiany poziomu ekspresji 461 genów, a produkty genów ulegające różnicowej (zmienionej) ekspresji (DEGs) obecne są na wielu szlakach metabolicznych biorąc udział w procesach regulacji metabolizmu energetycznego, procesach proliferacji, czy przemieszczania się komórek. Ekspozycja endometrium na PEM miała zróżnicowany wpływ na kierunek zmian ekspresji genów. Podwyższenie ekspresji wykazano dla genów – (VDR - *vitamin D receptor*; IFNGR1 - *interleukin 1 receptor accessory protein 1*; HSD17B2 – *hydroxysteroid 17ß*; NOS3 - *nitric oxide synthase 3*), zaś obniżenie ekspresji dla genów (EGR2 - *early growth response 2*; ID2 - *inhibitor of DNA binding 2*). Zmiany ekspresji genów (VDR, NOS3, ID2 i HSD17B2) powodowane ekspozycją na PEM mogą mieć negatywny wpływ na przebieg wielu kluczowych procesów w środowisku wewnątrzmacicznym, powodując zaburzenie syntezy i sekrecji estrogenów i androgenów w endometrium macicy, a w konsekwencji utrudniając lub uniemożliwiając fizjologiczne funkcje endometrium podczas implantacji zarodka lub jego dalszego rozwoju.

Publikacje (1, 2, 3) składające się na „Osiągnięcie naukowe" są oryginalnymi pracami współautorskimi. We wszystkich pracach mgr inż. Wiktoria Kozłowska jest pierwszym autorem. Oświadczenia współautorów potwierdzają istotny wkład Doktorantki w ich powstanie. Indywidualny udział Doktorantki obejmuje współudział w opracowaniu metodyki badań, pobieranie materiału doświadczalnego, analizę laboratoryjną i statystyczną uzyskanych wyników, przygotowanie dokumentacji graficznej, przygotowanie publikacji do druku (publikacje 1, 2, 3) oraz udział w przeprowadzeniu analizy bioinformatycznej (publikacja 3). Wkład pracy Doktorantki w merytoryczną wartość „Osiągnięcia naukowego " oceniam jako wystarczający. Prace zostały opublikowane w latach 2021-2022 w

czasopismach z listy JCR, o wymiernych wartościach współczynników oddziaływania oraz punktach MEiN. Publikacja (1) IF 2,145 i 140 punktów; publikacja (2) IF 2,376 i 100 punktów; publikacja (3) IF 2,750 i 100 punktów. Łącznie wartość sumaryczna IF „Osiągnięcia naukowego" wynosi 7,271, a liczba punktów MEiN 340. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wnoszą nowe istotne wartości poznawcze w badaniach nad wpływem PEM na aktywność steroidogenną macicy świni na poziomie białek biorących udział w syntezie i uwalnianiu hormonów steroidowych oraz na poziomie molekularnym, poprzez analizę zmian profilu ekspresji genów kodujących określone białka. Obserwowane reakcje endometrium na PEM nie były jednoznaczne, różniły się między sobą w zależności od czasu ekspozycji na PME, jego częstotliwości, obecności P4 oraz od rodzaju analizowanych genów i enzymów. Doktorantce udało się uzyskać cenne praktyczne dane interpretacyjne dotyczące skutków ekspozycji tkanek macicy świni na PEM w okresie okołoimplantacyjnym. Dotąd proces ten badano jedynie podczas fazy lutealnej cyklu rujowego.

Wysoko oceniam szeroki zakres analiz laboratoryjnych wymagających precyzji, umiejętność wykorzystania nowoczesnych metod i technik stosowanych w biologii, takich jak (sekwencjonowanie następnej generacji, różnicowanie i profilowanie ekspresji genów, ocena zróżnicowanej ekspresji genów), kompetentną interpretację uzyskanych wyników (bioinformatyczna analiza danych), przygotowanie dokumentacji graficznej. Wszystkie te elementy świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki. Problem związany z ekspozycją na PEM jest zjawiskiem globalnym, dlatego potencjalne skutki zdrowotne powodowane ekspozycją na PEM, powinny obligować zespoły badawcze do zintegrowanych działań mających na celu minimalizację zagrożeń jakie powoduje ekspozycja na PEM.

Reasumując, uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa pt. „Konsekwencje oddziaływania pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości na steroidogenezę i profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy" spełnia wymogi przewidziane w „art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.)" i w pełni uzasadnia ubieganie się mgr inż. Wiktorii Kozłowskiej o stopień naukowy doktora. Przedstawiam zatem jej pozytywną ocenę i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Bożena Witek, prof. UJK