Kraków, 24-08-2022

dr hab. Małgorzata Duda, Prof. UJ
Zakład Endokrynologii
Katedra Fizjologii Zwierząt
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego

UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział Biologii

Instytut Zoologii
i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

ul. Gronostajowa 9
30-387 Kraków
tel./fax: 12 664 50 98

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgr inż. Wiktorii Kozłowskiej, pt.:
Konsekwencje oddziaływania pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości na steroidogenezę i profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy

Recenzowana rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Anity Franczak (promotor) oraz dr Agaty Żmijewskiej (promotor pomocniczy). Przeprowadzone badania zrealizowano w ramach projektu badawczego OPUS nr 2017/25/B/NZ9/00090, finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.

Gwałtowny rozwój technologiczny (w tym także rozwój zaawansowanych technologii bezprzewodowych) i związany z nim stały wzrost zapotrzebowania na energię elektryczną spowodował w ostatnich latach ekspansję sztucznych źródeł emisji niejonizujących pól elektromagnetycznych o ekstremalnie niskich częstotliwościach (PEM; od 0 do 300 Hz). Na szczególną uwagę zasługuje PEM o częstotliwościach od 50 do 120 Hz, które generowane jest przez powszechnie stosowane urządzenia codziennego użytku np. płyty indukcyjne czy kuchenki mikrofalowe. O ile czas trwania ekspozycji na PEM emitowane przez tego typu urządzenia jest bardzo ograniczony, to wykorzystywanie np. ogrzewania podłogowego prowadzi do narażenia użytkowników zarówno w dzień, jak w nocy. Tu należałoby wspomnieć o korzystaniu z urządzeń osobistych, co także oznacza skumulowane narażenie na PEM, a także ciągły rozwój technologiczny i związane z nim wprowadzanie nowych źródeł pól niskich częstotliwości (przykładowo: coraz częściej zamiast lamp energooszczędnych stosuje się lampy LED czy też indukcyjne ładowanie akumulatorów w samochodach elektrycznych). Wszystko to oznacza, że stałe narażenie na działanie tego typu pola elektromagnetycznego jest istotną częścią

życia współczesnych społeczeństw, zaś wszechobecność PEM prowadzi do obaw zarówno o krótkoterminowe jak o długoterminowe efekty jego działania. Negatywny wpływ pola elektromagnetycznego na organizm człowieka stał się zatem przedmiotem szeregu wnikliwych badań, których część to szeroko zakrojone badania epidemiologiczne, dzięki którym, od 1999 roku PEM zostało zaliczone do grupy czynników 2B czyli „potencjalnych czynników rakotwórczych" (*possibly carcinogenic to humans*), najpierw przez: Amerykański Narodowy Instytut Nauk o Zdrowiu Środowiskowym (*U.S. National Institute of Environmental Health Sciences*; NIEHS), a później (w 2001) przez Międzynarodową Agencję ds. Badań nad Rakiem (*International Agency for Research on Cancer*; IARC) oraz Światową Organizację Zdrowia (*World Health Organization* – WHO). Równolegle z badaniami epidemiologicznymi przeprowadzono szereg eksperymentów *in vitro* w celu zidentyfikowania komórkowych i tkankowych skutków ekspozycji na PEM. Otrzymane wyniki pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że PEM może modyfikować przebieg procesów fizjologicznych i biochemicznych w komórce. Przykładowo, w zależności od częstotliwości i czasu ekspozycji PEM może zmieniać tempo proliferacji komórek, może indukować stres oksydacyjny i przez to wpływać na przeżywalność komórek, może wpływać na ekspresję wielu genów, modyfikować homeostazę jonową czy też zmieniać strukturę DNA. Celem potwierdzenia otrzymanych wyników badań *in vitro* przeprowadzono szereg eksperymentów *in vivo* z wykorzystaniem modeli zwierzęcych, dzięki którym stwierdzono, że pole elektromagnetyczne nie pozostaje bez wpływu na działanie ośrodkowego układu nerwowego, układu krążenia czy układu odpornościowego. Do tej pory jednak nie są w pełni poznane konsekwencje narażenia na działanie PEM komórek układu rozrodczego samic ssaków, zwłaszcza, że nieliczne jak dotąd badania przeprowadzano głównie na małych zwierzętach laboratoryjnych. Tu udokumentowano negatywny, zależny od częstotliwości i czasu ekspozycji, wpływ PEM m.in. na prawidłowy przebieg procesu steroidogenezy, ciąży a także liczbę osobników w miocie. Mając na uwadze fakt stałego narażenia ludzi na PEM o ekstremalnie niskiej częstotliwości, oraz wiedzę dokumentującą negatywne skutki jego działania, wykorzystanie świni domowej jako modelu w badaniach dotyczących molekularnych mechanizmów zaangażowanych w prawidłowe funkcjonowanie błony śluzowej macicy w okresie około-implantacyjnym jakiego podjęła się Doktorantka w przedłożonej mi do recenzji pracy doktorskiej, należy uznać za niezwykle istotne i zasadne. Zważywszy na niepodważalną rolę błony śluzowej macicy w regulacji funkcji rozrodczych samicy, zwłaszcza w tak newralgicznym punkcie czasowym, uważam, że tematyka podjęta przez Doktorantkę jest niezwykle wartościowa. Uzyskane wyniki mogą przyczynić się do pełniejszego zrozumienia procesów leżących u podstaw negatywnego oddziaływania PEM na tkanki układu

rozrodczego, co w przyszłości może pomóc chronić je przed skutkami ewentualnego narażenia i przyczynić się do sukcesu rozrodczego.

W dotychczasowych pracach Zespołu Prof. Franczak wykazano, m.in. że PEM podczas fazy środkowo-lutealnej cyklu rujowego świni może zaburzać aktywność steroidogenną błony śluzowej i mięśniowej macicy. Jednocześnie dowiedziono, że w fazie lutealnej cyklu rujowego progesteron może przeciwdziałać negatywnym skutkom oddziaływania PEM na tkanki macicy. Wykazano także konsekwencje negatywnego oddziaływania PEM na aktywność steroidogenną błony mięśniowej macicy świni w okresie około-implantacyjnym, a wykorzystując sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) udokumentowano jego negatywny wpływ na profil transkryptomiczny błony mięśniowej w okresie około-implantacyjnym. Zatem doświadczenia zaplanowane w rozprawie doktorskiej mgr inż. Wiktorii Kozłowskiej stanowią logiczną kontynuację tych badań. Główne cele jakie postawiła przed sobą Doktorantka to: określenie wpływu pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości na ekspresję kluczowych enzymów steroidogenezy, tak na (**1**) poziomie mRNA (*CYP17A1, HSD3B1, CYP19A3, HSD17B4;* Real-Time PCR) jak (**2**) białka (cytochrom P450c17, 3βHSD, aromataza cytochromu P450, 17βHSD; Western Blot), a także (**3**) określenie wpływu PEM na sekrecję *in vitro* androstendionu (A4), testosteronu (T), estronu (E1), estradiolu-17β (E2) (RIA), oraz (**4**) poznanie wpływu PEM na zmiany profilu transkryptomicznego błony śluzowej macicy. Wykorzystanie przez Doktorantkę nowoczesnej metody wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji (NGS) zapewniło uzyskanie kompleksowych i wielopłaszczyznowych wyników badań i stanowi dodatkowy walor tej pracy.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z tematycznie spójnego cyklu trzech, wieloautorskich prac naukowych, opublikowanych w latach 2021-2022, w czasopismach z listy filadelfijskiej, których łączny współczynnik oddziaływania wynosi 7,271, natomiast suma punktów MEiN – 340 (wg punktacji za rok 2021). Do rozprawy zostały dołączone pisemne oświadczenia, w których wszyscy współautorzy szczegółowo określi swoje zaangażowanie w wykonanie badań i przygotowanie poszczególnych artykułów do druku. Z treści oświadczeń wynika jednoznacznie wiodący udział Doktorantki, polegający na: aktywnym uczestnictwie w opracowaniu metodyki badań, wykonaniu analiz laboratoryjnych oraz bioinformatycznych, interpretacji i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu publikacji do druku. W każdej z tych publikacji mgr inż. Wiktoria Kozłowska zajmuje pozycję pierwszego autora.

OMÓWIENIE PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH PODSTAWĘ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pierwsza publikacja, będąca podstawą rozprawy doktorskiej mgr inż. Wiktorii Kozłowskiej ukazała się w czasopiśmie Animal Reproduction Science. W pracy tej, w oparciu o nowoczesne techniki (Real-Time PCR, immunofluorescencja, Western blot, RIA) wykonano szereg analiz, których celem było określenie wpływu PEM o ekstremalnie niskiej częstotliwości na syntezę i sekrecję androgenów w błonie śluzowej macicy świń w okresie około-implantacyjnym. Dodatkowo, wybrane skrawki błony śluzowej macicy poddano działaniu progesteronu w celu zbadania, czy hormon ten ma wpływ na ochronę tkanki przed działaniem PEM, tak jak ma to miejsce w macicy pobranej od świń w fazie lutealnej cyklu rujowego. Przeprowadzone analizy pozwoliły stwierdzić, że w zależności od częstotliwości PEM (50 i 120 Hz) oraz od czasu ekspozycji tkanki na jego działanie (tu: 2 i 4 godziny), pole elektromagnetyczne wpływa na ekspresję wybranych enzymów steroidogenezy, tak na poziomie mRNA (*CYP17A1, HSD3B1*) jak białka (cytochrom P450c17, 3βHSD). Prowadzi to w konsekwencji do zburzonego uwalniania androgenów (tu: androstendion i testosteron). Nie potwierdzono funkcji ochronnej progesteronu przed negatywnym oddziaływaniem PEM na błonę śluzową macicy świni w okresie około-implantacyjnym.

Celem drugiej publikacji, która ukazała się w czasopiśmie Reproductive Biology, była analogiczna analiza wpływu PEM o ekstremalnie niskiej częstotliwości na syntezę i sekrecję estrogenów w błonie śluzowej macicy świń w okresie około-implantacyjnym. Tu również wybrane skrawki błony śluzowej macicy poddano działaniu progesteronu celem określenia jego roli - ochronnej lub uwrażliwiającej tkankę - na działanie PEM. Wykazano, przy zastosowaniu analogicznych jak w pierwszej publikacji technik (Real-Time PCR, Western blot, RIA), że w zależności od częstotliwości PEM (50 i 120 Hz) oraz od czasu ekspozycji tkanki na jego działanie (tu: 2 i 4 godziny) pole elektromagnetyczne wpływa na ekspresję wybranych enzymów steroidogenezy, tak na poziomie mRNA (*CYP19A3* i *HSD17B4*) jak białka (aromataza cytochromu P450, 17βHSD), co w konsekwencji prowadzi do zburzonego uwalniania estrogenów (tu: estron i estradiol-17β). Progesteron zaś, w zależności od parametrów ekspozycji błony śluzowej macicy na PEM, może zarówno chronić jak uwrażliwiać tkankę na działanie PEM.

Trzecia praca, opublikowana w czasopiśmie Journal of Physiology and Pharmacology, poświęcona jest identyfikacji zmian wywołanych przez PEM o ekstremalnie niskiej częstotliwości w transkryptomie błony śluzowej macicy świń, w okresie około-implantacyjnym. Wykazano, przy zastosowaniu sekwencjonowania

następnej generacji wraz z analizą bioinformatyczną, że w tkance poddanej ekspozycji na działanie PEM zmienia się ekspresja 461 genów (*differently expressed gen*es; DEGs), które zaangażowane są w szereg procesów biologicznych takich jak: proces steroidogenezy, regulacja homeostazy energetycznej, przepływ krwi w macicy, modulacja migracji i proliferacji komórek.

W trakcie lektury publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej mgr. inż. Wiktorii Kozłowskiej nie znalazłam elementów problematycznych, czy wzbudzających wątpliwości. Z pewnością dlatego, że wszystkie prace zostały poddane rzeczowej i wnikliwej ocenie przez kompetentnych recenzentów wydawniczych. Prace stanowią logiczny i spójny układ, są napisane zrozumiale, z jasno postawionymi celami, szczegółowym opisem metod analitycznych oraz wyników, a także prawidłowo przeprowadzoną dyskusją. Moja rola zatem sprowadza się do oceny manuskryptu polskojęzycznego, będącego autorskim opracowaniem Doktorantki, który ma za zadanie ujawnić zasób Jej wiedzy, umiejętność formułowania wniosków i posługiwania się piśmiennictwem naukowym.

OMÓWIENIE OPRACOWANIA W JĘZYKU POLSKIM

Oryginalne prace badawcze, które składają się na rozprawę doktorską, opatrzone zostały 59-stronicowym omówieniem zawierającym: spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wprowadzenie będące syntetycznym przeglądem literatury, hipotezę, cele pracy i zadania badawcze, materiały i metody, wyniki, podsumowanie i wnioski, wykaz wybranych pozycji bibliografii (62) oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Dołączono również oświadczenia wszystkich współautorów prac, z których wynika wiodący udział Doktorantki w omawianych publikacjach.

We Wprowadzeniu Doktorantka przedstawiła w sposób przejrzysty i klarowny dotychczasowy stan wiedzy w zakresie omawianego zagadnienia. Rozdział ten jest napisany niezwykle dojrzale i doskonale prowadzi do postawionej hipotezy badawczej oraz celów pracy, co świadczy o pełnym zrozumieniu tematu przez Doktorantkę. W oparciu o analizę aktualnej literatury Doktorantka przedstawiła zagrożenie, jakim jest promieniowanie elektromagnetyczne o ekstremalnie niskiej częstotliwości oraz jego wpływ na organizm człowieka i innych organizmów żywych. Wykazała wielotorowość oddziaływania pola elektromagnetycznego, a także różnorodne efekty zdrowotne i biologiczne jakie wywołuje. Wyczerpująco wyjaśniła na jakiej podstawie dokonano wyboru częstotliwości stosowanego w pracy doktorskiej PEM, uzasadniła wybór świni domowej jako modelu badawczego, a także, w oparciu o dotychczasowe wyniki

badań dokumentujące negatywny wpływ ekspozycji tkanek macicy na PEM obserwowane w okresie cyklu rujowego, wyjaśniła konieczność podjęcia takich badań u samic ciężarnych.

W kolejnym rozdziale: Cel pracy, hipotezy i zadania badawcze, Doktorantka przedstawiła hipotezę badawczą, cele pracy oraz sformułowała zadania badawcze, które zrealizowała z sukcesem dzięki nowoczesnym metodom badawczym oraz zaawansowanym analizom bioinformatycznym. W rozdziale Materiał i metody. Doktorantka opisała model doświadczalny, krótko scharakteryzowała procedury wstępnego przygotowania materiału eksperymentalnego do badań oraz przedstawiła metody badawcze stosowane w ocenianej pracy: inkubację *in vitro* skrawków błony śluzowej macicy świni, które posłużyły do izolacji RNA poddanego sekwencjonowaniu następnej generacji z wielostopniową bioinformatyczną analizą danych. Uzyskane wyniki potwierdzono metodą real-time PCR. Dodatkowo, Doktorantka przeprowadziła analizę wybranych białek z wykorzystaniem techniki Western-blot, oraz oznaczyła poziomy wybranych hormonów steroidowych w pożywce hodowlanej, po zakończonej inkubacji (technika radioimmunologiczna). Muszę podkreślić, że opanowanie przez Doktorantkę tak szerokich i specjalistycznych umiejętności praktycznych budzi zrozumiały podziw. Moja uwaga odnośnie tej części opracowania dotyczy brakującego fragmentu opisującego przeprowadzoną analizę immunofluorescencyjną cytochromu P450c17 i 3βHSD w skrawkach błony śluzowej macicy, poddanych działaniu pola elektromagnetycznego. Fragment ten znajduje się w załączonej, pierwszej publikacji – czy nie powinien zostać również umieszczony w opracowaniu polskojęzycznym rozprawy?

Treść rozdziału Wyniki jest zgodna z zawartością publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej i w adekwatny sposób odnosi się do poszczególnych rycin i tabel w nich zawartych. W Podsumowaniu wypunktowano otrzymane rezultaty w nawiązaniu do poszczególnych celów pracy, co znacznie ułatwia czytelnikowi odnalezienie się w ogromie prezentowanych wyników. Polskojęzyczne opracowanie zamykają trzy syntetyczne Wnioski, które jednoznacznie wskazują, że Doktorantka z sukcesem zrealizowała założone cele, a uzyskane wyniki badań stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę na temat zagrożenia jakie może nieść ekspozycja organizmu samicy na PEM, zwłaszcza w kontekście tak ważnego dla sukcesu rozrodczego okresu wczesnej ciąży.

Za najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Wiktorii Kozłowskiej uznaję: (1) udokumentowane stwierdzenie, że PEM zmieniając poziom syntezy i uwalniania tak androgenów jak estrogenów w błonie śluzowej macicy świni w okresie około-implantacyjnym, może zaburzać optymalne dla wczesnej ciąży poziomy tych hormonów w środowisku wewnątrzmacicznym, a przez to zakłócać

funkcje macicy podczas implantacji, oraz (2) identyfikację zmian w transkryptomie błony śluzowej macicy poddanej działaniu PEM o ekstremalnie niskiej częstotliwości, Zmiany te wskazują, że w zależności o częstotliwości stosowanego pola elektromagnetycznego oraz czasu ekspozycji tkanki, dochodzi do zmienionej ekspresji kluczowych genów, w tym genu receptora witaminy D, genów związanych z procesem steroidogenezy, czy też genów warunkujących prawidłową regulację procesów metabolicznych, co może zaburzać środowisko wewnątrzmaciczne niezbędne dla prawidłowego rozwoju zarodka.

Po przeczytaniu omówienia polskojęzycznego nasunęły mi się następujące pytania:

1. Doktorantka w swojej pracy doktorskiej wykorzystała jako zwierzęcy model doświadczalny świnię domową. Mając na uwadze odniesienie otrzymanych wyników do zastosowań w medycynie ludzkiej, jest to jeden z najlepszych modeli badawczych. Między świnią, a człowiekiem występują liczne podobieństwa, czy to w budowie anatomicznej, fizjologii czy genetyce. Niewątpliwym, dodatkowym atutem jest także podobieństwo wczesnego rozwoju przed-implantacyjnego zarodków. Czy zatem w tytule polskojęzycznego opracowania pracy doktorskiej nie powinna się pojawić informacja odnośnie modelu badawczego?
2. Doktorantka używa sformułowania „medium hodowlane” – czy nie lepiej byłoby napisać po prostu „pożywka hodowlana”?
3. Bardzo satysfakcjonującym jest fakt, iż do normalizacji wybrano dwa geny referencyjne: *GAPDH* i *ACTB*. Proszę o wyjaśnienie na jakiej podstawie wybrano właśnie te geny?
4. Czy przeciwciała pierwszorzędowe, wykorzystane w analizie Western blot, były specyficzne dla świni, ew. czy przeprowadzono walidację przeciwciał dla tkanek świni?
5. Czy Doktorantka uważa, że otrzymane wyniki można z powodzeniem odnieść do fizjologii rozrodu człowieka? Czy wyniki te mogą być wykorzystane w medycynie weterynaryjnej?

PODSUMOWANIE I WNIOSEK KOŃCOWY

Po przeczytaniu rozprawy doktorskiej mgr. inż. Wiktorii Kozłowskiej nie mam wątpliwości, że uzyskane przez nią nowatorskie, interesujące i kompleksowe wyniki poszerzają dotychczasową wiedzę na temat wpływu PEM o ekstremalnie niskiej częstotliwości na układ rozrodczy świni, w okresie około-implantacyjnym. Co więcej, wyniki te mogą posłużyć do dalszych badań, na przykład nad wpływem PEM w

przypadkach wymagających interwencji medycznych. W mojej ocenie przedstawiona do recenzji rozprawa jest dowodem dojrzałości naukowej Autorki oraz jej dobrego przygotowania merytorycznego i warsztatowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zmianami) stawiane pracom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Mając na uwadze wysoki poziom naukowy otrzymanych wyników badań, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach, wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej.

