UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Prof. dr hab. Justyna Rogalska,
Katedra Fizjologii Zwierząt i Neurobiologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń
e-mail: rogal@umk.pl

OCENA

rozprawy doktorskiej Pani magister inżynier Wiktorii Kozłowskiej pt.

„Konsekwencje oddziaływania pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości na steroidogenezę i profil transkryptomiczny błony śluzowej macicy"

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska poświęcona została badaniu wpływu pola elektromagnetycznego niskiej częstotliwości na zmiany procesów hormonalnych i zmiany transkryptomu w błonie śluzowej macicy, które są kluczowe dla prawidłowego rozwoju płodu. Badania zostały zrealizowane na modelu świni domowej.

W skład przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej wchodzą trzy prace eksperymentalne opublikowane w czasopismach *Animal Reproduction Science, Reproductive Biology* oraz *Journal of Physiology and Pharmacology* o łącznym impact factor 7.271, liczba punktów MEiN 340 punktów. Warto podkreślić, że Pani mgr Kozłowska jest pierwszym autorem we wszystkich wymienionych pracach. Wartość dysertacji podnosi fakt, iż badania zostały wykonane w ramach projektu badawczego finansowanego przez NCN, którego kierownikiem była promotor dysertacji prof. dr hab. Anita Franczak.

Konsekwencje ekspozycji na pole elektromagnetyczne niskiej częstotliwości obejmują szeroki zakres zjawisk, dotyczą różnych układów czy narządów, a zatem istnieje ryzyko, że ekspozycja na PEM może mieć kluczowy wpływ na przebieg ciąży. Weryfikacja procesów, które ulegają modyfikacjom pod wpływem PEM jest istotnym elementem w szacowaniu ryzyka związanego z oddziaływaniem tego czynnika środowiskowego. Z drugiej strony daje to również szansę na odkrycie czy są procesy wzmacniane przez działanie PEM, które skutkują jego pozytywnymi konsekwencjami. W tym drugim wypadku odziaływanie PEM może być istotnym elementem opracowania skutecznych metod terapeutycznych wielu schorzeń. Badania opisane w dysertacji wpisują się w ten nurt badawczy poszukujący odpowiedzi na pytania o negatywne i pozytywne konsekwencje odziaływania PEM.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy zostały podsumowane w komentarzu autorskim. Układ tej części rozprawy jest typowy dla prac doświadczalnych. Komentarz zawiera wprowadzenie, hipotezę, cele i zadania badawcze, omówiono również w sposób syntetyczny materiały i metody wykorzystane przy realizacji badań, a także wyniki badań. Komentarz autorski kończy podsumowanie,

wnioski, streszczenie i piśmiennictwo (62 pozycje). Przy czym liczba pozycji zacytowana w publikacjach jest zdecydowanie większa, co dowodzi dogłębnej analizy badanego tematu przez doktorantkę. Na szczególne podkreślenie zasługuje estetyka przygotowania rozprawy, jak również przejrzysty i poprawny język naukowy.

Wkład doktorantki w powstanie publikacji nie budzi wątpliwości, został potwierdzony oświadczeniami współautorów. Pani mgr Kozłowska brała udział w opracowywaniu metodyki badań, pobierała materiał doświadczalny i wykonała przewidziane planem badawczym analizy, następnie dokonała analizy uzyskanych wyników i sformułowała wnioski. Ostatnim etapem pracy było przygotowanie publikacji do druku.

We wstępie komentarza autorskiego doktorantka bardzo czytelnie i jasno przedstawia problem badawczy, zwracając szczególną uwagę na te elementy, które stały się podstawą do sformułowania celów pracy. Autorka omawia konsekwencje oddziaływania PEM na organizmy żywe, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu na tkanki układu rozrodczego. Ponadto przedstawia udział androgenów i estrogenów w procesach zachodzących w błonie śluzowej macicy, w okresie około-implantacyjnym. Synteza i sekrecja hormonów steroidowych w zarodkach i tkankach macicy determinują zdarzenia występujące w czasie tego krytycznego okresu, W tym czasie prawidłowa aktywność błony śluzowej macicy jest konieczna do niezaburzonej interakcji pomiędzy zarodkiem a matką

Wstęp w logiczny sposób prowadzi do kolejnej części komentarza autorskiego, czyli założeń i celów podjętych przez doktorantkę badań. Głównym celem pracy doktorskiej było określenie czy PEM wpływa na aktywność steroidogeniczną błony śluzowej macicy w okresie około-implantacyjnym oraz profil transkryptomiczny tej tkanki u świni domowej. Biorąc pod uwagę, że progesteron może pełnić funkcję ochronną, tj. przeciwdziałającą negatywnym skutkom oddziaływania PEM na tkanki macicy, doktorantka podjęła się również zbadania udziału tego hormonu we wspomnianych procesach po ekspozycji na PEM. Ponadto, cele szczegółowe i ich realizacja zostały omówione w poszczególnych publikacjach. Metodyka przeprowadzonych badań, nie budzi zastrzeżeń. Były to badania prowadzone in vitro na skrawkach błony śluzowej macicy ciężarnych świń (w 15-16 dniu ciąży czyli w okresie około-implantacyjnym). Analizy zostały wykonane z użyciem zróżnicowanych metod badawczych: RT-PCR, Western-Blot, metoda radioimmunologiczna (RIA), metoda sekwencjonowania następnej generacji (NGS). Chciałabym natomiast poruszyć kwestię zastosowania PEM o wartości indukcji magnetycznej 8 mT. W całej pracy analizie podlegają zastosowane częstotliwości pola elektromagnetycznego czyli 50 i 120 Hz, dla których doktorantka wskazała uzasadnienie. Natomiast jeśli chodzi o wartość indukcji magnetycznej nie znalazłam wyjaśnienia dla tego parametru ani w publikacjach, ani w komentarzu autorskim. Stąd moja prośba do doktorantki o odniesienie się do tej kwestii. Chciałabym również zapytać, czy w czasie ekspozycji monitorowano parametry pola (zapewne były zdefiniowane w urządzeniu, ale czy weryfikowano, czy rzeczywiste wartości odpowiadają ustawieniom).

Dobrze przemyślane, logicznie zaplanowane badania, a także ich konsekwentna i precyzyjna realizacja, przyniosły spodziewane efekty w postaci interesujących wyników. Komentarz autorski zawiera przedstawienie wyników badań z odniesieniem do adekwatnych tabel i rycin w publikacjach. Ta część komentarza jest moim zdaniem zbyt obszerna, gdyż te dane są przedstawione w poszczególnych publikacjach. W podsumowaniu p. Kozłowska dokonała omówienia wyników badań i ich interpretacji w komentarzu autorskim, które wykazało, że uzyskane wyniki pozwoliły na rozwiązanie problemu badawczego sformułowanego w celu dysertacji.

Chciałabym zwrócić uwagę na główną część rozprawy czyli publikacje, które czyta się z ogromną przyjemnością i uznaniem dla bardzo dobrze poprowadzonej argumentacji dla wyprowadzanych wniosków ze zrealizowanych badań.

W publikacjach nr 1 i 2 omówiono wyniki dotyczące wpływu pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości (PEM) na poziom hormonów (androstendionu (A_4) testosteronu (T), estronu (E_1) i estradiolu-17β (E_2)) i ekspresję mRNA enzymów zaangażowanych w proces steroidogenezy (*CYP17A1, HSD3B1, CYP19A3* i *HSD17B4)* i w błonie śluzowej macicy. Stwierdzono, że wpływ PEM na błonę śluzową macicy był bardziej widoczny w przypadku syntezy oraz sekrecji androgenów, niż w przypadku syntezy oraz sekrecji estrogenów. Ponadto, udokumentowano, że w

przypadku obu zastosowanych częstotliwości PEM nie stwierdzono zmian w poziomie sekrecji testosteronu w skrawkach błony śluzowej macicy, natomiast w obecności progesteronu, stężenie testosteronu uległo obniżeniu. Ten wynik może świadczyć, że progesteron w odniesieniu do sekrecji T pełni funkcję uwrażliwiającą tkankę na działanie PEM. Kolejny ważny wynik dotyczy zależności poziomu sekrecji androstendionu przez skrawki błony śluzowej macicy od czasu ekspozycji na PEM o częstotliwości 120 Hz i obecności progesteronu. Po 2-godzinnej ekspozycji stwierdzono obniżoną sekrecję androstendionu, co ze względu na to, że związek ten jest substratem do syntezy estrogenów może potencjalnie skutkować niższym ich poziomem w macicy. Natomiast wydłużona (4-godzinna) ekspozycja na PEM (120 Hz) w obecności progesteronu spowodowała wzrost sekrecji androstendionu co może przyczynić się do wyższej niż w prawidłowym przebiegu ciąży produkcji estrogenów przez błonę śluzową macicy.

Warto zauważyć, że zmiany sekrecji androstendionu po krótkotrwałej (2-godzinnej) ekspozycji tkanki na PEM (120 Hz) nie były widoczne w obecności progesteronu, co świadczy o potencjalnie protekcyjnym działaniu tego hormonu przed niekorzystnymi skutkami oddziaływania PEM na badaną tkankę. W przypadku ekspozycji z dodatkiem P_4 zaobserwowano obniżenie sekrecji E_2 (PEM 50 Hz 2 godziny) oraz T (efekt PEM o częstotliwości 50 i 120 Hz, 2 i 4 godziny). Wpływ PEM na badane androgeny i estrogeny, obserwowano zatem zarówno w obecności, jak i przy braku progesteronu. A zatem rola progesteronu nie jest w pełni jasna, uzyskane wyniki wskazują, że wpływ hormonu na poziom analizowanych parametrów może być różny w zależności od czasu ekspozycji i częstotliwości PEM. Ważnym wynikiem pracy jest również wykazanie, że parametry pola w tym wypadku częstotliwość jest istotnym czynnikiem determinującym wpływ PEM na organizm. Błona śluzowa macicy w obecności P_4 była uwrażliwiana częściej na działanie PEM o częstotliwości 50 Hz niż 120 Hz.

W tym miejscu chciałabym wrócić do parametru, który opisuje właściwości pola elektromagnetycznego czyli wartości indukcji magnetycznej. W przypadku prezentowanych wyników wartość indukcji magnetycznej była stała dla obu zastosowanych częstotliości PEM 50 i 120 Hz, a zatem parametrem różnicującym wpływ PEM była częstotliwość pola elektromagnetycznego. Natomiast w pracach naukowych weryfikujących wpływ PEM na konkretne procesy w żywym organizmie stosuje się różne wartości częstotliwości i różne wartości indukcji magnetycznej, której wpływ na konsekwencje działania PEM jest w pełni potwierdzony. A zatem zasadne byłoby odnoszenie się do wyników badań innych autorów wskazując nie tylko na stosowane częstotliwości PEM, ale również na wartość indukcji magnetycznej, czego brakuje zarówno w komentarzu autorskim, jak również w publikacjach.

Jak wykazano w dysertacji wpływ udziału progesteronu na procesy indukowane PEM nie jest jednoznaczny. Czy mogłaby Pani zaproponować kierunek dalszych badań, jakie parametry, szlaki metaboliczne należałoby zweryfikować aby znaleźć bardziej przyczyny zmian w poziomach badanych parametrów w obecności progesteronu. Kolejne pytanie: Czy w świetle uzyskanych wyników, abstrahując od wpływu pola elektromagnetycznego można wysnuć wnioski dotyczące roli progesteronu w kontekście terapii zaburzeń związanych z zagnieżdżaniem zarodka we wczesnym etapie ciąży.

Trzecia z prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej dotyczy wpływu PEM na zmiany profilu transkryptomicznego błony śluzowej macicy

Istotnym odkryciem było stwierdzenie, że pod wpływem PEM ulega zmianie ekspresja genów, które pośrednio są powiązane z regulacją metabolizmu hormonów steroidowych, a zatem może mieć to również wpływ na syntezę androgenów i estrogenów.

Ponadto zaobserwowano zmiany w ekspresji genów, które mają wpływ na strukturę, proliferację i migrację komórek błony śluzowej macicy, a także mogą wpływać na przepływ krwi i zaburzać konwersję androgenów oraz estrogenów. W konsekwencji może to skutkować zmianami w funkcji macicy i zaburzać prawidłowy rozwój zarodka.

Dyskusja wyników w poszczególnych publikacjach świadczy o dużej wnikliwości doktorantki. Pani mgr Kozłowska dowiodła, że doskonale porusza się w zagadnieniach związanych z tematem dysertacji i w publikacjach elegancko w oparciu o literaturę tłumaczy uzyskane wyniki.

Po przeczytaniu publikacji nie mam wątpliwości, że przedstawione do oceny prace stanowią spójny cykl, który odnosi się do postawionego celu dysertacji, a wyniki w nim opisane weryfikują

postawioną hipotezę. Uzyskane wyniki przedstawione w poszczególnych pracach uzupełniają się wzajemnie i dają pełen obraz zmian procesów steroidogenezy w błonie śluzowej macicy pod wpływem ekspozycji na pole elektromagnetyczne niskiej częstotliwości.

Podsumowaniem pracy doktorantki są 3 wnioski, uzasadnione uzyskanymi wynikami, które potwierdzają zrealizowanie postawionych celów badawczych.

Jedyne czego mi zabrakło w komentarzu autorskim to spis używanych w pracy skrótów. Ponadto, jeśli dany termin czy substancja dla której przypisano skrót czy oznaczenie literowe pojawia się po raz pierwszy w tekście powinna być zapisana w pełnym brzmieniu,, np., na str. 19 wprowadzenia pojawia się A_4, a co kryje się za tym oznaczeniem dowiadujemy się dopiero w kolejnym rozdziale. To nie jest błąd merytoryczny, ale utrudnia rozumienie założeń pracy omówionych we wprowadzeniu. To są drobne uchybienia, które nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę dysertacji.

W podsumowaniu chciałabym wyraźnie podkreślić, że mgr inż. Wiktoria Kozłowska wynikami swojej pracy zrealizowała zamierzone cele. Było to możliwe dzięki dobrze zaplanowanym badaniom, a także ich konsekwentnej realizacji z użyciem różnorodnych technik i metod badawczych.

Badania przeprowadzone przez doktorantkę są bardzo interesujące i nowatorskie, dostarczają zupełnie nowych danych na temat wpływu PEM na zjawiska w błonie śluzowej macicy, i co istotne pozwalają na postawienie kolejnych pytań badawczych, szczególnie o rolę progesteronu, który przy okazji tych badań pokazał niejako nowe oblicze, któremu należy się przyjrzeć w kontekście terapii służących utrzymaniu ciąży na wczesnym okresie jej rozwoju.

Przedstawione wyniki w istotny sposób uzupełniają istniejącą wiedzę wnosząc zupełnie nowe elementy w zrozumienie długoterminowych konsekwencji ekspozycji na PEM, które może mieć wpływ na tempo rozwoju zarodków i przebieg ciąży w zależności od częstotliwości i czasu.

Badania potwierdziły, że PEM może indukować zmiany stężeń hormonów steroidowych w blonie śluzowej macicy, co może mieć istotny wpływ na proces implantacji, ponieważ hormony te regulują szereg procesów molekularnych w komórkach macicy. Konsekwencją zaburzeń syntezy i sekrecji androgenów i estrogenów produkowanych w błonie śluzowej macicy mogą być zmiany w budowie i aktywności tej tkanki, które z kolei mogą mieć wpływ na utrzymanie wczesnej ciąży.

Ponadto rozprawa pozwala stwierdzić, że doktorantka posiada ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki biologiczne i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy badawczej.

Konkludując, uważam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone 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 zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o nadanie Pani mgr inż. Wiktorii Kozłowskiej stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ze względu na bardzo wysoką jakość przedstawionych badań, ich znaczenie aplikacyjne, a także ogromny nakład pracy, jaki doktorantka włożyła zarówno w realizację badań, jak również w ich opracowanie merytoryczne wnioskuję o wyróżnienie rozprawy. Badania zrealizowane przez p. Kozłowską mają charakter innowacyjny i zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych.

Prof. dr hab. Justyna Rogalska

Justyna Rogalska

Toruń, dnia 14. września 2022