

dr hab. Katarzyna Knapczyk-Stwora
Zakład Endokrynologii
Katedra Fizjologii Zwierząt
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Ocena pracy doktorskiej mgr Agnieszki Sadowskiej pt. "Zmiany w transkryptomie komórek ziarnistych linii AVG-16 poddanych działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny (TCDD)"

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

i Badań Biomedycznych

Zakład Endokrynologii

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat dioksyny, zaliczane do trwałych zanieczyszczeń organicznych, budzą bardzo duże zainteresowanie i są tematem licznych badań naukowych. Bezpośrednim, znaczącym źródłem tych związków są procesy spalania substancji organicznych, w tym tworzyw sztucznych, zawierających w swoim składzie chlor. Wśród dioksyn największą toksycznością dla organizmów żywych charakteryzuje się 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyna (TCDD). Ze względu na swoją lipofilność i brak efektywnych mechanizmów pozwalających na sprawną detoksykację, dioksyny ulegają bioakumulacji w środowisku i w żywych organizmach. Człowiek może zostać narażony na ich działanie poprzez kontakt ze skażoną wodą, powietrzem, a także, w głównej mierze, w wyniku spożycia zanieczyszczonej żywności pochodzenia zwierzęcego i roślinnego. Mediatorem efektów toksycznego działania dioksyn jest receptor węglowodorów aromatycznych (AhR), który wraz z jego jądrowym przenośnikiem (ARNT) tworzy kompleks będący czynnikiem transkrypcyjnym, aktywującym ekspresję genów. Z uwagi na fakt, że dioksyny mogą zaburzać produkcję i działanie hormonów steroidowych, jednym z ważniejszych miejsc ich aktywności jest układ rozrodczy. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Sadowskiej doskonale wpisuje się w te zagadnienia. Ma ona na celu pełniejsze poznanie molekularnych mechanizmów toksyczności indukowanej przez TCDD w jajniku. Zagadnienia poruszane przez Doktorantkę są jak najbardziej aktualne i godne uwagi, a dodatkowym walorem pracy jest wykorzystanie nowoczesnej metody wysokoprzepustowego sekwencjonowania następnej generacji w celu poznania struktury genów AhR i ARNT u świni oraz określenia

ul. Gronostajowa 9

30-387 Kraków

tel./fax: 12 664 50 98

kompleksowych zmian w transkryptomie komórek ziarnistych linii AVG-16 poddanych działaniu TCDD.

Przedstawiona do oceny praca ma formę spójnego tematycznie zbioru trzech artykułów opublikowanych w latach 2015 (jedna publikacja) i 2017 (dwie publikacje) w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach naukowych, indeksowanych w bazie JCR (Journal Citation Reports), o sumarycznym współczynniku oddziaływania (Impact Factor) 5,639 i 70 punktach MNiSW. Dwie z oryginalnych prac, opublikowane w *Journal of Genetics* i *Chemosphere*, zawierają również dane uzupełniające do artykułów (tzw. Supplementary data), których niestety nie dołączono do rozprawy. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że we wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w dwóch pracach również autorem korespondencyjnym. Wszystkie powyższe prace są wieloautorskie – liczą od ośmiu do jedenastu współautorów, co jest zrozumiałe w świetle ilości wyników oraz ich szczegółowego i kompleksowego opracowania. Zgodnie z dołączonymi do rozprawy doktorskiej oświadczeniami wszystkich współautorów publikacji, udział Doktorantki w każdej z prac był dominujący i polegał na opracowaniu koncepcji oraz metodyki badań, wykonaniu analiz laboratoryjnych, interpretacji i opracowaniu wyników oraz przygotowaniu publikacji do druku.

Powyższe publikacje stanowią logiczny układ, a ich tematyka konsekwentnie dąży do weryfikacji hipotezy badawczej zakładającej, że transkryptomy komórek kontrolnych i poddanych działaniu TCDD różnią się. W pierwszej pracy stanowiącej rozprawę doktorską, Doktorantka podjęła się zbadania cech fenotypowych, biochemicznych i molekularnych wyprowadzonej z komórek ziarnistych jajnika świni linii AVG-16, w celu określenia jej przydatności do badań wpływu czynników środowiskowych na funkcjonowanie komórek ziarnistych. Doktorantka wykazała, że wykorzystane w dalszych badaniach, komórki linii AVG-16 stanowią doskonały model doświadczalny. Celem kolejnej pracy było zbadanie struktury i chromosomowej lokalizacji genów AhR i ARNT u świni przy zastosowaniu innowacyjnej metody sekwencjonowania następnej generacji. Doktorantka wykazała występowanie wariantów cDNA AhR i ARNT, co może wpływać na specyficzną dla danej komórki odpowiedź na określony ligand. Wyniki z dwóch pierwszych publikacji umożliwiły realizację głównego celu rozprawy doktorskiej, którym było zbadanie zmian zachodzących w transkryptomie komórek linii AVG-16 poddanych działaniu TCDD. Rezultaty tych ostatnich badań zamieszczono w trzeciej publikacji stanowiącej rozprawę doktorską, w

moim mniemaniu najistotniejszej. Doktorantka wykazała w niej, również przy zastosowaniu sekwencjonowania następnej generacji, że TCDD może zaburzać funkcjonowanie pęcherzyków jajnikowych świni poprzez wpływ na ekspresję genów związanych z proliferacją, różnicowaniem oraz cyklem komórkowym komórek ziarnistych.

W czasie lektury wszystkich, wcześniej już recenzowanych prac, nie znalazłam elementów problematycznych, czy wzbudzających wątpliwości. Chciałabym jedynie zwrócić uwagę, że lepszą kontrolą negatywną w reakcji immunofluorescencyjnej, od ominięcia przeciwciała pierwszorzędowego, jest zastosowanie nieimmunizowanej surowicy pochodzącej od gatunku zwierzęcia, od którego pochodzi przeciwciało pierwszorzędowe.

Oryginalne prace badawcze, które składają się na rozprawę, opatrzone są obszernym, 39. stronicowym omówieniem zawierającym: streszczenie w języku polskim i angielskim, spis publikacji składających się na rozprawę doktorską, wstęp będący syntetycznym przeglądem literatury, cele pracy, materiały i metody, wyniki i wnioski oraz wykaz wybranych pozycji bibliografii w liczbie 81.

W krótkim, sześciostronicowym wstępie Doktorantka przedstawiła w bardzo przejrzysty sposób zagadnienia będące podstawą rozprawy doktorskiej. Rozdział ten napisany jest bardzo dojrzałe, co wskazuje na dobre zapoznanie się z tematem. Doktorantka zwróciła uwagę na brak danych dotyczących chromosomowej lokalizacji genów AhR i ARNT oraz pełnej sekwencji ich transkryptów u świni, jak również niewiele informacji dotyczących komórek linii AVG-16. Moja jedyna uwaga dotyczy braku cytacji odnoszącej się do zsekwencjonowania genu AhR u bezkręgowców i kręgowców (strona 8).

Cel pracy, opisany wcześniej, został jasno sformułowany, a następnie konsekwentnie realizowany. Aczkolwiek zabrakło mi wyjaśnienia dlaczego jako model badawczy zastosowano świnię. Odpowiedź na to pytanie można znaleźć w dołączonych publikacjach, ale uważam, że informacja ta jest istotna i powinna znaleźć się również w opisie celów pracy dołączonego opracowania.

Bardzo dokładny opis metodyki prowadzonych badań zajmuje aż 11 stron. Wydaje się, że w wielu miejscach wystarczyłoby odesłanie czytelnika do odpowiednich publikacji, w których zawarte są wyczerpujące opisy poszczególnych metod. Natomiast szczególną uwagę zwraca tutaj ilość i różnorodność wykonanych analiz, co świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę nowoczesnego warsztatu badawczego. Stosowane metody to:

hodowla in vitro linii komórkowej AVG-16 i limfocytów, analiza morfologiczna komórek, metoda radioimmunologiczna, elektroforeza kapilarna, analiza ekspresji genów metodą real-time PCR, fluorescencyjna hybrydyzacja in situ, analiza ekspresji białek metodą Western-blot, immunocytofluorescencyjna lokalizacja białek, sekwencjonowanie następnej generacji z bioinformatyczną analizą danych.

W rozdziale „Wyniki” opisano w skondensowanej formie wyniki zawarte w trzech pracach stanowiących rozprawę doktorską. Rozdział ten podzielono na podrozdziały, z których każdy dotyczył osobnej pracy badawczej składającej się na rozprawę i został zakończony krótkim podsumowaniem.

Polskojęzyczne opracowanie zamyka pięć wniosków, które w jednoznaczny sposób pokazują na zrealizowanie postawionych celów pracy i stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę na temat toksycznego działania TCDD. Za najważniejsze osiągnięcie rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Sadowskiej uznaję wykazanie, że (1) komórki linii AVG-16 stanowią dobry model doświadczalny do badania wpływu czynników środowiskowych na jajnik, (2) występowanie wariantów AhR i ARNT może być jednym z sposobów determinowania specyficznej odpowiedzi komórki na dioksyny, (3) TCDD może zaburzać funkcjonowanie pęcherzyków jajnikowych świni poprzez wpływ na ekspresję genów związanych z proliferacją, różnicowaniem, cyklem komórkowym, a także może powodować atreję pęcherzyków jajnikowych wywołując śmierć komórek ziarnistych na drodze innej niż apoptotyczna.

PODSUMOWANIE

Po przeczytaniu pracy doktorskiej nie mam żadnych wątpliwości, że uzyskane przez Doktorantkę interesujące, pionierskie i kompleksowe wyniki poszerzają dotychczasową wiedzę na temat mechanizmu działania TCDD w jajniku. W mojej ocenie rozprawa jest bardzo wartościowa, w której widać dobry plan badawczy i konsekwentną realizację eksperymentów. Świadczy to o dojrzałości naukowej Autorki i o jej dobrym przygotowaniu merytorycznym i warsztatowym. Co więcej, prezentowane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań, zmierzających do pełniejszego poznania mechanizmów toksycznego działania ksenobiotyków. Poza kilkoma zamieszczonymi powyżej uwagami, które nie umniejszają wartości pracy, a wynikają jedynie z

obowiązku recenzenta, chciałabym, żeby Doktorantka odniosła się do zalet i wad/ograniczeń metody sekwencjonowania następnej generacji.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Agnieszki Sadowskiej: „Zmiany w transkrypcyjnej komórce ziarnistej linii AVG-16 poddanych działaniu 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksyny (TCDD)” spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595; z późniejszymi zmianami) stawiane pracom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Wysockiej Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Agnieszki Sadowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto z uwagi na wysoką wartość merytoryczną dysertacji i oryginalność uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej przeze mnie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.

Katarzyna Knapczyk-Stuora

Kraków 21.06.2017