

dr hab. Małgorzata Kajta
Zakład Neuroendokrynologii Doświadczalnej
Instytut Farmakologii PAN w Krakowie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ mgr Agnieszki Sitarz-Głównia

*„Ftalany jako związki zaburzające funkcję neuronów i komórek glejowych
mózgu myszy w hodowlach in vitro”*

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedłożona do oceny praca doktorska mgr Agnieszki Sitarz-Głównia powstała w Katedrze Biotechnologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, pod kierunkiem dr hab. Anny K. Wójtowicz.

Rozprawa liczy 100 stron maszynopisu i zawiera: Wykaz Skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cele pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusję, a także Podsumowanie, Wnioski i Literaturę. W spisie piśmiennictwa zacytowanego w rozprawie znalazło się 200 publikacji, głównie anglojęzycznych. Struktura pracy w pełni odpowiada przyjętym standardom. Streszczenie przedstawia w zwięzły sposób poszczególne rozdziały rozprawy i jest zgodne z wynikami badań.

Badania stanowiące podstawę pracy doktorskiej zostały sfinansowane w głównej mierze przez Narodowe Centrum Nauki, grant OPUS 2012/07/B/NZ4/00238.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Tematyka przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej jest adekwatna wobec wyzwań współczesnej biologii i medycyny. Dotyczy bowiem efektów i mechanizmów działania ftalanu, jakim jest DEHP, w dwóch typach komórek występujących w mózgu ssaków tj. w neuronach i astrocytach. Coraz więcej badań wskazuje na silną korelację między narażeniem na występujące w środowisku zanieczyszczenia chemiczne a rozwojem chorób neurodegeneracyjnych i zaburzeń neurologicznych. Biorąc pod uwagę, że wiele spośród tych zanieczyszczeń ma długi okres półtrwania i łatwo pokonuje bariery krew-mózg i krew-łożysko, konieczność radzenia sobie z zagrożeniem stawia przed badaczami wciąż nowe wyzwania. Od niedawna za czynniki ryzyka wystąpienia autyzmu i zespołu nadpobudliwości psychoruchowej z deficytem uwagi (ADHD) uważa się ftalany. Najnowsze dane sugerują, że wywołane przez DEHP zmiany w metylacji DNA są dziedziczone epigenetycznie. Obecne w środowisku substancje mogą działać na organizm jak fałszywe hormony ingerując m.in. w szlaki receptorów steroidowych oraz czynników transkrypcyjnych aktywowanych ligandem jak np.

receptor węglowodorów aromatycznych (AhR) czy receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów typu gamma (PPAR γ). Dowiedziono, że oprócz zaburzania funkcji endokrynnych i działania jak „*endocrine disrupting chemicals*”, wiele z tych substancji upośledza neuroprzekąźnictwo i tworzenie sieci neuronalnych, a więc działa jak „*neural disrupting chemicals*”.

W kontekście mechanizmów działania ftalanu DEHP, przedmiotem obecnej rozprawy doktorskiej są receptory AhR i PPAR γ , a także regulowane przez nie cytochromy i metaloproteinazy. Receptory AhR i PPAR γ uczestniczą nie tylko w odpowiedzi komórek na różnego typu substancje egzogenne/ksenobiotyki, lecz biorą również aktywny udział w neurorozwoju. Receptory AhR i PPAR γ występują w nerwowych komórkach macierzystych regulując ich proliferację, migrację i różnicowanie. Delecja receptora AhR w neuronach ziarnistych mózdzku myszy hamuje neurogenezę. Z kolei nokaut receptora PPAR γ przyczynia się do stresu oksydacyjnego oraz sprzyja ischemicznemu uszkodzeniu mózgu. Wiele wskazuje na to, że zaburzenie ekspresji i/lub aktywności PPAR γ może prowadzić do neurodegeneracji i nowotworów mózgu. Co więcej, receptor PPAR γ jest od niedawna uważany za atrakcyjny punkt uchwytu w leczeniu zaburzeń metabolicznych i chorób układu nerwowego, z chorobą Alzheimera i udarem włącznie. Jednak wiedza na temat udziału ww. receptorów w odpowiedzi komórek nerwowych na zanieczyszczenia środowiskowe, jakimi są ftalany jest niewielka, zwłaszcza w odniesieniu do wczesnych etapów rozwoju układu nerwowego.

Wykonanie badań w oparciu o pierwotne hodowle komórek mózgu myszy pozwoliło Doktorantce na precyzyjne prześledzenie zmian w przeżywalności i aktywności metabolicznej komórek (ROS, kaspaza-3, barwienie Hoechst'em 33342 i kalceiną, oznaczanie białka Ki-67, pomiar aktywności enzymów mitochondrialnych i uwalniania dehydrogenazy mleczanowej), a także umożliwiło identyfikację mechanizmów działania DEHP z uwzględnieniem receptorów AhR i PPAR γ , cytochromów CYP1A1 i CYP1B1 oraz metaloproteinazy-2 i -9. W początkowym etapie badań Doktorantka określiła krzywe zależności efektu od stężenia DEHP w szerokim zakresie stężeń tj. 10^{-3} - 10^2 μ M, przy czym zbadała efekty działania 8 różnych stężeń wybranego ftalanu. Te żmudne analizy dotyczyły oznaczania ROS oraz pomiarów aktywności kaspazy-3, enzymów mitochondrialnych, enzymu CYP1A1 i dehydrogenazy mleczanowej, zarówno w astrocytach, jak i neuronach. Warto podkreślić, że z wyjątkiem pomiaru aktywności CYP1A1, który wykonano w 2 punktach czasowych, każda z pozostałych analiz została przeprowadzona co najmniej w 3 punktach czasowych. Dopiero w kolejnych etapach badań Doktorantka ograniczyła liczbę stężeń DEHP i stosowała zazwyczaj najniższe działające stężenie ftalanu tj. 10 μ M. Doktorantka ustaliła profile ekspresji mRNA i białka receptora AhR oraz regulowanych przez niego cytochromów CYP1A1 i CYP1B1, a także receptora PPAR γ i metaloproteinaz MPP-2 i MPP-9. Autorka rozprawy zadała sobie wiele trudu, by ocenić dynamikę zmian ekspresji specyficznych białek, czemu służyły pomiary w 5 punktach czasowych, w przedziale od 1 do 48 godziny ekspozycji na DEHP. Tylko osoba

o prawdziwym zacięciu naukowym porywa się na tak czasochłonne i wymagające niezwyklej precyzji analizy.

Liczący 14 stron WSTĘP jest klarownym wprowadzeniem w tematykę rozprawy. Znajdziemy w nim m.in. opis kory mózgowej i kory nowej, której komórki były hodowane *in vitro* i poddawane działaniu DEHP, charakterystykę receptorów AhR i PPAR γ , cytochromów zależnych od AhR oraz metaloproteinaz, a także najnowsze informacje na temat ftalanu DEHP, jego budowy chemicznej i efektów biologicznych. Całość ilustrują Rycina 1 i Schemat 1. W tym kontekście dobrym uzupełnieniem byłby schemat przedstawiający znane interakcje między ww. receptorami, cytochromami i metaloproteinazami, zwłaszcza że Autorka rozprawy opisuje szczegółowo te zależności.

Następnym rozdziałem są CELE PRACY DOKTORSKIEJ, do których sformułowania Doktorantka przygotowywała się we WSTĘPIE. Obecna rozprawa miała na celu określenie efektów (przeżywalność, aktywność metaboliczna) i molekularnych mechanizmów działania ftalanu DEHP w neuronach i astrocytach myszy, ze szczególnym uwzględnieniem receptorów AhR i PPAR γ , cytochromów CYP1A1 i CYP1B1 oraz metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9. Mimo iż coraz więcej danych wskazuje na ftalany jako neurorozwojowe czynniki ryzyka, wiedza na temat wpływu ftalanów na neurony i astrocyty rozwijającego się mózgu ssaków jest fragmentaryczna, co w pełni uzasadnia realizację powyższych celów badawczych.

Kolejnych 11 stron stanowi rozdział MATERIAŁ i METODY. Doktorantka opisuje w nim m.in. sposób izolacji i hodowli neuronów oraz astrocytów, pomiary aktywności enzymów (kaspaza-3, CYP1A1, dehydrogenaza mleczanowa, enzymy mitochondrialne), analizy ekspresji mRNA i białka (qPCR, western blot), oznaczanie ROS i markera proliferacji Ki-67, jak również przyżyciowe barwienie kalceiną i Hoechst'em 33342. Autorka cytuje odpowiednie publikacje. Podaje również szczegółowe informacje na temat zastosowanych sond molekularnych i przeciwciał oraz przeprowadzonych analiz statystycznych, co ilustrują Ryciny 2 i 3. Podczas obrony pracy doktorskiej proponuję również przedstawić schemat doświadczenia. Warto wówczas podkreślić, że pierwotne hodowle neuronów i astrocytów stanowią najlepszy model *in vitro* do zbadania efektów i mechanizmów działania DEHP w mózgu ssaków. W hodowlach pierwotnych komórki są każdorazowo pobierane od zwierząt, co sprawia, że tego typu hodowle *in vitro* odzwierciedlają w dużej mierze właściwości komórek obserwowane w warunkach *in vivo*.

WYNIKI zostały opisane na 23 stronach, a zilustrowane 24 wykresami, 2 kompletami zdjęć komórek wybarwionych fluorescencyjnie oraz 4 zestawami zdjęć membran z analizy western blot. Doktorantka konsekwentnie opisuje efekty działania DEHP, które świadczą o wywołaniu przez ten ftalan proliferacji astrocytów oraz apoptozy neuronów, czemu towarzyszy zaburzenie ekspresji receptora PPAR γ i metaloproteinazy-2. Wspólnym mechanizmem działania DEHP w obu typach komórek mózgu myszy jest wzrost poziomu ROS

oraz aktywności kaspazy-3 i CYP1A1, co jest skorelowane ze spadkiem poziomu metaloproteinazy-9 oraz receptora AhR i zależnych od niego cytochromów CYP1A1 i CYP1B1. Z uwag krytycznych, w opisie figur 6, 7, 12, 18, 23 i 25 informacja na temat oznaczania różnic statystycznie istotnych jest zbędna, ponieważ porównywane grupy nie różnią się w sposób statystycznie istotny. Znakomitym dopełnieniem wykonanych doświadczeń byłoby zastosowanie przez Doktorantkę selektywnych ligandów receptorów względnie specyficznych siRNA, ale to już jest temat na kolejne badania.

Rozdział DYSKUSJA, PODSUMOWANIE i WNIOSKI obejmują łącznie 15 stron rozprawy. Dyskusja otrzymanych wyników została przeprowadzona kompetentnie i w nawiązaniu do najnowszej literatury w dziedzinie badań. Doktorantka formułuje wnioski w sposób przemyślany i klarowny. Realizacja planowanych zadań badawczych pozwoliła na uzyskanie oryginalnych wyników, spośród których za najważniejsze uważam wykazanie przez Doktorantkę, że:

- i. W zależności od rodzaju komórek mózgu myszy, DEHP indukuje apoptozę lub stymuluje proliferację komórek, co może sprzyjać neurotoksyczności i glejozie.
- ii. Aktywowana przez DEHP kaspaza-3 uczestniczy w apoptozie komórek nerwowych względnie towarzyszy proliferacji i przypuszczalnie różnicowaniu astrocytów.
- iii. Mechanizm apoptotycznego i cytotoksycznego działania DEHP w neuronach wiąże się ze wzrostem poziomu ROS, aktywności kaspazy-3 i CYP1A1 oraz poziomu receptora PPAR γ , a także spadkiem poziomu receptora AhR, cytochromów CYP1A1 i CYP1B1 oraz metaloproteinaz MPP-2 i MPP-9.
- iv. Stymulowana przez DEHP proliferacja astrocytów idzie w parze ze wzrostem poziomu ROS, aktywności kaspazy-3 i CYP1A1 oraz poziomu metaloproteinazy MPP-2, a także spadkiem poziomu receptorów AhR i PPAR γ , cytochromów CYP1A1 i CYP1B1 oraz metaloproteinazy MPP-9.

W nawiązaniu do wymienionych odkryć, chcę poznać opinię Doktorantki, który z wymienionych mechanizmów działania DEHP uważa za najbardziej istotny? Co zdaniem Doktorantki jest przyczyną łańcucha zdarzeń wiodących do apoptozy neuronów względnie stymulacji proliferacji astrocytów?

W tekście rozprawy znalazło się kilka drobnych błędów lub nieścisłości, które przytaczam z obowiązku recenzenta:

Str. 10, wiersz 10-11; „Uzyskane wyniki udowodniły, że pod wpływem działania DEHP dochodzi do zaburzenia funkcji tych receptorów już na poziomie ekspresji”. To zdanie nieco zawile. Prościej jest stwierdzić, że zaburzenie ekspresji receptorów może się przyczynić do nasilenia lub upośledzenia ich funkcji.

Str. 23, wiersz 1; W tym zdaniu wyraz „gamma” jest zbędny, ponieważ jest tu mowa o wszystkich receptorach PPAR.

Str. 27, wiersz 2; „procesem nauki” proponuję zastąpić „procesem uczenia się”.

PODSUMOWANIE i WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w identyfikację efektów i molekularnych mechanizmów działania ftalanu DEHP w mózgu ssaków. Szczególna wartość przeprowadzonych badań polega na wykazaniu, że narażenie embrionalnych komórek nerwowych i astrocytów na zanieczyszczenia środowiskowe w postaci ftalanów może mieć udział w etiologii chorób układu nerwowego, głównie poprzez zaburzenie szlaków receptorów AhR i PPAR γ , o których wiadomo, że uczestniczą w neurorozwoju. Badania Doktorantki przyczyniły się do zrozumienia patomechanizmów działania ftalanu DEHP, co może mieć wpływ na ograniczenie stosowania tej substancji względnie znalezienie skutecznych sposobów ochrony komórek mózgu przed jej szkodliwym działaniem. Autorka włożyła wiele wysiłku w przeprowadzenie licznych doświadczeń oraz wykonanie odpowiednich pomiarów i analiz. Dzięki zastosowaniu nowoczesnych metod i technik badawczych Doktorantka uzyskała wysoce oryginalne wyniki.

Rozprawę doktorską Pani mgr Agnieszki Sitarz-Głownia oceniam bardzo wysoko, a nieliczne uwagi krytyczne nie umniejszają merytorycznej wartości pracy. Biorąc pod uwagę oryginalność badań, co idzie w parze z zastosowaniem nowoczesnych metod i technik badawczych z zakresu biochemii, biologii molekularnej i komórkowej, a także przewyższa zwyczajowe wymogi prac doktorskich, składam wniosek o wyróżnienie rozprawy. Rozprawa doktorska mgr Agnieszki Sitarz-Głownia pt. „Ftalany jako związki zaburzające funkcję neuronów i komórek glejowych mózgu myszy w hodowlach *in vitro*” spełnia wymagania określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w zakresie Sztuki (Dz. Ustaw z 2003 r., Nr 65 poz. 595., Dz. Ustaw z 2005 r., Nr 164, poz. 1365, Dz. Ustaw z 2011 r., Nr 84, poz. 455). Wnioskuje o dopuszczenie mgr Agnieszki Sitarz-Głownia do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 29 czerwca 2018



Małgorzata Kajta