

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

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ mgr EWY SZWEJSER

„Badania udziału jądrowych i błonowych receptorów estrogenowych oraz aromatazy cytochromu P450 w regulacji reakcji odpornościowej karpia (*Cyprinus carpio* L.)”

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Ewy Szwejser została wykonana w Zakładzie Immunologii Ewolucyjnej Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Chadzińskiej.

Podstawę rozprawy stanowią 2 prace oryginalne (Szwejser i wsp. 2017, *Dev Comp Immunol*; Szwejser i wsp. 2017, *Fish Shellfish Immunol*) o łącznym współczynniku wpływu wynoszącym 6,366, a także 1 praca przeglądowa (Szwejser i wsp. 2017, *Horm Behav*) opublikowana w czasopiśmie, którego aktualny współczynnik wpływu wynosi 3,378.

We wszystkich wymienionych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, zaś Pani Promotor pełni rolę autora korespondującego. Do opisu publikacji dołączono oświadczenia współautorów wskazujące na znaczący udział Doktorantki w wykonaniu badań i analizie wyników zawartych w publikacjach.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedłożona do recenzji praca stanowi próbę odpowiedzi na pytanie, w jakim stopniu układ odpornościowy ryb jest regulowany przez układ neuroendokrynnny, a ściślej przez elementy układu neuroendokrynnego, jakimi są: estrogeny, receptory estrogenowe oraz aromataza tj. enzym katalizujący końcowy etap syntezy estrogenów. Wybór tematu rozprawy został w głównej mierze podyktowany brakiem dostatecznej wiedzy o roli błonowego receptora estrogenowego GPR30 (obecnie GPER1) w regulacji odpowiedzi immunologicznej u ryb. Nie bez znaczenia było także uwzględnienie powszechnego narażenia ryb na występujące w środowisku wodnym ksenoestrogeny. Wiadomo bowiem, że występujące w środowisku substancje hormonalnie czynne mogą nie tylko zaburzać funkcje endokrynne, ale również niekorzystnie oddziaływać na inne układy, w tym także na układ odpornościowy. Z uwagi na fakt, że receptor GPR30 został odkryty stosunkowo niedawno, bo w roku 2005,

brakuje informacji na temat jego znaczenia i mechanizmów działania w organizmach kręgowców. Nawet rola klasycznych receptorów estrogenowych, zwłaszcza receptora estrogenowego ER β , nie została jeszcze w pełni ustalona. Zatem podjęcie badań mających określić udział klasycznych i błonowych receptorów estrogenowych w regulacji odpowiedzi immunologicznej u ryb jest w pełni zasadny. Mimo iż badania objęte pracą doktorską mają przede wszystkim znaczenie poznawcze, mogą się przyczynić do poprawy warunków hodowli i bytowania ryb, głównie poprzez zwiększenie oporności tych zwierząt wodnych na patogeny.

Hormony płciowe mają istotny wpływ na rozwój chorób o podłożu immunologicznym i zapalnym. Pośrednio wskazują na to badania epidemiologiczne, z których wynika, że choroby autoimmunologiczne dotyczą w ogromnej większości przypadków kobiet (nawet 80%). Przykładem szczególnie dużej dysproporcji w zapadaniu na tego typu choroby jest stwardnienie rozsiane, na które 2-4 krotnie częściej chorują kobiety niż mężczyźni. Z kolei mężczyźni są bardziej podatni na infekcje i zakażenia. Uważa się, że w warunkach fizjologicznych estrogeny stymulują humoralną odpowiedź immunologiczną. Natomiast w warunkach patologicznych, np. w reumatoidalnym zapaleniu stawów czy toczeniu rumieniowatym układowym, estrogeny mogą prowadzić do zaostrzenia reakcji zapalnej. Hormony płciowe wykazują działanie immunomodulujące wobec komórek dendrytycznych, makrofagów, neutrofilów i limfocytów. Wiadomo, że wpływają one na odporność wrodzoną i nabytą regulując m.in. liczbę limfocytów i sekrecję cytokin. Jednak rola, jaką żeńskie hormony płciowe tj. estrogeny odgrywają w etiologii chorób o podłożu immunologicznym nie jest w pełni poznana. Zaskakuje brak istotnych różnic między profilami hormonów płciowych u pacjentów z chorobami autoimmunologicznymi a profilami hormonów u osób zdrowych. Coraz więcej przesłanek sugeruje, że obok hormonów płciowych istotną rolę w rozwoju tych chorób pełnią czynniki genetyczne. Na chromosomie X znajduje się bowiem szereg genów odpowiedzialnych za regulację czynności układu immunologicznego.

Opis prac stanowiących podstawę rozprawy rozpoczyna STRESZCZENIE oraz liczący 15 stron WSTĘP. W tym rozdziale znajdziemy charakterystykę układu odpornościowego ryb, opis oddziaływania układu neuroendokrynnego z układem odpornościowym, a dalej informacje na temat wpływu estrogenów na odporność ryb. Końcowe podrozdziały zostały poświęcone receptorom estrogenowym, ich budowie i klasyfikacji, a także mechanizmom działania i syntezie estrogenów. Jasność przekazu została wzmocniona przez 3 ryciny. Pragnę podkreślić szczególnie wartość ryciny 2, która przedstawia schemat inicjowanych przez 17 β -estradiol szlaków przekazywania sygnału za pośrednictwem receptorów estrogenowych, w sposób genomowy i niegenomowy.

Kolejnym rozdziałem opisu prac stanowiących podstawę rozprawy jest CEL badań, który obejmuje: *a.* Zbadanie ekspresji receptorów estrogenowych i aromatazy cyt. P450 w narządach limfatycznych i leukocytach karpia, *b.* Określenie roli aromatazy cyt. P450 w procesie lokalnej oraz ogólnoustrojowej syntezy 17 β -estradiolu, *c.* Zbadanie wpływu immuno-stymulantów oraz stresu na ekspresję receptorów estrogenowych i aromatazy w układzie odpornościowym karpia oraz *d.* Zbadanie w warunkach *in vitro* wpływu 17 β -estradiolu na aktywność wybranych populacji leukocytów karpia. Realizacja wymienionych zadań badawczych pozwoliła na uzyskanie oryginalnych wyników, spośród których za najważniejsze uważam wykazanie przez Doktorantkę, że:

I praca oryginalna - Szwejser i wsp. 2017, *Dev Comp Immunol*

1. Geny receptorów estrogenowych *era*, *er β* i *gpr30* są obecne w narządach limfatycznych (grasica, śledziona, nerka głowowa) oraz w leukocytach krwi obwodowej karpia.
2. Receptory estrogenowe ER α , ER β i GPR30 występują w nerce głowowej karpia (monocyty/makrofagi, granulocyty, limfocyty).
3. 3-godzinna ekspozycja na LPS stymuluje ekspresję genu *gpr30* w monocytach i granulocytach nerki głowowej karpia. 70-godzinna ekspozycja na LPS stymuluje ekspresję genu *er β* w limfocytach krwi obwodowej. Z kolei 70-godzinna ekspozycja na konkanawalinę A stymuluje ekspresję genu *era* w limfocytach nerki głowowej i krwi obwodowej, a także ekspresję genu *gpr30* w limfocytach krwi obwodowej.
4. Monocyty/makrofagi nerki głowowej karpia poddane stymulacji estrem forbolu są wrażliwe na 17 β -estradiol i G1, czego przejawem jest zwiększona produkcja ROS.

II praca oryginalna - Szwejser i wsp. 2017, *Fish Shellfish Immunol*

1. Geny aromatazy *cyp19a* i *cyp19b* oraz geny receptorów estrogenowych *era*, *er β* i *gpr30* są obecne w nerce głowowej, przysadce, podwzgórz i jajnikach karpia.
2. Stres unieruchomienia hamuje ekspresję genu aromatazy *cyp19b* we wszystkich badanych narządach karpia, a także hamuje ekspresję genu *era* w podwzgórz i jajnikach oraz genu *er β* w podwzgórz, jajnikach i przysadce. Ponadto, stres unieruchomienia stymuluje ekspresję genów *cyp19a* i *era* w nerce głowowej, a także genu *gpr30* w nerce głowowej i jajnikach.
3. Stres unieruchomienia obniża ekspresję genów aromatazy *cyp19* w monocytach i granulocytach nerki głowowej oraz leukocytach krwi obwodowej karpia. Stres unieruchomienia obniża również ekspresję genu *er β* w monocytach i granulocytach

oraz genu *gpr30* w granulocytach. W odróżnieniu od hamowania ekspresji genów aromatazy oraz receptorów estrogenowych *erβ* i *gpr30*, stres unieruchomienia stymuluje ekspresję genu receptora estrogenowego *era*, co zaobserwowano w monocytach nerki główowej i leukocytach krwi obwodowej.

4. Stres unieruchomienia obniża poziomy aromatazy Cyp19b i receptora estrogenowego ERβ w monocytach/makrofagach nerki główowej karpia. Stres unieruchomienia obniża również poziomy aromatazy Cyp19a i Cyp19b oraz receptorów estrogenowych ERα, ERβ i GPR30 w granulocytach nerki główowej karpia. Co więcej, stres unieruchomienia obniża poziom aromatazy Cyp19b w leukocytach krwi obwodowej karpia, a równocześnie zwiększa w tych komórkach poziom aromatazy Cyp19a i receptora estrogenowego ERα.
5. Stres unieruchomienia prowadzi do obniżenia poziomu 17β-estradiolu w surowicy krwi karpia.

Mimo wysokiej wartości poznawczej i oryginalności uzyskanych wyników, w opisach prac stanowiących podstawę rozprawy względnie w same prace oryginalne wkładły się pomyłki lub nieścisłości, które przytaczam z obowiązku recenzenta. Tytuł zawiera błąd literowy: jest *Cyprnus carpio* L., a powinno być *Cyprinus carpio* L. W Streszczeniu zdanie: „Stres podnosi m.in. ekspresję *erβ* w leukocytach krwi obwodowej” nie znajduje potwierdzenia w wynikach opublikowanych w pracach oryginalnych stanowiących podstawę rozprawy. Prawdopodobnie chodziło o ekspresję *era*, która rosła w odpowiedzi na stres unieruchomienia. Niewykluczone że nie chodziło o stres unieruchomienia, lecz narażenie komórek krwi obwodowej na LPS, czemu istotnie towarzyszył wzrost ekspresji *erβ*. We Wstępie brak informacji na temat błonowej lokalizacji tzw. klasycznych receptorów estrogenowych. Dla przykładu, izoforma ERα, jaką jest ERα36, występuje we frakcji błonowej mitochondrium oraz w błonie cytoplazmatycznej i wywołuje efekty niegenomowe (Sun Q i wsp. 2017, *Biochem Biophys Res Commun*; Yan Y i wsp. 2017, *PLoS One*; Inoue i Fry, 2015, *Genet Epigenet*). Samce myszy z nokautem błonowego receptora ERα są mniej płodne tj. wykazują niską żywotność i małą ilość plemników (Nanjappa i wsp. 2016, *Endocrinology*). Ponadto, w przypadku błonowego receptora estrogenowego Autorka podaje obie nazwy GPR30 i GPER1, ale w przypadku receptorów ERα i ERβ nie uzupełnia ich obecnie obowiązującymi ESR1 i ESR2. Rozdział Materiał i Metody nie został uwzględniony w opisie prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Jednak po lekturze prac oryginalnych nasuwają się następujące pytania:

- i. Dlaczego nie izolowano frakcji komórkowych np. błonowej, jądrowej, cytoplazmatycznej? W ten sposób można ustalić lokalizację receptorów w komórce i pośrednio zweryfikować mechanizmy ich działania.
- ii. Czy pożywka hodowlana zawierała czerwień fenolową? Jeszcze do niedawna czerwień fenolowa działała jak agonista receptorów estrogenowych, co byłoby niepożądane podczas badań z użyciem E2 czy ligandów receptorów estrogenowych.
- iii. Na jakiej podstawie wybrano stężenia G1 i G15 i dlaczego zastosowano ICI 182,780, a nie MPP (selektywny antagonistą ER α) i PHTPP (selektywny antagonistą ER β)? Obecnie wiadomo, że ICI 182,780 nie tylko antagonizuje ER α i ER β , ale również działa jak agonista receptora GPER1, a więc działa nieselektywnie.

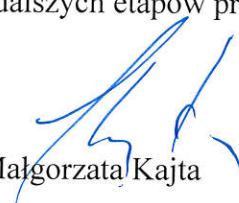
Odnosnie Wyników, ekspresja mRNA zmienia się bardziej dynamicznie niż poziomy białka. Białko zwykle bliżej do funkcji niż mRNA. Trochę szkoda, że poza 1 wyjątkiem (Supplementary data w Szwejsler i wsp. 2017, *Fish Shellfish Immunol*) brakuje ilościowych danych na temat zmian w poziomie białka receptorów estrogenowych i aromatazy. W pracy Szwejsler i wsp. 2017, *Develop Comp Immunol*, Fig. 9, stężenie ICI 182,780 wydaje się niewłaściwe, ponieważ wywołuje efekt taki sam lub zbliżony do efektu działania E2. Nie widzimy i nie powinniśmy nawet oczekiwać osłabienia efektu działania E2 pod wpływem ICI 182,780. Przypuszczalnie obserwowany efekt ICI 182,780 wynika z braku selektywnego działania tej substancji tj. antagonizowania receptorów estrogenowych ER α i ER β , lecz pobudzenia receptora GPER1. Brak syntetycznego Podsumowania sprawia, że Wnioski czyta się w pewnym oderwaniu od wyników. Poczucie niepewności potęguje niejasne sformułowanie np. 5. Wniosku: „Stres unieruchomienia obniża ekspresję genów kodujących aromatazę cytochromu P450 i wpływa na obniżenie poziomu 17 β -estradiolu produkowanego w tych komórkach”. Jakie komórki Autorka ma na myśli? Czy chodzi o monocyty? Na pewno bardzo pomocny byłby schemat ilustrujący najważniejsze odkrycia Autorki rozprawy. W tekście opisu prac oryginalnych znalazły się drobne błędy i niejasności: str. 5, wiersz 25; powinno być narządami limfatycznymi, str. 6, wiersz 1; powinno być obecności, str. 9, wiersz 10-11; powinno być związania się kompleksu ligand-receptor z motywem ERE, str. 14, 1 wiersz pod Ryc. 2; Niezrozumiałe stwierdzenie: „Większość doniesień wskazuje na obecność GPER-1”. Jest to stwierdzenie na poziomie ogólności bardzo odległym od przedmiotu badań; W Streszczeniu i we Wstępie używano w nadmiarze przecinków przed wyrazem „oraz”, natomiast nie używano wystarczająco często przecinków przed wyrażeniem „jak i”.

PODSUMOWANIE i WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w identyfikację mechanizmów oddziaływania układu endokrynnego na układ odpornościowy ryb. Szczególna wartość wykonanych badań polega na ustaleniu specyficznych zależności między receptorami estrogenowymi i enzymem aromatazy cyt. P450 a komórkami układu odpornościowego. Z badań objętych pracą dokterską wynika, że leukocyty karpia wykazują ekspresję receptorów estrogenowych ER α , ER β i GPR30 oraz aromatazy cyt. P450, zarówno na poziomie genu, jak i białka. Interesujące jest odkrycie, w myśl którego stres unieruchomienia obniża ekspresję genów receptorów estrogenowych i aromatazy m.in. w podwzgórzu, natomiast stymuluje ekspresję genów *era*, *gpr30* i *cyp19a* w nerce głowowej. Wzrost ekspresji genów *era* i *cyp19a* idzie w parze ze wzrostem poziomu białek ER α i Cyp19a w leukocytach krwi obwodowej, co jest odwrotnie skorelowane ze spadkiem poziomu 17 β -estradiolu w surowicy krwi w odpowiedzi na stres. Autorka sugeruje, że obniżenie lub brak ekspresji receptora estrogenowego ER β w leukocytach krwi obwodowej i części limfocytów nerki głowowej może mieć związek ze stopniem dojrzałości komórek i redystrybucją leukocytów podczas stresu. Na uwagę zasługuje również udział receptora estrogenowego GPR30 w stymulowanej przez estradiol produkcji ROS, co Autorka słusznie wiąże z szybkimi efektami działania estrogenów. Autorka włożyła wiele pracy w wykonanie licznych doświadczeń oraz czasochłonnych pomiarów i analiz. Wyniki uzyskane przy użyciu nowoczesnych metod i technik badawczych są wysoce oryginalne.

Rozprawę dokterską Pani mgr Ewy Szwejser oceniam bardzo wysoko, a uwagi krytyczne nie umniejszają merytorycznej oceny pracy. Rozprawa dokterska mgr Ewy Szwejser pt. „Badania udziału jądrowych i błonowych receptorów estrogenowych oraz aromatazy cytochromu P450 w regulacji reakcji odpornościowej karpia (*Cyprinus carpio* L.)” spełnia wymagania określone w art. 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 Ewy Szwejser do dalszych etapów przewodu dokterskiego.

Kraków, 29 grudnia 2017


Małgorzata Kajta