

Prof. dr hab. Stanisław Okrasa  
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
UWM w Olsztynie  
10-718 OLSZTYN  
ul. Oczapowskiego 1A

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Wnuk**  
**pt.: "Efekty działania chemicznego filtra UV, benzofenonu-3 w komórkach**  
**nerwowych myszy"**

**OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Przedstawiona do oceny **praca doktorska Pani mgr Agnieszki Wnuk** została wykonana w Zakładzie Neuroendokrynologii Doświadczalnej Instytutu Farmakologii Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Kajty. Na rozprawę doktorską składają się trzy – niżej wyszczególnione – prace oryginalne, opublikowane w języku angielskim w czasopismach z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania IF wynosi 14,247 (za 5-letni okres IF=14,091), a punktacja wg MNiSW – 110.

1. **Wnuk A.**, Rzemieniec J., Lasoń W., Krzeptowski W., Kajta M. Apoptosis Induced by the UV Filter Benzophenone-3 in Mouse Neuronal Cells Is Mediated via Attenuation of Era/Ppar $\gamma$  and Stimulation of Er $\beta$ /Gpr30 Signaling. *Mol Neurobiol.* 2018, 55: 2362-2383.
2. **Wnuk A.**, Rzemieniec J., Lasoń W., Krzeptowski W., Kajta M. Benzophenone-3 Impairs Autophagy, Alters Epigenetic Status and Disrupts Retinoid X Receptor Signaling in Apoptotic Neuronal Cells. *Mol Neurobiol.* 2018, 55: 5059-5074.
3. **Wnuk A.**, Rzemieniec J., Litwa E., Lasoń W., Kajta M. Prenatal Exposure to Benzophenone -3 (BP-3) Induces Apoptosis, Disrupts Estrogen Receptor Expression And Alters the Epigenetic Status of Mouse Neurons. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018,182: 106-118.

We wszystkich wymienionych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a Pani Promotor pełniła rolę autora korespondującego. Załączona dokumentacja zawiera także oświadczenia Współautorów, wskazujące na wysoki udział Doktorantki w przeprowadzeniu badań przedstawionych w załączonych publikacjach. Prezentowane badania były finansowane przez NCN w ramach projektu *Preludium* – 7 (Nr 2014/13/N/NZ4/04845). Rozprawa doktorska mgr A. Wnuk, oprócz kopii ww. publikacji, zawiera *Autoreferat*, w którym przedstawiono: wykaz używanych skrótów, wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie badawcze, merytoryczne wprowadzenie do podjętego problemu badawczego pt. *Wstęp, Hipotezę badawczą* i *Cel badań*, a w ramach opisu poszczególnych publikacji – informacje o stosowanych metodach badawczych, uzasadnienie badań oraz uzyskane wyniki, które w *Dyskusji* poddano wnikliwej analizie ze szczególnym uwzględnieniem efektów działania benzofenonu-3 *in vitro* oraz następstw prenatalnej ekspozycji na działanie tej substancji.

W *Autoreferacie* zamieszczono również *Podsumowanie*, *Wnioski* i *Wniosek końcowy*, *Streszczenia* w języku polskim i angielskim oraz *Bibliografię*, zawierającą 132 pozycje cytowanego piśmiennictwa.

## MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy identyfikacji toksycznych i apoptotycznych skutków i mechanizmów działania benzofenonu-3 (2-hydroksy-4-metoksybenzofenonu) w komórkach nerwowych myszy. Benzofenon-3 jest organicznym związkem chemicznym o właściwościach lipofilnych i promieniochłonnych, absorbującym promieniowanie UVB i UVA. W związku z tym jest on używany jako składnik preparatów do opalania oraz wielu kosmetyków i innych produktów, takich jak: wyroby plastikowe, tekstylia, lakiery i farby. Produkcja tej substancji w skali europejskiej sięga kilkaset ton i narażenie człowieka na jej działanie jest bardzo duże. Ze względu na swoją budowę chemiczną, benzofenon-3 – obok dioksyn, bifenyli, nanofenoli i pestycydów – należy do grupy związków zaburzających funkcje endokrynne organizmu (EDC). Związki te stanowią poważne zagrożenie dla prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych i większość z nich (w tym benzofenon-3) wykazuje zdolność przemieszczania się przez barierę łożyskową oraz barierę krew-mózg. Badania benzofenonu-3 pod kątem jego zdolności do zakłócania procesów endokrynych dotychczas były prowadzone głównie w odniesieniu do układu rozrodczego, natomiast nie badano efektów działania tego związku w układzie nerwowym. Zatem, określenie wpływu benzofenonu-3 na komórki nerwowe należy uznać za w pełni uzasadnione przedsięwzięcie badawcze.

We *Wstępie*, Doktorantka przedstawia charakterystykę benzofenonu-3 – występowanie i narażenie ludzi na jego działanie oraz możliwość zaburzania przez ten związek regulacji neurohormonalnych. Opisuje procesy, z którymi jego działanie może być powiązane, takie jak apoptoza, autofagia oraz mechanizmy epigenetyczne. Opisuje również receptory, które mogą być celem oddziaływania związków hormonalnie czynnych, w tym także benzofenonu-3, tj. receptory estrogenowe – klasyczne (ESR1 i ESR2) i błonowe związane z białkiem G (GPER1), receptory retinoidowe typu X (RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  i RXR $\gamma$ ) oraz receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów typu gamma (PPAR $\gamma$ ). Przyjęta przez Doktorantkę hipoteza badawcza zakłada, że benzofenon-3 wywołuje efekt neurotoksyczny i inicjuje procesy apoptotyczne w komórkach nerwowych myszy w powiązaniu z wcześniej wymienionymi receptorami oraz zaburza naturalny przebieg procesu autofagii w komórkach nerwowych i zmienia profil epigenetyczny tych komórek. W kontekście przyjętej i uzasadnionej we „*Wstępie*” hipotezy badawczej, Doktorantka wyznacza sobie trzy główne cele pracy, takie jak:

- 1) identyfikacja toksycznych i apoptotycznych efektów działania benzofenonu-3 w komórkach nerwowych myszy w hodowli pierwotnej *in vitro*;
- 2) określenie mechanizmów działania benzofenonu-3 w komórkach nerwowych myszy, z uwzględnieniem potencjalnego udziału w nich receptorów estrogenowych i retinoidowych typu X oraz receptora aktywowanego przez proliferatory

peroksosomów (poprzez określanie zmian w ekspresji mRNA i białka tych receptorów), a także wpływu benzofenonu-3 na proces autofagii i status epigenetyczny komórek nerwowych;

- 3) zbadanie wpływu prenatalnej ekspozycji na benzofenon-3 na procesy apoptotyczne, ekspresję receptorów estrogenowych oraz status epigenetyczny komórek nerwowych.

Przedstawione cele rozprawy doktorskiej jasno określają kierunki weryfikacji przyjętej hipotezy badawczej i wskazują na bardzo kompleksowe podejście do rozpatrywanego problemu badawczego. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem myszy szczepu Albino Swiss CD1 w układzie *in vitro* i *in vivo*, a ich przebieg zilustrowano na ogólnym schemacie zamieszczonym w *Autoreferacie*. W badaniach tych zastosowano liczne techniki badawcze, m.in. takie jak: pomiar aktywności kaspaz (3 i 8) oraz blokowanie kaspaz (8 i 9) przy pomocy selektywnych inhibitorów, oznaczanie dehydrogenazy mleczanowej, błonowego potencjału mitochondrialnego i poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach, wizualizacja jąder komórkowych i cytoplazmy na zasadzie przyżyciowego barwienia komórek z użyciem Hoechst 33342 i kalceiny AM, detekcja autofagosomów na podstawie odczytu fluoroscencji po zastosowaniu specyficznego ich markera, analiza ekspresji genów zaangażowanych w proces apoptozy i autofagii z wykorzystaniem mikromacierzy, ilościowa analiza qPCR ekspresji genów (*Esr1 i 2, Gpr30, Pparg, Rxra, β i γ, Bcl2, Bax, Casp3*), oznaczanie białek przy pomocy analizy Western-blot ( $ER\alpha$  i  $\beta$ , GPR30, PPAR- $\gamma$ , RXR $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , BCL2, BAX, CASP3) i testów immunoenzymatycznych ELISA ( $ER\alpha$  i  $\beta$ , GPR30, PPAR- $\gamma$ , RXR $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ , BCL2, BAX, CASP3), oznaczanie poziomu globalnej metylacji oraz metylacji wybranych genów (*Esr1 i 2, Gpr30, Bcl2, Bax*), określanie aktywności DNA metylotransferazy oraz aktywności acetylotransferazy histonowej (HAT) i deacetylazy histonowej HDAC), oddziaływanie na badane receptory selektywnymi ligandami (agonistami i antagonistami) oraz wyciszanie ich ekspresji przy użyciu specyficznego siRNA (*Esr1 i 2, Gpr30, Pparg, Rxra, β i γ*), jak również barwienie immunofluorescencyjne i mikroskopia konfokalna. Podsumowując stronę metodyczną przeprowadzonych badań, na szczególne uznanie zasługuje właściwy dobór metod badawczych oraz ich różnorodność. Znacząco podnosi to poziom naukowy przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Należy dodać, iż wymienione powyżej metody dosyć szczegółowo opisano w załączonych publikacjach.

Wyniki badań przeprowadzonych przez mgr Agnieszkę Wnuk w ramach rozprawy doktorskiej zostały zaprezentowane w trzech pracach opublikowanych w br. (2018) w wysoko punktowanych czasopismach, takich jak: *Molecular Neurobiology* (2) oraz *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* (1). Fakt ten dowodzi, że spełniły one wysokie wymagania redakcji tych czasopism i uzyskały pozytywne opinie recenzentów wydawniczych. Badania Doktorantki dostarczyły wiele interesujących i wartościowych wyników. Spośród nich, na szczególne wyróżnienie – wg. mnie – zasługuje wykazanie, że:

- 1) benzofenon-3 działa neurotoksyczne i indukuje procesy apoptotyczne (głównie poprzez wewnętrzny szlak apoptotyczny) w komórkach nerwowych, osłabia w nich sygnalizację związaną z receptorami ESR1 i PPAR $\gamma$ , zaś stymuluje ścieżki związane z receptorami ESR2 i GPER1, co potwierdzają zmiany w ekspresji mRNA i białek

tych receptorów oraz wyniki eksperymentów z użyciem selektywnych ligandów i specyficznych siRNA;

- 2) większą wrażliwość na działanie benzofenonu-3 wykazują komórki kory nowej niż hipokampa;
- 3) indukcji apoptozy przez benzofenon-3 towarzyszy również zaburzenie szlaków angażujących receptory retinoidowe typu X (tj. stymulacja sygnalizacji związanej z receptorem RXR $\alpha$  i osłabienie ścieżek związanych z receptorami RXR $\beta$  i RXR $\gamma$ ) oraz upośledzenie procesu autofagii i statusu epigenetycznego komórek nerwowych;
- 4) prenatalna ekspozycja na benzofenon-3 nasila procesy apoptotyczne w neuronach myszy, obniża ekspresję mRNA i białka receptorów ESR1 i ESR2, a zwiększa ekspresję GPER1, wywołuje zmiany w statusie epigenetycznym komórek (hipometylację DNA) oraz zmiany poziomu metylacji genów związanych z apoptozą i sygnalizacją estrogenową.

Duże znaczenie wyników badań przedstawionych w publikacjach stanowiących rozprawę mgr Agnieszki Wnuk wynika z faktu, że w zasadzie po raz pierwszy określają one niekorzystne skutki działania benzofenonu-3 – powszechnie używanego do produkcji kosmetyków i artykułów gospodarstwa domowego – na układ nerwowy. Wcześniejsze badania (Schlecht i wsp., 2004) przeprowadzone na owarietomizowanych szczurzykach w ograniczonym zakresie – tylko w odniesieniu do przysadki, tarczycy i macicy – wskazywały na możliwość oddziaływania benzofenonu-2 i -3 na aktywność transkrypcyjną genów kodujących receptory estrogenowe i receptor węglowodorów aromatycznych (AhR). Z kolei badania Doktorantki kompleksowo dokumentują efekty neurotoksyczne w komórkach nerwowych wywołane przez benzofenon-3. Na szczególne wyróżnienie zasługują wyniki dokumentujące zmiany w komórkach nerwowych stwierdzone po ekspozycji na benzofenon-3 w okresie prenatalnym. Można bowiem przypuszczać, że wykazane przez Doktorantkę w tych warunkach zmiany statusu epigenetycznego komórek nerwowych mogą przyczyniać się do pojawiania się u płodów nieprawidłowości rozwojowych lub funkcjonalnych, które ujawnią się w pełni w układzie nerwowym dorosłych osobników. Na podkreślenie zasługuje bardzo wnikliwe przeanalizowanie przez Doktorantkę uzyskanych wyników w poszczególnych publikacjach i *Autoreferacie* oraz ich zbiorcze podsumowanie i prawidłowo sformułowane wnioski zamieszczone w *Autoreferacie*. Na podstawie przeprowadzonych badań, w syntetycznie zredagowanym *Wniosku końcowym*, Doktorantka wymienia najważniejsze efekty działania benzofenonu-3 na komórki nerwowe oraz wskazuje znaczenie i możliwość wykorzystania uzyskanych wyników.

Podsumowując badania zrealizowane przez Doktorantkę w ramach pracy doktorskiej, należy wysoko ocenić ich dużą wartość poznawczą, na którą składa się wskazanie skutków oraz – w znacznym stopniu – wyjaśnienie mechanizmu działania benzofenonu-3 na komórki nerwowe myszy. Dodatkowym potwierdzeniem wysokiej wartości tych badań jest opublikowanie uzyskanych wyników w wysoko notowanych czasopismach, których łączny współczynnik IF wynosi 14,247, a punktacja wg MNiSW – 110. Poszczególne publikacje oraz całościowe podsumowanie przeprowadzonych badań w formie *Autoreferatu* pozwalają stwierdzić, że Doktorantka w pełni zrealizowała wcześniej wyznaczone cele badawcze.

Ponadto, należy zauważyć, że wyniki zaprezentowane przez Doktorantkę w tych publikacjach stanowią bardzo dobre uzupełnienie wcześniejszych badań Zespołu, pracującego pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Kajty, które m.in. dotyczyły toksycznego działania nonylofenolu oraz neuroprotektoryjnego potencjału raloksyfenu i 2,3'-diindolometanu w odniesieniu do komórek nerwowych myszy i mogą stanowić odpowiedni materiał do przygotowania interesującej i bardzo pożądanej pracy przeglądowej.

## UWAGI i PYTANIA

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Wnuk były wcześniej pozytywnie ocenione przez recenzentów wyznaczonych przez redakcje renomowanych czasopism naukowych. W związku z tym nie mam uwag krytycznych do ich formy i treści. Pozwolę sobie jednak na kilka pytań dotyczących przeprowadzonych badań lub problematyki podjętej w rozprawie doktorskiej.

1. Co zdecydowało o wyborze do badań benzofenonu-3 z grupy tzw. ketonów aromatycznych, a nie np. benzofenonu-2.
2. W kilku przypadkach liczba powtórzeń w ramach poszczególnych eksperymentów wahała się od 5 do 8 (np. Fig. 5 w publikacji 1). Od czego zależała taka rozpiętość liczby powtórzeń w odniesieniu do niektórych eksperymentów?
3. Człowiek może być równocześnie narażony na działanie różnych związków o właściwościach neurotoksycznych. Czy neurotoksyczne efekty ich równoczesnego działania mogą się potęgować lub przeciwnie – znosić?
4. Badania przeprowadzone w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej potwierdziły udział receptorów estrogenowych (klasycznych i błonowych), receptorów retinoidowych typu X oraz receptora aktywowanego przez proliferatory peroksyosomów (PPAR $\gamma$ ) w mechanizmie działania benzofenonu-3. Jakie kierunki dalszych badań nad mechanizmem neurotoksycznego działania benzofenonu-3 uważa Pani za celowe na bazie wyników przedstawionych w pracy doktorskiej?

## PODSUMOWANIE

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że **rozprawa doktorska mgr Agnieszki Wnuk** zawiera liczne i wartościowe wyniki badań, które opisują mechanizm neurotoksycznego działania benzofenonu-3 na komórki nerwowe myszy. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem różnorodnych procedur i zawansowanych metod badawczych pozwoliły określić stopień zaangażowania receptorów estrogenowych, receptorów retinoidowych typu X oraz receptora aktywowanego przez proliferatory peroksyosomów (PPAR $\gamma$ ) w mechanizmie oddziaływania benzofenonu-3 na komórki nerwowe. Potwierdziły one także możliwość działania tego związku z udziałem mechanizmów epigenetycznych, co może prowadzić do zmian w ekspresji genów i w dalszej perspektywie – zaburzenia określonych procesów fizjologicznych. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki, oprócz wartości poznawczej, mogą mieć zastosowanie przy opracowywaniu zasad profilaktyki lub terapii ograniczających

niekorzystne efekty działania benzofenonu-3 w układzie nerwowym. Z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca doktorska prezentuje wysoki poziom naukowy, a Doktorantka wykazała się w niej bardzo dobrym opanowaniem warsztatu badawczego i dobrą znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Należy dodać, że Doktorantka – poza trzema publikacjami stanowiącymi rozprawę doktorską – ma znaczący dorobek publikacyjny, który obejmuje 14 prac oryginalnych, wyszczególnionych w bazie PubMed.

#### **WNIOSEK KOŃCOWY**

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa zatytułowana **”Efekty działania chemicznego filtra UV, benzofenonu-3 w komórkach nerwowych myszy”** spełnia wszystkie wymagania – określone w Ustawie nr 595 o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14.03.2003 r. (wraz z późniejszymi zmianami) – stawiane rozprawom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie z wnioskiem o **dopuszczenie mgr Agnieszki Wnuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Równocześnie, ze względu na szeroki zakres przeprowadzonych badań i ich nowatorski charakter oraz wysoki poziom naukowy przeprowadzonych badań, przedkładam Wysokiej Radzie **wniosek dotyczący wyróżnienia rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Wnuk.**

Olsztyn 29.10.2018 r.



Stanisław Okrasa