



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Ocena pracy doktorskiej

Pani Eweliny Honkisz

pt. **"Tetrabromobisfenol A (TBBPA) jako substancja endokrynnie czynna
zaburzająca funkcje łożyska ludzkiego."**

została wykonana
w Katedrze Biotechnologii Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie
pod kierunkiem Pani dr hab. Anny Wójtowicz.

Wydział Biologii

i Nauk o Ziemi

Instytut Zoologii

Katedra Fizjologii Zwierząt

Zakład Endokrynologii

Przedłożona do oceny praca doktorska jest napisana na 93 stronach. Rozprawa została ujęta w sposób typowy dla prac na stopień naukowy. Pani Doktorantka wyodrębniła w niej następujące rozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim poprzedzone spisem treści i wykazem stosowanych skrótów, obszerny Wstęp (16 stron), Cel badań (1 strona), Materiał i Metody (13 stron), Wyniki zebrano i przedstawiono graficznie na 8 wykresach i 8 rysunkach (18 stron). Rozprawa zawiera Dyskusję (12 stron) a całość kończy Podsumowanie i Wnioski (2 strony) oraz (13 stron) Spisu 182 pozycji piśmiennictwa i załącznik o sposobie prezentacji uzyskanych wyników. Badania zrealizowano w ramach projektu Nr 2011/01/N/NZ4/01151 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Autorka postawiła sobie ambitne zadania: zbadania w hodowlach *in vitro* wpływu różnych stężeń TBBPA na sekrecję hormonów steroidowych: estradiolu i progesteronu oraz ludzkiej gonadotropiny kosmówkowej przez komórki łożyska ludzkiego JEG-3. Komórki tej linii wykazują wiele cech biologicznych i fizjologicznych, identycznych z prawidłowymi komórkami ludzkiego trofoblastu. Wybrana linia komórek choriokarcinomy łożyska JEG-3 jest miarodajnym i odpowiednim i powszechnie stosowanym modelem do badania funkcji hormonalnej komórek trofoblastu łożyska.

-określenie wpływu TBBPA na aktywność i ekspresję białka enzymu aromatazy (CYP 19), kluczowego enzymu syntezy estradiolu, w komórkach linii JEG-3. Obserwowana pod wpływem TBBPA stymulacja sekrecji estradiolu związana ze zwiększoną aktywnością aromatazy, enzymu regulującego syntezę estrogenów a krytycznego dla utrzymania ciąży, jak też dla regulacji procesu porodu.

Wzrost aktywności aromatazy w komórkach JEG-3 wywołany przez TBBPA był związany z podwyższoną ekspresją białka dla tego enzymu. Wiadomo, że aktywność aromatazy jest zależna od c-AMP w różnych komórkach, włączając w to komórki łożysk ludzkich, Doktorantka zbadła zaangażowanie TBBPA w szlak sygnałowy związany z tym wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem.

TBBPA okazał się czynnikiem zaburzającym sekrecję hormonów istotnych dla podtrzymania ciąży i prawidłowego przebiegu rozwoju płodu. Związek ten w szerokim zakresie stężeń (1×10^{-9} – 1×10^{-4}) stymulował uwalnianie estradiolu i progesteronu w hodowlach *in vitro* komórek JEG-3, natomiast hamował sekrecję hCG. Jednocześnie, w tym zakresie stężeń TBBPA, nie wpływał na zmianę żywotności i proliferacji badanych komórek. Pani Doktorantka zbadła wpływ TBBPA na procesy proliferacji i apoptozy oraz żywotność

tel. 12 664 50 25

fax 12 664 50 98

jerzy.galas@uj.edu.pl

komórek linii JEG-3. Określiła również zaangażowanie receptora aktywowanego proliferatorami peroksosomów gamma (PPAR γ) w mechanizmie działania TBBPA w hodowanych komórkach JEG-3 za pośrednictwem, którego jest kontrolowana ekspresja genów kodujących podjednostki α i β ludzkiej choriogonadotropiny.

Praca obejmuje interesujące badania wpływu związków halogenoorganicznych będących trwałymi zanieczyszczeniami szeroko rozpowszechnionymi w środowisku. Do tej grupy zalicza się substancje zawierające brom stosowane jako bromoorganiczne opóźniacze spalania (BFRs- *Brominated Flame Retardants*). Najczęściej stosowanym jest tetrabromobisfenol A (TBBPA) stosowanym w technice instalacyjnej oraz w branży meblarskiej, chłodniczej, akwarystycznej czy w architekturze wnętrz do dekoracji. W tym charakterze jest również dodawany do materiałów tekstylnych oraz papieru, jest też składnikiem plastiku.

Mechanizm działania tej grupy związków polega na wychwyceniu wolnych rodników, które odpowiadają za rozprzestrzenianie się ognia. Efektywność działania tej klasy związków zależy od stosowanego atomu halogenu w opóźniaczu spalania. Jedynie organiczne związki bromu i chloru znalazły zastosowanie jako dodatki hamujące spalanie. Większa skuteczność wychwytu wolnych rodników sprawia, że to właśnie (poli) bromowane opóźniacze spalania stosowane są najpowszechniej.

Do grupy BFRs należą, między innymi: polibromowane etery difenyłowe – PBDE, polibromowane bifenyłe – PBB, 1,2,5,6,9,10-heksabromocyklododekan – HBCD oraz tetrabromobisfenol A – TBBP-A. HBCD, PBDE oraz PBB należą do addytywnych opóźniaczy spalania, co oznacza, że nie wytwarzają wiązań z matrycą (polimerem), natomiast TBBP-A, który wiąże się kowalencyjnie z matrycą, należy do opóźniaczy spalania reaktywnych. Uwalnianie dodatków addytywnych z tworzywa sztucznego następuje na skutek podwyższonej temperatury, niewłaściwego składowania oraz przetwarzania tworzyw sztucznych. Szkodliwe oddziaływanie na człowieka zakwalifikowało je jako trwałe zanieczyszczenia organiczne TZO (*ang. persistent organic pollutants*, POPs) i wg Konwencji Sztokholmskiej wprowadzono zakaz produkcji: heksabromobifenyłu (2010), eterów tetrabromodifenyłowych i pentabromodifenyłowych (2010), eterów heksabromodifenyłowych i heptabromodifenyłowych (2010), heksabromocyklododekanu (2014).

Wszystkie z wyżej wymienionych związków są wpisane do załącznika A Konwencji Sztokholmskiej, co oznacza całkowite zaprzestanie ich produkcji i stosowania. TBBP-A nie uwalnia się tak łatwo z matrycy, dlatego jest dalej stosowany jako opóźniacz procesu spalania. Opóźniacze spalania halogenoorganiczne są wyjątkowo słabo polarne, przez co nie rozpuszczają się w wodzie, ale bardzo dobrze w tłuszczach. Z tego względu ulegają bioakumulacji w tkance tłuszczowej oraz mogą migrować wzdłuż łańcucha troficznego co jest procesem biomagnifikacji.

Wybór, TBBPA powszechnie występującej w środowisku jest uzasadniony z uwagi na łatwość migracji poprzez błony biologiczne i wnikania do wnętrza komórek może, więc oddziaływać na organizm od najwcześniejszych etapów życia. Udowodniono, że może pokonywać barierę łożyskową. Należy do grupy tzw. *endocrine disrupting chemicals* (EDS-s) substancji zaburzających homeostazę układu hormonalnego. Tak, więc jego obecność w łożysku może stanowić poważne zagrożenie nie tylko dla tego ważnego endokrynnie narządu, ale dla rozwijającego się płodu i prawidłowego przebiegu ciąży.

W pracy doktorskiej obszerny *Wstęp* zawiera wiele ciekawych informacji biologicznych na temat łożyska. Pani mgr Ewelina Honkisz omówiła szczegółowo budowę i funkcję jednego z bezsprzecznie najważniejszych organów istotnych nie tylko dla rozwijającego się płodu, ale również dla zdrowia matki. Łožysko odgrywa zasadniczą rolę w wymianie substancji odżywczych między organizmem matki i płodu. Pomyślny przebieg ciąży jest przede wszystkim uwarunkowany prawidłowym rozwojem organu tymczasowego jakim jest łożysko. Znajdująca się w łożysku błona naczyniowo-nabłonkowa stanowi przegrodę między krwią matczyną a płodową. Podstawową i chyba najważniejszą funkcją łożyska jest jednak wymiana tlenu i dwutlenku węgla. Bez niej nie ma możliwości, aby płód rozwijał się prawidłowo. Ta zdolność łożyska, tymczasowego organu, zastępuje u płodu funkcje płuc,

które podejmują pracę dopiero w chwilę po porodzie. Transport tlenu do płodu i dwutlenku węgla w kierunku przeciwnym odbywa się na zasadzie dyfuzji biernej. Przez łożysko transportowane są również tłuszcze, cukry, białka, substancje mineralne i witaminy, a w końcowym okresie ciąży – przeciwciała, które zapewniają noworodkowi odporność w pierwszych tygodniach życia poza łonem matki. Niestety, związki halogenoorganiczne, również pokonują tę barierę. Pani Doktorantka omówiła czynność wewnątrzwydzielniczą łożyska polegającą na wytwarzaniu progesteronu i jego roli dla prawidłowego rozwoju ciąży zwłaszcza w pierwszych tygodniach jej trwania jak również w późniejszym okresie, zapobiegając poronieniu czy przedwczesnemu porodowi poprzez hamowanie pobudliwości skurczowej mięśniówki macicy. Omówiła rolę estrogenów i gonadotropiny kosmówkowej oraz somatomammotropiny, zwanej także laktogenem łożyskowym. Podkreśliła jak istotną rolę odgrywają te hormony w donoszeniu ciąży i prawidłowym jej przebiegu. Powodują one zachodzenie odpowiednich zmian w budowie i czynnościach niektórych narządów ciężarnej tak, aby przystosować je jak najlepiej do nadchodzących zadań. Szczegółowo omówiła proces apoptozy w łożysku i jej rolę w fizjologii i patofizjologii tego narządu. Wstęp kończy opis roli receptorów aktywowanych proliferatorami peroksosomów (PPAR) w łożysku. Za pośrednictwem receptorów PPAR gamma kontrolowana jest ekspresja genów kodujących podjednostki α i β budujące ludzką gonadotropinę kosmówkową. To hCG odgrywa istotną rolę auto – i parakrynną w różnicowaniu trofoblastu.

Zabrakło mi w tym podrozdziale szerszej informacji o funkcji androgenów i skutkach ich niedoboru w poszczególnych okresach ciąży, zwłaszcza ich niedoboru na ekspresję VEGF, jego receptorów oraz koneksyny Cx43 budującej połączenia między komórkami łożyska. Jest to istotne z punktu widzenia poznawczego jak i terapeutycznego.

Druga obszerna część **Wstępu** charakteryzuje związki endokrynnie czynne i główne drogi narażenia ludzi na bromoorganiczne antypireny. O istnieniu zależności pomiędzy zanieczyszczeniem środowiska przez TBBPA, a jego obecnością w surowicy krwi i prawie 25-krotnie wyższym poziomie w mleku karmiących matek, co może świadczyć o preferencyjnym transferze TBBPA z krwi. Całość dyskutowana z najnowszymi doniesieniami literatury prawidłowo dobranej. Podaje dane epidemiologiczne dotyczące zdolności TBBPA do przenikania przez barierę łożyskową. Najnowsze badania wykazują, że ta lipofilna substancja może wywoływać efekty mutagenne i kancerogenne. Doktorantka mając świadomość, że wiedza na temat mechanizmu działania tego związku w organizmie człowieka jest niepełna ostrożnie poszukuje dróg jej poszerzenia.

Wciąż wprowadza się nowe związki pod kątem właściwości opóźniających proces spalania oraz ich wpływu na środowisko i ludzi. W materiałach konstrukcyjnych stosuje się tworzywa z dodatkiem związków boru a ostatnio nowym trendem jest stosowanie związków cynowo-cynkowych wykazujących doskonale efekty uniepalniające, ale głównie zmniejszające emisję dymu w trakcie spalania. Do tej grupy związków opóźniających spalanie należy heksahydroksocynian cynku $Zn[Sn(OH_6)]$ stosowany w termoplastykach.

Czy istnieją przepisy prawne, które zmuszają producentów nowych tworzyw sztucznych wprowadzanych na rynek do wcześniejszego przebadania zwłaszcza FRs (*flame retardants*) z matrycy oraz wpływu takich związków na środowisko i zdrowie człowieka?

Uzyskanie odpowiedzi na pytania postawione w tezach wymagało badań bardzo trudnych metodycznie. Cel pracy został przedstawiony w 5 punktach, z których każdy mógłby stanowić podstawę odrębnego, samodzielnego opracowania.

Zagadnienie jest obszerne, praca wymagała stosowania różnorodnych wyrafinowanych technik i benedyktyńskiej cierpliwości przy pozyskiwaniu biologicznego materiału i interpretacji wyników. Pani Doktorantka zrealizowała to trudne zadanie.

Materiał i Metody nie budzą zastrzeżeń. Szeroko zaplanowane badania były realizowane etapami ze względu na różnorodny charakter oznaczeń. Założono cztery osobne doświadczenia. Przed każdym eksperymentem komórki linii JEG-3 wyprowadzone z łożyska ludzkiego w I trymestrze ciąży, preinkubowano je w pożywce DMEM wzbogaconej dodatkiem 10% surowicy FBS przez jedną dobę, aby przyczepiły się do podłoża. Po tym czasie Pani Doktorantka zmieniała pożywkę wzbogaconą 5% FBS oraz różnymi stężeniami TBBPA. Hodowle komórek prowadziła do trzeciego dnia. Po zakończeniu hodowli zbierała pożywki w celu oznaczenia poziomu badanych hormonów, poziomu dehydrogenazy mleczanowej (LDH) a w przylegających do dna komórkach poziomu aktywności kaspazy-3. W doświadczeniu drugim hodowała komórki w obecności wzrastających stężeń TBBPA oraz odczynnika alamarBlue w celu określenia krzywej odpowiedzi na TBBPA przy różnych czasach ekspozycji.

W doświadczeniu trzecim komórki hodowane w płytkach przystosowanych do pomiaru fluorescencji i określono krzywe odpowiedzi na TBBPA w zależności od stężenia i czasu ekspozycji. Wybrała te stężenia, które wywoływały efekty biologiczne i w ich obecności hodowała komórki. Przylegające do dna płytek komórki posłużyły do oznaczenia aktywności aromatazy. W doświadczeniu czwartym hodowane komórki w obecności wybranych stężeń TBBPA posłużyły do izolacji białka do metody Western-Blot.

Do realizacji celu badań Pani mgr Ewelina Honkisz użyła nowoczesnych metod jak: hodowla komórkowa *in vitro*, cytologiczne metody barwienia komórek, oznaczanie spektrofotometrycznie przy użyciu czytnika ELISA aktywności dehydrogenazy mleczanowej a będącej miarą toksyczności badanej substancji względem komórek w hodowli, oznaczenie proliferacji komórek *in vitro*, szybkim i czułym testem Alamar Blue, oznaczenie aktywności kaspazy-3 jako markera apoptozy. Zmiany morfologiczne zachodzące w komórkach w późnych fazach apoptozy śledziła przy użyciu barwnika Hoechst 33342. Stężenia hormonów (progesteronu, estradiolu i hCG) oznaczano metodą EIA.

Dlaczego nie użyto czulszej metody radioimmunologicznej (RIA) do oznaczenia stężenia hormonów steroidowych?

Aktywność enzymu aromatazy metodą fluorescencyjną, pomiary wewnątrzkomórkowego c-AMP przy użyciu komercyjnego testu cAMP ELISA. Zbadano ekspresję enzymu aromatazy oraz receptorów PPAR γ metodą Western Blot. Wizualizacje membran przeprowadziła za pomocą metody chemiluminescencji przy użyciu PhotoImager Fuji-Las 1000 a ilość oznaczanego białka oceniała na podstawie analizy densytometrycznej z wykorzystaniem programu Image Studio Lite. Wyniki ekspresji normalizowała względem przeciwciała przeciwko β -aktynie i przedstawiła jako względną gęstość optyczną wyrażoną jako procent kontroli.

W ocenie recenzenta wybrane metody badawcze i testy statystyczne stanowiły podstawę, aby wszystkie postawione ambitne cele poszukiwań zostały osiągnięte. Nie mam zastrzeżeń merytorycznych do rozbudowanej części metodycznej. Przeprowadzenie tak

licznych wariantów badań wymagało od Pani Doktorantki determinacji, pracowitości, odpowiedzialności za poprawne wykonanie przepisanych procedur, zreczności manualnej, pomysłowości i dobrej przemyślanej organizacji czasu i pracy.

Rozprawa napisana jest jasno i zwięźle, a uzyskane wyniki podzielono na szereg paragrafów zgodnie z tezami rozprawy. Stanowi wartościowy wkład do badań endokrynologii łożyska narażonego na działanie środowiskowych EDs jakim jest badany TBBPA. Każdy paragraf zakończony jest odpowiednią dyskusją. Jej cechą charakterystyczną było opieranie się na stwierdzonych faktach i duża ostrożność w wyciąganiu zbyt pochopnych wniosków.

Wyniki obejmują 6 podrozdziałów zgodnie z założeniami i przebiegiem doświadczeń opisanych w Materiałach i metodach. W tekst rozdziału wkomponowane są wykresy i rysunki. Na szczególne podkreślenie zasługuje niezwykła umiejętność Doktorantki w przygotowaniu dokumentacji graficznej. W rozdziale **Materiał i Metody** przejrzyste staranie opisane tabelki oraz schematy reakcji. W rozdziale Wyniki zasługujące na uznanie czytelne wykresy, z zaznaczonymi istotnymi statystycznie różnicami. Jedynie zdjęcia komórek łożyska ludzkiego JEG-3 wybarwione barwnikiem fluorescencyjnym Hoechst 33342 analizowane w mikroskopie fluorescencyjnym Nikon Eclipse są wprawdzie zadawalającej jakości, niestety zbyt zminiaturyzowane (str. 57).

Mikrofotografie nie są wyraźnie oznaczone: małe czarne znaczki bez białego otoku są z trudem zauważalne na szaro-czarnym tle i białe strzałki „zawieszono” w czarnym polu co wskazują? Niepoprawnie wykonano analizę obrazu. Opis jest nieprecyzyjny i zbyt ogólnikowy. Należałoby wprowadzić dobrze widoczne litery i strzałki. Patrz: wykres 5 str. 57

W rozdziale **Dyskusja** Pani Doktorantka omówiła szczegółowo wszystkie wyniki badań i porównywała je z danymi piśmiennictwa. Jeszcze raz podkreśliła, że mimo kontrowersji w licznych środowiskach i często sprzecznych doniesień na temat skutków jakie może wywierać badany związek na zdrowie człowieka i środowisko, niewątpliwie jednomyślne są doniesienia literaturowe wskazujące na powszechną obecność TBBPA w środowisku, w organizmach wodnych, tkankach zwierząt i ludzi. Urządzenia codziennego użytku elektroniczne, elektryczne oraz elementy tapicerki meblowej i samochodowej są głównym źródłem uwalniania TBBPA, który w postaci cząstek krąży w powietrzu we wnętrzach domu i biur. Mogą więc dostawać się do pęcherzyków płucnych a tam wraz z krwią przedostają się do licznych narządów i tkanek. Przypomniała liczne dane z piśmiennictwa o obecności TBBPA w płynach ustrojowych i krwi oraz o przenikaniu przez barierę łożyskową. Należy podkreślić, że **Pani Doktorantka po raz pierwszy wykazała**, że badany związek w szerokim zakresie stężeń stymulował sekrecję estradiolu w komórkach JEG-3 w miarę wydłużającego się czasu ekspozycji a **nie wpływał istotnie** na zmianę **żywołności i proliferację** tych komórek. Wyniki pracy wskazują, że TBBPA **stymulował wzrost aktywności CYP 19** w badanych komórkach tym intensywniej im dłuższy był czas ekspozycji na ten związek, co potwierdza podwyższona ekspresja białka dla tego enzymu. Słusznie też zauważyła pani mgr inż. Ewelina Honkisz, że brak jest danych piśmienniczych, które potwierdzałyby stymulujący wpływ TBBPA na aktywność aromatazy w komórkach choriokarcinomy ludzkiego łożyska. Mechanizm, poprzez który TBBPA indukuje ekspresję i aktywność aromatazy nie jest poznany. Ostrożnie sugeruje, że TBBPA mógłby działać poprzez błonowy receptor GPR30 jednak **krytycznie i uczciwie podkreśla**, że wyniki Jej badań są niewystarczające, aby sugerować taki mechanizm działania. Przeprowadzone przez panią Doktorantkę badania uzupełniają tę wiedzę i **po raz pierwszy dokumentują stymulujący wpływ TBBPA na wewnątrzkomórkowy poziom c-AMP w komórkach JEG-3**. Wzrost wewnętrznego

poziomu cAMP pokrywał się z zależnym od czasu jak i stężenia wzrostem aktywności aromatazy. Za sukces Pani Doktorantki należy uznać wykazanie, że **TBBPA we wszystkich przedziałach czasowych i przy stężeniach nano- jak i mikromolowych w statystycznie istotny sposób obniżał sekrecję choriogonadotropiny hCG w stosunku do kontroli**. Jak wiadomo hormon ten produkowany przez jednostkę płodowo-łożyskową i jego gwałtowny wzrost aż do 10 - 12 tygodnia ciąży -jest gwarantem utrzymania ciała żółtego, podtrzymania produkcji progesteronu i funkcji endokrynych syncytiotrofoblastu. Zauważa, że pełna forma funkcjonalnego receptora LH/hCG o masie cz. 80kD występuje w łożysku dopiero po 10 tygodniu od zapłodnienia, a w badanej linii komórkowej i w komórkach łożyska do 9 tygodnia obecna jest forma skrócona o masie cząsteczkowej 50kD. Prawdopodobnie krótsza forma receptora pozbawiona jest regionu transbłonowego, który jest krytyczny dla wiązania ligandu i może to wpływać na brak autokrynnego mechanizmu syntezy hCG. Pani Doktorantka ostrożnie i w sposób dojrzały wyjaśnia powody, dla których korzystała z linii JEG-3 a nie bezpośrednio izolowanych łożysk. Ponieważ, modelem badawczym w przedstawionej do oceny pracy są komórki choriokarcinomy, to uważała za uzasadnione zbadanie receptorów PPAR gamma, za pośrednictwem których kontrolowana jest ekspresja genów kodujących podjednostki α i β hCG. Wykazała używając agonistów i antagonistów tych receptorów, że działanie TBBPA po zablokowaniu receptora jest zbliżone do działania samym antagonistą, natomiast na poziomie białka zastosowanie antagonisty znosiło do poziomu kontroli wzrost ekspresji receptorów po zadziałaniu samym TBBPA, ale tylko w stężeniu 10 nanoM. Przy omawianiu wyników badań dotyczących ekspresji czynników na poziomie genu i białka, wskazała na trudności interpretacyjne sugerując istnienie dwóch niezależnych mechanizmów działania TBBPA w wyniku, których zakłócona była funkcja endokryna badanych komórek JEG-3.

Rozprawę kończy przejrzyste i ładnie napisane Podsumowanie oraz Wnioski końcowe, które stanowią odpowiedź na zawarty w celu pracy problem.

Odczuwam pewien niedosyt, bo Pani Doktorantka wspomina, że pewne zagadnienia wymagają dalszych badań, ale „nie zagląda w przyszłość” by znaleźć odpowiedź na „dreczące” ją pytania. Chciałbym prosić by Pani Doktorantka bogatsza w doświadczenia swojej pracy, pokusiła się o zarysowanie dalszych perspektyw badawczych.

Piśmiennictwo obejmuje 182 pozycje, zawiera publikacje głównie anglojęzyczne opublikowane w ostatnich latach i tak: 91 prac między 2000-2009, a 40 pozycji w ciągu ostatnich 4 lat. Pani Doktorantka cytuje też starsze prace, które dają podstawy wiedzy na temat budowy badanych struktur tkankowych lub stanowią przegląd doniesień opisujących badania epidemiologiczne, lub działanie związków endokrynie aktywnych. Cytowanie piśmiennictwa przez Panią Doktorantkę nie budzi zastrzeżeń, choć cytowanie pozycji literatury bez numeracji i porządku alfabetycznego utrudnia i zmusza czytelnika do ciągłego sprawdzania spisu bibliograficznego. Autorka niestarannie cytuje literaturę i niezgodnie z obowiązującymi schematami.

W całej pracy jest „eksplozja” nazw i skrótów, jednak umieszczenie słownika skrótów i trudniejszych terminów na początku ułatwia lekturę recenzowanej pracy. Autorka nie ustrzegła się drobnych błędów interpunkcyjnych, ale i zabawnych określeń.

Zauważone błędy przy redagowaniu tekstu, które **nie wymagają dyskusji**, pozwałam sobie zebrać w kilku punktach:

W Spisie skrótów jest całkowita dowolność, niektóre ze stosowanych skrótów występują w tekście pracy a w wykazie brak.

Np. jest cAMP ale brak np. FBS, ang. *fetal bovine serum* - płodowej surowicy bydlęcej, FSH, LH, TSH, hCG, hPL,

Na str. 11 „ze uwagi na fakt” winno być „z uwagi na fakt....

Na str. 16 „jest silnie unaczynione, i mimo że naczynia włosowate matki i dziecka” ..jest silnie unaczynione i mimo, że naczynia.....

Str. 17 czy użycie określenia „unikatowy” nie jest „nadużyciem” w stosunku do podjednostki β hCG, a może wystarczyze względu na „wyjątkowy, „niepowtarzalny”

Str. 20 ...w trzecim trymestrze ciąży, niż w trymestrze pierwszym” – chyba ciąży...

Str. 24w tym celu stosuje się substancje, które skutecznie „inhibują”? a nie wystarczy „hamują” proces palenia, i na tej samej stronie 3 linia od dołu: ...” w stosowaniu tych bromoorganicznych retardantów palenia” a może środków opóźniających palność

Str. 31 ... w 2013 roku Narodowy Program Toksykologiczny (NTP-National Toxicology Programme) gdzie w Polsce? opublikował dane, które wykazały, że TBBPA prowadzi do powstania....

Na str. 35 .”wirowano przez 10 min z prędkością 125g” ale na stronach 43 i 45...wirowano przez 20 min przy 16,000g? czy obrotach wirówki/ min?

Str. 39 ... „a następnie dokonano pomiaru fluorescencji” ... powinno być pomiaru

Str. 45elektroforezę powadzono w aparacie Mini_Protean winno być prowadzono

Str. 58 Wykres 1? był już na str. 49, powinno być Wyk. 6

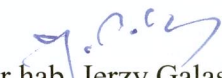
Str. 62względem Kontroli oznaczono: ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$; powinno być: ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$;

Str. 68” w komórkach choriocarcinomy” powinno się użyć choriokarcinomy.

Przedstawiona do recenzji praca wnosi nowe i cenne wartości poznawcze o istotnym znaczeniu nie tylko teoretycznym. Omówienie wyników i rzeczowa dyskusja są przeprowadzone prawidłowo i świadczą o znajomości literatury przedmiotu oraz dojrzałości Doktorantki. Podsumowując, zauważone przeze mnie błędy nie umniejszają wartości pracy. Stwierdzam, iż praca spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Przedkładam, więc Wysokiej Radzie Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach wniosok o dopuszczenie mgr inż. Eweliny Honkisz do dalszych etapów przewodu doktorskiego zmierzającego do nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk biologicznych i dyscyplinie biologii.

Bardzo wysoko oceniam recenzowaną rozprawę ze względu na aktualną problematykę, wartość merytoryczną badań, ich wykonanie, interpretację i to, że z części wyników doktoratu pani Eweliny Honkisz powstała publikacja pt. "Modulation of estradiol synthesis and aromatase activity in human choriocarcinoma JEG-3 cells exposed to tetrabromobisphenol A" *Toxicology in vitro*, 2015; 29:44-50; IF 3,207) w bardzo dobrym czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej o wysokim IF i druga publikacja pt. "The role of PPARgamma in TBBPA-mediated endocrine disrupting effects in human choriocarcinoma JEG-3 cells"- w druku. Praca doktorska nie tylko w pełni odpowiada wymaganiom stawianym rozprawom doktorskim, ale zasługuje na wyróżnienie.

Kraków, dnia 29.XII 2014


dr hab. Jerzy Galas