

Prof. dr hab. inż. Anna Koziorowska
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Rzeszowski

OCENA

rozprawy doktorskiej
mgr Angeliki Klimek

pt. *Wpływ pola elektromagnetycznego o niskiej częstotliwości (50 Hz) na status oksydacyjny i reakcje stresowe u szczura – efekt hormezy*

**Recenzja została wykonana na wniosek Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z dnia 22 marca 2024 r.**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Neurobiologii na Wydziale Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, pod opieką naukową Promotora prof. dr hab. Justyny Rogalskiej oraz Promotora pomocniczego dr hab. Łukasza Peplowskiego, prof. UMK.

Podstawę do ubiegania się o stopień doktora stanowią jedna praca przeglądowa oraz dwie oryginalne prace naukowe opublikowane w latach 2021 i 2022 w czasopismach z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania Impact Factor wynosi 14,54 i punktacja ministerialna łącznie 300 punktów, przedstawione poniżej:

1. A. Klimek, J. Rogalska (2021) Extremely Low-Frequency Magnetic Field as a Stress Factor—Really Detrimental?—Insight into Literature from the Last Decade. *Brain Sciences*, 2021, 11(2):174, IF: 3,13 (2021), MNiSW: 100
2. A. Klimek, A. Nowakowska, H. Kletkiewicz, J. Wyszowska, J. Maliszewska, M. Jankowska, L. Peplowski, J. Rogalska (2022) Bidirectional Effect of Repeated Exposure to Extremely Low-Frequency Electromagnetic Field (50 Hz) of 1 and 7 mT on Oxidative/Antioxidative Status in Rat's Brain: The Prediction for the Vulnerability to

Diseases, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2022(2):1-14, IF: 7,31 (2022), MNiSW: 100

3. A. Klimek, H. Kletkiewicz, A. Siejka, J. Wyszowska, J. Maliszewska, M. Klimiuk, M. Jankowska, J. Seckl, J. Rogalska (2022) New view on the impact of the low-frequency electromagnetic field (50 Hz) on stress responses – hormesis effect, Neuroendocrinology, 2023;113(4):423-441, IF: 4,1 (2023), MNiSW: 100

Dodatkowo Doktorantka załączyła manuskrypt pod tytułem The electromagnetic field (50 Hz) can establish a new “set-point” for the activity of the locus coeruleus–noradrenergic (LC-NA) system in rat, autorstwa A. Klimek, H. Kletkiewicz, A. Siejka, J. Wyszowska, J. Maliszewska, M. Klimiuk, M. Jankowska, J. Rogalska, który w najbliższym czasie zostanie skierowany do redakcji czasopisma Neuroscience, co sprawia, że rozprawa ma charakter hybrydowy i zdaniem recenzenta pozwoliło to Doktorantce zaprezentować najbardziej aktualne wyniki i istotnie podnosi wartość prezentowanych badań. Założenia pracy, stosowane metody, uzyskane wyniki i forma ich przedstawienia oraz dyskusja pozwalają recenzentce przypuszczać, że praca zostanie przyjęta do druku w renomowanym czasopiśmie o światowym zasięgu.

W bazie bibliometrycznej Scopus Doktorantka jest 3 razy indeksowana z współautorami z Katedry jako pierwszy autor, oraz 1 raz jako współautor, z 29 cytowaniami, indeks Hirsha 3 (dostęp z dnia 28.04.2024). Taka aktywność w ciągu ostatnich trzech lat świadczy o dużym zaangażowaniu w badaniach i o zdolności publikacyjnej.

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały sfinansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki “Nowe spojrzenie na wpływ pola elektromagnetycznego niskiej częstotliwości (50 Hz) na reakcje stresowe i plastyczność mózgową – efekt hormezy” (OPUS nr 2017/25/B/NZ7/00638) oraz projektu Universitas Copernicana Thoruniensis In Futuro- modernizacja Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w ramach Zintegrowanego Programu Uczelni. (Nr projektu: POWR.03.05.00-00-Z302/17-00).

Przedstawiona do oceny rozprawa, wraz z dołączonymi pracami liczy 177 stron. Zawiera następujące rozdziały: Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy, Wprowadzenie, Cele i hipotezy, Metody badawcze, Omówienie wyników, Podsumowanie, Wnioski, Literatura, Prace 1-4, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Wkład w autorstwo publikacji.

W pracy nr 1 Doktorantka dokonała przeglądu światowego piśmiennictwa i zaprezentowała wiedzę ściśle związaną z efektami oddziaływania pól elektromagnetycznych na stres oraz informacje dotyczące stresu, jako czynnika determinującego funkcjonowanie organizmu na wszystkich poziomach jego organizacji. Doktorantka zauważyła, iż wyniki

dotychczasowych badań nie dają jednoznacznej odpowiedzi w jaki sposób pola elektromagnetyczne działają na układ nerwowy. W badaniach wykazywano zarówno pozytywną, jak i negatywną odpowiedź organizmu na ekspozycję. Wykazywano negatywny wpływ pól w przypadku zastosowania pól o dużych wartościach indukcji magnetycznej, pola o niższych wartościach indukcji wykazywały słabszy efekt. Doktorantka zauważyła, iż oddziaływanie pól na organizmy ma charakter hormetyczny. Pole elektromagnetyczne emitowane w dużej dawce może być szkodliwe dla organizmu, w małej dawce może wywołać odpowiedź adaptacyjną organizmu.

Po analizie piśmiennictwa Doktorantka postawiła hipotezę, iż pole elektromagnetyczne wykazuje hormezę, powtarzana ekspozycja na pola elektromagnetyczne zmienia set point - „punkt nastawczy” aktywności układów stresu, a dynamika tego procesu i kierunek zmian zależą od wartości indukcji magnetycznej. Pole elektromagnetycznej o niskiej wartości indukcji magnetycznej mogłoby pobudzać mechanizmy antyoksydacyjne organizmu i indukować szlaki komórkowe zaangażowane w neuroplastyczność, zachowując homeostazę organizmu. Pole o wysokiej wartości indukcji magnetycznej wywoła uszkodzenia komórek przy braku mechanizmów ochronnych.

Doktorantka podjęła się badań, w których zweryfikowała cztery hipotezy robocze:

1. U podłoża dwukierunkowego działania pola elektromagnetycznego leżą zmiany statusu oksydacyjno-antyoksydacyjnego mózgowia (hipoteza I)
2. Pole elektromagnetyczne inicjuje zmiany w odpowiedzi stresowej, których kierunek i nasilenie zależą od natężenia pola elektromagnetycznego (hipoteza II)
3. Pole elektromagnetyczne trwale modyfikuje status oksydacyjno-antyoksydacyjny i poziom aktywności układów stresu i tym samym zmienia odpowiedź na kolejne czynniki stresogenne (hipoteza III)
4. Zmiany w odpowiedzi stresowej indukowanej przez pole elektromagnetyczne modulują plastyczność mózgową (hipoteza IV),

a rezultaty tych badań przedstawiła w publikacjach 2-3 oraz dołączonym manuskrypcie.

Doktorantka prowadziła badania z użyciem samców szczurów rasy Wistar Han. Na badania uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej w Bydgoszczy nr 3/2018. Zwierzęta zostały podzielone na 6 grup badawczych. Emiterem pola elektromagnetycznego użytym w badaniach był generator o polu jednorodnym, sinusoidalnym, częstotliwości 50 Hz i indukcji magnetycznej o wartościach z zakresu 0,1 – 8 mT. W badaniach Doktorantka wykorzystwała dwie wartości indukcji magnetycznej: 1 mT i 7 mT. Ekspozycje były powtarzane codziennie przez 1 h przez 7 dni i były powtarzane 3-krotnie w 3-tygodniowych odstępach czasu. Część

zwierząt była poddawana testom behawioralnym. W celu określenia stopnia aktywności lokomotorycznej oraz eksploracyjnej badanych zwierząt Doktorantka wykonała test otwartego pola. Do obserwacji zachowań lękowych użyła podwyższonego labiryntu krzyżowego. Behawior zwierząt analizowała przy użyciu oprogramowania EthoVision 11. Grupa kontrolna była poddawana identycznym procedurom, z pominięciem ekspozycji na pole elektromagnetyczne.

Do analizy statystycznej uzyskanych wyników Doktorantka zastosowała Ogólny Model Liniowy określając wpływ pola na równowagę oksydacyjno-antyoksydacyjną mózgu oraz zmiany parametrów reakcji stresowej. Użyła także wieloczynnikowej analizy wariancji MANOVA do oceny zmian behawioralnych, a następnie wykonała test post-hoc z poprawką Bonferroniego. Analizy wykonała przy pomocy programu SPSS 25.0.

Doktorantka w celu wykonania analiz wyizolowała hipokamp, podwzgórze, przysadkę, miejsce sinawe oraz korę przedczołową, nadnercza oraz krew z serca. W celu weryfikacji założonych hipotez oznaczyła markery stresu oksydacyjnego – stężenie grup karbonylowych białek (CP), stężenie 8-izoprostanów oraz całkowitą pojemność antyoksydacyjną (TAC), a ich wyniki przedstawiła w pracy 2. Oznaczyła stężenia hormonów osi podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowej (HPA) – kortykoliberyny (CRH), kortykotropiny (ACTH) i kortyzolu (CORT), oznaczyła ekspresję receptorów: glukokortykoidowego (GR), mineralokortykoidowego (MR), receptora 1 hormonu uwalniającego kortykotropinę (CRH-R1) oraz receptora 2 hormonu adrenokortykotropowego (MC2R) prezentując wyniki w pracy 3, oraz oznaczyła stężenia hormonów układu noradrenergicznego – noradrenaliny (NA) i 3-metoxy-4-hydroksyfenyloglikolu (MHPG) oraz ekspresję receptora andrenergicznego beta-2 (β 2-AR) prezentując wyniki w dołączonym manuskrypcie.

Weryfikując hipotezę 1 Autorka wykazała, że powtarzająca się ekspozycja na pole elektromagnetyczne o częstotliwości 50 Hz zmienia status oksydacyjno-antyoksydacyjny kory przedczołowej szczurów i zależy od liczby ekspozycji i wartości indukcji magnetycznej. W przypadku szczurów poddanych ekspozycji na pole o wartości indukcji magnetycznej 1 mT poziom wskaźników stresu oksydacyjnego i antyoksydantów nie wykazał różnic statystycznie istotnych w porównaniu z grupą kontrolną. Mechanizmy kompensacyjne w odpowiedzi na działanie pola utrzymywały równowagę oksydacyjną po dwóch ekspozycjach, a po trzeciej Doktorantka zauważyła skumulowany efekt wszystkich ekspozycji, skutkujący wzrostem poziomu grup karbonylowych białek (CP). Każda kolejna ekspozycja powodowała tendencję do zmniejszania się poziomu 8-izoprostanów. Powtarzająca się ekspozycja zwierząt na pole o indukcji magnetycznej 7 mT podwyższała poziom stresu oksydacyjnego. Po drugiej i trzeciej

ekspozycji Autorka wykazała znaczny wzrost poziomu grup karbonylowych białek (CP). Z każdą ekspozycją wzrastał poziom 8-izoprostanów, a po trzeciej ekspozycji ich poziom był statystycznie istotnie wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej. Doktorantka wnioskuje, iż pole elektromagnetyczne o indukcji magnetycznej o wartości 1 mT nie zaburza równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, a pole o indukcji magnetycznej 7 mT indukuje uszkodzenia oksydacyjne białek oraz lipidów i ma potencjał do osłabiania obrony antyoksydacyjnej mózgu.

Weryfikując hipotezę 2 Autorka wykazała, że aktywność układów stresu w przypadku powtarzającej się ekspozycji na pole elektromagnetyczne jest zależna od wartości indukcji magnetycznej i liczby ekspozycji. Wykazała, iż hormony osi HPA wykazywały tendencje wzrostowe po jednokrotnej ekspozycji na pole elektromagnetyczne o indukcji magnetycznej 1 mT, a z każdą kolejną ekspozycją następował spadek ich stężeń. Wykazała również wzrost stężenia ACTH po pierwszej i drugiej ekspozycji, a po trzeciej wykazała spadek jego poziomu. Stężenie noradrenaliny i poziomy MHPG po ekspozycji na takie pole nie różniły się statystycznie istotnie od grupy kontrolnej. Ekspozycja na pole o wysokiej wartości indukcji magnetycznej 7 mT spowodowała wzrost stężeń hormonów osi HPA w porównaniu do grupy kontrolnej i do grupy eksponowanej na pole o indukcji magnetycznej 1 mT. Stężenie CRH wzrastało po każdej ekspozycji na pole o indukcji magnetycznej 7 mT. Doktorantka wykazała 4-krotny wzrost stężenia ACTH w przysadce mózgowej po pierwszej ekspozycji na takie pole, każda następna ekspozycja wywoływała wzrost jego stężenia. Doktorantka zasugerowała, że ekspozycja na pola o wartości 1 mT jest sygnałem pobudzającym mechanizmy kompensacyjne w organizmie i uznała, iż ekspozycja na takie pola jest bezpieczna dla układu nerwowego, natomiast pola o wartości indukcji 7 mT są silnym stresorem, wywołują wpływ na układy stresu i zaburzają ich funkcjonowanie.

Weryfikując hipotezę 3 Doktorantka stwierdziła, iż powtarzająca się ekspozycja na pole elektromagnetyczne ma dwukierunkowy wpływ na poziom stresu oksydacyjnego i aktywność układów stresu i zależy od dawki. Poddając szczury ekspozycji na pole o wartości indukcji magnetycznej 1 mT Autorka zauważyła zmiany w statusie oksydacyjno-antyoksydacyjnym, który był indukowany w odpowiedzi na kolejny czynnik stresowy – test otwartego pola. Niewielki wzrost poziomu grup karbonylowych białek (CP) wywołany testem otwartego pola ulegał obniżeniu po kolejnych ekspozycjach. Zmiany w poziomie stresu oksydacyjnego spowodowane ekspozycją na pole o indukcji magnetycznej 1 mT były wystarczające, aby zmienić profil procesów oksydacyjnych po zadziałaniu innego czynnika stresowego, jakim był test otwartego pola. Analiza procentowych zmian w stężeniach hormonów u zwierząt eksponowanych na pole o niskiej wartości wykazała osłabioną odpowiedź na kolejny czynnik

stresowy, co jak sugeruje Doktorantka może być adaptacją do innych czynników stresowych. Pole o niskiej wartości indukcji magnetycznej (1 mT) może działać jako prekondukcjonowanie, które ułatwia adaptacyjną odpowiedź na kolejne czynniki stresowe. Poddając zwierzęta ekspozycji na pole elektromagnetyczne o wartości indukcji magnetycznej 7 mT Doktorantka zauważyła zakłócenie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej mózgu indukowanej ekspozycją na kolejny czynnik stresowy. Zwierzęta poddane oddziaływaniu na pola o wysokiej wartości indukcji magnetycznej wykazywały mniej zachowań lękowych w porównaniu do pozostałych grup. Doktorantka wyciągnęła wniosek, iż u zwierząt poddanych takiemu oddziaływaniu aktywność układów stresu oraz zachowanie w odpowiedzi na stres są zaburzone.

Weryfikując hipotezę 4 Doktorantka badała wpływ pól elektromagnetycznych na zmiany w hipokampie. Opisała, iż oddziaływanie zależało od wartości indukcji magnetycznej. Pole o niskiej wartości indukcji (1 mT) specyficznie stymulowało ekspresję receptorów mineralokortykoidowych (MR) w hipokampie, gdyż zdaniem Doktorantki niewielkie czynniki stresowe mogły zwiększać ekspresję tych receptorów w neuronach. Stanowi to mechanizm kompensacyjny indukujący plastyczność neuronalną. Receptory te determinują aktywność osi HPA i mają znaczenie neuroprotektoryjne. Ekspozycja szczurów na pole elektromagnetyczne o indukcji magnetycznej 7 mT obniżyła statystycznie istotnie ekspresję receptorów adrenergicznych beta-2 (β 2-AR), co może skutkować wystąpieniem neuropatologii, takich jak depresja. Doktorantka wnioskuje, iż ekspozycja na pole o dużej wartości indukcji magnetycznej może stanowić czynnik ryzyka rozwoju takich chorób.

Podsumowując Autorka w dysertacji udowodniła, iż oddziaływanie pól elektromagnetycznych ekstremalnie niskiej częstotliwości 50 Hz jest czynnikiem determinującym dwukierunkowy wpływ na mózg, zarówno pozytywny, jak i negatywny, zależny od wartości indukcji magnetycznej. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki po raz pierwszy wykazały hormetyczny mechanizm działania pól elektromagnetycznych o częstotliwości 50 Hz u szczurów. Pole elektromagnetyczne może być wykorzystywane w terapii nowych schorzeń.

Po przeprowadzeniu badań Doktorantka wysunęła następujące wnioski: Oddziaływanie polem elektromagnetycznym ekstremalnie niskiej częstotliwości 50 Hz i niskiej wartości indukcji magnetycznej 1 mT stanowi czynnik umiarkowanie wpływający na organizm, poprzez aktywację układu stresu (os HPA i układ LC-NA). Dodatkowo pole takie jest czynnikiem pobudzającym mechanizmy kompensacyjne i adaptacyjne w organizmie. Natomiast pole elektromagnetyczne ekstremalnie niskiej częstotliwości 50 Hz o wysokiej

wartości indukcji magnetycznej 7 mT jest silnym stresorem i zwiększa odpowiedź organizmu po każdej ekspozycji na czynnik stresowy. Pole elektromagnetyczne modyfikuje status oksydacyjno-antyoksydacyjny i modyfikuje odpowiedź na kolejne oddziaływanie czynnikiem stresowym. Pola o niskiej wartości indukcji magnetycznej pozwalają adaptować zwierzęta do warunków stresogennych. Poddanie zwierząt działaniu zwierząt polem o indukcji magnetycznej 1 mT nie powodowało żadnych zmian w behawiorze natomiast pole o wartości 7 mT powodowały zaburzenia. Pole o niskiej wartości indukcji powoduje zwiększoną ekspresję receptorów mineralokortykoidowych w hipokampie, natomiast oddziaływania polem o wysokiej wartości obniża ekspresję receptorów beta-adrenergicznych. Doktorantka potwierdziła hormetyczny efekt oddziaływania pól o ekstremalnie niskiej częstotliwości. Kierunek i intensywność odpowiedzi organizmu na taki rodzaj stresu są zależne od wartości indukcji magnetycznej.

Reasumując w ocenianym opracowaniu Doktorantka wykazała się dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje moim zdaniem doskonały wybór tematyki badawczej, która w najbliższej przyszłości może mieć bardzo duże znaczenie. Pojawiające się coraz częściej fejkowe informacje o szkodliwości pola elektromagnetycznego w wynikach badań doktorantki zostały całkowicie obalone. Wartości indukcji magnetycznej pól występujących w środowisku są niewielkie (w zakresie mikro Tesli) i nie powinny być czynnikiem epidemiologicznym powodującym zagrożenie zdrowia ludzi.

Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka posiada ważne w pracy badawczej cechy, takie jak pracowitość, solidność i dociekliwość oraz wiedzę z zakresu nie tylko nauk biologicznych, ale i technicznych.

Chcąc wywiązać się w pełni z roli recenzenta chcę zwrócić uwagę na drobne niedociągnięcia w nazewnictwie pola elektromagnetycznego. Pola elektromagnetyczne o częstotliwości z zakresu 1-300 Hz w piśmiennictwie technicznym przyjęto nazywać polami elektromagnetycznymi ekstremalnie niskich częstotliwości. Doktorantka w opracowaniu używa określenia pola niskiej częstotliwości. Na stronie 11 manuskryptu Doktorantka napisała, iż weryfikuje wpływ pola magnetycznego, zaznaczając iż w publikacjach będzie stosowała pojęcie pola elektromagnetycznego. Pole elektromagnetyczne scharakteryzowane jest przez dwie wielkości wektorowe: natężenie pola elektrycznego i natężenie pola magnetycznego.

Składowa magnetyczna jest dominującą w przypadku częstotliwości 50 Hz i Doktorantka weryfikowała wpływ składowej magnetycznej pola elektromagnetycznego.

Przedstawione uwagi mają na celu podniesienie wartości i w żadnym stopniu nie wpływają na moją wysoką ocenę.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Angeliki Klimek pt. *Wpływ pola elektromagnetycznego o niskiej częstotliwości (50 Hz) na status oksydacyjny i reakcje stresowe u szczura – efekt hormezy* w opinii recenzenta spełnia wszystkie wymagania – określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.) – stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie mając na uwadze wysoki poziom naukowy zaprezentowanych badań, ich interdyscyplinarność i nie tylko poznawczy charakter, ale również aplikacyjny, co uznali recenzenci kwalifikujący prace do druku w czasopismach o światowym zasięgu, pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie w pełni uzasadniony moim zdaniem wniosek o wyróżnienie pracy, którego najlepszą rekomendacją niech będzie podsumowanie zaprezentowanych wyników badań łacińską maksymą „Ad Bonum Hominis”.

