



Warszawa, 14.02.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Średnickiej

pt. „*Interakcje związków endokrynnie czynnych obecnych w żywności z mikrobiotą jelitową człowieka*”,
wykonanej pod kierunkiem Promotorów:
Pana dr hab. inż. Marka Roszko, prof. IBPRS-PIB oraz
Pani dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB.

Rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Średnickiej dotyczy aktualnego i ważnego społecznie i klinicznie problemu, jakim jest ekspozycja człowieka na działanie związków endokrynnie czynnych (EDC, ang. *endocrine disrupting chemicals*). Ze względu na swoje rozpowszechnienie i wpływ na funkcjonowanie układu hormonalnego, EDC stanowią realne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Działanie EDC wiązane jest z rosnącą częstością zachorowań na tzw. choroby cywilizacyjne, w tym otyłość, choroby nowotworowe, sercowo-naczyniowe i autoimmunologiczne. Badania wskazują, że większość populacji (jeśli nie wszyscy ludzie) są nie tylko narażeni na ekspozycję na EDC, ale niestety już wykazują obecność tych związków w płynach ustrojowych i tkankach. Dlatego tak ważne są badania nad możliwością eliminacji EDC z organizmu bądź przynajmniej minimalizowania szkodliwych efektów ich działania. Próbą rozwiązania problemu są nowe analogi tych szkodliwych związków, takich jak bisfenol A (BPA), wprowadzane przez przemysł jako zamienniki o ograniczonym wpływie na zdrowie człowieka. W tym kontekście niezwykle ważna jest weryfikacja wpływu tych nowych związków na zdrowie człowieka przez niezależne laboratoria badawcze. Omawiana rozprawa nawiązuje do tej tematyki, skupiając się na ocenie działania analogów BPA: bisfenolu S (BPS), bisfenolu F (BPF) oraz tetrametylobisfenolu F (TMBPF).

W swojej pracy Autorka postawiła hipotezę zakładającą, że działanie EDC prowadzi do zaburzeń mikrobioty jelitowej, zaś ta ostaną ma zdolność do eliminacji EDC i modyfikowania ich aktywności biologicznej. Mikrobiota jelitowa (GM, ang. *gut microbiota*), definiowana jako populacja mikroorganizmów różnych taksonów zasiedlających przewód pokarmowy, wpływa na funkcjonowanie organizmu człowieka, m.in. poprzez modulowanie składu metabolitów aktywnie działających na komórki, tkanki i narządy. Hipoteza Doktorantki oparta jest na wcześniej publikowanych pracach, wskazujących, że GM, jakkolwiek nie dokonuje biotransformacji bisfenoli, może wpływać na ich eliminację drogą adsorpcji, której intensywność koreluje dodatnio ze wzrostem hydrofobowości adsorbowanego związku. Zaobserwowano, że proces ten może prowadzić do zmniejszenia estrogennych efektów działania bisfenoli.

W celu weryfikacji hipotezy badawczej, Autorka w pierwszym rzędzie postanowiła dokonać optymalizacji metod hodowli GM *in vitro*, a następnie zbadać wpływ wybranych EDC na profil taksonomiczny, α - i β - różnorodność GM i profil metaboliczny GM. Z drugiej strony, prowadziła badania nad zdolnością GM do neutralizacji działania wybranych EDC, aktywnością estrogeno-/androgenopodobną EDC oraz cytotoksycznością wybranych EDC.

Ocena formalna rozprawy:

Na rozprawę składają się dwie prace poglądowe oraz dwa artykuły o charakterze oryginalnych prac eksperymentalnych. Łączna wartość wskaźnika IF cyklu prac wynosi 19,079, punkty MNiSW 460.



Zestawienie cyklu prac jest poprzedzone streszczeniem w dwóch wersjach językowych, polskiej i angielskiej, po których następuje spis treści oraz wykaz opublikowanych artykułów naukowych wchodzących w skład rozprawy z opisanym wkładem doktorantki. Wstęp obejmuje przegląd piśmiennictwa związanego z tematyką pracy, dalej następują rozdziały opisujące cel pracy i hipotezy badawcze, zakres pracy, materiał badawczy i metody badań, rozdział pt. Materiały opublikowane, na który składają się dwie prace poglądowe (oznaczone jako P1, P2) i praca oryginalna (P3), rozdział Materiały nieopublikowane (które po ukończeniu pisania rozprawy ukazały się jako artykuł P4), rozdział Stwierdzenia i wnioski, Spis literatury, oraz Aneks. Spis piśmiennictwa zawiera 193 pozycje literatury, przy czym zdecydowaną większość stanowią artykuły naukowe opublikowane w ciągu ostatnich 10 lat, co odzwierciedla aktualność tematyki rozprawy.

Rozprawa opatrzona jest również oświadczeniami: obojga promotorów, o przyjęciu rozprawy, autorki rozprawy, a także wszystkich współautorów odnośnie wkładu merytorycznego w powstanie poszczególnych artykułów naukowych. Do rozprawy załączona jest również Uchwała Komisji Etyki Badań naukowych z udziałem ludzi w sprawie zgodności projektu badania naukowego z zasadami etyki.

Muszę przyznać, że nie do końca jest dla mnie zrozumiałe, dlaczego część głównych rozdziałów rozprawy (w tym m.in. Wstęp, Cel pracy) pozostały nienumerowane, podczas gdy podrozdziały tych fragmentów pracy oraz inne rozdziały (np. Zakres pracy, Materiał badawczy...) zostały opatrzone numerami porządkowymi. Taki układ nieco utrudniał płynne czytanie rozprawy i sprawne przemieszczanie się między jej kolejnymi rozdziałami.

Wstęp stanowi unikalne zestawienie informacji o charakterze interdyscyplinarnym, w tym opis chemicznych i biologicznych właściwości EDC, opis roli pełnionej przez GM w ustroju, jak również podstawowych informacji dotyczących prawodawstwa regulującego wykorzystywanie związków, których dotyczy rozprawa. Zwraca uwagę, że Doktorantka śledzi na bieżąco informacje prawne (np. te dotyczące przekazanego przez Komisję Europejską do konsultacji publicznych w lutym 2024 roku projektu regulacji zakazujących stosowania BPA i innych BP w materiałach mających kontakt z żywnością. Warto podkreślić, że pod koniec roku 2024 zakaz stosowania BPA stał się faktem (Rozporządzenie Komisji UE 2024/3190 z dnia 19 grudnia 2024 r.)).

Opisane po Wstępie Cele i hipotezy badawcze są jasno sformułowane i dobrze umotywowane. Rozdział Zakres Pracy zawiera bardzo pomocną rycinę, przedstawiającą plan projektu badawczego wraz z informacją, w których artykułach naukowych zawarte są wyniki poszczególnych etapów projektu. Materiał badawczy i metodyka badań zostały precyzyjnie opisane, w sposób pozwalający na odtworzenie eksperymentów w niezależnym laboratorium. W rozdziale 4 omówiono przedstawione w pracy artykuły naukowe oznaczone literami P1, P2, P3, a w rozdziale 5 materiały nieopublikowane, które po ukończeniu rozprawy ukazały się jako artykuł oznaczony P4.

Na rozprawę składają się teksty napisane w języku polskim oraz angielskim. Polszczyzna w rozprawie Doktorantki jest poprawna, precyzyjna, unikająca żargonu laboratoryjnego. Artykuły w języku angielskim są również poprawne językowo (ich opublikowanie w recenzowanych czasopismach zagranicznych również świadczy o tym, że pomyślnie przeszły ocenę językową prowadzoną przez redakcje czasopism). Od strony edytorskiej rozprawa jest wyjątkowo poprawna (natrafiłam tylko na jedną literówkę na str. 62: „celem określenia żywotność” zamiast: „celem określenia żywotności”).



Z obowiązku wynikającego z funkcji recenzenta zmuszona jestem zwrócić uwagę na niewielkie niedociągnięcia, nieuniknione w tego typu opracowaniach:

1. We Wstępie nie zdefiniowano pojęcia α i β różnorodności mikrobioty jelitowej (pojęcia te pojawiają się dopiero w rozdziale Cele pracy i hipotezy badawczej)
2. str. 49: nie jest jasne, co mają oznaczać strzałki umieszczone w zdaniu "Wybór podłoża zachowującego / bioróżnorodność i / aktywność metaboliczną GM"
3. Przy pierwszej wzmiance nie zdefiniowano skrótu ASV. Po raz pierwszy skrót ten pojawia się na str. 53 w opisie metodyki analizy bioinformatycznej, a jego wyjaśnienie (*amplicon sequence variants*) znajdujemy dopiero na str. 115, w załączonej pracy opublikowanej w Scientific Reports
4. Nie podano wyjaśnienia skrótu "OTUs" na str. 18 artykułu opublikowanego w Scientific Reports (str. 130 rozprawy)

Ocena merytoryczna rozprawy:

Prace poglądowe:

PUBLIKACJA [P1] Średnicka P., Juszcuk-Kubiak E., Roszko M.Ł. (2021) *Interakcje związków endokrynnie czynnych obecnych w żywności z mikroflorą jelitową człowieka* **ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość**, 28, 2(127), 36-48. DOI: 10.15193/zntj/2021/127/376

PUBLIKACJA [P2] Średnicka P., Juszcuk-Kubiak E., Wójcicki M., Akimowicz M., Roszko M.Ł. (2021) *Probiotics as a biological detoxification tool of food chemical contamination: A review* **Food and Chemical Toxicology**, 153. 112306. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112306

Prace poglądowe opublikowane w czasopismach ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, oraz Food and Chemical Toxicology omawiają, odpowiednio, interakcje EDC z GM oraz możliwości detoksyfikacji ksenobiotyków za pomocą probiotyków. Zawarte w nich informacje stanowią dobry wstęp i uzasadnienie problematyki podjętej w kolejnych dwóch oryginalnych pracach eksperymentalnych.

Prace oryginalne:

PUBLIKACJA [P3] Średnicka P., Roszko M.Ł., Popowski D., Kowalczyk M., Wójcicki M., Emanowicz P., Szczepańska M., Kotyrba D., Juszcuk-Kubiak E. (2023) *Effect of in vitro cultivation on human gut microbiota composition using 16S rDNA amplicon sequencing and metabolomics approach* **Scientific Reports**, 13, 3026. DOI: 10.1038/s41598-023-29637-2.

Celem pracy P3 była ocena wpływu czterech powszechnie stosowanych mediów hodowlanych na zachowanie bioróżnorodności i aktywności metabolicznej mikrobioty człowieka w hodowli in vitro. Badanie polegało na wstępnej analizie mieszaniny próbek kału pobranych od zdrowych osób, w celu oceny możliwości redukcji liczby zmiennych i zapewnienia powtarzalności wyników. Następnie, przy użyciu PMA (monoazydku propidyny) dokonano różnicowania między drobnoustrojami żywymi i martwymi, poddając je sekwencjonowaniu 16S rDNA oraz nieukierunkowanej analizie metabolomicznej techniką LC-HR-MS/MS oraz analizie profili SCFA techniką GC-MS.

W artykule dokonano oceny wpływu czterech mediów hodowlanych na stabilność taksonów GM. Dokonano też oceny ich użyteczności pod kątem dalszych badań toksykomikrobiomicznych. W pierwszym



etapie badań oceniono czy połączone próbki kału mogą stanowić dobrą alternatywę wobec analizy próbek pochodzących od poszczególnych dawców. To wstępne badanie wykazało, że połączone próbki kału pozwalają na wyeliminowanie zmienności osobniczej jako źródła błędu w wynikach. Następnie wykonano analizę wpływu efektu łączenia próbek na wynik analizy genomowej. Na końcu wykonano zintegrowaną analizę 16S rDNA i profilowanie metabolomu hodowli *in vitro*. Badania wykazały, że łączenie próbek kału pochodzących od różnych dawców pozwala na przygotowanie wystandaryzowanego *inoculum* reprezentującego GM badanej populacji. Wykorzystanie tak wystandaryzowanego *inoculum* pozwala również na zwiększenie powtarzalności pomiędzy poszczególnymi eksperymentami. Bardzo ciekawe wyniki przyniosła nieukierunkowana analiza metabolomu. Wykazano w niej, że hodowla GM w medium GMM związana była z powstaniem unikalnego profilu metabolitów, zdecydowanie różniącego się od profili wygenerowanych w trakcie hodowli w pozostałych mediach hodowlanych.

Badania opisane w artykule opublikowanym w Scientific Reports są istotne dla ustalenia warunków hodowli GM. Mimo istotnego postępu w pracach nad opracowaniem mediów, które naśladowałyby warunki panujące jelicie, wciąż brakuje procedur, które pozwalałyby na hodowlę wszystkich gatunków wchodzących w skład GM. Charakterystyka wpływu różnych mediów hodowlanych na skład gatunkowy GM oraz jej aktywność metaboliczną pozwala przybliżyć się do standaryzacji metod hodowli GM *in vitro*.

PUBLIKACJA [P4] Średnicka P., Roszko M., Emanowicz P., Wójcicki M., Popowski D., Kanabus J., Juszczuk-Kubiak, E. (2024) *Influence of bisphenol A and its analogues on human gut microbiota composition and metabolic activity: Insights from an in vitro model* **Science of the Total Environment**, 956, 177323. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.177323

Celem pracy była ocena wpływu BPA i jego analogów, BPS, BPF i TMBPF, na skład i aktywność metaboliczną GM. Praca cechuje się oryginalnym podejściem eksperymentalnym. Podczas gdy większość badań tego typu opiera się na modelach zwierzęcych, Doktorantka zdecydowała się wykorzystać scharakteryzowany we wcześniejszych badaniach model hodowli GM *in vitro*. Takie podejście ma swoje oczywiste plusy, w tym możliwość ścisłej kontroli warunków eksperymentalnych i brak wątpliwości natury etycznej, wiąże się też jednak z ograniczeniami, takimi jak brak możliwości uwzględnienia interakcji GM-organizm gospodarza. Zarówno plusy, jak i minusy takiego podejścia zostały przez Doktorantkę starannie przedyskutowane w podrozdziale Wstępu 1.2.5. Rozprawy.

Wykorzystując techniki sekwencjonowania 16s rDNA, nieukierunkowanej analizy mikrobiomu metodą LC-HRMS/MS oraz analizy ukierunkowanej na profilowanie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFAs, ang. *short-chain fatty acids*), w pracy stwierdzono, że BPA, BPS i BPF obniżają α -różnorodność GM oraz całkowitą produkcję SCFA. Te same trzy związki oraz dodatkowo TMBFP obniżają ilość bakterii typu *Bacteroidetes*. W badaniach wykorzystujących model reporterowy zmodyfikowanych szczepów drożdży wykazano, że GM adsorbują BPA, BPS i BPF, co zmniejsza ich działanie estrogenopodobne. Z kolei bazując na modelu hodowlanych *in vitro* komórek człowieka wykazano również, że BPA, BPF i TMBPF wpływają na żywotność komórek jelita grubego.

Każda dobra rozprawa doktorska pobudza do stawiania pytań. Nie inaczej jest w przypadku rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Średnickiej, W związku z tym prosiłabym, by Doktorantka odniosła się w trakcie obrony do następujących zagadnień:



1. Str. 9 Streszczenie: „*Ekspozycja komórek nabłonka jelitowego na supernatanty, uprzednio poddanych działaniu BPA, BPF i TMBPF, prowadziła do istotnego spadku żywotności komórek Caco-2.*”: komórki Caco-2 wywodzą się z gruczolakoraka jelita grubego. Czy zdaniem Doktorantki uzyskany wynik sugeruje, że działanie tych związków może być paradoksalnie dobroczynne w przypadku choroby nowotworowej? Jak Doktorantka skomentuje otrzymane wyniki w kontekście tego, że fenotyp tych komórek znacznie różni się od prawidłowych enterocytów, w szczególności obecnością onkogennych mutacji i ekspresją genów kontrolujących proliferację, migrację i metabolizm komórkowy. Monowarstwa Caco-2 nie odzwierciedla też funkcji nabłonka jelita (m.in. charakteryzuje się słabą przepuszczalnością dla związków hydrofilowych (zob. PMID: 32984279).
2. W opisie Wyników (str. 65) : "*odpowiednio wzbogacona pożywka (SM) może zachować znaczną część społeczności bakteryjnej*" – tj. jaką dokładnie część?
3. Artykuł P3 (opublikowany w Scientific Reports):
 - a. Zgodnie z kryteriami opisanymi w rozdziale Methods, do badania kwalifikowano zdrowe osoby, których BMI powinno być mniejsze lub równe 25 kg/m². Z Tabeli S1 wynika, że nie wszyscy dawcy spełniali te kryteria: BMI dawcy nr 4 i 17 wynosi, odpowiednio, 25,18 i 25,03. Wskaźnik BMI o wartości równej lub większej 25,0 wskazuje na nadwagę. Z kolei dawca nr 8 miał BMI o wartości 17,72, co wskazuje na niedowagę. Czy zatem zasadne jest stwierdzenie, że do badania kwalifikowane były "zdrowi dawcy" ("*healthy donors*"?). W badaniu opisanym w artykule z Scientific Reports nie dokonywano porównania GM między zdrowymi a chorymi osobami, więc nie było ryzyka uzyskania fałszywych wyników. Doktorantka powinna jednak zwrócić uwagę na kryteria kwalifikacji osób do badań, jeśli w przyszłości planuje wykorzystać próbki od zdrowych osób jako grupy kontrolnej. Zarówno nadwaga, jak i niedowaga wpływają na GM. Ponadto, kryteria kwalifikacji do badania określały wiek dawców na 25-35 lat. Tymczasem wśród zakwalifikowanych osób mamy dawcę nr 13 (23 lata), 15 (20 lat) i 17 (43 lata).
 - b. Analiza wyników pracy P3 (str. 11 wg numeracji Scientific Reports, 123 strona rozprawy) wykazała, że w porównaniu z wyjściowym *inoculum* hodowla w medium SM związana była ze zmniejszeniem się udziału ścieżek związanych z ruchliwością komórek "*Within cellular processing, the level 2 KEGG showed the largest decrease in cell motility in the SM compared to the non-cultured MIX inoculum (Fig. 6h)*". Czy zdaniem Autorki może to oznaczać, że medium SM może w najmniejszym stopniu wpływać na ruchliwość bakterii? Czy może to z kolei mieć wpływ na adhezję BPA do GM?
4. Artykuł P4 (publikacja w Science of the Total Environment):
 - a. Autorka zaobserwowała, że ekspozycja na większość badanych związków powodowała bardzo znaczące zmniejszenie stężenia kwasów izowalerianowego i izomasłowego (dla BPA i BPS), a w przypadku BPF obniżenie kwasu izowalerianowego o 91% i izomasłowego o 84%. Jakie znaczenie fizjologiczne może mieć tak duży spadek ilości SCFA?
 - b. Podając wyniki zmierzonych stężeń SCFA po ekspozycji na badane związki Autorka interpretuje spadki stężenia jako "obniżenie produkcji". Skąd wiadomo, że nie mamy tu do



- czynienia ze zwiększeniem degradacji danego SCFA? w rozdziale 5.2.1 czytamy "W niniejszych badaniach zaobserwowano wpływ ekspozycji na BPs na produkcję SCFA jako głównych metabolitów". Metodologia badań pozwalała zaobserwować zmiany w stężeniu metabolitów po ekspozycji GM na badanie związku - nie badano jednak samej produkcji, a zaobserwowane zmiany w stężeniu mogły wynikać z przemian metabolicznych/degradacji
- c. W porównaniu do pozostałych badanych związków, TMBPF miał najmniejszy wpływ na zmiany stężenia SCFA. Nie wykazywał też aktywności estrogenopodobnej. W najmniejszym stopniu hamował też żywotność komórek Caco-2. Czy ten brak wpływu TMBPF na zmiany stężenia metabolitów może być związany z zaobserwowaną przez Autorkę eliminacją tego związku przez GM?
5. Rozprawę kończy rozdział 6, w którym Autorka podsumowuje uzyskane wyniki badań i wskazując na pozytywne zweryfikowanie postawionych hipotez. Zdecydowana większość wniosków wyciągniętych z uzyskanych wyników badań jest prawidłowa. Trudno mi jednak zgodzić się z wnioskiem 6. "Hodowla mikrobioty jelitowej z BPA, BPF i TMBPF prowadzi do tworzenia metabolitów, które negatywnie wpływają na żywotność komórek nabłonka jelitowego". Jakkolwiek w rozprawie wykazano, że hodowla GM w obecności badanych związków powoduje zmiany w profilu metabolitów, nie przeprowadzono badań, który wykazałyby ich toksyczność wobec komórek Caco-2. Obniżenie żywotności komórek Caco-2 po inkubacji z supernatantem z hodowli GM eksponowanej na działanie bisfenoli może wynikać nie tylko z działania toksycznych metabolitów, ale też innych związków wydzielanych przez GM, takich jak białka, lipidy, niekodujące RNA (PMID: 34208860) czy też różnego rodzaju inne związki nie będące metabolitami.

Powyższe pytania i wątpliwości w niczym nie umniejszają wysokiej wartości przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej. Doktorantka postawiła w rozprawie oryginalną hipotezę, którą następnie zweryfikowała realizując kolejne cele badawcze, wykonując prawidłowo zaplanowane eksperymenty z wykorzystaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej i chemii, i poddając uzyskane wyniki skrupulatnej analizie statystycznej. Należy podkreślić, że badania opisywane w rozprawie były finansowane z grantu statutowego, którego doktorantka była kierownikiem. Opublikowane prace niewątpliwie stanowią wartościowy wkład w badania nad rolą GM w odpowiedzi organizmu człowieka na zmieniające się warunki środowiska. Wyniki opublikowane w czasopiśmie *Scientific Reports* stanowią dobry punkt wyjścia do opracowania wystandaryzowanych protokołów hodowli mikrobioty jelitowej człowieka. O wartości tej pracy świadczy również i to, że w chwili obecnej jest ona już cytowana około 20 razy, w większości przez zagraniczne zespoły badawcze. Spodziewam się, że praca opublikowana w czasopiśmie *Science of the Total Environment* wzbudzi w środowisku naukowym co najmniej podobne zainteresowanie.

Tym samym stwierdzam, że **rozprawa doktorska mgr Pauliny Średnickiej spełnia wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. poz. 1668 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Wacława Dąbrowskiego – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy.**

Kierownik Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego