

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Waława Dąbrowskiego –
Państwowy Instytut Badawczy

mgr Paulina Średnicka

**Interakcje związków endokrynnie czynnych obecnych w
żywności z mikrobiotą jelitową człowieka**

Interactions of endocrine-disrupting compounds present in food with human
gut microbiota

Praca doktorska
Doctoral thesis

*Zrealizowana w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. Waława Dąbrowskiego – Państwowy Instytucie Badawczym*

Promotor:

dr hab. inż. Marek Roszko, prof. IBPRS-PIB
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego
im. prof. W. Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności

Promotor:

dr hab. Edyta Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego
im. prof. W. Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy
Pracownia Biotechnologii i Inżynierii Molekularnej
Zakład Mikrobiologii

Warszawa, 2024

Warszawa, dn. 30.09.2024

dr hab. inż., prof. IBPRS-PIB
stopień/tytuł naukowy Promotora

Marek Roszko
Imię i nazwisko Promotora

Nauki rolnicze
Technologia żywności i żywienia
Dziedzina / dyscyplina naukowa Promotora

Oświadczenie Promotora o przyjęciu rozprawy doktorskiej Pani/Pana

mgr (mgr/~~inż.~~)¹ Pauliny Średnickiej

pt.: Interakcje związków endokrynnie czynnych obecnych w żywności z mikrobiotą jelitową
człowieka

Dziedzina: nauki rolnicze

Dyscyplina naukowa: technologia żywności i żywienia / ~~rolnictwo i ogrodnictwo~~ / ~~zootechnika~~
i ~~rybactwo~~²

Jako promotor przyjmuję rozprawę doktorską, która spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2023, poz. 742 z późn. zm.) oraz może być skierowana do dalszych etapów związanych z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora.

30.09.2024

Data i podpis Promotora

¹ Niepotrzebne wykreślić

² Pozostawić właściwą dyscyplinę, pozostałe wykreślić

Warszawa, dn. 30.09.2024

dr hab., prof. IBPRS-PIB
stopień/tytuł naukowy Promotora

Edyta Juszcuk-Kubiak
Imię i nazwisko Promotora

Nauki rolnicze
Technologia żywności i żywienia
Dziedzina / dyscyplina naukowa Promotora

Oświadczenie Promotora o przyjęciu rozprawy doktorskiej Pani/Pana

mgr (mgr/~~inż.~~)¹ Pauliny Średnickiej

pt.: Interakcje związków endokrynnie czynnych obecnych w żywności z mikrobiotą jelitową człowieka

Dziedzina: nauki rolnicze

Dyscyplina naukowa: technologia żywności i żywienia / ~~rolnictwo i ogrodnictwo~~ / ~~zootechnika i rybactwo~~²

Jako promotor przyjmuję rozprawę doktorską, która spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. 2023, poz. 742 z późn. zm.) oraz może być skierowana do dalszych etapów związanych z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora.

30.09.2024

Data i podpis Promotora



¹ Niepotrzebne wykreślić

² Pozostawić właściwą dyscyplinę, pozostałe wykreślić

Oświadczenie Autora rozprawy doktorskiej

Świadom(a) odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska przygotowana przeze mnie nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data.....Podpis autora rozprawy doktorskiej

Streszczenie

Interakcje związków endokrynnie czynnych obecnych w żywności z mikrobiotą jelitową człowieka

Zanieczyszczenie żywności jest główną drogą narażenia ludzi na działanie związków endokrynnie czynnych (EDCs), w tym bisfenoli (BPs), których negatywny wpływ na skład i funkcję mikrobioty jelitowej (GM) oraz homeostazę jelita stają się coraz poważniejszym problemem zdrowia publicznego na całym świecie. W ramach niniejszej dysertacji dokonano kompleksowej analizy wpływu bisfenolu A (BPA) i jego analogów, bisfenolu S (BPS), bisfenolu F (BPF) i tetrametylobisfenolu F (TMBPF), na skład taksonomiczny i funkcjonalny ludzkiej GM oraz jej zdolności do eliminacji badanych związków i modyfikacji ich aktywności biologicznej *in vitro*. Próbkę GM poddano działaniu BPs w stężeniu 1 mM przez 48 h w warunkach beztlenowych. W pierwszej kolejności oceniono wpływ BPA, BPS, BPF i TMBPF na taksonomiczne i metaboliczne profile GM, ze szczególnym uwzględnieniem produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFAs). W dalszych etapach badań oceniono zdolność GM do usuwania badanych BPs oraz jej wpływ na aktywność estrogenową BPs. W efekcie końcowym przeanalizowano wpływ metabolitów GM, powstałych w wyniku ekspozycji na BPs, na żywotność komórek nabłonka jelitowego (Caco-2). BPA, BPS i BPF istotnie zaburzały skład taksonomiczny GM oraz produkcję metabolitów, prowadząc do znaczącego obniżenia produkcji SCFAs. TMBPF wywoływał znacznie mniejsze zmiany w porównaniu do pozostałych BPs, co sugeruje, że może być bezpieczniejszą alternatywą do produkcji materiałów przeznaczonych do kontaktu z żywnością (FCMs). Nie stwierdzono biotransformacji BPs przez GM, natomiast zaobserwowano proces bioadsorpcji, którego stopień wzrastał wraz z hydrofobowością związków, w kolejności BPS > BPF > BPA > TMBPF. Obserwowane zmniejszenie aktywności estrogenowej BPs było głównie wynikiem ich bioadsorpcji przez GM. Ekspozycja komórek nabłonka jelitowego na supernatanty, uprzednio poddanych działaniu BPA, BPF i TMBPF, prowadziła do znaczącego spadku żywotności komórek Caco-2. Wyniki te sugerują, że ekspozycja GM na BPs może prowadzić do powstawania szkodliwych metabolitów lub do redukcji korzystnych metabolitów wytwarzanych przez GM pod wpływem badanych związków.

Słowa kluczowe: mikrobiota jelitowa, bisfenole, związki endokrynnie czynne, bezpieczeństwo żywności

Abstract

Interactions of endocrine-disrupting compounds present in food with human gut microbiota

Food contamination is the main route of human exposure to endocrine-disrupting compounds (EDCs), including bisphenols (BPs), whose negative impact on the composition and function of gut microbiota (GM) and intestinal homeostasis is becoming an increasingly serious public health issue worldwide. In this dissertation, a comprehensive analysis was conducted on the impact of bisphenol A (BPA) and its analogs—bisphenol S (BPS), bisphenol F (BPF), and tetramethylbisphenol F (TMBPF)—on the taxonomic and functional composition of human GM, as well as an assessment of the GM's ability to eliminate the studied compounds and modify their biological activity *in vitro*. GM samples were exposed to BPs at a concentration of 1 mM for 48 h under anaerobic conditions. Firstly, the impact of BPA, BPS, BPF, and TMBPF on GM's taxonomic and metabolic profiles was evaluated, with particular emphasis on the production of short-chain fatty acids (SCFAs). In subsequent stages of the study, the ability of GM to remove the studied BPs and its effect on the estrogenic activity of BPs were assessed. Ultimately, the impact of GM metabolites from exposure to BPs on the viability of intestinal epithelial cells (Caco-2) was analyzed. BPA, BPS, and BPF significantly disrupted the taxonomic composition of GM and metabolite production, leading to a significant decrease in SCFA production. TMBPF caused fewer changes than the other BPs, suggesting it may be a safer alternative for producing food contact materials (FCMs). No biotransformation of BPs by GM was observed; however, a process of bioadsorption was noted, the extent of which increased with the hydrophobicity of the compounds in the order BPS > BPF > BPA > TMBPF. The observed decrease in the estrogenic activity of BPs was mainly due to their bioadsorption by GM. Exposure of intestinal epithelial cells to supernatants previously treated with BPA, BPF, and TMBPF led to a significant decrease in the viability of Caco-2 cells. These results suggest that exposure of GM to BPs may lead to the formation of harmful metabolites or the reduction of beneficial metabolites produced by GM under the influence of the studied compounds.

Keywords: gut microbiota, bisphenols, endocrine disrupting compounds, food safety

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	15
WSTĘP	21
1. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA	23
1.1. Związki endokrynnie czynne (EDCs)	23
1.1.1. Mechanizmy działania związków endokrynnie czynnych (EDCs)	24
1.1.2. Związki endokrynnie czynne (EDCs) jako zanieczyszczenia chemiczne żywności	25
1.1.3. Bisfenole (BPs)	27
1.1.4. Regulacje prawne dotyczące stosowania BPs w przemyśle spożywczym 31	
1.2. Mikrobiota Jelitowa (GM)	32
1.2.1. Metabolity mikrobioty jelitowej (GM)	33
1.2.1.1. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFAs)	34
1.2.2. Wpływ związków endokrynnie czynnych (EDCs) na strukturę i aktywność metaboliczną mikrobioty jelitowej (GM)	35
1.2.3. Eliminacja ksenobiotyków przez mikrobiotę jelitową (GM)	37
1.2.3.1. Biotransformacja	38
1.2.3.2. Adsorbpcja	40
1.2.4. Bariera jelitowa	41
1.2.5. Modele <i>in vitro</i> wykorzystywane w badaniach wpływu ksenobiotyków na mikrobiotę jelitową (GM)	42
CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE	47
2. ZAKRES PRACY	49
3. MATERIAŁ BADAWCZY I METODY BADAŃ	51
3.1. Materiał biologiczny	51
3.2. Metody badań	51
3.2.1. Pobieranie próbek kału i przygotowanie inokulum mikrobioty jelitowej 51	
3.2.2. Hodowle <i>in vitro</i> mikrobioty jelitowej	51
3.2.3. Traktowanie PMA	52
3.2.4. Hodowle <i>in vitro</i> mikrobioty jelitowej z bisfenolami	52
3.2.5. Ekstrakcja DNA, przygotowanie biblioteki ampikonów 16S rDNA i sekwencjonowanie MiSeq	53
3.2.6. Analiza bioinformatyczna	53
3.2.7. Oznaczenie profilu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych	54
3.2.8. Ilościowa ocena eliminacji bisfenoli przez mikrobiotę jelitową	55

3.2.9.	Analiza profilu zewnątrzkomórkowych metabolitów mikrobioty jelitowej.....	56
3.2.10.	Test aktywności estrogenowej i androgenowej.....	57
3.2.11.	Ocena cytotoksyczności metabolitów mikrobioty jelitowej po ekspozycji na bisfenole	58
3.2.12.	Analiza Statystyczna	59
4.	MATERIAŁY OPUBLIKOWANE.....	61
4.1.	Wyniki i omówienie badań opublikowanych	61
4.1.1.	Wpływ łączenia próbek kału na społeczność GM.....	61
4.1.2.	Żywotność inokulum GM z próbki zbiorczej od wielu dawców	62
4.1.3.	Wpływ wybranych mediów hodowlanych na GM	62
4.2.	Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej	67
5.	MATERIAŁY NIEOPUBLIKOWANE.....	141
5.1.	Wyniki części nieopublikowanej	141
5.1.1.	Wpływ bisfenoli (BPs) na profil taksonomiczny mikrobioty jelitowej (GM) 141	
5.1.2.	Wpływ ekspozycji na bisfenoli (BPs) na produkcję krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (BPs) przez mikrobiotę jelitową (GM).....	150
5.1.3.	Wpływ ekspozycji bisfenoli (BPs) na profil metaboliczny mikrobioty jelitowej (GM)	154
5.1.4.	Ocena eliminacji bisfenoli (BPs) przez mikrobiotę jelitową (GM)	157
5.1.5.	Wpływ mikrobioty jelitowej (GM) na aktywność endokrynną bisfenoli (BPs) 158	
5.1.6.	Ocena cytotoksyczności supernatantów po hodowli mikrobioty jelitowej (GM) z bisfenolami (BPs).....	159
5.2.	Dyskusja wyników z części nieopublikowanej.....	160
6.	STWIERDZENIA I WNIOSKI	171
7.	SPIS LITERATURY	173
	ANEKS.....	197

WYKAZ SKRÓTÓW

- AhR** – receptor węglowodorów aromatycznych (ang. aryl hydrocarbon receptor)
AR – receptor androgenowy (ang. androgen receptor,)
BADGE – bisfenol A diglicydyloeter (ang. bisphenol A diglycidyl ether)
BCFA – rozgałęzione kwasy tłuszczowe (ang. branched-chain fatty acids,)
BPA – bisfenol A (ang. bisphenol A)
BPF – bisfenol F (ang. bisphenol F)
BPS – bisfenol S (ang. bisphenol S)
CFBM – podstawowe podłoże bez węglowodanów (ang. Carbohydrate Free Basal Medium)
E2 – estradiol
EDCs – związki endokrynnie czynne (ang. endocrine disrupting compounds)
EFSA – Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority,)
ER – receptor estrogenowy (ang. estrogen receptor)
ERR γ – receptor pokrewny receptorom estrogenowym typu γ (ang. estrogen-related receptor γ)
FBS – surowica płodowa bydłęca (ang. fetal bovine serum)
FM – podłoże fermentacyjne (ang. Fermentation Medium)
FCMs – materiały przeznaczone do kontaktu z żywnością (ang. food contact materials)
GI – przewód pokarmowy (ang. gastrointestinal tract)
GLP1 – peptyd 1 podobny do glukagonu (ang. glucagon-like peptide-1)
GM – mikrobiota jelitowa (ang. gut microbiota)
GMM – podłoże dla mikrobioty jelitowej (ang. gut microbiota medium)
GPCR – receptor sprzężony z białkiem G (ang. G protein-coupled receptors)
IBD – choroba zapalna jelit (ang. inflammatory bowel disease)
IND – próbki od indywidualnych dawców
LAB – bakterie kwasu mlekowego (ang. lactic acid bacteria)
LPS – lipopolisacharyd
MIX – inokulum z próbki zbiorczej od wszystkich dawców, traktowane PMA
NMDS – niemetrycznego skalowania wielowymiarowego (ang. non-metric multidimensional scaling)
OD – gęstości optycznej (ang. optical density)
PAHs - wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (ang. polycyclic aromatic hydrocarbons)
PC – poliwęglan (ang. polycarbonate)
PMA – monoazydek propidyny (ang. propidium monoazide)
POPs - trwałe zanieczyszczeniami organiczne (ang. persistent organic pollutant)
SCFAs – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. short chain fatty acids)
SDS – laurylosiarczan sodu (ang. sodium dodecyl sulfate)
SM – bulion Schaedlera
SML – limity migracji (ang. specific migration limit)
SVHC – substancje budzące bardzo duże obawy (ang. substance of very high concern)
TR – receptor hormonów tarczycy (ang. thyroid hormone receptor)
Untreated MIX - inokulum z próbki zbiorczej, nie traktowane PMA
US EPA – Agencja Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (ang. Environmental Protection Agency)
WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

WYKAZ OPUBLIKOWANYCH ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ Z OPISANYM UDZIAŁEM DOKTORANTA

[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.

(IF= 0,311; 20 pkt. MNiSW; liczba cytowań wg bazy Web of Science = 0)

Mój udział w realizacji niniejszej publikacji obejmował opracowanie koncepcji i celu artykułu przeglądowego (z pomocą merytoryczną dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB i dr hab. inż. Marka Roszko, prof. IBPRS-PIB), opracowanie końcowego układu poszczególnych rozdziałów pracy przeglądowej, dobór odpowiednich źródeł literaturowych spośród tych znalezionych przez współautorów artykułu, przygotowanie graficzne wszystkich figur i tabel, a także przygotowanie, redakcja tekstu manuskryptu oraz odpowiedzi na uwagi recenzentów (wraz z merytorycznym wsparciem dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB i dr hab. inż. Marka Roszko, prof. IBPRS-PIB).

[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.

(IF=5,572; 100 pkt. MNiSW; liczba cytowań wg bazy Web of Science = 55)

Mój udział w tworzeniu artykułu przeglądowego obejmował opracowanie koncepcji i celu artykułu przeglądowego (przy wsparciu merytorycznym dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB oraz dr hab. inż. Marka Roszko, prof. IBPRS-PIB), a także koordynację i finalizację struktury poszczególnych rozdziałów. Odpowiadałem za wybór kluczowych źródeł literaturowych, spośród materiałów dostarczonych przez współautorów, a także za opracowanie graficzne wszystkich figur i tabel. Dodatkowo zajmowałem się przygotowaniem tekstu manuskryptu, jego redakcją oraz opracowaniem odpowiedzi na uwagi recenzentów (po konsultacji merytorycznej z dr hab. Edytą Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB oraz dr hab. inż. Marka Roszko, prof. IBPRS-PIB).

[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.

(IF=4,996; 140 pkt. MNiSW; liczba cytowań wg bazy Web of Science = 6)

Mój udział w realizacji niniejszej publikacji obejmował określenie zakresu badań oraz opracowanie metodyki dla poszczególnych etapów badań (przy wsparciu merytorycznym dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB oraz dr hab. inż. Marka Roszko, prof. IBPRS-PIB). Przeprowadziłam szczegółowy przegląd literatury niezbędny do przygotowania wstępu teoretycznego i dyskusji uzyskanych wyników. Odpowiadałam za realizację eksperymentów wspólnie z pozostałymi współautorami, nadzorując również prawidłowe wykonanie części doświadczalnych. Samodzielnie przeanalizowałam dane oraz przygotowałam graficzne opracowanie tabel. Zredagowałam manuskrypt, a także przygotowałam odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Sumaryczny Impact Factor (IF) opublikowanych artykułów wynosi: 10,879.

Sumaryczna liczba punktów wg wykazu czasopism MNiSW opublikowanych artykułów wynosi: 260.

IF oraz liczbę punktów MNiSW obliczono na podstawie danych z roku, w którym ukazała się publikacja lub ostatniego roku, dla którego te dane zostały opublikowane.

Liczba cytowań wg bazy Web of Science została podana na dzień 29 września 2024 roku.

Badania stanowiące przedmiot niniejszej rozprawy zrealizowano w ramach działalności statutowej IBPRS-PIB – temat statutowy nr 142-01-ZM, którego byłam kierownikiem.

Oświadczenia współautorów o ich współudziale w realizacji badań i w przygotowaniu poszczególnych publikacji naukowych stanowiących rozprawę doktorską i przedłożonych do oceny załączono w części dotyczącej materiałów opublikowanych.

WSTĘP

Zanieczyszczenie żywności związkami endokrynnie czynnymi (EDCs), w tym bisfenolami (BPs), stanowi poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności oraz zdrowia publicznego. Bisfenol A (BPA) jest jednym z najczęściej produkowanych chemikaliów na świecie stanowiącym główny składnik poliwęglanów oraz żywic epoksydowych, wykorzystywanych do produkcji materiałów przeznaczonych do kontaktu z żywnością (FCMs). Liczne badania potwierdzają, że narażenie na BPA jest związane z poważnymi problemami zdrowotnymi, takimi jak alergie, astma, choroby sercowo-naczyniowe, otyłość, uszkodzenia nerek czy przedwczesny poród. W odpowiedzi na te zagrożenia, przemysł opracował analogi bisfenolu A (BPA), takie jak bisfenol S (BPS) i bisfenol F (BPF) w celu ograniczenia potencjalnych skutków zdrowotnych wynikających z ekspozycji na BPA. Analogi te są obecnie szeroko stosowane w produkcji tworzyw sztucznych w tym opakowań do żywności wolnych od BPA („BPA free”). Niemniej jednak, badania sugerują, że BPS i BPF, ze względu na swoje strukturalne podobieństwo do wyjściowego związku BPA, mogą również wykazywać potencjał endokrynni. Pomimo wprowadzania ich jako bezpieczniejsze alternatywy, mogą oddziaływać na układ hormonalny, co rodzi obawy dotyczące ich długoterminowego wpływu na zdrowie publiczne. Z tego powodu opracowanie nowych analogów, które nie wykazują aktywności estrogenowej ani innych negatywnych oddziaływań endokrynnych, jest priorytetem dla przemysłu tworzyw sztucznych. Jednym z takich analogów jest TMBPF, który już jest stosowany w produkcji plastikowych opakowań do żywności. Najnowsze badania sugerują jednak, że pomimo braku aktywności estrogenowej, TMBPF może wykazywać aktywność antyestrogenową, antyandrogenową oraz wpływać na inne szlaki metaboliczne, zaburzając regulację metabolizmu i magazynowania tłuszczu w organizmie.

Prowadzone w ostatnich latach badania wskazują, że EDCs migrujące do żywności mogą mieć negatywny wpływ na mikrobiotę jelitową (GM) człowieka. Ekspozycja na EDCs może zaburzać skład taksonomiczny mikrobioty prowadząc do dysbiozy jelitowej i ryzyka rozwoju chorób metabolicznych. Mimo istniejących doniesień naukowych na temat wpływu BPA i jego analogów na mikrobiotę jelitową (GM), nadal brakuje danych dotyczących zdolności GM do metabolizowania tych związków profilu powstających metabolitów oraz zmian ich aktywności biologicznej. Dlatego też, zrozumienie złożonego charakteru tych interakcji jest kluczowe dla oceny ryzyka i opracowania strategii ograniczających negatywny wpływ EDCs na zdrowie konsumentów.

1. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

1.1. Związki endokrynnie czynne (EDCs)

Zanieczyszczenie żywności przez ksenobiotyki wynikające z procesów industrializacji i rosnącego zanieczyszczenia środowiska stanowi kluczowe wyzwanie dla globalnego bezpieczeństwa żywnościowego, co ma znaczące konsekwencje dla zdrowia publicznego i ekonomii. Głównymi źródłami ekspozycji ludzi na ksenobiotyki, w tym zarówno syntetyczne zanieczyszczenia środowiskowe, jak i naturalnie występujące toksyny są zanieczyszczona woda oraz żywność (Seghir i in., 2023). Szczególnie niebezpieczną kategorię ksenobiotyków stanowią związki endokrynnie czynne (ang. endocrine disrupting compounds, EDCs). Należą do nich substancje chemiczne, które poprzez różnorodne molekularne mechanizmy oddziałują na układ endokrynnny ludzi i zwierząt (Yilmaz i in., 2020). Zgodnie z definicją Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO), EDC to związek egzogeny, który wpływa na funkcje układu endokrynnego, wywołując negatywne skutki zdrowotne w zdrowym organizmie, jego potomstwie lub w (sub) populacjach. Z kolei zgodnie z definicją Agencji Ochrony Środowiska Stanów Zjednoczonych (ang. Environmental Protection Agency, US EPA), EDC to substancja egzogenna, która może zakłócać syntezę, wydalanie, wiązanie z receptorami, transport, metabolizm lub usuwanie endogennych hormonów, w efekcie zmieniając homeostazę endokrynologiczną (Peivasteh-roudsari i in., 2023).

Obecnie zidentyfikowano ponad 1000 związków chemicznych wykazujących aktywność hormonalną, w tym leki, pestycydy, substancje stosowane w produkcji tworzyw sztucznych, detergenty oraz metale ciężkie (Stiefel i in., 2023; Yilmaz i in., 2020). Ekspozycja ludzi na EDCs jest szeroko rozpowszechniona, ponieważ substancje te występują w produktach codziennego użytku, kosmetykach, żywności i zabawkach (Kiess i in., 2021; Sangeetha i in., 2021). Aktywność biologiczna EDCs jest zróżnicowana i naśladuje działanie naturalnych hormonów, manifestując się już przy bardzo niskich stężeniach na poziomie nanomoli lub pikomoli. Charakterystyczna dla EDCs jest niemonotoniczna krzywa dawka-odpowieź (ang. Non-Monotonic Dose-Response Curve, NMDRC), co utrudnia ocenę ich wpływu na zdrowie (Kumar i in., 2020). EDCs mogą wykazywać aktywność estrogenową lub androgenową oraz blokować działanie endogennych hormonów poprzez efekty antyestrogenowe lub antyandrogenowe. Badania

in vitro i *in vivo* sugerują, że EDCs mogą wpływać również na inne układy hormonalne, powodując zaburzenia w funkcjonowaniu przysadki mózgowej, tarczycy, trzustki oraz nadnerczy (Egalini i in., 2022). W ostatnich latach pojawiły się również hipotezy, że pewna grupa EDCs, nazywana obesogenami, może zaburzać homeostazę energetyczną, negatywnie wpływać na wydzielanie insuliny, sprzyjać otyłości oraz zwiększać ryzyko wystąpienia cukrzycy typu 2 (Yilmaz i in., 2020).

Chroniczne narażenie ludzi na wiele różnych związków z grupy EDCs powoduje że związki te są wykrywane powszechnie w ludzkich próbkach biologicznych takich jak tkanka tłuszczowa, krew, mocz, mleko matki, płyn owodniowy (Encarnação i in., 2019; Puche-Juarez i in., 2023). Odpowiedź organizmu na działanie EDCs różni się w zależności od genetyki, czynników środowiskowych, stylu życia i diety (Yilmaz i in., 2020). Badania pokazują, że EDCs mogą stanowić największe zagrożenie w kluczowych fazach rozwoju organizmu, takich jak okres prenatalny i wczesny postnatalny, kiedy to formują się organy i układ nerwowy. Rozwijający się płód i noworodki są najbardziej podatne na zakłócenia endokrynne ze względu na programowanie epigenetyczne (Lee, 2018).

Jednoczesne narażenie ludzi na mieszaniny wielu różnych substancji chemicznych może prowadzić do powstania „efektu koktajlu”, wywołując skutki zdrowotne różniące się od działania każdego składnika osobno. Efekt ten może być addytywny, gdy działanie poszczególnych substancji sumuje się, lub synergistyczny, gdy kombinacja substancji prowadzi do efektów silniejszych niż suma oddziaływań każdego z nich z osobna. Ocena wpływu szerokiego spektrum chemikaliów na układ endokrynnny jest skomplikowana, szczególnie gdy dochodzi do narażenia na ich mieszaniny, co może prowadzić do trudnych do przewidzenia zaburzeń hormonalnych (Hamid i in., 2021; Yilmaz i in., 2020).

1.1.1. Mechanizmy działania związków endokrynnie czynnych (EDCs)

Układ hormonalny jest złożonym systemem działający poprzez sieć gruczołów dokrewnych odpowiadających za przepływ informacji między różnymi komórkami i tkankami. System ten jest kontrolowany przez złożone mechanizmy, które odpowiadają za wytwarzanie, wydzielanie, transport, metabolizm, dostarczanie do wnętrza komórek docelowych, oraz ekspresję receptorów hormonów (Gardner i in., 2017). Sygnały hormonalne wpływają na wiele podstawowych funkcji organizmu takich jak metabolizm, trawienie, funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego, a także dojrzewanie i reprodukcja. Układ hormonalny pozwala utrzymać homeostazę organizmu, która integruje

działanie organizmu poprzez serię sprzężeń zwrotnych (Gardner i in., 2017; Peivasteh-Roudsari i in., 2023).

Związki chemiczne są zaliczane do grupy EDCs wtedy, gdy zakłócają prawidłowe funkcjonowanie układu endokrynnego, w tym syntezę, metabolizm oraz działanie hormonów endogennych (Kumar i in., 2020; Yilmaz i in., 2020). Mechanizmy działania EDCs można podzielić na genomowe i niegenomowe. Do mechanizmów genomowych zalicza się bezpośrednie wiązanie się tych związków z receptorami hormonów, gdzie mogą działać jako agoniści, aktywując receptor, lub antagoniści, blokujący jego działanie. EDCs wykazują często niższe powinowactwo niż endogenne hormony, ale ze względu na ich powszechne występowanie w środowisku, konkurują z nimi o wiązanie z receptorem (Marci, 2023). EDCs mogą również wpływać na regulację hormonalną, oddziałując na pozostałe elementy ścieżki sygnalizacji hormonalnej. Dotyczy to zarówno wpływu na biosyntezę hormonów, która może być stymulowana lub hamowana, a także ich degradację. EDCs mogą również konkurować z endogennymi hormonami o wiązanie z białkami transportowymi, wpływać na biosyntezę i degradację tych białek oraz hamować ekspresję receptorów (Egalini i in., 2022; Marci, 2023). Zaburzenia wywoływane przez EDCs poprzez mechanizmy niegenomowe odgrywają istotną rolę podczas rozwoju, zwłaszcza w trzech kluczowych oknach ekspozycji, kiedy epigenom jest najbardziej podatny na zmiany indukowane przez te związki - w czasie dojrzewania gamet, implantacji zarodka oraz różnicowania komórek pluripotencjalnych. Mechanizmy niegenomowe dotyczą modyfikacji epigenetycznych takich jak metylacja DNA i/lub acetylacja DNA, modyfikacja histonów oraz wpływ na niekodujące RNA (Marci, 2023; Peivasteh-Roudsari i in., 2023; Rizzo i in., 2023). Poszczególne EDCs mogą działać poprzez różne mechanizmy, zakłócając różne poziomy działania układu endokrynnego jednocześnie. Ta wielotorowość działania wpływa na złożoność oddziaływań EDCs z organizmem, co może mieć trudne do przewidzenia konsekwencje (Marci, 2023; Rizzo i in., 2023).

1.1.2. Związki endokrynnie czynne (EDCs) jako zanieczyszczenia chemiczne żywności

Żywność stanowi główną drogę ekspozycji ludzi na EDCs (Peivasteh-Roudsari i in., 2023). Substancje te mogą przedostać się do łańcucha żywnościowego różnymi ścieżkami. Mogą zanieczyszczać żywność w wyniku skażenia środowiska, obejmującego zarówno metale ciężkie (kadm, rtęć), metaloidy (arsen) oraz trwałe zanieczyszczenia organiczne (ang. persistent organic pollutant, POPs) (Li i in., 2023). Do POPs zaliczane są dioksyne,

polichlorowane bifenyle, polibromowane środki opóźniające palenie, substancje per- i polifluoroalkilowe oraz pestycydy chloroorganiczne. Związki te są trwałe, ulegają bioakumulacji w organizmach żywych i biomagnifikacji w łańcuchu pokarmowym. Mimo że wiele z nich jest zakazanych lub rygorystycznie regulowanych od wielu lat, ich trwałość w środowisku sprawia, że wciąż można je wykryć w próbkach żywności i ludzkich próbkach biologicznych (Popli i in., 2022). Narażenie na pozostałości EDCs, takie jak dopuszczone do użytku pestycydy, biocydy, dodatki do pasz, farmaceutyki weterynaryjne i środki wspomagające wzrost zwierząt, stanowi ryzyko dla łańcucha żywnościowego. Można jednak ograniczyć to ryzyko poprzez wdrożenie skutecznych programów nadzoru, rygorystycznych procesów zatwierdzania oraz odpowiednie stosowanie tych substancji, co umożliwi utrzymanie niskiego poziomu pozostałości w produktach spożywczych (Stiefel i in., 2023). Zanieczyszczenia chemiczne mogą przedostawać się do żywności z FCMs, takich jak plastyfikatory, pozostałości monomerów plastikowych jak np. bisfenol A (ang. bisphenol A, BPA) czy inne środki przetwórcze. Zarządzanie tym ryzykiem wymaga starannego doboru opakowań, zastępowania szkodliwych substancji bezpiecznymi alternatywami, ograniczenia użycia opakowań oraz wprowadzenia regulacji z rygorystycznymi limitami migracji i pozostałości. Migracja substancji zależy od składu chemicznego materiałów, rodzaju żywności, temperatury, czasu i powierzchni kontaktu (Ong i in., 2022). Badania wykazały, że używanie pojemników z poliwęglanu, ekspozycja na wysoką temperaturę i zmiany pH, przechowywanie w warunkach nasłonecznienia, stosowanie alkalicznych detergentów, twarda woda oraz wielokrotne używanie pojemników mogą zwiększać uwalnianie BPA do żywności (Sadrabad i in., 2023).

W żywności występują również naturalnie związki o aktywności endokrynej, takie jak fitosterole i fitoestrogeny, obecne w różnych produktach roślinnych, które mogą mieć neutralny lub pozytywny wpływ na zdrowie (Wang i in., 2021). Pomimo tego, ich wykorzystanie w suplementach diety lub w żywności funkcjonalnej powinno być podejmowane z ostrożnością, ponieważ istnieją uzasadnione obawy związane z tym, czy korzyści zdrowotne przewyższają potencjalne ryzyko narażenia (Adnan i in., 2022). Należy wziąć pod uwagę możliwość że fitoestrogeny mogą również potencjalnie zaburzać gospodarkę hormonalną (Wang i in., 2021). Dodatkowo do łańcucha pokarmowego mogą dostawać się inne niepożądane naturalne EDCs, takie jak mykotoksyny (na przykład zearalenon) czy endogenne hormony w produktach zwierzęcych. Ich występowanie, zarówno w żywności jak i środowisku, wymaga starannego monitorowania i odpowiednio ustanowionych maksymalnych poziomów dla różnych EDCs (Stiefel i in., 2023).

EDCs mogą powstawać dodatkowo podczas obróbki żywności. Procesy wysokotemperaturowe, takie jak smażenie, grillowanie czy pieczenie, mogą prowadzić do powstawania substancji o działaniu endokrynnym (Stiefel i in., 2023). Przykładem są wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (ang. polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs), które mogą tworzyć się podczas grillowania mięsa (Patel i in., 2020). Innym przykładem są zachodzące podczas obróbki żywności bogatej w białka i węglowodany reakcje Maillarda, które mogą prowadzić do formowania akrylamidu o potencjalnym działaniu endokrynnym (Matoso i in., 2019).

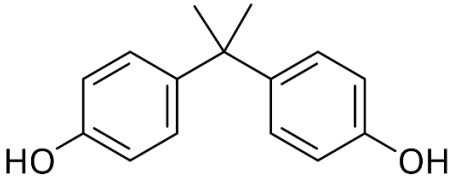
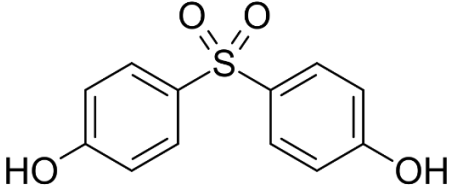
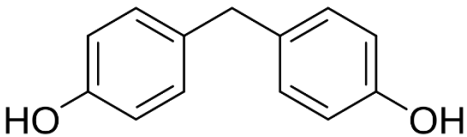
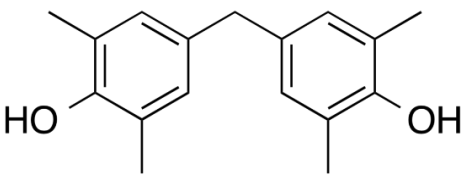
1.1.3. Bisfenole (BPs)

Bisfenole (ang. bisphenols, BPs), zaliczane do EDCs stanowią istotne źródło zanieczyszczeń w żywności ze względu na swoje szerokie zastosowanie w przemyśle tworzyw sztucznych. Bisfenol A (BPA), bisfenol S (BPS) oraz bisfenol F (BPF) są powszechnie stosowane w produkcji plastikowych opakowań i pojemników. Możliwość migracji tych związków do żywności stwarza ryzyko potencjalnej ekspozycji konsumentów na ich szkodliwe działanie (Sadrahad i in., 2023). BPA jest jednym z najczęściej produkowanych chemikaliów na świecie i głównym składnikiem poliwęglanów oraz żywic epoksydowych. BPA wykorzystywany jest w produkcji różnych typów żywic epoksydowych, w tym jako bisfenol A diglicydyloeter (ang. bisphenol A diglycidyl ether, BADGE) – monomer służący do wytwarzania wewnętrznych powłok metalowych puszek na żywność i napoje. BPA stosowany jest również jako stabilizator światła ultrafioletowego, stabilizator ciepła oraz przeciwutleniacz w różnych FCMs, aby zwiększyć ich trwałość (Ong i in., 2022). Zastosowanie BPA w produkcji szerokiej gamy produktów – od pojemników na żywność i butelek na napoje, poprzez papier termiczny, sprzęt medyczny, zabawki, elektronikę, aż po rury wodne – prowadzi do chronicznego narażenia ogólnej populacji (Abbasi i in., 2024). W konsekwencji BPA jest wykrywany w różnych próbkach biologicznych ludzi, w tym w surowicy, moczu, ślinie, włosach, tkankach, paznokciach i krwi (Gálvez-Ontiveros i in., 2023; Gonkowski i in., 2022; Li i in., 2022). Mimo że BPA nie bioakumuluje się w organizmie i ma szacowany czas półtrwania wynoszący około 6 h, to z powodu chronicznego narażenia jest systematycznie wykrywany w ludzkich próbkach biologicznych. Po pobraniu z żywnością, BPA jest wchłaniany przez przewód pokarmowy i transportowany do wątroby, gdzie 90% BPA jest prawie całkowicie metabolizowane przez glukuronidację i w mniejszym stopniu przez sulfatację, co skutkuje powstaniem dwóch pasywnych form BPA: glukuronidowanego BPA i siarczanowanego

BPA, które następnie są wydalane z moczem (Peivasteh-Roudsari i in., 2023; Yilmaz i in., 2020). Europejska Inicjatywa Biomonitoringu Ludzkiego (HBM4EU) wykryła BPA w moczu 92% dorosłych uczestników z 11 krajów europejskich (Govarts i in., 2023).

Struktura chemiczna BPA złożona z dwóch pierścieni benzenowych i dwóch grup funkcyjnych (4,4')-OH, powoduje że cząsteczka ta pasuje do kieszeni wiążących receptorów estrogenowych (ang. estrogen receptor, ER) α i ER β (**Tabela 1**) (vom Saal i in., 2021). BPA ma wyższe powinowactwo do ER β , natomiast w porównaniu do naturalnego hormonu estradiolu (E2) jego powinowactwo jest o 1000–10 000 razy niższe. Wykazano, że BPA może indukować odpowiedź biologiczną która jest równie silna lub silniejsza niż E2; może to wynikać z odpowiedzi za pośrednictwem innych niż klasyczne dróg aktywowanych przez estrogen (Alonso-Magdalena i in., 2012). Oprócz efektów inicjowanych przez wiązanie z ER, BPA może się również wiązać z transbłonowym receptorem zwanym G-protein coupled estrogen receptor 1 (GPER/GPR30) (Marci, 2023). BPA działa również jako antagonistą innego receptora jądrowego — receptora androgenowego (ang. androgen receptor, AR). BPA wiążąc się i tworząc kompleks BPA-AR blokuje wiązanie endogennych androgenów takich jak 5 α -dihydrotestosteronem (ang. 5 α -dihydrotestosterone, DHT) wykazując działanie antyandrogenowe (Peivasteh-Roudsari i in., 2023). Badania wykazały również, że BPA działa jako agonista receptorów hormonów tarczycy (ang. thyroid hormone receptor, TR) w wyniku swojego strukturalnego podobieństwa do TR, szczególnie TR β , zakłócając transkrypcję genów regulowaną przez TR zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* (Peivasteh-roudsari i in., 2023; Zhang i in., 2018). Wykazano również wiązanie BPA do innych receptorów, takich jak receptor pokrewny receptorom estrogenowym typu γ (ang. estrogen-related receptor γ , ERR γ) i receptor węglowodorów aromatycznych (ang. aryl hydrocarbon receptor, AhR) (vom Saal i in., 2021). ERR γ u ludzi ulega ekspresji na wysokim poziomie w tkankach i mózgu płodów, a BPA wiąże się z nim silniej niż E2 (Pathak i in., 2024).

Tabela 1. Budowa i właściwości chemiczne BPs

Nazwa	Masa molowa [g/mol]	Struktura chemiczna	Log P _{o/w}	Log S (ESOL)
BPA	228,29		3,06	-3,74
BPS	250,27		1,88	-2,98
BPF	200,23		2,58	-3,37
TMBPF	256,34		4,03	-4,70

Wartości LogP i LogS zostały obliczone w programie SwissADME

Ekspozycja na BPA została powiązana z problemami zdrowotnymi takimi jak astma (Wu i in., 2021), choroby sercowo-naczyniowe (Moon i in., 2021), otyłość (Wu i in., 2020), uszkodzenia nerek (Moreno-Gómez-Toledano i in., 2021), zwiększonym ryzykiem przedwczesnego porodu (Namat i in., 2021) oraz chorobami alergicznymi w dzieciństwie (Tang i in., 2022).

W odpowiedzi na rosnące obawy dotyczące wpływu BPA na zdrowie, przemysł opracował nowe tworzywa sztuczne niezawierające BPA, mające zastąpić tradycyjne materiały do pakowania i przechowywania żywności. Analogi BPA powstały w wyniku połączenia fenolu z acetonem (BPA), formaldehydem (BPF), heksafluoroacetonem (BPAF) lub trójtlenkiem siarki (BPS) (Thoene i in., 2020). Najczęściej stosowane analogi BPA w przemyśle to BPS i BPF (Reininger i Oehlmann, 2024). BPS ma strukturę chemiczną podobną do BPA, ale czwartorzędowy atom węgla z dwiema grupami metylowymi (-CH₃) w BPA został zastąpiony przez grupę sulfonową (-SO₂-). Dzięki temu BPS charakteryzuje się zwiększoną stabilnością termiczną i mniejszą skłonnością do

uwalniania się w wysokich temperaturach. BPS został wprowadzony jako bezpieczniejsza alternatywa dla BPA i występuje w produktach oznaczonych jako "BPA free", znajdując zastosowanie w tworzywach sztucznych i żywicach, w tym używanych do produkcji butelek na wodę i pojemników na żywność oraz do produkcji papieru termicznego (Qiu i in., 2019). Innym analogiem BPA, jest BPF, który również zawiera dwie grupy fenolowe, ale są one połączone bezpośrednio mostkiem metylenowym (-CH₂-) zamiast grupy metylowej (Usman i in., 2019). BPF jest używany w produkcji żywic epoksydowych wykorzystywanych w lakierach, wykładzinach, klejach, tworzywach sztucznych, rurach wodnych oraz w produkcji powłok do opakowań żywności ze względu na niższą lepkość i lepszą odporność na rozpuszczalniki niż BPA (Usman i Ahmad, 2019).

Ze względu na podobną strukturę chemiczną i właściwości fizyczne, analogi BPA wykazują zbliżoną aktywność biologiczną do wyjściowego związku. Badania wykazały że BPS i BPF mogą zaburzać funkcjonowanie układu endokrynnego podobnie do BPA (Rochester i in., 2015). BPS i BPF wykazują działanie agonistyczne względem ER oraz antagonistyczne względem AR, a także obniżają poziom białka ER α (Park i in., 2020). Ponadto Park i in. (2020) stwierdzili, że mieszanina BPA, BPS i BPF wykazuje aktywność względem ER i anty-AR przy niższych stężeniach niż w przypadku stosowania pojedynczych BPs. Badania wykazały, że ekspozycja na BPS i BPF jest związana z rozwojem otyłości i cukrzycy (Alharbi i in., 2022; Moreno-Gómez-Toledano i in., 2023). Wyniki eksperymentalne sugerują, że BPS może mieć bardziej wyraźne działanie obesogenne niż BPA, potencjalnie z powodu jego działania estrogenowego lub androgenowego, zmian w ekspresji genów związanych z rozwojem komórek tłuszczowych oraz indukcji stresu oksydacyjnego i stanów zapalnych (Alharbi i in., 2022). Dodatkowo stwierdzono, że BPS zakłóca syntezę testosteronu u samców myszy (Wang i in., 2023). Badania na komórkach HepG2 wykazały, że ekspozycja na BPS i BPF prowadzi do stresu oksydacyjnego i uszkodzenia DNA, wykazując toksyczność porównywalną do BPA, w tym znaczną cytotoksyczność, zwiększoną produkcję wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu oraz uszkodzenia DNA (Ozyurt i in., 2023). Analogi BPA wykazały nie tylko silną cytotoksyczność i genotoksyczność ale również zaburzenie poziomu ekspresji genów szlaku naprawy DNA (Kose i in., 2020).

Ludzie są narażeni na niższe stężenia BPS i BPF w porównaniu do BPA. Niemniej jednak, ze względu na dalsze stosowanie BPS i BPF jako zamienników BPA, istnieje możliwość, że ich stężenia w środowisku mogą w przyszłości przewyższyć poziomy BPA (Park i in., 2020). W ramach inicjatywy HBM4EU, substytuty BPS i BPF zostały wykryte

w moczu odpowiednio u 67% i 62% dorosłych uczestników z 10 różnych krajów europejskich (Vorkamp i in., 2023).

Opracowanie analogu BPA, który nie wykazuje aktywności estrogenowej, było celem poszukiwań prowadzonych przez firmę Sherwin-Williams. Stosując strategię „Safety by Design” (Bezpieczeństwo przez Projektowanie), firma zidentyfikowała tetrametylobisfenol F (TMBPF) jako potencjalny zamiennik BPA. TMBPF został wybrany po przeprowadzeniu analizy strukturalnej metodami obliczeniowymi, mającej na celu znalezienie kandydatów, którzy mogą zachować podobne właściwości polimerów - takie jak trwałość i integralność strukturalna - jednocześnie nie wykazując aktywności estrogenowej w badaniach *in vitro* i *in vivo* (Soto i in., 2017; Maffini i in., 2020). Monomer jest wykorzystywany do produkcji powłok valPure V70 stosowanych głównie w opakowaniach do żywności i napojów (Mallen i in., 2023). Niemniej jednak, badania Szafran i in. (2017) wykazały, że TMBPF wykazuje zarówno działanie antyestrogenowe, jak i silne działanie antyandrogenowe w liniach komórkowych HeLa i komórkach raka prostaty. Dodatkowo, badania *in vitro* przeprowadzone przez Singha i in. (2024) sugerują, że TMBPF może być związkami obesogennym indukując adipogenezę poprzez zwiększenie akumulacji lipidów i poziomu ekspresji markerów adipogennych w większym stopniu niż BPA.

1.1.4. Regulacje prawne dotyczące stosowania BPs w przemyśle spożywczym

W Unii Europejskiej podstawowym aktem prawnym regulującym materiały i wyroby, w tym FCMs, jest Rozporządzenie Komisji UE nr 1935/2004 (EC 2004). Natomiast Rozporządzenie Komisji UE nr 2023/2006 zawiera wytyczne dotyczące dobrych praktyk produkcyjnych. Odpowiednie regulacje dotyczące tworzyw sztucznych oraz substancji przeznaczonych do kontaktu z żywnością są zawarte w Rozporządzeniu Komisji UE nr 10/2011 (EU 2011). W ramach tego rozporządzenia stworzono listę zatwierdzonych substancji, które mogą być wykorzystywane w produkcji plastikowych FCMs, z przypisanymi limitami migracji (ang. specific migration limit, SML). W 2012 roku Japonia, Kanada i Unia Europejska zakazały stosowania BPA w niektórych produktach konsumenckich. Rozporządzenia Komisji UE nr 2018/213, znacznie obniżyło dopuszczalny poziom BPA w żywności z 0,6 do 0,05 mg/kg. Przepisy zakazują również używania BPA w produkcji kubków i butelek z PC przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci (EU 2018). Natomiast stosowanie BADGE w FCMs jest dozwolone na mocy Rozporządzenia Komisji UE nr 1895/2005, które ustala limit migracji dla BADGE i jego

hydrolizowanych pochodnych na poziomie 9 mg/kg w żywności i symulantach żywności oraz 9 mg/6 dm² dla pojemników poniżej 500 ml lub powyżej 10 litrów, a także dla folii i arkuszy (EC 2005). BPS jest dozwolony do użycia w materiałach mających kontakt z żywnością na mocy Rozporządzenia Komisji UE nr 10/2011 z określonym limitem migracji substancji wynoszącym 0,05 mg na kg żywności (FitzGerald i in., 2020). W kwietniu 2023 roku Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. European Food Safety Authority, EFSA) opublikował ponowną ocenę bezpieczeństwa BPA w FCMs, obniżając dopuszczalne dzienne spożycie (ang. tolerable daily intake, TDI) z 4 µg/kg masy ciała/dobę, które było ustalone w 2015 roku, do 0,2 ng/kg masy ciała/dobę. Jednak szacunki ekspozycji dietetycznej pokazują, że konsumenci we wszystkich grupach wiekowych przekraczają nowe TDI (Lambré i in., 2023). Ponadto, BPA i BPS są wpisane na listę substancji budzących bardzo duże obawy (ang. Substance of very high concern, SVHC) w ramach Kandydackiej Listy zgodnie z Rozporządzeniem nr 1907/2006 Parlamentu Europejskiego (ECHA, 2024). W odpowiedzi na te obawy Komisja Europejska wydała w lutym 2024 roku projekt regulacji zakazującej stosowania BPA i innych BPs w FCMs, który został otwarty do konsultacji publicznych (Komisja Europejska, 2024; Ong i in., 2022).

1.2. Mikrobiota Jelitowa (GM)

BPs oraz inne EDCs, przedostające się do organizmu poprzez spożycie zanieczyszczonej żywności, mogą wywierać istotny wpływ na mikrobiotę jelitową (ang. gut microbiota, GM) (Calero-Medina i in., 2023). GM to społeczność drobnoustrojów zasiedlających przewód pokarmowy (ang. Gastrointestinal tract, GI), która poprzez stałą dwukierunkową komunikację z gospodarzem odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu. Ten dynamiczny ekosystem tworzą organizmy należące do wszystkich trzech domen życia: Bacteria (bakterie), Archaea (archeony) i Eukarya (eukarionty, takie jak grzyby) (Donaldson i in., 2016). Ponadto w ekosystemie tym obecne są także wirusy, w tym bakteriofagi i wirusy eukariotyczne, które, mimo że nie są organizmami żywymi, współistnieją z innymi mikroorganizmami oraz wchodzi w interakcje zarówno z nimi, jak i z gospodarzem (Matijašić i in., 2020). GM jest zdominowana przez bakterie, których stosunek liczby do ludzkich komórek wynosi około 1:1 (Sender i in., 2016). Ze względu na wzajemnie korzystną relację GM z gospodarzem, związek ten bywa nazywany „superorganizmem” (Salvucci, 2019). GM człowieka składa

się głównie z bakterii należących do typów Firmicutes, Bacteroides, Actinomycetes, Fusobacteria i Verrucomicrobia, przy czym Firmicutes i Bacteroides (Hou i in., 2022).

Zdrowa GM nie została zdefiniowana na poziomie taksonomicznym, a jej skład jest unikalny dla każdego człowieka (Rinninella i in., 2019). Zazwyczaj charakteryzuje się wysoką różnorodnością taksonomiczną, bogactwem genów mikrobiologicznych oraz stabilnym rdzeniem mikrobioty, wykazując stabilność, oporność i symbiotyczne interakcje z gospodarzem. Należy jednak podkreślić, że GM jest dynamicznym ekosystemem, w którym skład mikroorganizmów może zmieniać się nawet u tej samej osoby (Fan i in., 2021). Czynniki wpływające na skład GM to między innymi wiek, stan zdrowia, czynniki środowiskowe, dieta, stosowanie leków, w tym antybiotyków, suplementacja probiotykami, oraz prowadzony styl życia (Hasan i in., 2019).

GM pełni szereg kluczowych funkcji, takich jak pozyskiwanie energii i składników odżywczych z pożywienia, dzięki bogatemu zestawowi genów metabolicznych, które umożliwiają produkcję unikalnych enzymów i szlaków biochemicznych. Odgrywa także istotną rolę w biosyntezie bioaktywnych cząsteczek, takich jak witaminy, aminokwasy i lipidy (Rinninella i in., 2019). W kontekście układu odpornościowego, GM nie tylko chroni gospodarza przed patogenami poprzez produkcję substancji przeciwdrobnoustrojowych, ale odgrywa kluczową rolę w rozwoju układu immunologicznego (Hou i in., 2022). Co więcej, poprzez dwukierunkowy system komunikacji jakim jest oś jelito-mózg, GM integruje sygnały nerwowe, hormonalne i immunologiczne między jelitami a mózgiem (Carabotti i in., 2015; Marano i in., 2023).

1.2.1. Metabolity mikrobioty jelitowej (GM)

Profil metabolitów GM jest bezpośrednio związany z jej składem taksonomicznym, a wytwarzane przez nią metabolity wywierają zarówno bezpośredni, jak i pośredni wpływ na funkcje organizmu gospodarza (Feng i in., 2022). GM produkuje metabolity o szerokim spektrum bioaktywności do których zaliczane są zarówno metabolity wytwarzane przez GM bezpośrednio z pożywienia, takie jak krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (ang. short chain fatty acids, SCFAs) i pochodne indolu, metabolity produkowane przez organizm gospodarza i modyfikowane przez GM, takie jak wtórne kwasy żółciowe, oraz metabolity wytwarzane *de novo*, takie jak polisacharyd A (Liu i in., 2022a). Metabolity GM mogą działać miejscowo na nabłonek jelitowy, komórki odpornościowe oraz drobnoustroje zasiedlające jelita (Ghosh i in., 2021). Ponadto, metabolity te mogą być wchłaniane i transportowane do innych narządów i tkanek, gdzie pełnią różnorodne funkcje, a niektóre

z metabolitów mogą również uczestniczyć w krążeniu jelitowo-wątrobowym (Feng i in., 2022; Liu i in., 2022).

Powstające metabolity wpływają na skład i funkcje GM, oddziałując na wirulencję, oporność na antybiotyki, tworzenie biofilmu, ruchliwość oraz sporulację bakterii. Dodatkowo mogą hamować rozwój niektórych gatunków bakterii (Liu i in., 2022). Pełnią również istotne funkcje odżywcze, wspierając wchłanianie składników odżywczych i syntezę witamin, zwłaszcza z grupy B i witaminy K (Rowland i in., 2018). Metabolity te biorą także udział w modulacji metabolizmu gospodarza, wpływają na metabolizm lipidów, białek i glukozy, wspierając termogenezę, odczucie sytości, funkcje motoryczne narządów oraz wrażliwość na insulinę (Liu i in., 2022). Ponadto, wzmacniają barierę jelitową stymulując wydzielanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz białek połączeń ścisłych (S. Ghosh i in., 2021). Na poziomie osi jelito-mózg, neuroaktywne metabolity bakteryjne wpływają na funkcjonowanie układu nerwowego, w tym na uczenie się, pamięć i zachowanie. Ponadto, poprzez stymulację komórek enteroendokrynych nabłonka jelita stymulują syntezę neuropeptydów i neuroprzekaźników gospodarza (Bastings i in., 2023; Carabotti i in., 2015).

1.2.1.1. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFAs)

SCFAs należą do najważniejszej grupy metabolitów produkowanych przez GM, pełniąc kluczową rolę w interakcjach z organizmem gospodarza (Ma i in., 2022). Powstają one jako produkt uboczny fermentacji mikrobiologicznej polisacharydów złożonych, które nie są trawione lub są tylko częściowo trawione w jelicie cienkim człowieka (Fusco i in., 2023). Pod względem struktury, do najważniejszych SCFAs produkowanych przez GM należą kwas octowy, propionowy, masłowy oraz walerianowy.

W organizmie gospodarza SCFAs są podstawowym źródłem energii dla komórek nabłonka jelita grubego i krętego. SCFAs są szybko wchłaniane przez nabłonek jelitowy i metabolizowane w wątrobie, znacząco przyczyniając się do zaspokajania zapotrzebowania energetycznego u ludzi i zwierząt. Dodatkowo, stanowią one substraty do syntezy cukrów i lipidów, co ma potencjalnie wpływ na utrzymanie równowagi energetycznej i regulację metabolizmu (Birkeland i in., 2023). SCFAs wspierają również barierę jelitową i mechanizmy obronne organizmu poprzez wpływ na ekspresję genów połączeń ścisłych w jelitach, co sprzyja wzmocnieniu desmosomów i połączeń szczelinowych (Ma i in., 2022). SCFAs mają także istotny wpływ na funkcjonowanie komórek układu odporności wrodzonej, takich jak makrofagi, neutrofile i komórki dendrytyczne, odgrywając ważną

rolę w odpowiedzi immunologicznej. Ponadto SCFAs mogą regulować różnicowanie komórek T i B, wpływając na adaptacyjną odpowiedź immunologiczną (Yao i in., 2022). Interakcje SCFAs z receptorami sprzężonymi z białkami G (ang. G protein-coupled receptors, GPCR) na komórkach enteroendokrynych, trzustkowych oraz adipocytach odgrywają kluczową rolę w regulacji metabolizmu organizmu. Na przykład maślan i propionian w komórkach enteroendokrynych jelit stymulują wydzielanie peptydu 1 podobnego do glukagonu (ang. Glucagon-like peptide-1, GLP-1) oraz hormonu PYY, regulującego apetyt. Jedną z funkcji GLP-1 i PYY jest zwiększanie wrażliwości na insulinę, a także spowalnianie opróżniania żołądka i motoryki jelit (Han i in., 2021). Ponadto SCFAs mogą przenikać do krwiobiegu z jelit, wpływając na metabolizm i funkcje tkanek obwodowych oraz przekraczać barierę krew-mózg. W ośrodkowym układzie nerwowym regulują procesy neurozapalne, wpływają na aktywność komórek glejowych, wspomagają neurogenezę, biosyntezę serotoniny oraz poprawiają funkcjonowanie neuronów. (Silva i in., 2020).

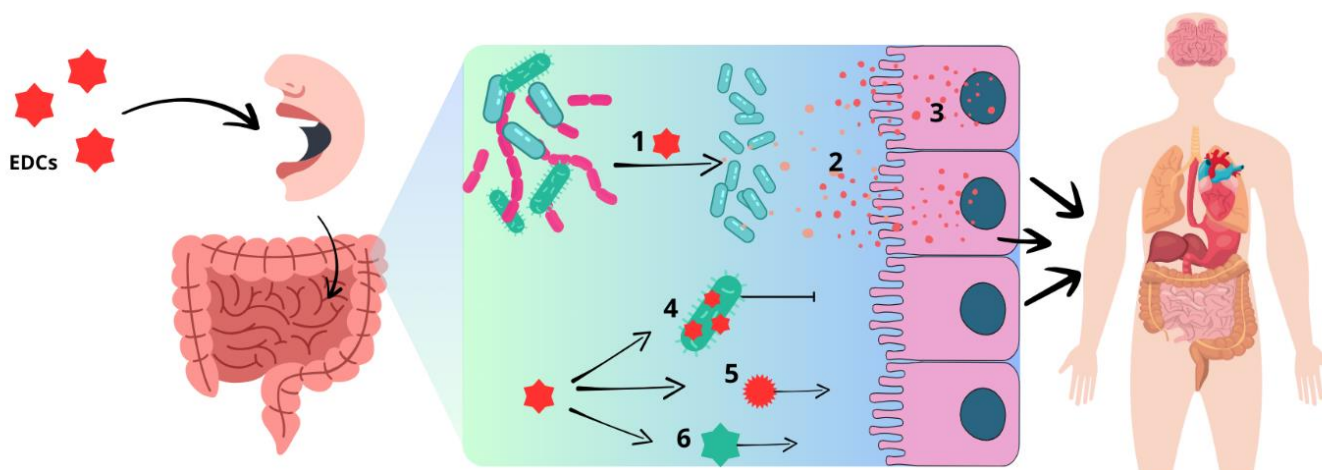
1.2.2. Wpływ związków endokrynnie czynnych (EDCs) na strukturę i aktywność metaboliczną mikrobioty jelitowej (GM)

Ekspozycja na ksenobiotyki, takie jak EDCs, może znacząco modyfikować skład GM oraz jej aktywność metaboliczną (Dikeocha i in., 2022). Ksenobiotyki, które dostają się do organizmu drogą pokarmową wchodzi w interakcje z GM w jelicie cienkim i okrężnicy, a następnie są wchłaniane w jelitach i transportowane do wątroby przez żyłę wrotną, gdzie ulegają procesom detoksyfikacji. W dalszych etapach mogą być wydalane z moczem lub, w postaci związków związanych z żółcią, ponownie trafić do jelit, gdzie ich obecność może ponownie wpływać na GM (Giambò i in., 2022). Mechanizm detoksyfikacji ksenobiotyków przez organizm gospodarza został szczegółowo omówiony w **publikacji [P2]**.

Ksenobiotyki, w tym EDCs mogą bezpośrednio wpływać na strukturę taksonomiczną GM, powodując zmiany w bioróżnorodności i liczebności poszczególnych gatunków bakterii (Collins i in., 2020) (**Rysunek 1**). W konsekwencji ksenobiotyki mogą pośrednio oddziaływać na produkcję kluczowych metabolitów przez GM, które następnie wchodzi w bezpośrednie interakcje z organizmem gospodarza (Jin i in., 2023). Zaburzenia wytwarzania kluczowych metabolitów sygnałowych, takich jak SCFAs które są niezbędne dla utrzymania integralności bariery jelitowej i regulacji odpowiedzi immunologicznej mogą powodować osłabienie bariery jelitowej, indukcję stanu zapalnego a w konsekwencji

zwiększenie ryzyka chorób metabolicznych (Clarke i in., 2019; Matsuzaki i in., 2023). Dodatkowo zaburzenia w produkcji metabolitów takich jak tryptofan i jego pochodne mogą wpływać na oś jelito-mózg, co może mieć potencjalne konsekwencje dla zdrowia psychicznego (Matsuzaki i in., 2023). W ten sposób ksenobiotyki poprzez modyfikację aktywności metabolicznej mikrobioty, mogą potencjalnie oddziaływać na szeroki zakres funkcji fizjologicznych gospodarza (Jin i in., 2023). Podczas analizy zmian wywołanych ekspozycją na ksenobiotyki należy pamiętać, że GM jest złożonym i dynamicznym systemem, w którym rola poszczególnych taksonów w utrzymaniu homeostazy nie jest w pełni poznana. Co więcej, ze względu na funkcjonalną redundancję, różne gatunki bakterii mogą pełnić podobne funkcje, co oznacza, że zmiany w składzie GM nie zawsze prowadzą do przewidywanych zmian w jej funkcjonowaniu (Chi i in., 2021). Wpływ wybranych EDCs na GM omówiono w **publikacji [P1]**.

Powszechna ekspozycja na EDCs z grupy BPs uzasadnia potrzebę badań nad ich wpływem na GM, ponieważ zmiany taksonomiczne i funkcjonalne mikrobioty mogą prowadzić do zaburzeń zdrowotnych gospodarza (Lopez-Moreno i in., 2024). Badania *in vivo* na różnych gatunkach, takich jak ryby z rodzaju *Danio*, myszy, szczury, króliki pokazały, że ekspozycja na BPA może znacząco zwiększać liczebność *Bacteroides*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* i *Akkermansia* spp. (Joshi i in., 2023). Na przykład, długotrwała ekspozycja na BPS u myszy indukowała dysbiozę jelitową prowadząc do otyłości (Chi i in., 2024). Z kolei u *Danio* ekspozycja na BPF była skorelowana z obniżeniem różnorodności i liczebności GM (Gu i in., 2022), a jednoczesna ekspozycja na BPF i BPS prowadziła do wzrostu liczebności potencjalnie patogennych bakterii, takich jak *Flavobacterium*, *Pseudomonas* i *Stenotrophomonas* (Wang i in., 2021). U myszy, narażenie na BPA i BPF prowadziło do zmiany profilu taksonomicznego GM w kierunku wzrostu relatywnej obfitości *Ruminococcaceae* UCG-010 i *Oscillibacter* oraz spadku *Prevotella* 9 i *Streptococcus* (Meng i in., 2024).



Rysunek 1. Wielkokierunkowe interakcje między GM a EDCs.

(1) Wpływ EDCs na profil taksonomiczny i bioróżnorodność GM. (2) Wpływ EDCs na metabolity sygnałowe produkowane przez GM: takie jak SCFA, pochodne tryptofanu, wtórne kwasy żółciowe. (3) Wpływ metabolitów GM na komórki jelita: metabolity GM modulują integralność bariery jelitowej oraz stymulują wydzielanie hormonów przez komórki enteroendokryne, co ma istotny wpływ na regulację apetytu i poczucia sytości oraz homeostazy energetycznej. Metabolity poza bezpośrednim oddziaływaniem na komórki jelita, mogą przedostawać się do krwiobiegu, wpływając na odległe narządy i tkanki. (4) EDCs mogą ulegać fizycznej adsorpcji na powierzchni komórek bakteryjnych GM, co potencjalnie ogranicza ich biodostępność dla gospodarza. (5) Bakterie jelitowe mogą aktywnie metabolizować EDCs, prowadząc do powstania produktów biotransformacji, które mogą wykazywać bardziej niekorzystne działanie niż związki macierzyste, w tym potencjał endokryny, cytotoksyczność oraz genotoksyczność. (6) GM może biotransformować EDCs do pochodnych o zredukowanej lub braku aktywności biologicznej, co prowadzi do ich inaktywacji. W ten sposób potencjalnie szkodliwe związki mogą zostać zneutralizowane przed wchłonięciem do krwiobiegu. Rysunek przygotowany w programie Canva.

1.2.3. Eliminacja ksenobiotyków przez mikrobiotę jelitową (GM)

Mikroorganizmy wchodzące w skład GM mogą bezpośrednio oddziaływać z ksenobiotykami, takimi jak zanieczyszczenia środowiskowe, leki czy dodatki do żywności. Te interakcje mogą wpływać zarówno na metabolizm i usuwanie ksenobiotyków z organizmu, jak i na aktywność biologiczną samych związków (Clarke i in., 2019). GM może metabolizować ksenobiotyki za pomocą szerokiego spektrum enzymów, przekształcając je w mniej toksyczne metabolity co sprzyja ich eliminacji z organizmu. W niektórych przypadkach jednak, metabolizm ten może prowadzić do powstania metabolitów bardziej szkodliwych niż związek wyjściowy (Collins i in., 2020). Poza aktywnym metabolizmem, GM może również pasywnie inaktywować ksenobiotyki poprzez ich adsorpcję na powierzchni ścian komórkowych bakterii (Clarke i in., 2019). Ten proces ogranicza dostępność ksenobiotyków do dalszej absorpcji przez nabłonek jelitowy,

zmniejszając ich biodostępność i potencjalnie redukując ich szkodliwe działanie (Abdelsalam i in., 2020; Selwyn i in., 2016).

1.2.3.1. Biotransformacja

GM posiada zdolność do bezpośredniego metabolizowania substancji chemicznych, które podlegają działaniu różnorodnych enzymów bakteryjnych, takich jak beta-glukozydazy, beta-glukuronidazy, sulfatazy, azoreduktazy, nitroreduktazy i transferazy (Clarke i in., 2019). Związki, które uległy inaktywacji w wątrobie mogą wyniku biotransformacji przez GM podlegać inaktywacji, aktywacji, lub reaktywacji. W przypadku ksenobiotyków, inaktywacja przez GM może skutecznie neutralizować zagrożenie związane z ich ekspozycją (Giambò i in., 2022). Z drugiej strony, biotransformacja przez GM może prowadzić do powstania pochodnych o zwiększonej genotoksyczności lub potencjale endokrynnym (Collins i in., 2020; Niderkorn i in., 2007). Mechanizm biotransformacji ksenobiotyków przez bakterie został szczegółowo opisany w publikacjach [P1] i [P2].

Liczne badania wskazują na możliwość biodegradacji BPs przez niektóre bakterie z gatunków *Pseudomonas*, *Sphingomonas* i *Bacillus* (De i in., 2022; López-Moreno i in., 2021; Sasaki i in., 2005). Potencjał do degradacji BPs przez *Sphingomonas* został opisany dla sześciu analogów BPA, w tym BPS, BPF, BPB, BPE, BPZ i BPC. Do degradacji tych związków zdolne były również bakterie z rodzaju podobnie jak *Cupriavidus*. Wykazano także, że bakterie z rodzaju *Sphingobium* mogą degradować BPA, BPS, BPF, BPB, BPE i BPP. W przypadku bakterii z rodzaju *Pseudomonas* potencjał degradacyjny został opisany dla BPA, BPS, BPF i BPB. Rodzaj *Bacillus*, degradujący pięć analogów (BPA, BPF, BPE, BPZ i BPC), jest szczególnie istotny ze względu na obecność tych bakterii w składzie GM (De i in., 2022). Ponadto bakterie z rodzajów *Sphingomonas* i *Bacillus*, były zdolne do wykorzystania BPA jako jedyne źródła węgla i metabolizowania go do CO₂, H₂O (López-Moreno i in., 2021; Sasaki i in., 2005). Biodegradacja BPA zachodzi dzięki współdziałowi i koordynacji wielu genów kodujących białka. López-Moreno i in. (2021) wyizolowali szczep *Bacillus* sp. AM1 z GM człowieka, posiadającego geny kodujące enzymy dla czterech referencyjnych szlaków degradacji BPA. W badaniach nad metabolizmem BPA przez bakterie podkreślono również kluczową rolę cytochromu P450 w tych procesach (López-Moreno i in., 2021). Większość bakteryjnych monooksygenaz cytochromu P450 należy do klasy I, które wymagają obecności reduktazy zawierającej flawinoadeninodynukleotyd (reduktaza ferredoksyny) zależnej od NADH oraz

ferredoksyny, białka z grupą żelazowo-siarkową. Układy te mogą katalizować reakcje hydroksylacji, epoksydacji, sulfoksydacji lub dealkilacji różnych ksenobiotyków (Sasaki i in., 2005). Beztlenowe Eubacterie a także Archeony często nie posiadają genów kodujących P450, jednak niektóre bakterie, takie jak promieniowce (Actinomycetes), mają ich wiele (Kelly i in., 2013). W badaniach przeprowadzonych przez Das i in. (2019) wykazano, że monooksygenaza cytochromu P450 uczestniczy w hydroksylacji BPA przez *Bacillus* sp. GZB, który degradował 100% BPA w ciągu 96 h przy stężeniu 10 mg/L zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Stwierdzono również, że *Bacillus* produkuje inne enzymy, w tym lakazę, która uczestniczy w biotransformacji BPA do mniej złożonych cząsteczek (Das i in., 2019). Lakaza odpowiada za katalizowanie reakcji utleniania związków aromatycznych, w tym fenolu i innych opornych związków (De i in., 2022). Na przykład, lakaza wyizolowana z grzyba z gatunku *Myrothecium roridum* degradowała 80% BPA w ciągu 96 h (Jasińska i in., 2021). Ponadto zdolność do biodegradacji BPA wykazano dla szczepów bakterii wyizolowanych z GI człowieka, takie jak *Lactocaseibacillus rhamnosus* (Ju i in., 2019), *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Lactiplantibacillus plantarum* oraz *Enterococcus faecalis* (Kyrila i in., 2021). W wyniku mikrobiologicznej degradacji BPA powstają metabolity, takich jak hydrochinon, 4-hydroksyacetyfenon, kwas 4-hydroksybenzoesowy oraz 4-izopropenylofenol (Kyrila i in., 2021).

Należy podkreślić, że potencjał biodegradacji BPA przez dany szczep bakteryjny nie jest jednoznaczny ze jego zdolnością do degradacji analogów tego związku (De i in., 2022). Na przykład, BPS jest znacznie mniej wrażliwy na biodegradację niż BPA, ze względu na unikalne wiązania podwójne grupy O=S=O (Fang i in., 2020; Zdarta i in., 2018). Badania nad biodegradacją BPs przez drobnoustroje obecne w wodzie morskiej wykazały, że biodegradowalność BPs można uporządkować w następującej kolejności BPF > BPA > BPS. BPF ulega rozkładowi szybciej niż BPA w środowisku morskim, podczas gdy BPS wykazuje większą tendencję do akumulacji w wodzie. Różnice w tempie degradacji BPA i BPF mogą wynikać z ich struktury chemicznej. W przypadku BPF, atomy wodoru związane z węglem czwartorzędowym są bardziej podatne na działanie drobnoustrojów niż grupy metylowe przyłączone do centralnego atomu węgla w BPA (Danzl i in., 2009).

1.2.3.2. Adsorbpcja

Wiele gatunków bakterii ma zdolność do wiązania ksenobiotyków poprzez fizyczną adsorbpcję do ściany komórkowej. Adsorbpcja jest metabolicznie pasywnym procesem, a substancje chemiczne mogą oddziaływać zarówno z żywymi, jak i martwymi komórkami drobnoustrojów (Feng i in., 2018; Zoghi i in., 2014a). Na efektywność adsorbpcji wpływają m.in. powierzchnia biosorbentu, struktura chemiczna ksenobiotyku i jego hydrofobowość, pH, temperatura oraz czas inkubacji (Solouki i in., 2018; Tripathi i in., 2023). Wiele badań wykazuje, że bakterie kwasu mlekowego (ang. lactic acid bacteria, LAB) mogą wiązać BPA z różną wydajnością i w różnym tempie (Endo i in., 2007; Lee i in., 2023; Solouki i in., 2018; Zhu i in., 2017). Struktura ściany komórkowej bakterii jest kluczowym czynnikiem determinującym zdolność wiązania (Solouki i in., 2018). Bakterie Gram-dodatnie, szczególnie *Bacillus spp.* i LAB, charakteryzują się wysoką zdolnością adsorbpcji dzięki specyficznej budowie ściany komórkowej, złożonej głównie z peptydoglikanu, a także niewielkich ilości kwasów tejchojowych i lipotejchojowych, polisacharydów i egzopolisacharydów (Solouki i in., 2018; Zoghi i in., 2014). Z kolei ściana komórkowa Gram-ujemnych bakterii zawiera jedynie 10-20% peptydoglikanu, co ogranicza ich zdolności adsorbpcyjne. Ponadto, Gram-ujemne bakterie posiadają zewnętrzną błonę złożoną z fosfolipidów i lipopolisacharydów (LPS) (Vijayaraghavan i in., 2008).

W przypadku ludzkiej GM dominują Gram-dodatnie Firmicutes oraz Gram-ujemne Bacteroidetes. Obecne są także inne, mniej licznie reprezentowane grupy, takie jak Gram-ujemne Proteobacteria, Gram-dodatnie Actinobacteria oraz Gram-ujemne Verrucomicrobia (Sarkar i in., 2021). Endo i in. (2007) wykazali, wyższy potencjał lactococci skutecznie adsorbują hydrofobowe analogi BPA, ale nie hydrofilowe, co sugeruje, że hydrofobowość jest kluczowym czynnikiem w adsorbpcji BPA. Ekspozycja na laurylosiarczan sodu (ang. Sodium dodecyl sulfate, SDS) zwiększyła adsorbpcję BPA przez odsłonięcie miejsc hydrofobowych, podczas gdy trypsyna zmniejszyła ją poprzez hydrolizę tych białek, co wskazuje, że efekt wiązania hydrofobowego białek powierzchniowych jest istotny (Endo i in., 2007). Hydrofobowa ściana komórkowa bakterii, zawierająca hydrofobowe lipidy, zwiększa hydrofobowość powierzchni, co z kolei pozwala na silniejsze wiązanie związków hydrofobowych, takich jak BPA (Bovo i in., 2013; López-Ramón i in., 2019). Bioadsorbpcję ksenobiotyków przez wybrane gatunki bakterii szczegółowo omówiono w **publikacji [P2]**.

1.2.4. Bariera jelitowa

Bariera jelitowa pełni kluczową rolę w selektywnym wchłanianiu składników odżywczych oraz ochronie organizmu przed drobnoustrojami, antygenami pokarmowymi, toksynami obecnymi w przewodzie pokarmowym (Ghosh i in., 2021). Składa się ona z kilku warstw, które tworzą bariery mikrobiologiczną, chemiczną, fizyczną i immunologiczną. Zewnętrzna warstwa obejmuje śluz, GM i białka obronne; warstwa środkowa to komórki nabłonka jelitowego; natomiast wewnętrzna warstwa zawiera komórki odpornościowe zarówno wrodzonej, jak i adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej (Tommaso i in., 2021).

Funkcjonowanie bariery jelitowej jest w dużym stopniu zależne od metabolitów produkowanych przez GM. SCFAs mogą wzmacniać barierę chemiczną, stymulując wydzielanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych, sIgA oraz mucyn, co zapobiega przedostawaniu się patogennych bakterii (Liu i in., 2022; Tommaso i in., 2021). SCFAs, kwasy żółciowe i pochodne indolu wzmacniają barierę fizyczną, zwiększając ekspresję białek połączeń ścisłych, takich jak kładyny, okludyna-1 i okludyna (Liu i in., 2022). SCFA i pochodne indolu mogą przenikać przez nabłonek jelitowy i wpływać na komórki układu odpornościowego, indukując sekrecję przeciwzapalnych cytokin, takich jak IL-10 i IL-22 (Di Tommaso i in., 2021). Zaburzenia połączeń ścisłych mogą osłabiać barierę fizyczną, umożliwiając przemieszczanie się LPS i bakterii, prowadząc do aktywacji komórek układu odpornościowego i sekrecji cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β , IL-6, IL-22 i TNF- α . Prowadzi to do zaburzenia integralności bariery jelitowej (Ghosh i in., 2020) oraz wzrostu produkcji tych cytokin, powodując ogólnoustrojowy stan zapalny (Page i in., 2022). SCFAs wykazują działanie przeciwzapalne, regulując produkcję cytokin i funkcję komórek odpornościowych (Liu i in., 2023). Indol i jego pochodne mogą działać jako ligandy dla receptorów jądrowych w komórkach nabłonka, takich jak AhR, PXR czy receptor gamma powiązany z sierocymi receptorami retinoidowymi, wpływając na integralność bariery jelitowej. Wykazano, że indol może zwiększać oporność transnabłonkową, indukować ekspresję białek połączeń ścisłych oraz obniżać poziom cytokin zapalnych (Liu i in., 2022a).

W regulacji bariery jelitowej uczestniczą endogenne receptory estrogenowe obecne w komórkach nabłonka jelitowego, głównie ER β , który powszechnie występuje w ludzkim jelicie grubym (Braniste i in., 2011). ER β pełni rolę hamulca w odnawianiu nabłonka jelitowego i prawdopodobnie ma bezpośredni wpływ na integralność połączeń ścisłych, w przeciwieństwie do ER α , który stymuluje proliferację (Barone i in. 2008). Równowaga

między sygnalizacją ER α i ER β w komórkach nabłonka wydaje się kluczowa dla utrzymania funkcjonalnej bariery jelitowej.

Ksenoestrogeny obecne w żywności takie jak BPA mogą bezpośrednio wpływać na nabłonek jelita grubego. BPA ma dziesięciokrotnie większe powinowactwo do ER β w porównaniu do ER α (Kuiper i in. 1997; Matthews i in. 2001). W wyniku wiązania się z receptorami estrogenowymi, BPA zaburza funkcję bariery nabłonkowej i nasila odpowiedź nocycyptywną w trzewiach u szczurów. Ponadto ekspozycja na BPA w trakcie ciąży może być czynnikiem ryzyka rozwoju ciężkiego zapalenia jelita grubego u żeńskiego potomstwa w dorosłym życiu (Mandal i in., 2023)

1.2.5. Modele *in vitro* wykorzystywane w badaniach wpływu ksenobiotyków na mikrobiotę jelitową (GM)

Modele *in vitro* hodowli GM stanowią cenne uzupełnienie badań *in vivo* oraz badań populacyjnych umożliwiając badanie związków przyczynowo-skutkowych oraz molekularnych mechanizmów, poprzez które zaburzenia GM mogą wiązać się z rozwojem jednostek chorobowych (Qi i in., 2023). Metody te są również kluczowe dla kompleksowej oceny toksyczności ksenobiotyków, w tym EDCs, które stanowią istotną część zanieczyszczeń żywności oraz zagrożenie dla zdrowia człowieka (Średnicka i in., 2023). Obecnie wykorzystywane modele *in vitro* do hodowli GM obejmują proste modele hodowli okresowej, systemy hodowli ciągłej oraz zaawansowane hodowle, które umożliwiają badanie interakcji między GM a gospodarzem (Pham i in., 2018).

Modele hodowli GM *in vitro* oferują szereg korzyści w porównaniu z badaniami *in vivo*, takie jak niższe koszty, większa powtarzalność wyników oraz brak konieczności uzyskiwania skomplikowanych zgód etycznych. Ponadto są mniej czasochłonne, co jest szczególnie korzystne przy badaniu dużej liczby substancji (L. Li i in., 2019). Jedną z kluczowych zalet modeli *in vitro* jest możliwość znacznego ograniczenia liczby czynników zewnętrznych, które mogą wpłynąć na wyniki badań. W badaniach *in vivo* istnieje wiele zmiennych biologicznych i środowiskowych, które mogą wprowadzać nieprzewidziane zmiany w wynikach eksperymentów takie jak pozornie niewielkie różnice w diecie, warunki klatkowe czy czas pobierania próbek związany ze zmiennością GM w ciągu doby (Ericsson i in., 2018; Franklin i in., 2017). Wpływ tych czynników w badaniach nad GM, jest istotny, jednak często pomijany i rzadko kontrolowany między różnymi badaniami (Chi i in., 2021). Natomiast, modele *in vitro* pozwalają na precyzyjną kontrolę składu

pożywek, temperatury, poziomu tlenu, pH oraz innych parametrów, co minimalizuje ryzyko wpływu niepożądanych zmiennych na przebieg eksperymentu (Pham i in., 2018).

Wykorzystanie modeli *in vitro* posiada pewne ograniczenia, wynikające z braku możliwości pełnego odtworzenia złożonych interakcji zachodzących w organizmach żywych (Qi i in., 2023). Hodowle *in vitro* mają ograniczoną zdolność do symulowania specyficznych interakcji między różnymi rodzajami komórek a GM. Dodatkowo GM w organizmie ludzkim wchodzi w liczne, skomplikowane interakcje z układami - immunologicznym, hormonalnym i nerwowym, które nie są uwzględniane w hodowlach *in vitro*. W związku z tym, wyniki uzyskane w warunkach *in vitro* mogą nie odzwierciedlać rzeczywistego działania substancji w żywym organizmie (Sardelli i in., 2021). Ponadto, modele *in vitro* są przede wszystkim stosowane w badaniach krótkoterminowych, co ogranicza ich przydatność w analizie długotrwałych efektów działania ksenobiotyków (Pham i in., 2018).

Kluczowym elementem hodowli GM w warunkach *in vitro* jest dobór odpowiedniego podłoża mikrobiologicznego, które zapewni mikroorganizmom optymalne warunki do wzrostu i rozwoju (Średnicka i in., 2023). Dominującą część GM stanowią bakterie beztlenowe oraz bezwzględnie beztlenowe, które są szczególnie wymagające w trakcie hodowli (von Martels i in., 2017). Wymagają one bogatych, specjalistycznie wzbogaconych mediów hodowlanych oraz zachowania beztlenowych warunków na każdym etapie, od pobierania próbek po samą hodowlę (Vartoukian, 2016). Wybór odpowiedniego podłoża wpływa bezpośrednio na przeżywalność różnych gatunków bakterii, co w konsekwencji determinuje zmiany w profilu taksonomicznym GM, a także jego aktywność metaboliczną i funkcjonalną. Zmiany te są widoczne m.in. w poziomach produkcji SCFAs, witamin oraz innych metabolitów, kluczowych dla zdrowia gospodarza (Yousi i in., 2019a). Pomimo licznych prób wykorzystania komercyjnie dostępnych i nowo opracowanych podłoży, wiele gatunków bakterii jelitowych wciąż pozostaje niehodowlanych *in vitro*, głównie ze względu na trudności w odtworzeniu ich naturalnych warunków środowiskowych (Średnicka i in., 2023; Tao i in., 2023; Yousi i in., 2019a).

Hodowle okresowe stanowią najprostszy model, który charakteryzuje się niskimi kosztami i jednocześnie umożliwia prowadzenie badań o wysokiej przepustowości. Hodowle okresowe zakładają zaszczenie podłoża hodowlanego żywą GM i prowadzenie hodowli w warunkach beztlenowych przez określony, krótki czas (Isenring i in., 2023). Ograniczenia tego modelu wynikają z wyczerpywania się składników odżywczych w medium hodowlanym, gromadzenia się metabolitów oraz towarzyszącego temu spadkowi

pH, co ogranicza maksymalny czas prowadzenia hodowli do około 48 h (Isenring i in., 2023; Pham i in., 2018). Jest to wartościowa i szeroko wykorzystywana metoda do wstępnych badań modulacji składu GM oraz jej aktywności metabolicznej (Pham i in., 2018).

Bardziej zaawansowane modele, takie jak procesy w bioreaktorach, umożliwiają prowadzenie hodowli pół-ciągłej lub ciągłej, co pozwala na badanie dynamiki GM oraz reakcji mikroorganizmów na różne interwencje w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (Sardelli i in., 2021). W systemach tych bioreaktory dostarczają świeże medium odżywcze i usuwają produkty fermentacji, co umożliwia stabilizację warunków hodowli oraz prowadzenie długoterminowych badań (Pham i in., 2018). Bioreaktory mogą działać w trybie półciągłym (np. SHIME) lub ciągłym (np. model Gibsona, PolyFermS), przy czym końcowe produkty metabolizmu są odprowadzane z bioreaktora celem utrzymania stałej objętości. W modelu TIM-2 natomiast usuwanie metabolitów zostało rozwiązane za pomocą zintegrowanego systemu dializ (Isenring i in., 2023; Pham i in., 2018).

Wieloetapowe modele, takie jak trójstopniowy model Gibsona, pozwalają na symulację różnych odcinków jelita grubego, które charakteryzują się zmiennym pH i aktywnością metaboliczną. Umożliwia to badanie zmian GM w odpowiedzi na różne interwencje w warunkach bardziej zbliżonych do naturalnych (Pham i in., 2018). GM występuje w obrębie GI w formie planktonicznej w świetle jelita oraz osiadłej jako biofilm, gdzie jest związana z nabłonkiem. Społeczność mikroorganizmów śluzówki ściśle oddziałuje z komórkami nabłonka gospodarza, co sprawia że potencjalnie może mieć większy wpływ na patogenezę różnych chorób niż populacje planktoniczne. Pomimo tego, wiele badań GM opiera się na próbkach kału i dostarcza informacji jedynie na temat populacji planktonicznych (Crowther i in., 2014). Niektóre modele bioreaktorów odtwarzają zarówno planktoniczny jak i osiadły tryb życia GM, stosując strategie, takie jak zastosowanie nośników pokrytych agarą z mucyną (M-SHIME), kulek alginianowo-mucynowych (M-ARCOL), lub unieruchamiając drobnoustroje w porowatych kulkach gellanowo-ksantanowych z mucyną dostarczaną w płynnym podłożu hodowlanym (PolyFermS) (Isenring i in., 2023). Konfiguracja i obsługa bioreaktorów wymaga zaawansowanej infrastruktury oraz wyszkolonego personelu o specjalistycznych umiejętnościach w zakresie technologii fermentacji. Procesy te są czasochłonne, niskoprzepustowe i kosztowne, co stanowi istotne wyzwanie w ich praktycznym zastosowaniu (Isenring i in., 2023; Sardelli i in., 2021).

Badania interakcji między gospodarzem a GM w modelach *in vitro* obejmują zarówno proste modele 2D, jak i bardziej zaawansowane modele 3D, które różnią się stopniem złożoności i realizmem w odzwierciedlaniu warunków biologicznych (Qi i in., 2023). Modele 2D wykorzystują linie komórkowych hodowane w monowarstwie na płaskich podłożach, takich jak standardowe płytki hodowlane, wkłady Transwell czy chipy do oceny reakcji komórek na określony bodziec (Aguilar-Rojas i in., 2020; Qi i in., 2023). Model hodowli w systemie Transwell to klasyczny model *in vitro*, który pozwala na jednoczesną hodowlę komórek wraz z GM, nieaktywnymi komórkami mikroorganizmów, lub ich metabolitami. Wkładka Transwell dzieli komorę na dwie części: w jednej znajdują się komórki w medium, a w drugiej badany obiekt. W modelu jelita komórki hodowane są na porowatej membranie, a obiekt badania umieszczony na dnie studzienki może oddziaływać na komórki w górnej części komory (Qi i in., 2023). Modele 2D odgrywają istotną rolę w badaniach podstawowych dzięki swojej prostocie i niskim kosztom, jednak mają ograniczoną zdolność do odwzorowywania warunków fizjologicznych. Jednym z przykładowych ograniczeń jest brak możliwości pełnej ekspresji czynników specyficznych dla tkanek, takich jak śluz (Aguilar-Rojas i in., 2020).

Modele 3D stosowane w badaniach *in vitro* interakcji między człowiekiem a GM, takie jak organoidy, organy-na-chipie czy hodowle komórkowe na rusztowaniach, pozwalają na bardziej realistyczne odtworzenie warunków panujących w organizmie w tym mikrośrodowiska z gradientem tlenu (Aguilar-Rojas i in., 2020). Przykładem takiego modelu jest system, w którym białka jedwabiu posłużyły do stworzenia porowatego rusztowania z pustym wnętrzem, pokrytego warstwą komórek nabłonka jelitowego (Caco-2 z HT29-MTX) wytwarzających warstwę śluzową, a w rusztowaniu umieszczono miofibroblasty zapewniające wsparcie strukturalne (Qi i in., 2023). Coraz bardziej złożone modele, które obejmują całe społeczności bakteryjne i elementy błony śluzowej, są opracowywane do badania interakcji między GM a gospodarzem. Te zaawansowane podejścia mogą znacząco wspierać rozwój modeli *in vitro* chorób przewlekłych, takich jak choroba zapalna jelit (ang. inflammatory bowel disease, IBD) czy rak jelita grubego, co sprawia, że będą odgrywać coraz większą rolę w badaniach nad interakcjami gospodarza z GM (Puschhof i in., 2021).

CEL PRACY I HIPOTEZY BADAWCZE

Przedmiotem dysertacji są interakcje związków endokrynnie czynnych obecnych w żywności z mikrobiotą jelitową człowieka. Badając dostępne dane literaturowe oraz w oparciu o dotychczasowe wyniki badań zidentyfikowano następujące cele badawcze:

1) Ocena wpływu wybranych związków chemicznych z grupy bisfenoli, w tym bisfenolu A oraz jego analogów bisfenolu S, bisfenolu F i tetrametyl bisfenolu F, na skład i funkcje metaboliczne mikrobioty jelitowej człowieka *in vitro*.

2) Ocena zdolności mikrobioty jelitowej do eliminacji badanych związków oraz modyfikacji ich aktywności biologicznej *in vitro*.

W odniesieniu do powyższych celów zostały postawione następujące **hipotezy badawcze**:

H1. Związki endokrynnie czynne prowadzą do zaburzenia struktury taksonomicznej i profilu metabolicznego mikrobioty jelitowej.

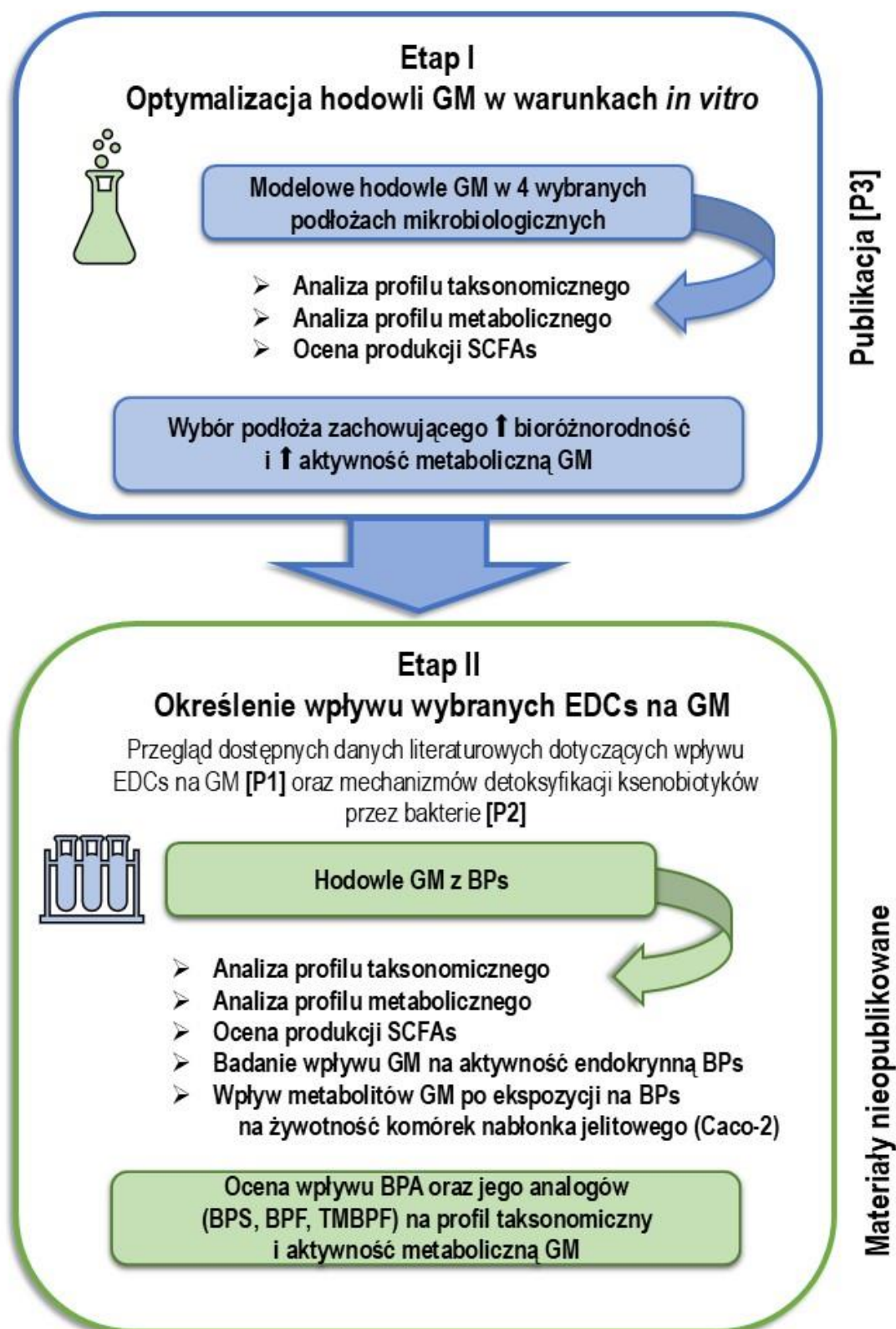
H2. Mikrobiota jelitowa posiada zdolność do eliminacji związków endokrynnie czynnych.

H3. Mikrobiota jelitowa modyfikuje aktywność biologiczną związków endokrynnie czynnych, wpływając na ich cytotoksyczność oraz potencjał endokrynni.

Dla realizacji postawionych celów zostało wyodrębnionych 6 zadań badawczych:

- 1) Optymalizacja metod hodowli mikrobioty jelitowej w warunkach *in vitro*.
- 2) Zbadanie wpływu wybranych związków endokrynnie czynnych na profil taksonomiczny oraz α i β różnorodność mikrobioty jelitowej człowieka.
- 3) Określenie zmian w profilach metabolicznych mikrobioty jelitowej pod wpływem badanych związków, ze szczególnym uwzględnieniem zmian w produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych.
- 4) Ocena potencjału mikrobioty jelitowej do usuwania wybranych związków endokrynnie czynnych.
- 5) Określenie wpływu mikrobioty jelitowej na aktywność estrogenową/androgenową wybranych związków endokrynnie czynnych.
- 6) Ocena wpływu mikrobioty jelitowej na cytotoksyczności wybranych związków endokrynnie czynnych.

2. ZAKRES PRACY



3. MATERIAŁ BADAWCZY I METODY BADAŃ

3.1. Materiał biologiczny

Materiał biologiczny stanowiły próbki kału, pobrane od zdrowych dawców, w tym 8 kobiet i 7 mężczyzn w wieku od 25 do 35 lat, spełniających poniższe kryteria: brak terapii antybiotykowej oraz suplementacji probiotykami przez co najmniej 6 miesięcy przed oddaniem próbki, brak otyłości (wskaźnik masy ciała, BMI \leq 25 kg/m²), brak chorób przewlekłych i zaburzeń żołądkowo-jelitowych, niepalenie tytoniu oraz stosowanie tradycyjnej diety, uwzględniającej produkty mięsne. Charakterystyka dawców mikrobioty jelitowej, opracowana na podstawie dostarczonych kwestionariuszy zdrowotnych, została przedstawiona w **Tabeli S1** w publikacji [P3].

3.2. Metody badań

3.2.1. Pobieranie próbek kału i przygotowanie inokulum mikrobioty jelitowej

Inokulum kałowe przygotowano zgodnie z protokołem zatwierdzonym przez Komisję Etyki Badań Naukowych z Udziałem Ludzi SGGW (nr 23/2021). Uchwałę Komisji umieszczono w **Aneksie**. Dawcy pobierali próbki kału w domu, które natychmiast umieszczali w warunkach beztlenowych (GenBag anaerobic, BioMerieux) i przechowywali w lodówce. Próbki były transportowane w stanie schłodzonym i przetwarzane w laboratorium w ciągu 8 h. W komorze beztlenowej (BACTRON 300 Sheldon Manufacturing, Inc., 90% N₂, 5% H₂, 5% CO₂) dzielono próbki na porcje po ~3 g od każdego ochotnika. Następnie próbki od wszystkich dawców łączono (MIX), rozcieńczano w buforze krioprezerwacyjnym (1:4 w/v), filtrowano, podzielono na równe porcje i zamrożono w temperaturze -80°C celem zabezpieczenia do dalszych badań.

3.2.2. Hodowle *in vitro* mikrobioty jelitowej

Media mikrobiologiczne wykorzystywane w celu optymalizacji metody hodowli GM w publikacji [P3] obejmowały: Gut Microbiota Medium (GMM) bez agaru (Goodman i in., 2011), Schaedler Broth (SM) z dodatkiem o 5% krwi owczej i 1,5 mg/L witaminy K₃ (GrasoBiotech, Polska), Fermentation Medium (FM) (Ahmadi i in., 2019) i Carbohydrate Free Basal Medium (CFBM) (Al-Tamimi i in., 2006). Wszystkie media przygotowano zgodnie z protokołami producentów.

Próbki kału (MIX) rozmrażano w łaźni wodnej (1h, temp. 37°C) i zaszczepiano wybrane podłoża mikrobiologiczne: GMM, FM, CFBM i SM (2% v/v). Hodowle *in vitro* prowadzono w warunkach beztlenowych w komorze BACTRON. Próbki były inkubowane na wytrząsarce laboratoryjnej przez (24 h, temp. 37°C), wykorzystując 96-dołkowe płytki typu deep well. Bezpośrednio po hodowli próbki z każdej grupy zostały podzielone na dwie grupy: traktowane i nietraktowane monoazydkiem propidyny (ang. propidium monoazide, PMA), w celu rozróżnienia DNA pochodzącego od mikroorganizmów żywych i martwych.

3.2.3. Traktowanie PMA

Do każdej próbki dodano PMA w stężeniu 20 mM, uzyskując końcowe stężenie 50 µM. Próbki wirowano przez 20 s i inkubowano w ciemności w temp. 37°C przez 20 min, mieszając co 5 min. Następnie próbki poddano działaniu światła za pomocą urządzenia do fotolizy LED PMA-Lite (Biotium, Fremont, CA, USA) przez 20 min, mieszając co 5 min. Komórki odwirowano przy 5000 × g przez 10 min, a supernatant usunięto. W przypadku próbek niepoddanych działaniu PMA, próbki przechowywano w temperaturze pokojowej przez cały czas ekspozycji na PMA. Uzyskane osady komórkowe przechowywano w temperaturze -80°C do momentu izolacji DNA. DNA wyekstrahowano zarówno z próbek traktowanych PMA, jak również nietraktowanych tym związkiem.

3.2.4. Hodowle *in vitro* mikrobioty jelitowej z bisfenolami

Hodowle *in vitro* przeprowadzono w ściśle beztlenowych warunkach. Zamrożone próbki kału MIX, rozmrażano w warunkach beztlenowych w łaźni wodnej (1 h, temp. 37°C). Wstępnie podgrzane, odtlenowane medium SB zaszczepiano inokulum MIX (2% v/v). Hodowle GM poddawano ekspozycji na BPA, BPS, BPF, TMBPF przez 24 h w końcowym stężeniu 1 mM (n = 9). Badane związki rozpuszczono w etanolu (96%), przy czym objętość etanolu nie przekraczała 2% całkowitej objętości hodowli. Równoważną objętość etanolu dodano do grupy kontrolnej rozpuszczalnika. Hodowle inkubowano w temp. 37°C na wytrząsarce laboratoryjnej (150 obr./min) w 96-dołkowych płytkach typu deep well przez 48 h. Płytki były przykryte folią aluminiową, umożliwiającą wymianę gazową. Po inkubacji hodowle odwirowano w celu oddzielenia peletu i supernatantu.

3.2.5. Ekstrakcja DNA, przygotowanie biblioteki amplikonów 16S rDNA i sekwencjonowanie MiSeq

Całkowite DNA z próbek kału wyizolowano zestawem QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy) zgodnie z instrukcją producenta. W celu dokładnej homogenizacji próbek kału, przeprowadzono mechaniczne rozbicie komórek przy użyciu urządzenia FastPrep-24 Classic Grinder (MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornia, USA) (20 s, 6,5 m/s). Czystość wyekstrahowanego DNA oceniono za pomocą spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), a stężenie DNA zmierzono za fluorymetrem Qubit 4.0 (Life Technologies Ltd., Wielka Brytania) i zestawem Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen). Do amplifikacji regionu V3-V4 genu 16S rDNA wykorzystano parę starterów 341 (F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') i 805 (R: 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') wraz z adapterami do sekwencjonowania Illumina MiSeq. Biblioteki DNA przygotowano zgodnie z protokołem Illumina Guide #15044223 Rev. B. Amplikony 16S rDNA indeksowano przy użyciu zestawu Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, USA) zgodnie z instrukcją Nextera DNA Sample Preparation Guide (protokół #15044223 Rev. B). Amplikony genu 16S rDNA sekwencjonowano na platformie Illumina MiSeq, korzystając z chemii v3 (600 cykli, 2 × 300 bp).

3.2.6. Analiza bioinformatyczna

Surowe odczyty sekwencji 16S rDNA zostały zdemultipleksowane do plików FASTQ, poddane kontroli jakości (jakość > Q25) oraz oczyszczone przy użyciu algorytmu DADA2 v2024.2.0 (Callahan i in., 2016). Kontrola jakości, wizualizacja oraz profilowanie taksonomiczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania QIIME 2 amplicon v2024.2 (<https://github.com/qiime2/qiime2>) (Bolyen i in., 2019). Tabela ASV została przefiltrowana i uwzględniono tylko te ASV, które stanowiły $\geq 0,25\%$ całkowitych odczytów w co najmniej jednej próbce, zgodnie z progiem zaproponowanym przez Reitmeier i in. (2021). Klasyfikacja taksonomiczna została przeprowadzona przy użyciu bazy danych SILVA v132 (<https://www.arb-silva.de/>) (Quast i in., 2012). PICRUSt2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) v2.5.2 (<https://github.com/picrust/picrust2>). Predykcje funkcji metagenomu oparto na Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) (<https://www.genome.jp/kegg/>) (Kanehisa, 2000). Do analizy wyników PICRUSt2 i wizualizacji użyto pakietu R `ggpicrust2` v1.7.1 (<https://github.com/cafferychen777/ggpicrust2>) (Yang i in., 2023). Następnie artefakty QIIME2 zaimportowano do R v4.4.1 jako obiekt `phyloseq` przy użyciu

pakietu qiime2R v0.99.20 (<https://github.com/jbisanz/qiime2R>). Analiza α -różnorodności została przeprowadzona przy użyciu pakietów R phyloseq v1.30-4 (<https://github.com/joey711/phyloseq>) oraz vegan v2.6-4 (<https://github.com/vegandevs/vegan>), w celu obliczenia Efektywnej Różnorodności Mikrobiologicznej i Efektywnej Liczby Shannona, przy głębokości próbkowania ustawionej na minimalną liczbę odczytów (25894). Wykres z zastosowaniem niemetrycznego skalowania wielowymiarowego (ang. non-metric multidimensional scaling, NMDS), oparty na odległościach β -różnorodności, uzyskano za pomocą narzędzia internetowego MicrobiomeAnalyst 2.0 (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>) (Lu i in., 2023). Różnice w porównaniach α -różnorodności oceniono przy użyciu testu Kruskala-Wallisa z testem *post-hoc* Dunna. Różnice w β -różnorodności oceniono za pomocą permutacyjnej wielozmiennej analizy wariancji (PERMANOVA) przeprowadzonej na odległościach Bray-Curtisa. Różnice w względnym udziale taksonów GM oceniono za pomocą ANCOM BC przeprowadzonego wykorzystując oprogramowanie QIIME 2. Różnice w przewidywanych funkcjach metabolicznych GM, na podstawie PICRUST2, oceniono za pomocą LinDA przy użyciu pakietu ggpicrust2 v1.7.1 (<https://github.com/cafferychen777/ggpicrust2>) w R (Yang i in., 2023). Wizualizacje wykonano przy użyciu pakietu ggpicrust2.

3.2.7. Oznaczenie profilu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych

Roztwory wzorcowe zawierające pojedynczy związek przygotowano w izopropanolu w stężeniu 0,2 g/mL, używając wzorców o wysokiej czystości. Roztwór wzorcowy kwasu pelargonowego, używanego jako standard wewnętrzny do oceny wydajności metody, przygotowano w izopropanolu w stężeniu 1 mg/mL. Roztwory te przechowywano w fiolkach z ciemnego szkła w temp. -20°C aż do momentu użycia. Krzywe kalibracyjne dla sześciu SCFA stworzono za pomocą metody pięciopunktowej w oprogramowaniu Thermo TraceFinder™ v5.1, dostarczonym przez Thermo Fisher Scientific (Pleasanton, CA, USA). 100 μL próbek wymieszano z 500 μL n-heksanu i 500 μL standardu wewnętrznego. Po krótkim mieszaniu próbki odwodniono przy użyciu siarczanu sodu. Następnie próbki przeniesiono do szklanych fiolek, szczelnie zamknięto po dodaniu 10 μL stężonego kwasu siarkowego i ogrzewano na termobloku (1 h, temp. 100°C) w celu przeprowadzenia derywatywacji. Próbki ekstrahowano, dodając 4 mL tert-butylometylu eteru i 4 mL roztworu zawierającego cytrynian sodu i chlorek sodu (odpowiednio 10% i 15%). Po intensywnym mieszaniu próbki wirowano, a 2 mL próbki z górnej fazy organicznej

przeniesiono do fiolki zawierającej siarczan sodu w celu usunięcia pozostałej wody. Próbkę przefiltrowano przy użyciu nylonowego filtra strzykawkowego o wielkości porów 0,22 μm . Próbkę załadowano do GC-MS (Agilent 7890A/5975C, Santa Clara) z kapilarną kolumną RTX-WAX MS (60 m x 250 μm x 0,25 μm). Temperatury iniektora, źródła jonów, kwadrupola i interfejsu GC/MS wynosiły odpowiednio 230, 230, 150 i 250°C. Przepływ helu jako gazu nośnego utrzymywano na poziomie 1,5 mL/min. Wstrzyknięto 2 μL derywatywizowanej próbki z podziałem 50:1. Początkowa temperatura kolumny wynosiła 40°C i była utrzymywana przez 2 min., następnie wzrastano do 60°C z szybkością 5°C/min, a następnie zwiększano do 150°C z szybkością 8°C/min, a na koniec do 250°C z szybkością 15°C/min i utrzymywano na tej temperaturze przez 5 min. Jonizacja była przeprowadzana w trybie zderzeń elektronów (EI) przy 70 eV. Dane MS były pozyskiwane w trybie pełnego skanu/SIM. Identyfikację związków potwierdzono przez wstrzyknięcie czystych wzorców i porównanie czasu retencji oraz odpowiadających im widm MS. Różnice w zawartości SCFA między grupami analizowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie testu *post-hoc* Tukey'a z korekcją Benjamini–Hochberg. Szczegółowe parametry analizy GC/MS SCFA znajdują się w **publikacji [P3]** w **Tabeli 1**.

3.2.8. Ilościowa ocena eliminacji bisfenoli przez mikrobiotę jelitową

Roztwory wzorcowe pojedynczych związków o stężeniu 1 mg/mL zostały przygotowane w acetonitrylu (ACN) przy użyciu wzorców o wysokiej czystości. Roztwór wzorcowy BPA-d16, używany jako standard wewnętrzny w każdej próbce do monitorowania wydajności metody, przygotowano w stężeniu 1 mg/mL w ACN. Roztwory wzorcowe były przechowywane w ciemnych fiolkach szklanych w temp. –20°C do momentu użycia. Pięciopunktowe krzywe kalibracyjne zostały przygotowane dla mieszaniny BPs w zakresie 1–50 ng/mL, wygenerowane za pomocą oprogramowania Thermo TraceFinder™ w wersji 5.1 (Thermo Fisher Scientific, Pleasanton, CA, USA). Próbkę całej hodowli oraz supernatanty wymieszano z ACN (1:1) i zamrożono w zamrażarce o temp. –80°C. Przed analizą próbki wyjęto z zamrażarki i pozwolono im stopniowo rozmrażać się w temp. 4°C. Następnie próbki całej hodowli sonikowano przez 30 min. w łaźni ultradźwiękowej. Supernatanty po hodowli GM oraz homogenizowane próbki całej hodowli rozcieńczono (1:1000) ACN, dodano 5 μL standardu wewnętrznego, przefiltrowano przez nylonowy filtr strzykawkowy o wielkości porów 0,22 μm do fiolki chromatograficznej i następnie poddano analizie przy użyciu LC-HR-MS/MS na spektrometrze masowym Q Exactive

Orbitrap (Thermo Scientific). W celu ilościowej analizy usuwania BPs zastosowano system chromatografii ciekowej o ultra-wysokiej wydajności (UHPLC) sprzężony ze spektrometrem masowym QExactive Orbitrap oraz podgrzewanym interfejsem elektrosprejowym (HESI-MS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono przy użyciu kolumny C18 Cortecs (2,1 mm × 100 mm, wielkość cząsteczek 1,6 μm; Waters, Milford, MA, USA). System LC działał przy stałym przepływie 0,3 mL/min. Faza A zawierała 1 mM fluorek amonu w wodzie w stosunku 90:10 v/v, a faza B zawierała 1 mM fluorek amonu w wodzie w stosunku 20:80 v/v. Objętość wstrzykiwanej próbki wynosiła 2,5 μL. Zakres skanowania dla spektrometru masowego wynosił od m/z 80 do 1200 m/z. Rozdzielczość ustawiono na 70,000, a stosowano tryb jednoczesnego skanowania i fragmentacji wszystkich jonów. Parametry jonizacji wynosiły: napięcie rozpylania +3500 V i -2500 V dla trybów dodatniego i ujemnego, odpowiednio; temperatura grzałki sondy wynosiła 412°C; temperatura kapilary 256,25°C. Przepływy gazów ustawiono na 47,5 jednostek dla gazu osłonowego, 11,25 jednostek dla gazu pomocniczego i 2,25 jednostek dla gazu zapasowego. Pozyskiwanie i przetwarzanie danych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Thermo Scientific TraceFinder™. Tolerancja dokładności masy wynosiła 5 ppm, a minimalny próg intensywności ustawiono na 100 000 jednostek. Ocena eliminacji BPs przez hodowle GM była przeprowadzona przy użyciu modelu ANOVA z testem *post-hoc* Tukey'a oraz korekcją Benjamini-Hochberg.

3.2.9. Analiza profilu zewnątrzkomórkowych metabolitów mikrobioty jelitowej

Supernatanty wymieszano z ACN (1:1) i zamrożono w temp. -80°C. Przed analizą próbki stopniowo rozmrażano w temp. 4°C. Następnie supernatanty przefiltrowano za pomocą nylonowego filtra strzykawkowego (0,22 μm) do fiolki chromatograficznej i poddano analizie LC-HR-MS/MS przy użyciu spektrometru masowego Q Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Metabolity wstrzyknięto na kolumnę C18 Cortecs (2,1 mm × 100 mm, rozmiar cząsteczek 1,6 μm; Waters, Milford, MA, USA). Chromatografia ciekowa była prowadzona przy stałym przepływie 0,3 mL/min. Faza ruchoma A zawierała 1 mM fluorek amonu w wodzie w stosunku 90:10 v/v, a faza B zawierała 1 mM fluorek amonu w wodzie w stosunku 20:80 v/v. Wszystkie próbki analizowano w trybie jonizacji dodatniej i ujemnej. Spektrometr masowy był ustawiony zgodnie z parametrami analizy ilościowej. Pozyskiwanie danych odbywało się w trybie zależnym od danych (data-dependant mode). Do identyfikacji pików, integracji danych

spektrometrycznych i profilowania metabolitów użyto oprogramowania Compound Discoverer v3.2. Związki zidentyfikowano i pogrupowano na podstawie baz danych ChemSpider (<https://www.chemspider.com>, dostęp 20 maja 2024) oraz mzCloud (<https://www.mzcloud.org>, dostęp 20 maja 2024). Statystyczną ocenę danych profili metabolicznych GM przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Compound Discoverer. Test hipotezy wykonano za pomocą modelu ANOVA z testem *post-hoc* Tukey'a oraz korekcją Benjamini–Hochberg.

3.2.10. Test aktywności estrogenowej i androgenowej

Do badań wykorzystywano zmodyfikowany szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Tigret Poland) zawierający ludzkie receptory ER (YES) lub AR (YAS). Aktywność endokrynną oceniano według metody Roszko i in. (2018) z własnymi modyfikacjami. Supernatanty badanej próbki po hodowli GM ekstrahowano za pomocą octanu etylu w stosunku objętości 1:1. Próbki energicznie mieszano ręcznie, a następnie odwadniano siarczanem magnezu. Następnie próbki poddano wirowaniu przy $10\,000 \times g$ przez 10 min. Górną fazę octanu etylu starannie zebrano do oceny aktywności endokrynej. 150 μL ekstraktu przeniesiono do 96-dołkowej płytki polipropylenowej. Wykonano seryjne rozcieńczenia w stosunku 1:3 przy użyciu octanu etylu. E2 użyto jako pozytywną kontrolę dla testu, przy czym octan etylu służył jako kontrola odczynnikowa. Próbki pozostawiono do odparowania przez noc w temperaturze pokojowej. Drożdże zaszczipiono do podłoża YPG (BLT, Polska) zawierającego streptomycynę (0,5 ml/mL) i ampicylinę (0,5 mg/mL) i hodowano przez noc w temp. 30°C. Całonocna hodowla drożdży o gęstości optycznej (ang. optical density, OD) około 1,2 zmierzona przy 690 nm została zwirowana przy $10\,000 \times g$ przez 10 min., a następnie zawieszona w 10 mL świeżego podłoża, aby zapewnić optymalną aktywność drożdży do testów. Odparowane próbki rekonstruowano w 120 μL 1% dimetylosulfotlenku (DMSO) i inokulowano 60 μL przygotowanej zawiesiny drożdży. Próbki inkubowano przez noc w 30 °C w nawilżonym pojemniku plastikowym. Wzrost oceniano poprzez pomiar OD przy długości fali $\lambda = 690\text{ nm}$. Hodowle zakończono dodając 20 μL 0,1% Triton X-100 i 30 μL litykazy (1 mg/mL) rozpuszczonej w buforze fosforanowym (pH 7,5) zawierającym merkaptotoetanol (50 mM). Próbki inkubowano przez 45 min. w temp. 35°C. Następnie dodano roztwór chlorofenolowej czerwieni- β -D-galakopiranozydu (CPRG) (1,0 mg/mL w buforze fosforanowym, pH 7,5). Szybkość hydrolizy CPRG mierzono przy fali $\lambda = 570\text{ nm}$ po 30 minutach inkubacji w 35°C w ciemności. Dane zebrano za pomocą oprogramowania Gen5 na czytniku płytek Biotek

Synergy H1. Aktywności agonistyczne wobec receptorów ER i AR zostały określone, a wyniki wyrażono jako wartości 20% maksymalnego stężenia skutecznego (EC_{20}). Istotność wyników oceniano za pomocą testów *t*-studenta.

3.2.11. Ocena cytotoksyczności metabolitów mikrobioty jelitowej po ekspozycji na bisfenole

Supernatanty po hodowli GM oraz kontrole abiotyczne (1 mM BP w SM) rozcieńczono w stosunkach 1:3, 1:6 i 1:10 w DMEM wzbogaconym o 10% surowicę płodową bydlęcą (FBS, ang. fetal bovine serum, v/v), 100 IU/mL penicyliny i 100 μ g/mL streptomycyny. Roztwory te następnie przefiltrowano przy użyciu filtra strzykawkowego z celulozy o wielkości porów 0,22 μ m w celu zapewnienia jałowości. Do eksperymentów użyto linii komórkowej Caco-2, pochodzącej z DSMZ (Braunschweig, Niemcy), w przedziałach pasażu od 22 do 35. Komórki hodowano w kolbach 75 mL, przy gęstości zaszczepienia 1×10^5 komórek/mL w DMEM wzbogaconym o 10% FBS, 100 IU/mL penicyliny i 100 μ g/mL streptomycyny, w 12 mL pożywki na kolbę. Pożywkę wymieniało trzy razy w tygodniu. Pasażowanie przeprowadzano po osiągnięciu 80% konfluencji. Do odłączenia komórek dwukrotnie płukano je 5 mL buforu fosforanowego (DPBS) i odrywano przy użyciu 4 mL trypsyny. Żywotność komórek oceniono kolorymetrycznie, mierząc aktywność dehydrogenazy mitochondrialnej przy użyciu barwnika MTT (3-(4,5-dimetylo-2-tiazolilo)-2,5-difenylnitrazolium bromide) dostarczonego przez firmę Merck (Darmstadt, Niemcy), zgodnie ze zmodyfikowanym protokołem wg Popowskiego i in. (2021). Komórki wysiewano w liczbie 1×10^4 komórek na dołek w 96-dołkowych płytkach. Pożywkę zmieniano trzy razy w tygodniu aż do uzyskania pełnej konfluencji, po czym dodano pełne medium z 5 mM maślanu sodu (Merck) w celu promowania różnicowania komórek, a hodowlę kontynuowano przez kolejny tydzień. Następnie pożywkę hodowlaną zastąpiono medium zawierającym związki testowe przygotowane w etanolu (1 mM), a także kontrolą negatywną (pożywka hodowlana), kontrolą rozpuszczalnika (pożywka hodowlana z etanolem) oraz kontrolą pozytywną (pożywka hodowlana z 0,1% Triton X, Thermo Fisher Scientific). Po 48 h inkubacji komórki przepłukano DPBS i dodano 20 μ L roztworu MTT na dołek (0,5 mg/mL w DPBS). Po 4 h inkubacji supernatant odciągnięto, a uzyskane kryształy formazanu rozpuszczono w 200 μ L DMSO, który również służył jako próbka tła do pomiarów absorpcji. Absorbancję mierzono przy długości fali $\lambda = 560$ nm (długość fali testowej) i $\lambda = 620$ nm (długość fali odniesienia) za pomocą czytnika płytek (Biotek Synergy H1). Test przeprowadzono w dwóch niezależnych eksperymentach, każdy

wykonany w trzech powtórzeniach. Istotność różnic określono przy użyciu modelu ANOVA z testem *post-hoc* Tukey'a oraz korekcją Benjamini-Hochberg.

3.2.12. Analiza Statystyczna

O ile nie zaznaczono inaczej, wszystkie testy statystyczne przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Graph Prism v9.4.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Różnice między grupami uznawano za istotne przy $p < 0,05$, a dane przedstawiono jako średnie \pm SD, z co najmniej 3 powtórzeń.

4. MATERIAŁY OPUBLIKOWANE

4.1. Wyniki i omówienie badań opublikowanych

ZADANIE BADAWCZE 1: Optymalizacja metod hodowli mikrobioty jelitowej w warunkach *in vitro*.

4.1.1. Wpływ łączenia próbek kału na społeczność GM

GM charakteryzuje się dużym bogactwem gatunkowym, które różni się między indywidualnymi dawcami (Fontana i in., 2019). Badania potwierdzają, że łączenie próbek kału od wielu dawców w celu przygotowania znormalizowanego inokulum jest wartościową metodą w badaniach populacyjnych (Aguirre i in., 2014; Logtenberg i in., 2020; Rodríguez-Ruano i in., 2020a). Użycie inokulum z próbki zbiorczej do hodowli GM *in vitro* umożliwia standaryzację eksperymentów i zapewnia powtarzalność wyników (Aguirre i in., 2014). W ramach badań przedstawionych w **publikacji [P3]** dokonano analizy próbek kału pochodzących od indywidualnych dawców (IND, n = 15) oraz zbiorczych próbek kału (MIX, n = 5) metodą sekwencjonowania amplikonu 16S rDNA, w celu oceny wpływu łączenia próbek na strukturę GM. Analiza porównawcza grup IND i MIX wykazała istotne różnice w metrykach α -różnorodności, przy czym grupa MIX charakteryzowała się istotnie wyższym Efektywnym Bogactwem Mikroorganizmów i Efektywną Liczbą Shannona. Przeprowadzone badania wykazały, że połączone próbki kału od indywidualnych dawców (MIX) charakteryzowały się wyższym bogactwem i równomiernością gatunków, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez Rodríguez-Ruano i in. (2020).

Mikrobiom rdzeniowy jest zwykle definiowany jako najbardziej rozpowszechniony zestaw taksonów mikrobiologicznych, które stale występują w danym ekosystemie (Custer i in., 2023). Przeprowadzona analiza mikrobiomu rdzeniowego ujawniła tylko 17 ASV wspólnych dla wszystkich próbek IND, co świadczy o dużej heterogeniczności GM poszczególnych dawców. W inokulum MIX zaobserwowano obecność większości (87,21%) taksonów bakteryjnych zidentyfikowanych w próbkach od poszczególnych dawców (IND). Ponadto 52,27% taksonów obecnych w grupie IND stanowiło wspólny rdzeń mikrobiomu występujący we wszystkich próbkach MIX. Wyniki te wykazały, że

połączenie próbek kału od różnych dawców (MIX) umożliwiło uzyskanie reprezentatywnego profilu GM, który odzwierciedla większość taksonów obecnych w próbkach pobranych od indywidualnych dawców. Uzyskane wyniki przeprowadzonego badania potwierdziły skuteczność wykorzystania inokulum przygotowanego z próbki zbiorczej do hodowli GM w modelu *in vitro*, co potwierdziły także badania Rodríguez-Ruano i in. (2020), Logtenberg i in. (2020), Aguirre i in. (2014) i Yousi i in. (2019).

4.1.2. Żywotność inokulum GM z próbki zbiorczej od wielu dawców

Ze względu na to, że GM składa się z wielu bakterii o wysokich wymaganiach odżywczych, z których nie wszystkie można hodować w warunkach *in vitro* (Lagier i in., 2018) w dalszym etapie badań zastosowano fotoreaktywny barwnik PMA wiążący DNA, w celu oceny żywotności bakterii w zamrożonych, zbiorczych próbkach kału (MIX). Obróbka z użyciem PMA umożliwiła wykluczenie DNA martwych bakterii z materiału przeznaczonego do sekwencjonowania, co pozwoliło na ocenę względnej żywotności bakterii. Porównanie próbek przed zastosowaniem PMA (MIX) i po (MIX/PMA) wykazało istotny spadek α -różnorodności, w tym Efektywnej Liczby Shannona ($p < 0,01$) oraz Efektywnego Bogactwa Mikroorganizmów ($p < 0,01$). Obserwowany spadek bioróżnorodności może wynikać z niekorzystnego wpływu procesu pobierania i zamrażania próbek oraz z faktu, że niektóre mikroorganizmy są niezdolne do wzrostu w tych warunkach (Bellali et al., 2019; Chen et al., 2022; Papanicolas et al., 2019). Ponadto bakterie należące do niektórych taksonów mogą tracić żywotność jeszcze zanim dotrą do końca przewodu pokarmowego (Bellali et al., 2021). Sekwencjonowanie z użyciem PMA umożliwiło odzwierciedlenie składu żywych mikroorganizmów w inokulum, które wykorzystywano w kolejnych etapach badań.

4.1.3. Wpływ wybranych mediów hodowlanych na GM

Przeprowadzono analizę wpływu czterech różnych podłoży hodowlanych: GMM, SM, FM i CFBM, na hodowlę GM w modelu *in vitro*. Podłoża zostały wybrane na podstawie przeglądu literatury oraz ich wcześniejszego wykorzystania w hodowlach GM, a także ze względu na ich przeznaczenie do hodowli bakterii beztlenowych o wysokich wymaganiach odżywczych (Ahmadi et al., 2019; Al-Tamimi et al., 2006; Goodman et al., 2011). Szczegółowe porównanie składu stosowanych podłoży mikrobiologicznych zostało zamieszczone w **Publikacji [P3]**, w **Tabeli S4**. Aby ocenić wpływ wybranych podłoży hodowlanych na profil taksonomiczny GM, zaszczerpiono je przygotowanym wcześniej

inokulum (MIX), a hodowle prowadzono w warunkach beztlenowych przez 24 h. Następnie w celu wyeliminowania błędu związanego z obecnością martwych komórek bakteryjnych przed sekwencjonowaniem 16S rDNA zastosowano barwnik PMA. Było to pierwsze badanie, w którym zastosowano opisaną metodykę do analizy wpływu podłoży hodowlanych na żywą populację GM. Zgodnie z literaturą, prezentowane wyniki potwierdziły, że skład pożywki hodowlanej znacząco wpływa na wzrost i zmianę profilu taksonomicznego społeczności GM (Yousi i in., 2019b). Po 24 h hodowli największą α -różnorodność GM (Efektywna Liczba Shannona) zaobserwowano po hodowli w podłożach SM i GMM, w odniesieniu do niehodowanego inokulum MIX, które reprezentowało wyjściową bioróżnorodność GM. Natomiast nie zaobserwowano istotnych zmian w Efektywnym Bogactwie Mikrobiologicznym między badanymi grupami a MIX. Zmiany w Efektywnej Liczbie Shannona przy braku istotnych różnic w Efektywnym Bogactwie Mikrobiologicznym sugerują, że hodowle w podłożach CFBM i FM wpłynęły na równomierność rozkładu taksonów, ale nie na ogólną liczbę unikatowych taksonów. Stwierdzono, że pożywki o niskiej koncentracji składników odżywczych, takie jak CFBM i FM, prowadziły do spadku bioróżnorodności GM w porównaniu z pożywkami SM i GMM, które charakteryzowały się wyższą zawartością składników odżywczych, co sugeruje, że bogatsze media sprzyjają większej różnorodności mikrobiologicznej. Ponadto analiza β -różnorodności, przeprowadzona z wykorzystaniem metryki Bray-Curtisa, wykazała istotne różnice w strukturze społeczności mikrobiologicznych pomiędzy wszystkimi grupami pożywek a niehodowanym inokulum MIX ($p < 0,001$). Wyniki analizy β -różnorodności wskazują, że badane podłoża hodowlane znacząco wpływały na strukturę społeczności mikrobiologicznych, przy czym podłoże CFBM powodowało największe zmiany w porównaniu do wyjściowego inokulum MIX, co sugeruje silny wpływ tego medium na kształtowanie składu GM.

W prezentowanej pracy zaobserwowano specyficzny dla każdej pożywki profil taksonomiczny GM, co można powiązać z różnorodną kompozycją składników odżywczych testowanych mediów, wspierającą wzrost różnych grup taksonomicznych mikroorganizmów. Wszystkie badane pożywki znacząco zwiększały względną obfitość rodzaju *Megasphaera*, w porównaniu do wyjściowego inokulum MIX. Największy wzrost względnej obfitości bakterii z tego rodzaju w porównaniu do inokulum MIX zaobserwowano w próbkach hodowanych w podłożu CFBM (18,4-krotny wzrost), natomiast najmniejszy wzrost odnotowano w próbkach hodowanych w podłożu SM (4,5-krotny wzrost). *Megasphaera* to beztlenowe, Gram-ujemne bakterie z rodziny Clostridia,

które produkują SCFAs, niezbędne aminokwasy i witaminy, oraz biorą udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza (Shetty i in., 2013).

Żadna z czterech testowanych pożywek nie zawierała dodatku mucyny, co prawdopodobnie było przyczyną zaobserwowanej zmniejszonej względnej obfitości bakterii degradujących mucynę takich jak *Akkermansia*, *Prevotella* i *Ruminococcus*. Wzrost obfitości *Clostridium sensu stricto 1*, patogenu oportunistycznego związanego z obniżoną produkcją SCFAs i stanami zapalnymi jelit, zaobserwowany w pożywkach GM, FM i CFBM, może być wywołany spadkiem produkcji SCFAs w badanym układzie modelowym (Hu i in., 2021).

W kolejnym etapie badania oceniono wpływ testowanych mediów hodowlanych na przewidywane funkcje metaboliczne metagenomów, wykorzystując analizę PICRUSt2 opartą na danych z sekwencjonowania 16S rDNA. Zaobserwowano zwiększoną względną obfitość szlaków związanych z biodegradacją i metabolizmem ksenobiotyków we wszystkich badanych grupach w porównaniu do inokulum MIX. Analiza szlaków metabolicznych na poziomie 3 KEGG wykazała wzrost względnej obfitości szlaków związanych z degradacją zanieczyszczeń organicznych, takich jak aminobenzoesan, atrazyna, benzoesan, bisfenol, dioksyny, styren, toluen i ksylen, co sugeruje możliwość zastosowania tych pożywek do hodowli GM *in vitro* w badaniach nad wpływem ksenobiotyków, co jest istotne, biorąc pod uwagę kluczową rolę GM w biotransformacji tych związków. GM zawiera unikatowe enzymy, które m.in. odwracają modyfikacje wprowadzone przez szlaki detoksykacyjne gospodarza (Collins i in., 2020).

Następnie oceniono wpływ zastosowanych podłoży hodowlanych na produkcję SCFAs, takich jak kwas octowy, propionowy, izomasłowy, masłowy, walerianowy oraz izowalerianowy. Analiza została przeprowadzona po 24 h hodowli GM *in vitro*. Podobnie jak w badaniach Yousi i in. (2019), potwierdzono, że skład pożywki hodowlanej znacząco wpływa na profil SCFAs w trakcie hodowli *in vitro*. Hodowla GM w podłożu SM charakteryzowała się najwyższą produkcją SCFAs, przy czym zarówno w SM, jak i GMM, największy udział w profilu SCFAs miał kwas octowy. Podobne wyniki zgłosili Yousi i in. (2019), którzy wykazali, że GMM sprzyjała najwyższej produkcji kwasu octowego spośród badanych podłoży hodowlanych. Dodatkowo, zaobserwowano zwiększoną produkcję kwasu propionowego w SM (1181 ± 233 mg/L) i GMM (1991 ± 249 mg/L). W niniejszej pracy wykazano, że bogate w skład pożywki mikrobiologiczne, takie jak GMM i SM, sprzyjają zwiększonej produkcji SCFAs w porównaniu z pożywkami ubogimi w składniki

odżywcze. Powyższe potwierdza kluczową rolę składu pożywki w regulacji aktywności metabolicznej GM.

Analiza metabolitów GM po 24 h hodowli w różnych podłożach mikrobiologicznych, przeprowadzona za pomocą techniki LC-HR-MS/MS, wykazała, że każda pożywka specyficznie kształtowała profile metabolitów GM. Niemniej jednak, niemal 80% wykrytych związków pozostało niezidentyfikowanych, co utrudniało ocenę wpływu składników pożywek na produkcję poszczególnych metabolitów oraz na funkcjonowanie GM. Analiza KEGG, przeprowadzona na zidentyfikowanych metabolitach, wykazała, że zastosowane podłoża mogą wpływać na szlaki biochemiczne związane z wydzielaniem żółci, biosyntezą nienasyconych kwasów tłuszczowych, metabolizmem kwasu linolowego oraz biosyntezą metabolitów wtórnych, sugerując, że specyficzne metabolity mogą być powiązane z aktywacją tych procesów.

Przeprowadzone badania wykazały, że pożywki o niskiej zawartości węglowodanów (FM, CFBM) znacząco zmniejszały bioróżnorodność GM oraz produkcję SCFAs. Natomiast komercyjny bulion Schaedlera (SM), wzbogacony o 5% krwi owczej i 1,5 mg/L witaminy K₃ wykazał zdolność do utrzymania wysokiej bioróżnorodności i aktywności metabolicznej GM w hodowli *in vitro* oraz istotnie zwiększył relatywną obfitość szlaków biodegradacji ksenobiotyków. W związku z tym, podłoże SM zostało wybrane do kolejnego etapu badań, mającego na celu określenie wpływu BPs na GM. Choć przeprowadzone badania miały pewne ograniczenia, takie jak niemożność hodowli pełnej populacji GM w żadnej z testowanych pożywek, wykazano, że odpowiednio wzbogacona pożywka, taka jak SM, może zachować znaczną część społeczności bakteryjnej. Mimo ograniczeń interpretacyjnych wyniki te stanowią istotny wkład do badań nad hodowlą GM *in vitro*.

Zrealizowanie zadania badawczego 1 umożliwiło realizację zadań badawczych 2-6.

4.2. Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

PUBLIKACJA [P1]

Średnicka P., Juszcuk-Kubiak E., Roszko M.Ł. (2021)

Interakcje związków endokrynnie czynnych obecnych w żywności z mikroflorą jelitową człowieka.

ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 28, 2(127), 36-48.

DOI: 10.15193/zntj/2021/127/376

Strony rozprawy: 69 - 81

**Oświadczenie o wkładzie merytorycznym Autorów
w opracowaniu publikacji ^{1/}**

Paulina Średnicka

Imię i nazwisko

Pracownia Biotechnologii i Inżynierii Molekularnej,
Zakład Mikrobiologii,
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego
- Państwowy Instytut Badawczy
Jednostka Organizacyjna / Instytut / miejsce realizacji pracy doktorskiej

Oświadczenie dotyczy publikacji pt.

Interakcje związków endokrynnie czynnych obecnych w żywności z mikroflorą jelitową człowieka
Tytuł artykułu


ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 2021, 28, 2 (127), 36 – 48;

doi: 10.15193/zntj/2021/127/376

Nazwa czasopisma, rok, numer, strony, DOI



Średnicka Paulina**, Juszcuk-Kubiak Edyta, Roszko Marek

Autorzy: Imię i nazwisko; Imię i nazwisko, Imię i nazwisko; Imię i nazwisko (²)

Lp.	Nazwisko i imię Autora	Opis wkładu merytorycznego	Ew. szacunkowy udział %	Afiliacja	Podpis Autora
1	Średnicka Paulina	Opracowanie koncepcji i celu artykułu przeglądowego, opracowanie układu poszczególnych rozdziałów, dobór źródeł, przygotowanie graficzne figur i tabel, przygotowanie, redakcja manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na	50%	Pracownia Biotechnologii i Inżynierii Molekularnej, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego-Państwowy Instytut Badawczy	

¹ Wypełnia pierwszy Autor, a jeśli pierwszy Autor jest spoza Jednostki organizacyjnej współprowadzącej SD, do której przypisany jest doktorat, najwyżej wymieniany wśród Autorów pracownik danej jednostki współprowadzącej SD

² Zaznaczyć przy odpowiednim nazwisku: */ autor korespondencyjny, **/doktorant. Pozostali autorzy - nazwiska bez zaznaczenia gwiazdką/gwiazdkami.

		uwagi recenzentów			
2	Juszczuk-Kubiak Edyta	Pomoc w opracowaniu koncepcji i celu artykułu, pomoc w doborze odpowiednich źródeł literaturowych, redakcja tekstu manuskryptu, pomoc w odpowiedzi na uwagi recenzentów	25%		
3	Roszko Marek	Pomoc w opracowaniu koncepcji i celu artykułu, pomoc w doborze odpowiednich źródeł literaturowych, redakcja tekstu manuskryptu, pomoc w odpowiedzi na uwagi recenzentów	25%	Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy	

PUBLIKACJA [P2]

Średnicka P., Juszczyk-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

Strony rozprawy: 87 - 107

**Oświadczenie o wkładzie merytorycznym Autorów
w opracowaniu publikacji ^{1/}**

Paulina Średnicka

Imię i nazwisko

Pracownia Biotechnologii i Inżynierii Molekularnej,
Zakład Mikrobiologii,
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego
- Państwowy Instytut Badawczy
Jednostka Organizacyjna / Instytut / miejsce realizacji pracy doktorskiej

Oświadczenie dotyczy publikacji pt.

Probiotics as a biological detoxification tool of food chemical contamination: A review

Tytuł artykułu

Food and Chemical Toxicology, 153. 112306. doi: 10.1016/j.fct.2021.112306

Nazwa czasopisma, rok, numer, strony, DOI

Średnicka Paulina**, Juszcuk-Kubiak Edyta*, Wójcicki Michał, Akimowicz Monika, Roszko Marek

Autorzy: Imię i nazwisko; Imię i nazwisko, Imię i nazwisko, Imię i nazwisko (2)

Lp.	Nazwisko i imię Autora	Opis wkładu merytorycznego	Ew. szacunkowy udział %	Afiliacja	Podpis Autora
1	Średnicka Paulina	Opracowanie koncepcji i celu artykułu przeglądowego, koordynacja i finalizacja struktury poszczególnych rozdziałów, wybór kluczowych źródeł literaturowych, opracowanie graficzne wszystkich figur i tabel, przygotowanie tekstu	50%	Pracownia Biotechnologii i Inżynierii Molekularnej, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy	<i>Średnicka</i>

¹ Wypełnia pierwszy Autor, a jeśli pierwszy Autor jest spoza Jednostki organizacyjnej współprowadzącej SD, do której przypisany jest doktorat, najwyżej wymieniany wśród Autorów pracownik danej jednostki współprowadzącej SD

² Zaznaczyć przy odpowiednim nazwisku: */ autor korespondencyjny, **/doktorant. Pozostali autorzy - nazwiska bez zaznaczenia gwiazdką/gwiazdkami.

		manuskryptu, redakcją oraz opracowanie odpowiedzi na uwagi recenzentów			
2	Juszczuk-Kubiak Edyta	Pomoc w opracowaniu koncepcji i celu artykułu, redakcja tekstu manuskryptu, pomoc w odpowiedzi na uwagi recenzentów	20%		
3	Wójcicki Michał	Pomoc w przeglądzie literatury.	5%		
4	Akimowicz Monika	Pomoc w przeglądzie literatury.	5%		
5	Roszek Marek	Pomoc w opracowaniu koncepcji i celu artykułu, redakcja tekstu manuskryptu, pomoc w odpowiedzi na uwagi recenzentów	20%	Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy	

PUBLIKACJA [P3]

Średnicka P., Roszko M.Ł., Popowski D., Kowalczyk M., Wójcicki M., Emanowicz P., Szczepańska M., Kotyrba D., Juszczyk-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

Strony rozprawy 113 - 137

Oświadczenie o wkładzie merytorycznym Autorów
w opracowaniu publikacji ^{1/}

Paulina Średnicka

Imię i nazwisko

Pracownia Biotechnologii i Inżynierii Molekularnej,
Zakład Mikrobiologii,
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego
- Państwowy Instytut Badawczy
Jednostka Organizacyjna / Instytut / miejsce realizacji pracy doktorskiej

Oświadczenie dotyczy publikacji pt.

Effect of *in vitro* cultivation on human gut microbiota composition using 16S rDNA amplicon sequencing and metabolomics approach.



Tytuł artykułu

Scientific Reports, 13, 3026. DOI: 10.1038/s41598-023-29637-2

Nazwa czasopisma, rok, numer, strony, DOI



Średnicka P.**, Roszko M.L., Popowski D., Kowalczyk M., Wójcicki M., Emanowicz P.,
Szczepańska M., Kotyrba D., Juszcuk-Kubiak E.*

Autorzy: Imię i nazwisko; Imię i nazwisko; Imię i nazwisko; Imię i nazwisko (2)

Lp.	Nazwisko i imię Autora	Opis wkładu merytorycznego	Ew. szacunkowy udział %	Afiliacja	Podpis Autora
1	Średnicka Paulina	Konceptualizacja, metodologia, analiza formalna i statystyczna, przygotowanie oryginalnego draftu, pisanie — recenzja i edycja, prowadzenie badań, wizualizacja	50%	Pracownia Biotechnologii i Inżynierii Molekularnej, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy	
2	Roszko Marek	Konceptualizacja, metodologia, prowadzenie badań, pisanie- recenzja, edycja, nadzór	10%	Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy	

¹ Wypełnia pierwszy Autor, a jeśli pierwszy Autor jest spoza Jednostki organizacyjnej współprowadzącej SD, do której przypisany jest doktorat, najwyżej wymieniany wśród Autorów pracownik danej jednostki współprowadzącej SD

¹ Zaznaczyć przy odpowiednim nazwisku: */ autor korespondencyjny, **/doktorant. Pozostali autorzy - nazwiska bez zaznaczenia gwiazdką/gwiazdkami.

3	Popowski Dominik	Analiza formalna i statystyczna, pisanie — recenzja i edycja	5%	Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego Państwowy Instytut Badawczy Mikrobiota Lab, Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii, Warszawski Uniwersytet Medyczny	
4	Kowalczyk Monika	Prowadzenie badań	5%	Pracownia Biotechnologii i Inżynierii Molekularnej, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy	
5	Wójcicki Michał	Prowadzenie badań	4%		
6	Emanowicz Paulina	Prowadzenie badań	2%		
7	Szczepańska Magdalena	Prowadzenie badań	2%	Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy	
8	Kotyriba Danuta	Analiza statystyczna	2%	Dział Koordynacji Badań, Informacji Naukowej i Marketingu, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy	
9	Juszczuk-Kubiak Edyta	Konceptualizacja, metodologia, pisanie — recenzja i edycja, nadzór	20%	Pracownia Biotechnologii i Inżynierii Molekularnej, Zakład Mikrobiologii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego- Państwowy Instytut Badawczy	

¹ Wypełnia pierwszy Autor, a jeśli pierwszy Autor jest spoza Jednostki organizacyjnej współprowadzącej SD, do której przypisany jest doktorat, najwyżej wymieniany wśród Autorów pracownik danej jednostki współprowadzącej SD

¹ Zaznaczyć przy odpowiednim nazwisku: */ autor korespondencyjny, **/doktorant. Pozostali autorzy - nazwiska bez zaznaczenia gwiazdką/gwiazdkami.

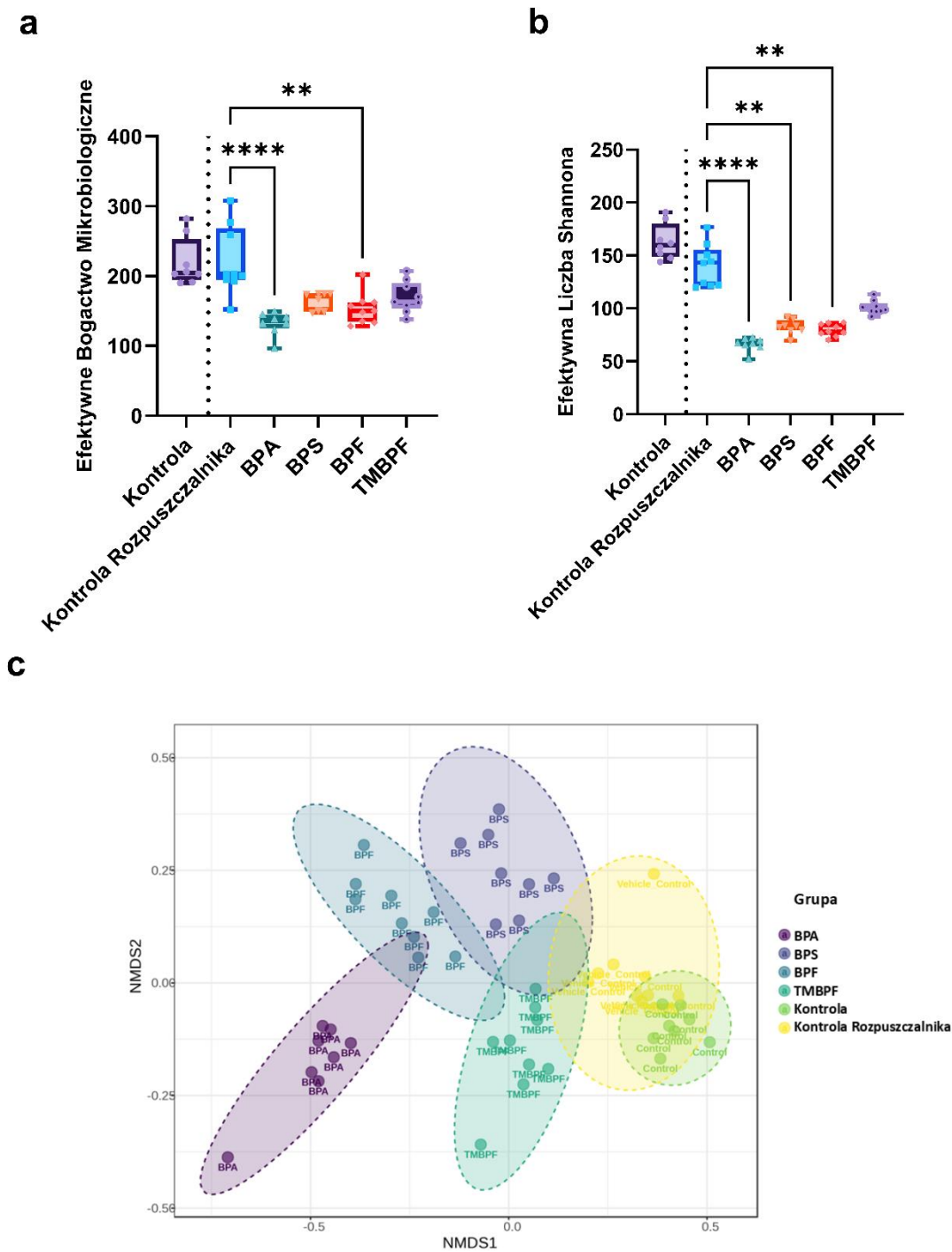
5. MATERIAŁY NIEOPUBLIKOWANE

5.1. Wyniki części nieopublikowanej

5.1.1. Wpływ bisfenoli (BPs) na profil taksonomiczny mikrobioty jelitowej (GM)

ZADANIE BADAWCZE 2: Zbadanie wpływu wybranych związków endokrynnie czynnych na profil taksonomiczny oraz α i β różnorodność mikrobioty jelitowej człowieka.

Określono wpływ czterech BPs (BPA, BPS, BPF, TMBPF) na zmiany profilu taksonomicznego GM, wykorzystując metryki α -różnorodności, takie jak Wskaźnik Efektywnego Bogactwa Mikrobiologicznego (**Rysunek 2a**) oraz Wskaźnik Efektywnej Liczby Shannona (**Rysunek 2b**). Analiza porównawcza wykazała, że BPA ($p < 0,0001$) i BPF ($p < 0,01$) znacząco obniżyły zarówno Efektywne Bogactwo Mikrobiologiczne, jak i Wskaźnik Efektywnej Liczby Shannona w porównaniu do grupy kontrolnej rozpuszczalnika. BPS nie wpłynął znacząco na Efektywne Bogactwo Mikrobiologiczne, ale obniżył Wskaźnik Efektywnej Liczby Shannona ($p < 0,01$). TMBPF był jedynym BP, który nie wpłynął na α -różnorodność w żadnej z wyżej wymienionych metryk. Analiza β -różnorodności, była oparta na metryce odmienności Bray-Curtis i wykazała istotne zmiany w strukturze społeczności GM między grupą kontrolną rozpuszczalnika a badanymi związkami z wykorzystaniem testu PERMANOVA (BPA $p \leq 0,001$; BPS $p \leq 0,001$; BPF $p \leq 0,001$; TMBPF $p \leq 0,001$). Wyniki β -różnorodności zostały zilustrowane na wykresie NMDS (**Rysunek 2c**). Hodowle GM poddane ekspozycji na BPA tworzyły odrębny klaster, wyraźnie oddzielony od grup kontrolnych (kontrola i kontrola rozpuszczalnika), co wskazuje na zmianę profilu taksonomicznego GM. Nakładanie się i bliskość grup BPS, BPF i TMBPF wskazuje na podobieństwo w indukowanych przez BPs zmianach profili taksonomicznych GM. Bliskość klastrów grupy kontrolnej i grupy kontrolnej rozpuszczalnika wskazuje na minimalny wpływ rozpuszczalnika użytego w eksperymencie na strukturę społeczności GM.



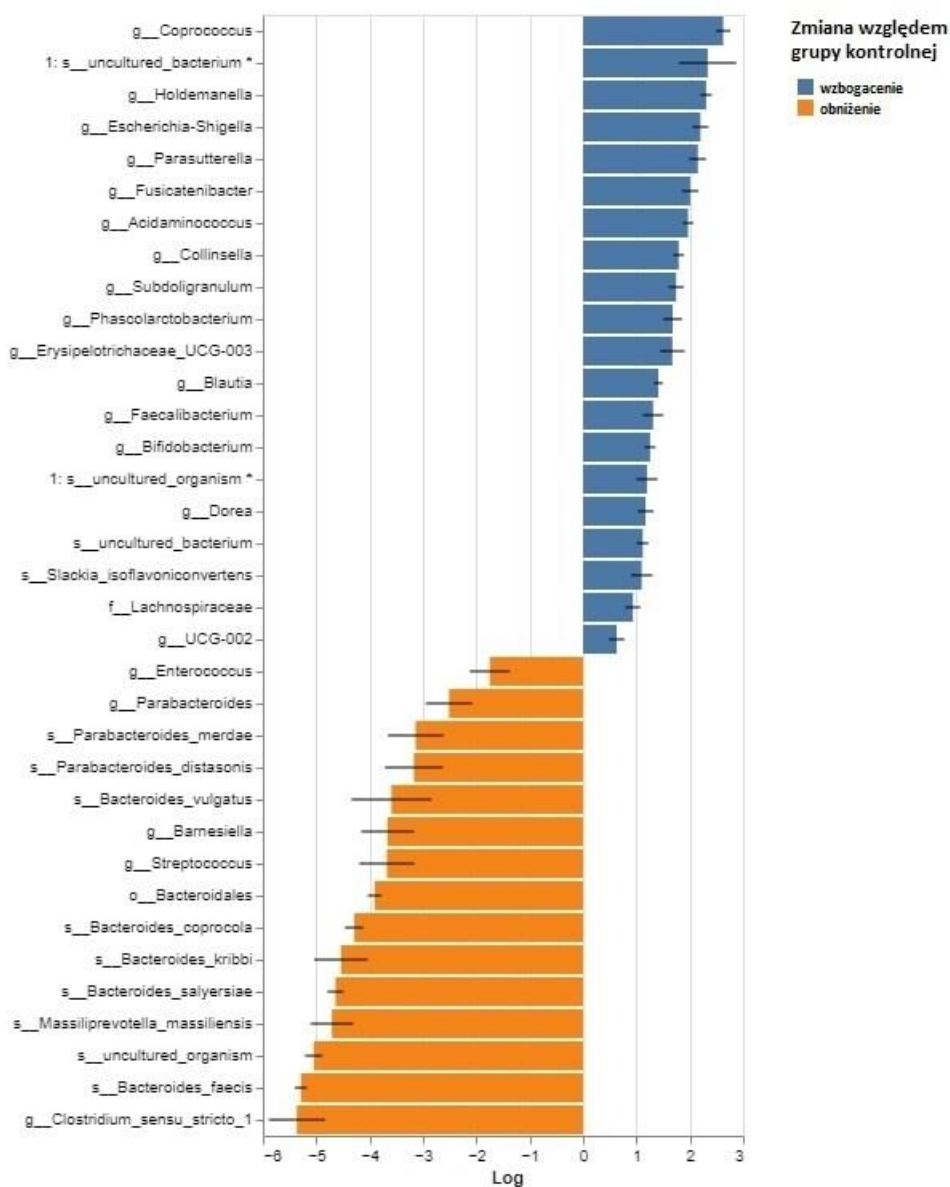
Rysunek 2. α -różnorodność GM przedstawiona jako **(a)** Efektywne Bogactwo Mikrobiologiczne oraz **(b)** Efektywna Liczba Shannona po 48 h hodowli GM z BPA, BPS, BPF i TMBPF w porównaniu do grupy kontrolnej rozpuszczalnika ($n = 9$). Analiza β -różnorodności przedstawiona jest jako **(c)** wykres NMDS bazujący na metryce odległości Bray-Curtis ($R^2: 0,57872$; $p = 0,001$; stres NMDS = $0,14718$). Elipsy zostały narysowane na podstawie 95% przedziału ufności dla każdej grupy.

Stwierdzone różnice w β -różnorodności posłużyły jako podstawa do przeprowadzenia analizy ANCOM-BC. Ta metoda umożliwia identyfikację taksonów bakteryjnych, które wykazują statystycznie istotne różnice w względnej obfitości pomiędzy porównywanymi grupami eksperymentalnymi a grupą kontrolną rozpuszczalnika. Ekspozycja na BPA znacząco zmieniła skład taksonomiczny GM, zwiększając względną obfitość 20 taksonów i redukując 15 (**Rysunek 3a**). Wzrost o ponad 2 logarytmy odnotowano dla taksonów takich jak *Fusicatenibacter*, *Parasutterella*, *Escherichia-Shigella*, *Holdemanella*, niehodowalna bakteria z rodzaju *Allisonella* oraz *Coprococcus*. Największy spadek (< -5 log) dotyczył *Bacteroides faecis* i *Clostridium sensu stricto 1*. Na poziomie typu odnotowano znaczną redukcję Bacteroidetes (synonim Bacteroidota) ($< -3,5$ log) oraz niewielki wzrost Proteobacteria ($\sim 0,5$ log) (**Rysunek 4a**).

Ekspozycja na BPS spowodowała wzrost względnej obfitości dwóch taksonów (*Erysipelotrichaceae* UCG 003 i *Acidaminococcus*) oraz redukcję ośmiu, z największym obniżeniem w przypadku *Clostridium sensu stricto 1* (< -4 log) (**Rysunek 3b**). Na poziomie typu ekspozycja na BPS spowodowała niewielki spadek Bacteroidetes ($< -0,7$ log) oraz Proteobacteria ($> -0,5$ log) (**Rysunek 4b**). Ekspozycja na BPF spowodowała zwiększenie względnej obfitości 16 taksonów, z *Oscillospiraceae* odnotowującym największy wzrost (> 5 log), a także zmniejszenie obfitości 11 taksonów, z *Bacteroides faecis* wykazującym największy spadek (~ -6 log) (**Rysunek 3c**). Zmiany na poziomie typu obejmowały niewielkie wzbogacenie w Actinobacteria i Firmicutes ($< 0,3$ log) oraz redukcje w Proteobacteria ($\sim -0,6$ log) i Bacteroidetes ($< -1,4$ log) (**Rysunek 4c**). TMBPF wykazał najmniejszy efekt na strukturę GM w porównaniu do innych badanych BPs, wpływając tylko na cztery taksony: *Barnesiella*, *Bacteroides*, *Bacteroides faecis* i *Bacteroides vulgatus* (**Rysunek 3d**). Na poziomie typu, analiza wykazała niewielkie wzbogacenie Actinobacteria ($> 0,2$ log) oraz redukcję Bacteroidetes ($< -0,8$ log) (**Rysunek 4d**).

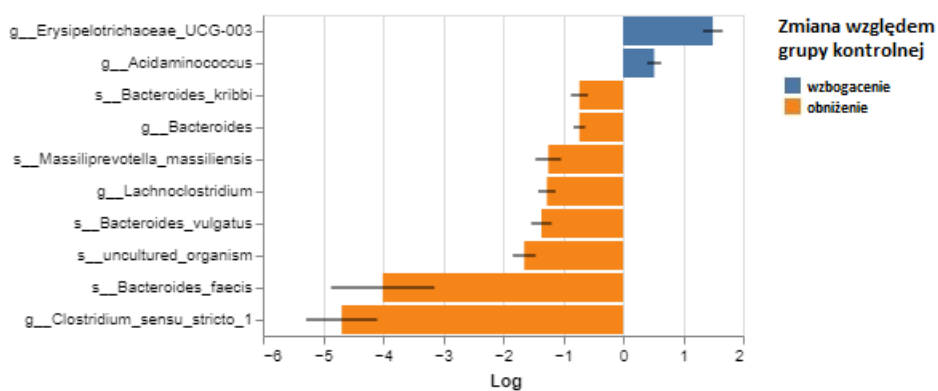
a

BPA vs. Kontrola Rozpuszczalnika

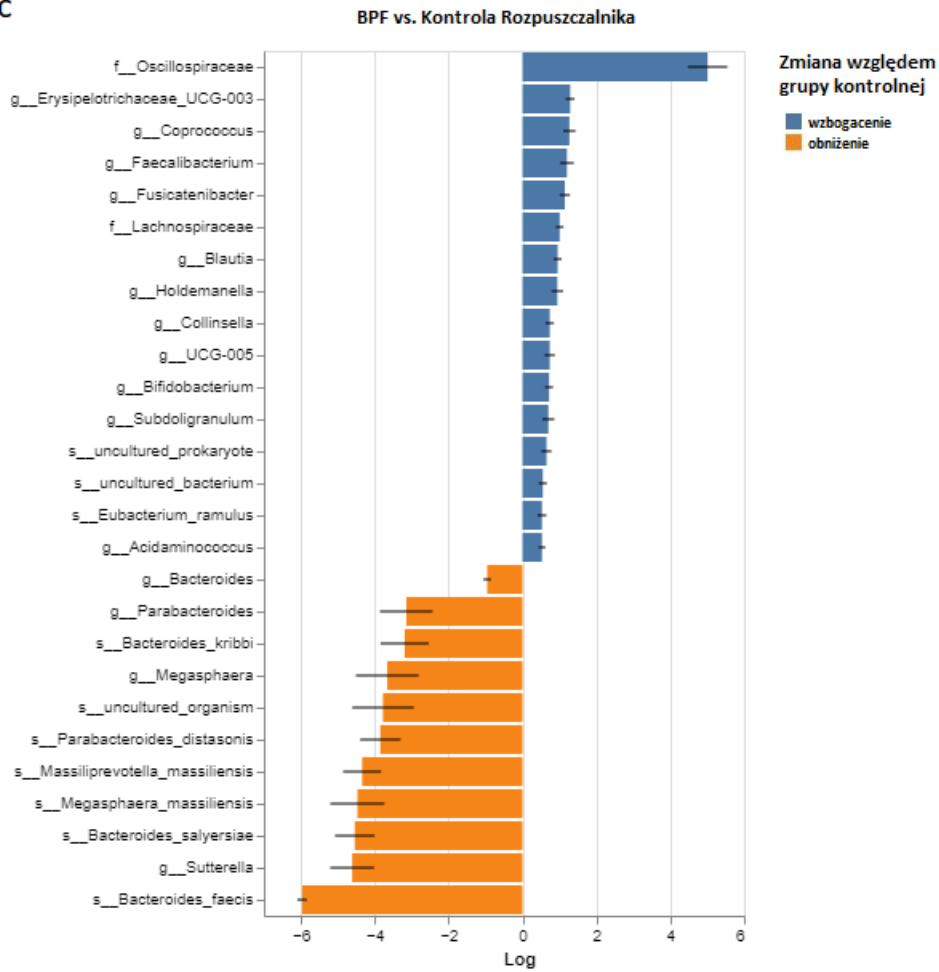


b

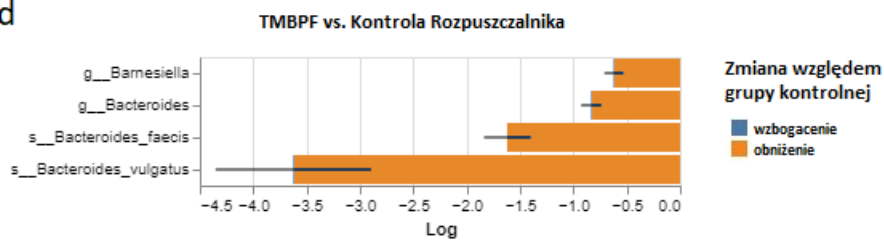
BPS vs. Kontrola Rozpuszczalnika



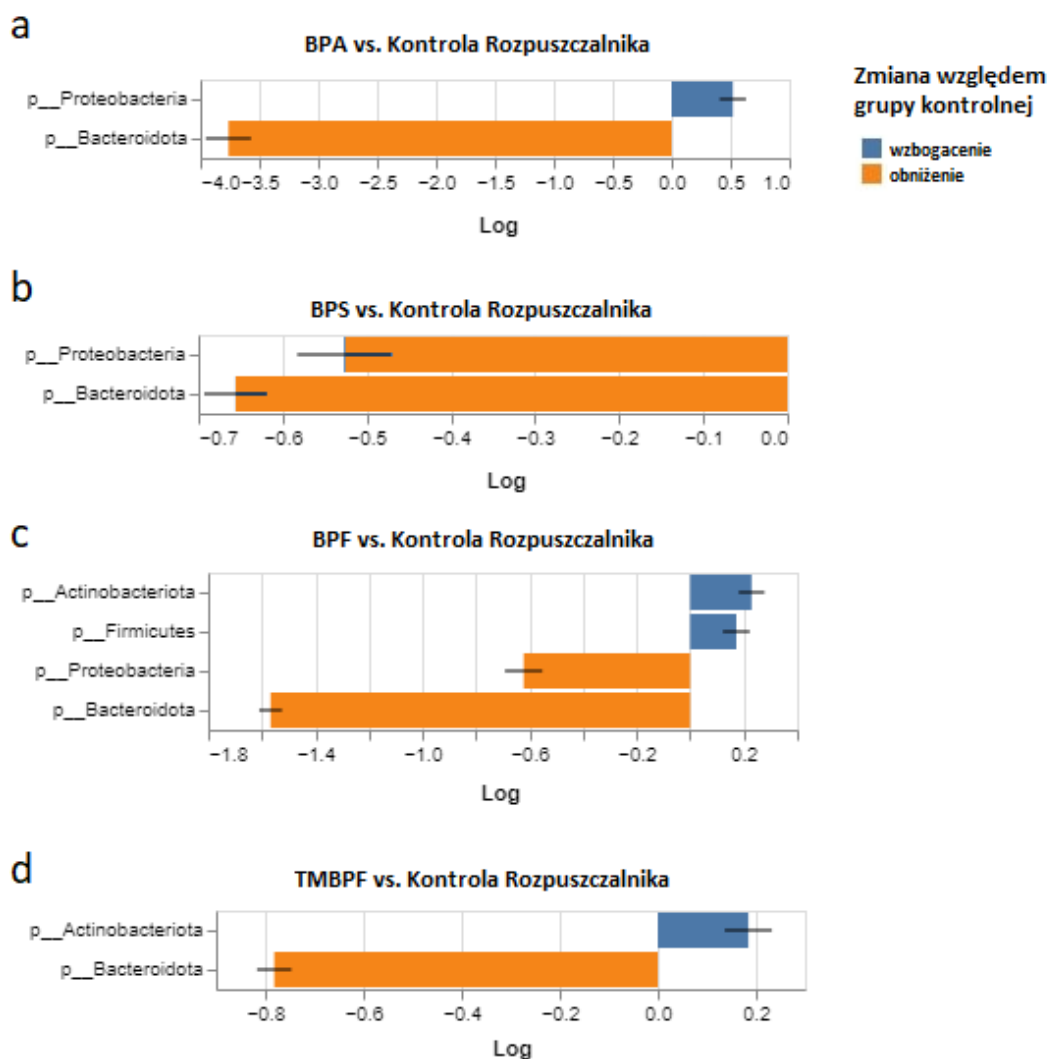
C



d



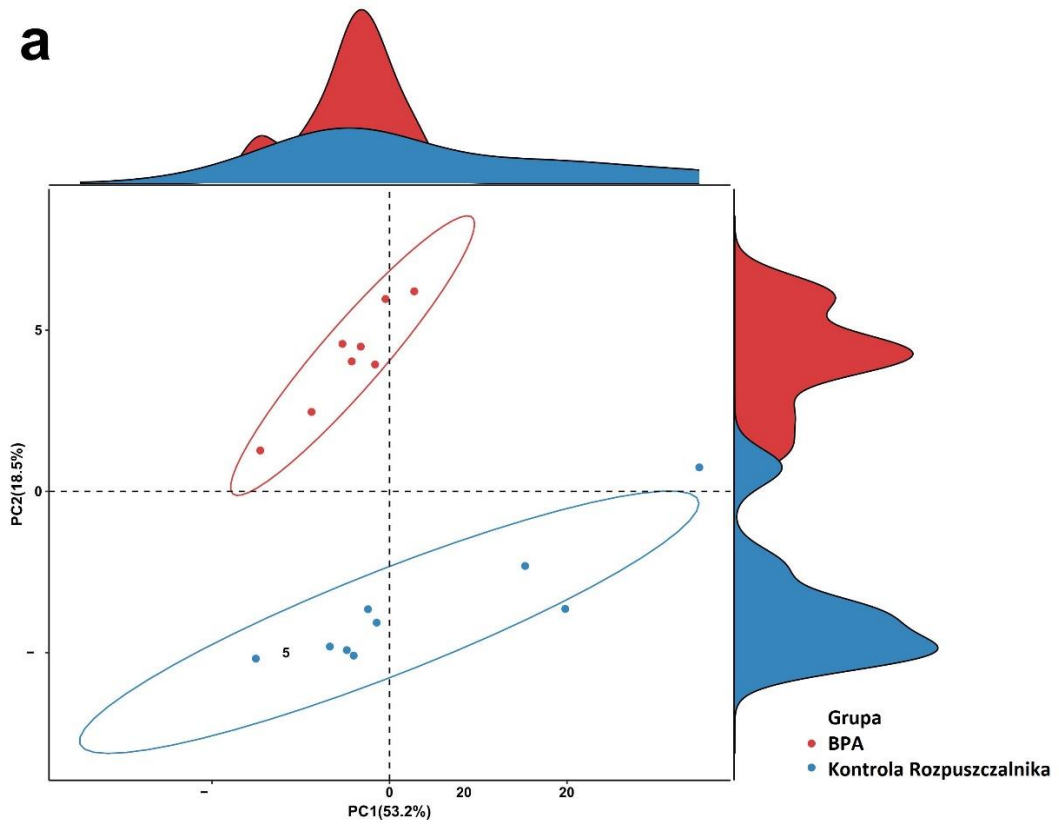
Rysunek 3: Analiza ANCOM-BC przedstawiająca zmiany logarytmiczne w względnej obfitości poszczególnych taksonów bakteryjnych pomiędzy porównywanymi grupami: BPA (a), BPS (b), BPF (c) oraz TMBPF (d) a grupą kontrolną rozpuszczalnika na poziomie gatunku i rodzaju.



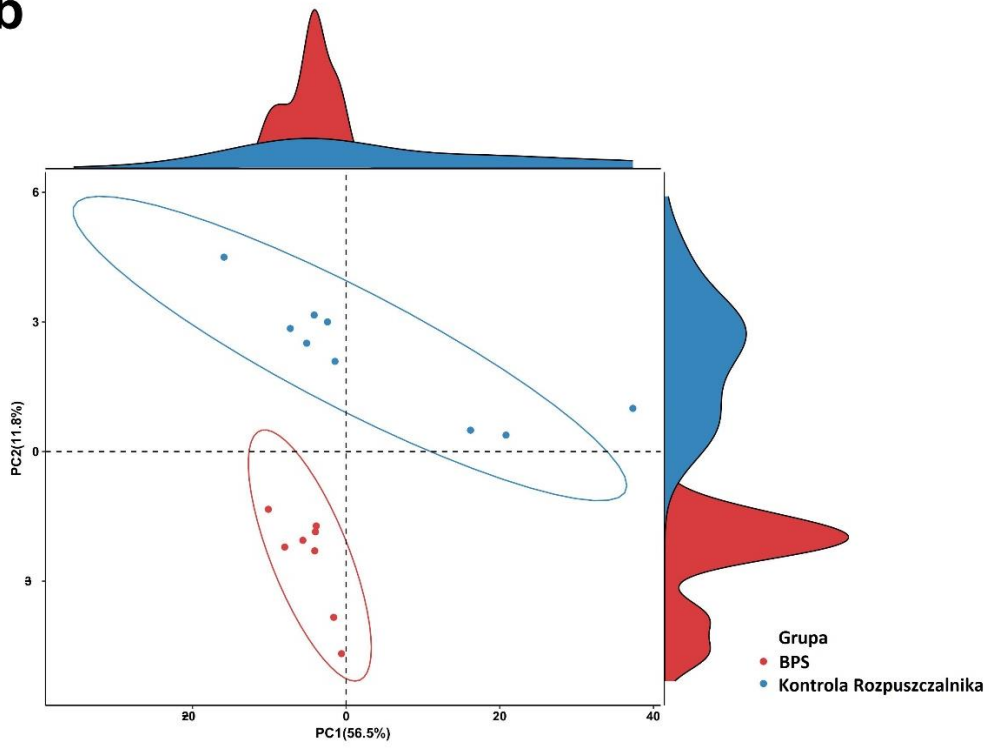
Rysunek 4. Analiza ANCOM-BC przedstawiająca zmiany logarytmiczne w względnej obfitości poszczególnych taksonów bakteryjnych pomiędzy porównywanymi grupami: BPA (a), BPF (b), BPS (c) oraz TMBPF (d) a grupą kontrolną rozpuszczalnika na poziomie na poziomie typu.

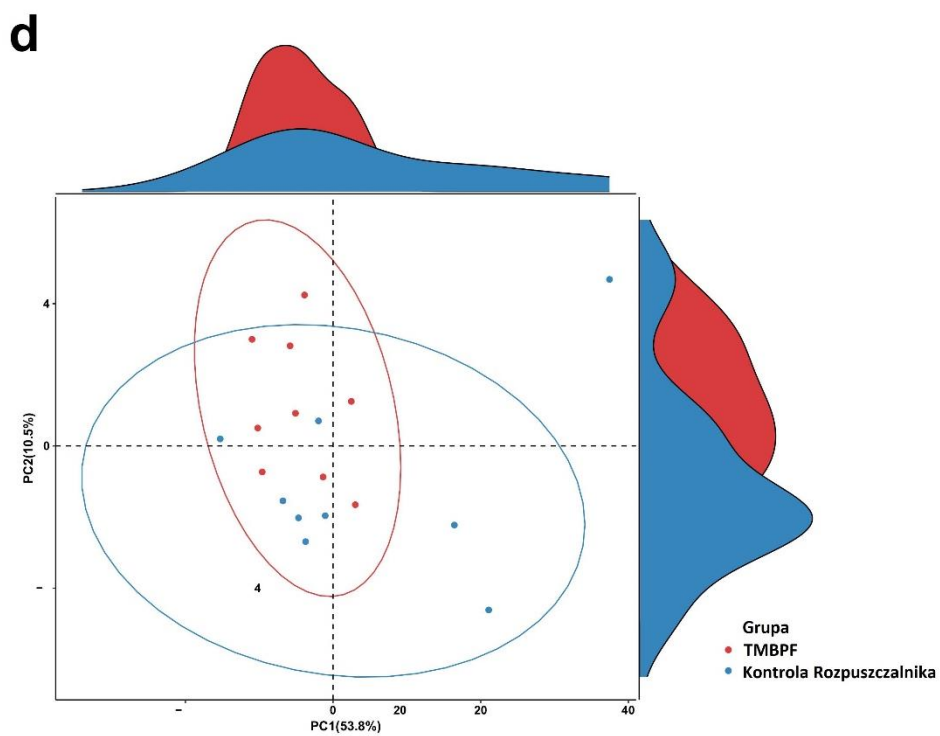
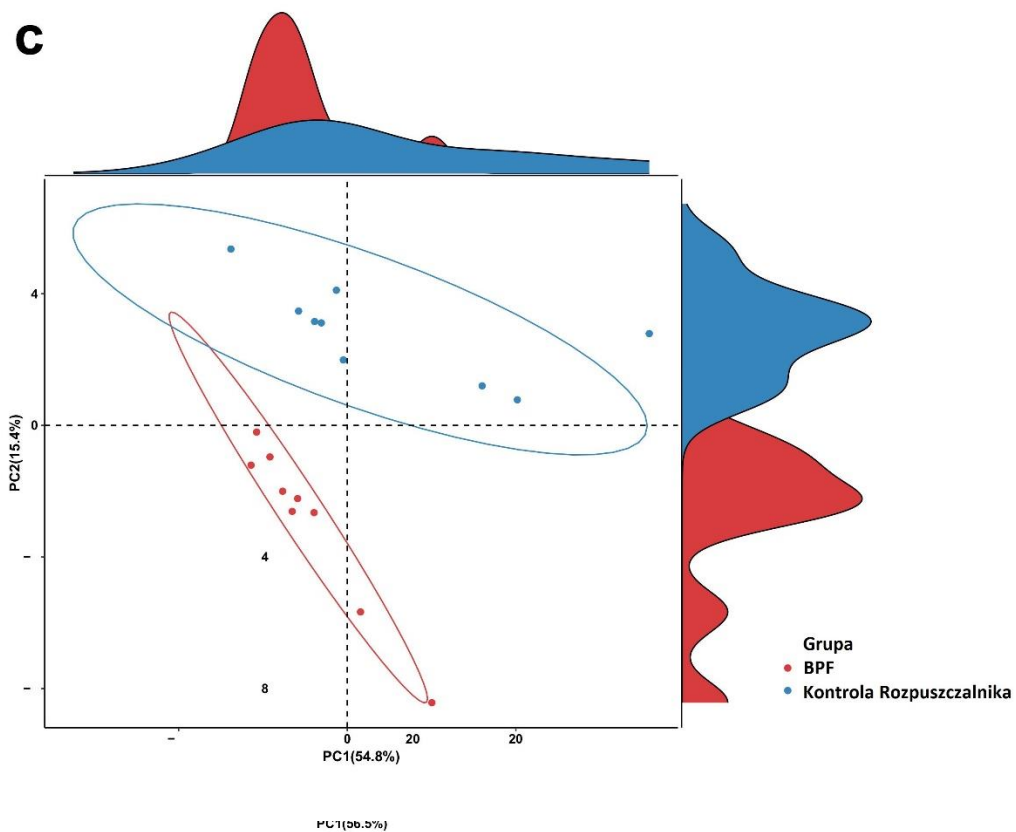
W celu określenia zmian strukturalnych GM po ekspozycji na BPs oraz ich wpływu na aktywność metaboliczną, zastosowano analizę PICRUST2 do przewidywania funkcjonalnych szlaków metabolicznych na bazie sekwencji 16s rDNA. Analiza PCA przedstawiająca zmiany we względnej obfitości szlaków metabolicznych na poziomie 3 KEGG wykazała wyraźne rozdzielanie między grupą kontrolną rozpuszczalnika a grupami poddanymi ekspozycji na BPA, BPS i BPF (Rysunek 5a-c). Natomiast próbki poddane ekspozycji na TMBPF grupowały się w obrębie klastru tworzonoego przez grupę kontrolną rozpuszczalnika (Rysunek 5d).

a



b





Rysunek 5. Wykresy PCA ukazujące różnice w profilach funkcjonalnych GM między grupą kontrolną rozpuszczalnika a grupami poddanymi ekspozycji na BPA (**a**), BPS (**b**), BPF (**c**) oraz TMBPF (**d**). Funkcje metaboliczne mikrobiomu na poziomie 3 KEGG zostały

przewidziane za pomocą algorytmu PICRUSt2, opierając się na danych uzyskanych z sekwencjonowania genu 16S rDNA.

W celu identyfikacji szlaków metabolicznych istotnie zmienionych po ekspozycji na badane związki, przeprowadzono analizę różnicową obfitości LinDA, koncentrując się na 20 szlakach wykazujących istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą eksperymentalną, a grupą kontrolną rozpuszczalnika. Ekspozycja na BPA wpłynęła istotnie na zmiany profilu 118 szlaków metabolicznych, co stanowiło największą liczbę zmian w porównaniu do pozostałych analizowanych BPs. Wśród tych 20 szlaków wykazujących istotne różnice, zidentyfikowano szlaki związane z metabolizmem i przetwarzaniem informacji środowiskowych (poziom 1 KEGG) (**Tabela A1**) obejmujące transdukcję sygnałów, biosyntezę innych metabolitów wtórnych, metabolizm węglowodanów, biosyntezę i metabolizm glikanów, metabolizm kofaktorów i witamin, oraz biodegradację i metabolizm ksenobiotyków (poziom 2 KEGG). Istotny statystycznie spadek zaobserwowano w szlaku sygnalizacji wapniowej ($\sim -0,2$ log), natomiast istotnie statystycznie wzrost odnotowano w szlaku degradacji toluenu ($\sim 1,5$ log).

Ekspozycja na BPS wpłynęła łącznie na 86 szlaków metabolicznych, z których 20 o największych różnicach w odniesieniu do grupy kontrolnej rozpuszczalnika, było głównie powiązanych z metabolizmem (poziom 1 KEGG) (**Tabela A2**). Znaczące obniżenie relatywnej obfitości odnotowano w szlakach związanych z biosyntezą metabolitów wtórnych, metabolizmem węglowodanów, biosyntezą i metabolizmem glikanów oraz metabolizmem lipidów (poziom 2 KEGG). Jednocześnie, zaobserwowano wzrost relatywnej obfitości szlaków związanych z metabolizmem kofaktorów i witamin, z wyjątkiem kwasu liponowego, który wykazał niewielki spadek. Dodatkowo, stwierdzono wzbogacenie szlaków biodegradacji i metabolizmu ksenobiotyków, obejmujące degradację toluenu, benzoenu, metabolizm ksenobiotyków przez cytochrom P450 oraz metabolizm leków przez cytochrom P450.

W przypadku ekspozycji na BPF, zaobserwowano znaczącą modyfikację relatywnej obfitości 113 szlaków metabolicznych, z których 20 wykazujących istotnie statystycznie różnice było powiązanych z metabolizmem (poziom 1 KEGG) (**Tabela A3**). Odnotowano istotną statystycznie redukcję relatywnej obfitości szlaków metabolizmu aminokwasów, biosyntezy metabolitów wtórnych, biosyntezy i metabolizmu glikanów, metabolizmu lipidów, metabolizmu kofaktorów i witamin, metabolizmu terpenoidów i poliketydów oraz biodegradacji i metabolizmu ksenobiotyków (poziom 2 KEGG). Największa redukcja

relatywnej obfitości dotyczyła szlaków degradacji glikozoaminoglikanów oraz biosyntezy glikosfingolipidów (-2,5 log). Ekspozycja na BPF była również skorelowana ze spadkiem relatywnej obfitości szlaku metabolizmu ksenobiotyków przez cytochrom P450 i metabolizmu leków przez cytochrom P450 (-1,25 log), oraz degradacji toluenu (< -1 log).

W toku przeprowadzonych badań wykazano, że ekspozycja na TMBPF spowodowała najmniej istotny statystycznie wpływ na funkcjonalne szlaki metaboliczne GM w porównaniu do pozostałych badanych BPs. TMBPF wpłynął jedynie na 60 szlaków, z czego 20 najbardziej zmienionych dotyczyło metabolizmu na poziomie 1 KEGG (**Tabela A4**). Zaobserwowano znaczące obniżenie relatywnej obfitości szlaków dotyczących biosyntezy metabolitów wtórnych, metabolizmu węglowodanów, biosyntezy i metabolizmu glikanów, metabolizmu lipidów, metabolizmu kofaktorów i witamin, oraz metabolizmu innych aminokwasów. Istotnie najwyższy spadek relatywnej obfitości zaobserwowano w szlakach dotyczących biosyntezy glikosfingolipidów oraz degradacji glikozoaminoglikanów (~ -1,2 log). Dodatkowo, zaobserwowano niewielki wzrost względnej obfitości szlaku degradacji benzoenu (0,2 log) co odpowiada kategorii biodegradacji i metabolizmu ksenobiotyków (poziom 2 KEGG).

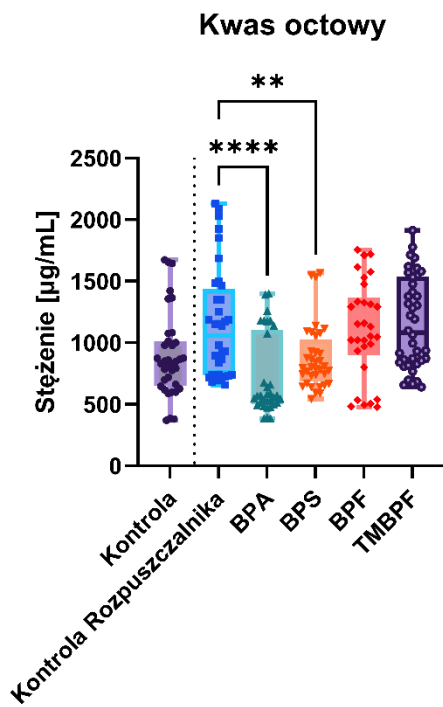
5.1.2. Wpływ ekspozycji na bisfenoli (BPs) na produkcję krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (BPs) przez mikrobiotę jelitową (GM)

ZADANIE BADAWCZE 3: Określenie zmian w profilach metabolicznych mikrobioty jelitowej pod wpływem badanych związków, ze szczególnym uwzględnieniem zmian w produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych.

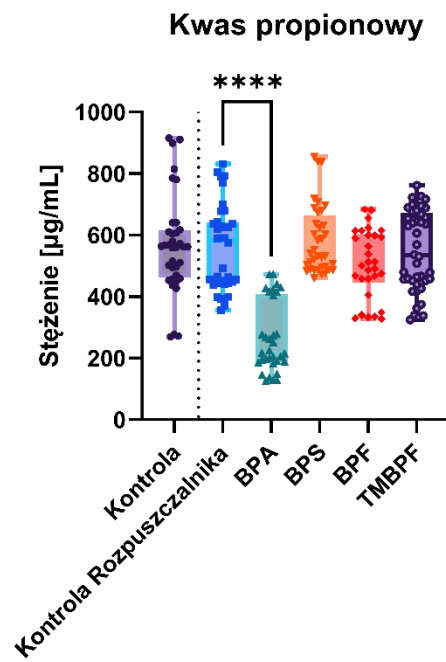
Wpływ BPs na produkcję SCFAs przez GM, w tym kwasu octowego, propionowego, masłowego, walerianowego i izowalerianowego, został przedstawiony na **Rysunku 7**. Hodowle GM poddane ekspozycji na BPA wykazały istotny spadek produkcji kwasów octowego, propionowego, izomasłowego, walerianowego i izowalerianowego, z wyjątkiem kwasu masłowego, którego produkcja wzrosła o około 12% (**Rysunek 7a-f**). Największą redukcję odnotowano w przypadku kwasów izowalerianowego i izomasłowego, z obniżeniem produkcji o odpowiednio około 87% i 84%. Ponadto, produkcja kwasu propionowego zmniejszyła się o 53%, kwasu walerianowego o 49%, a kwasu octowego o około 37% w porównaniu z grupą kontrolną rozpuszczalnika.

Ekspozycja na BPS wiązała się ze zmniejszoną produkcją czterech SCFAs: izowalerianowego, izomasłowego, walerianowego i octowego, z obniżeniem produkcji odpowiednio o ~84%, 81%, 56% i 23%. Z kolei ekspozycja na BPF spowodowała największy spadek w produkcji kwasu izowalerianowego, redukując go o około 91%. Znaczące obniżenie produkcji SCFAs odnotowano także w przypadku kwasów izomasłowego i walerianowego, z redukcją odpowiednio o około 84% i 83%. TMBPF miał niewielki wpływ na produkcję SCFAs, z wyjątkiem kwasu izomasłowego, którego spadek wyniósł około 30%. W grupie kontrolnej rozpuszczalnika całkowita produkcja SCFAs wynosiła $5256,55 \pm 846,04 \mu\text{g/mL}$. W hodowlach GM po ekspozycji na BPs, zaobserwowano następującą redukcję całkowitej produkcji SCFAs: około 28% dla BPA, 23% dla BPF i 22% dla BPS (**Rysunek 7g**). W przypadku TMBPF nie odnotowano istotnych zmian w całkowitej produkcji SCFAs przez GM.

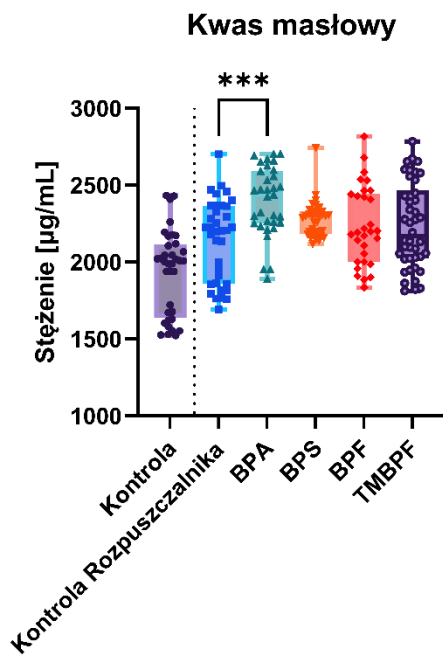
a



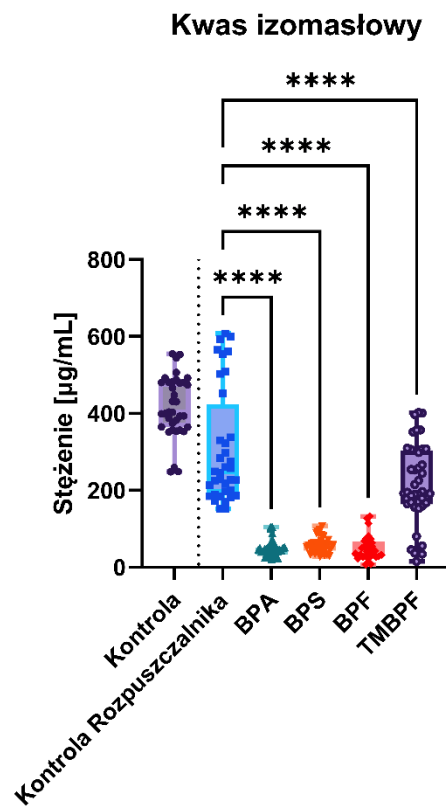
b

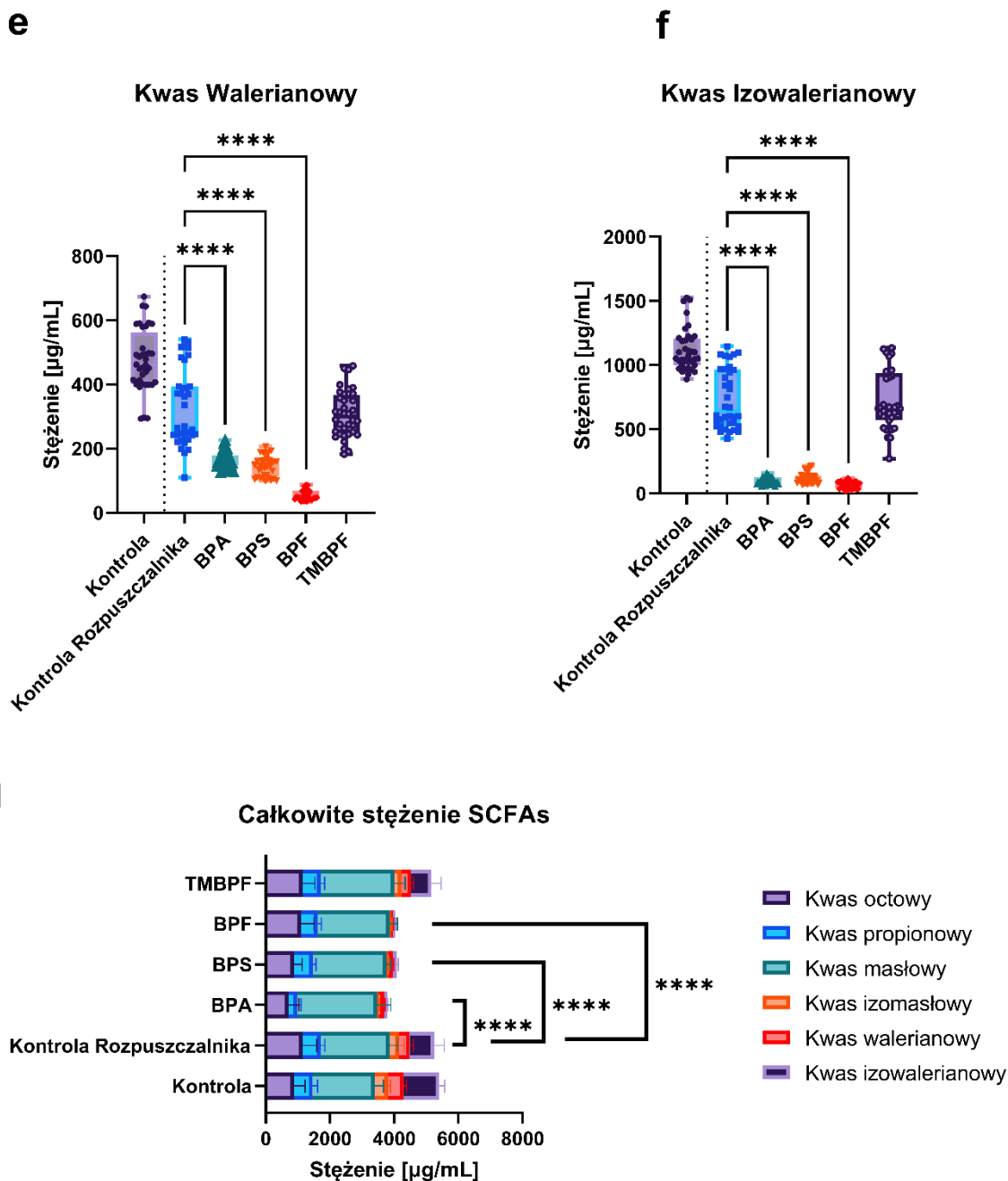


c



d





Rysunek 7: Wpływ ekspozycji na BPs na produkcję SCFAs przez GM po 48 h hodowli. Rysunek ten prezentuje poziomą produkcję poszczególnych SCFA: kwasu octowego (**a**), kwasu propionowego (**b**), kwasu masłowego (**c**), kwasu izomasłowego (**d**), kwasu walerianowego (**e**) oraz kwasu izowalerianowego (**f**), a także całkowitą produkcję SCFAs (**g**).

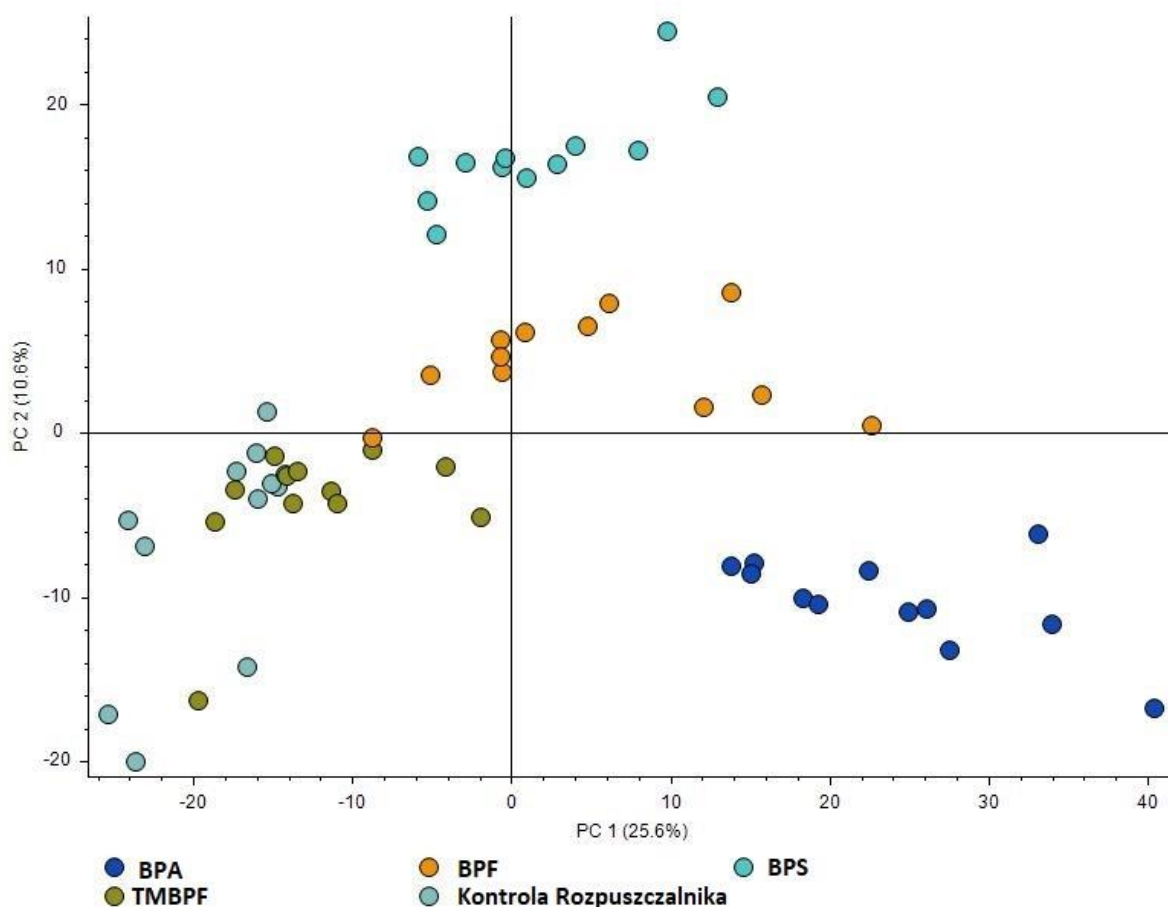
5.1.3. Wpływ ekspozycji bisfenoli (BPs) na profil metaboliczny mikrobioty jelitowej (GM)

Analiza profilu zewnątrzkomórkowych metabolitów w supernatantach po hodowli GM z BPs została przeprowadzona za pomocą UHPLC-HESI-MS. W **Tabeli 2** zestawiono metabolity wykazujące co najmniej dziesięciokrotną różnicę powierzchni piku pomiędzy badanymi grupami a grupą kontrolną rozpuszczalnika. Ekspozycja na BPA wpłynęła istotnie na profil metabolitów, prowadząc do wzrostu sześciu niezidentyfikowanych metabolitów oraz spadku 14 innych. Należy zaznaczyć, że 12 z tych metabolitów wykazało podobne obniżenie po ekspozycji na BPS i BPF. TMBPF wywarł jedynie niewielki wpływ, powodując istotne podwyższenie poziomu jednego metabolitu (niezidentyfikowany metabolit 9). Profilowanie metabolitów ujawniło także spadek poziomu kwasu walerianowego po ekspozycji na BPF, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami w zakresie analizy SCFAs, która również wykazała znaczące obniżenie stężenia tego kwasu, o około 90%. Powyższe wyniki zostały zilustrowane na wykresie PCA (**Rysunek 8**). Grupa poddana ekspozycji na BPA jest wyraźnie oddzielona od grupy kontrolnej rozpuszczalnika, a grupy poddane ekspozycji na BPS i BPF są mniej wyraźnie, ale zauważalnie oddzielone (**Rysunek 8**). TMBPF wywarł najmniejszy wpływ na ogólny profil metabolitów spośród wszystkich badanych BPs, grupując się blisko grupy kontrolnej rozpuszczalnika. Ponadto, grupa po ekspozycji na BPA wykazywała najwyższą zmienność wewnątrzgrupową, rozkładając się szeroko wzdłuż obu głównych osi składowych. Sugeruje to wysoki stopień zróżnicowania odpowiedzi metabolicznych GM na ekspozycję na BPA.

Tabela 2. Lista zewnątrzkomórkowych metabolitów GM, których poziom uległ zmianie po 48 h hodowli *in vitro* z BPA, BPS, BPF lub TMBPF w odniesieniu do grupy kontrolnej rozpuszczalnika.

Grupa	Nazwa	m/z	RT [min.]	Powierzchnia (Max.)
BPA ↑	niezidentyfikowany metabolit 1	732,3583	6,526	14873023
BPA ↑	niezidentyfikowany metabolit 2	193,0871	10,25	9748534
BPA ↑	niezidentyfikowany metabolit 3	187,0377	1,243	57509482
BPA ↑	niezidentyfikowany metabolit 4	642,3475	6,937	8647136
BPA ↑	niezidentyfikowany metabolit 5	166,059	1,25	6,11E+08
BPA ↑	niezidentyfikowany metabolit 6	165,0558	1,253	5,7E+09
BPF ↑	niezidentyfikowany metabolit 7	262,145	8,917	81406749
BPS ↑, BPF ↑	niezidentyfikowany metabolit 8	210,0749	0,805	15155391
TMBPF ↑	niezidentyfikowany metabolit 9	147,015	13,115	17236503
BPA ↓, BPS ↓, BPF ↓	niezidentyfikowany metabolit 10	159,023	1,132	39734959
BPA ↓, BPS ↓, BPF ↓	niezidentyfikowany metabolit 11	301,0835	1,256	32873426
BPA ↓	niezidentyfikowany metabolit 12	192,1032	7,18	17823763
BPA ↓, BPS ↓, BPF ↓	niezidentyfikowany metabolit 13	158,0613	8,944	23804221
BPA ↓, BPS ↓, BPF ↓	niezidentyfikowany metabolit 14	309,0537	1,3	1,08E+08
BPA ↓, BPS ↓, BPF ↓	niezidentyfikowany metabolit 15	275,0693	1,233	1,39E+08
BPA ↓	Fenol	93,03486	5,98	3,21E+08
BPA ↓, BPS ↓, BPF ↓	niezidentyfikowany metabolit 16	293,0798	1,348	4,07E+08
BPA ↓, BPS ↓, BPF ↓	niezidentyfikowany metabolit 17	259,0953	1,259	5,01E+08
BPF ↓	niezidentyfikowany metabolit 18	114,9862	0,818	1,11E+08
BPA ↓, BPS ↓, BPF ↓	niezidentyfikowany metabolit 19	241,0849	1,142	5,3E+08
BPA ↓, BPS ↓, BPF ↓	niezidentyfikowany metabolit 20	211,0953	1,082	7,4E+08
BPA ↓, BPS ↓, BPF ↓	niezidentyfikowany metabolit 21	225,1109	1,137	1,81E+09

Grupa	Nazwa	m/z	RT [min.]	Powierzchnia (Max.)
BPF ↓	Kwas walerianowy	101,061	1,194	3,18E+10
BPA ↓, BPS ↓, BPF ↓	niezidentyfikowany metabolit 21	267,0991	1,129	1,15E+08
BPA ↓, BPS ↓, BPF ↓	niezidentyfikowany metabolit 22	261,0822	1,326	20779394

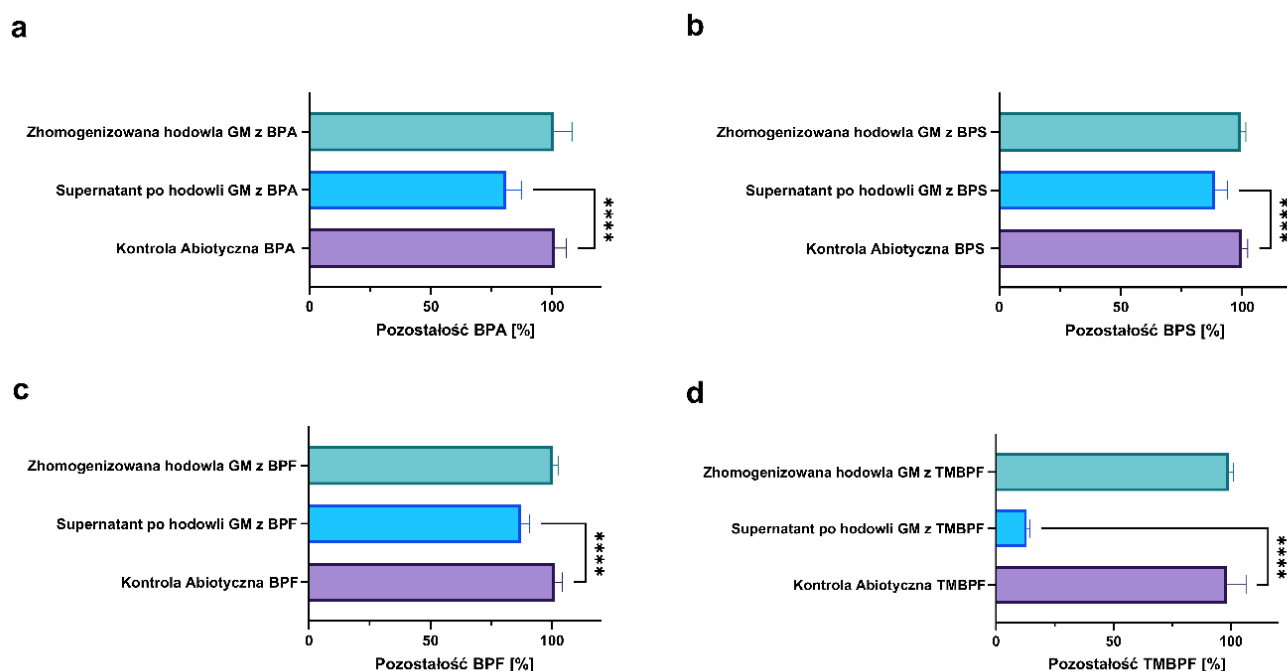


Rysunek 8. Wykres PCA profili zewnątrzkomórkowych metabolitów GM po 48 h ekspozycji na BPs. Poszczególne punkty reprezentują profile metaboliczne próbek w grupach poddanych ekspozycji na: BPA (niebieski), BPF (pomarańczowy), BPS (jasnoniebieski) i TMBPF (zielony), w porównaniu do grupy kontrolnej rozpuszczalnika (szary). Oś x reprezentuje pierwszą główną składową (PC 1), która odpowiada za 25,6% wariancji, podczas gdy oś y reprezentuje drugą główną składową (PC 2), która wyjaśnia 10,9% wariancji.

5.1.4. Ocena eliminacji bisfenoli (BPs) przez mikrobiotę jelitową (GM)

ZADANIE BADAWCZE 4: Ocena potencjału mikrobioty jelitowej do usuwania wybranych związków endokrynnie czynnych.

Po 48 h inkubacji z GM, ubytek BPs został ilościowo określony za pomocą chromatografii cieczowej i spektrometrii mas zarówno w supernatantach pochodzących z GM, jak i w zhomogenizowanych próbkach całej hodowli. Stopień usunięcia BPs w porównaniu z odpowiednimi kontrolami abiotycznymi przedstawiono na **Rysunku 9**. We wszystkich badanych grupach nie zaobserwowano znaczącego zmniejszenia stężenia BPs w zhomogenizowanych próbkach całej hodowli w porównaniu z odpowiednimi kontrolami abiotycznymi. Jednakże w supernatantach po hodowli odnotowano znaczne obniżenie stężenia BPs, szczególnie w przypadku TMBPF, spadek o $85,18 \pm 3,8\%$ (**Rysunek 9d**), następnie dla BPA z redukcją o $19,84 \pm 2,48\%$ (**Rysunek 9a**), BPF ze spadkiem o $13,81 \pm 1,5\%$ (**Rysunek 9c**) oraz BPS z redukcją o $11,16 \pm 1,5\%$ (**Rysunek 9b**).



Rysunek 9. Zmiany w poziomach BPs po hodowli z GM. Wykresy słupkowe przedstawiają procent pozostałości BPs po 48 h hodowli z GM dla każdego związku: BPA (a), BPS (b), BPF (c) oraz TMBPF (d). Wykresy ilustrują poziomy BPs w supernatancie po hodowli (niebieskie słupki) oraz w homogenizowanych próbkach całej hodowli (zielone słupki), porównane z odpowiednimi grupami kontrolnymi abiotycznymi (fioletowe słupki).

5.1.5. Wpływ mikrobioty jelitowej (GM) na aktywność endokrynną bisfenoli (BPs)

ZADANIE BADAWCZE 5: Określenie wpływu mikrobioty jelitowej na aktywność estrogenową/androgenową wybranych związków endokrynnie czynnych.

Aktywność endokrynną hodowli GM poddanych ekspozycji na BPs oceniono przy użyciu testów YES i YAS po 48 h hodowli z GM, porównując ją do odpowiednich kontroli abiotycznych, które służyły jako punkt odniesienia dla pomiarów aktywności estrogenowej (**Rysunek 10**). Nie zaobserwowano zahamowania wzrostu komórek drożdży przy testowanych stężeniach BPs ($5,5 \times 10^{-4}$ – $2,5 \times 10^{-7}$ M). Przeprowadzone badania wykazały, że BPs (BPA, BPS i BPF) działały jako agoniści ludzkich ER, podczas gdy TMBPF nie wykazywał aktywności estrogenowej. W supernatantach po hodowli GM z BPs zaobserwowano znaczący spadek aktywności estrogenowej w porównaniu z odpowiednimi kontrolami abiotycznymi. W przypadku TMBPF nie stwierdzono aktywności estrogenowej supernatantów po hodowli z GM. Uzyskane wyniki wykazały znaczny wzrost EC_{20} - około 83% dla BPS, 65% dla BPA i 44% dla BPF. Żaden z testowanych BPs nie wykazywał działania jako agonista ludzkiego AR. Ponadto, w supernatantach po hodowli GM z BPs nie wykryto aktywności androgenowej.

	YES	YAS
Kontrola Abiotyczna BPA	4.0×10^{-5}	
Supernatant po hodowli GM z BPA	1.1×10^{-4}	
Kontrola Abiotyczna BPS	3.3×10^{-4}	
Supernatant po hodowli GM z BPS	2.0×10^{-3}	
Kontrola Abiotyczna BPF	1.7×10^{-5}	
Supernatant po hodowli GM z BPF	3.0×10^{-5}	
Kontrola Abiotyczna TMBPF		
Supernatant po hodowli GM z TMBPF		

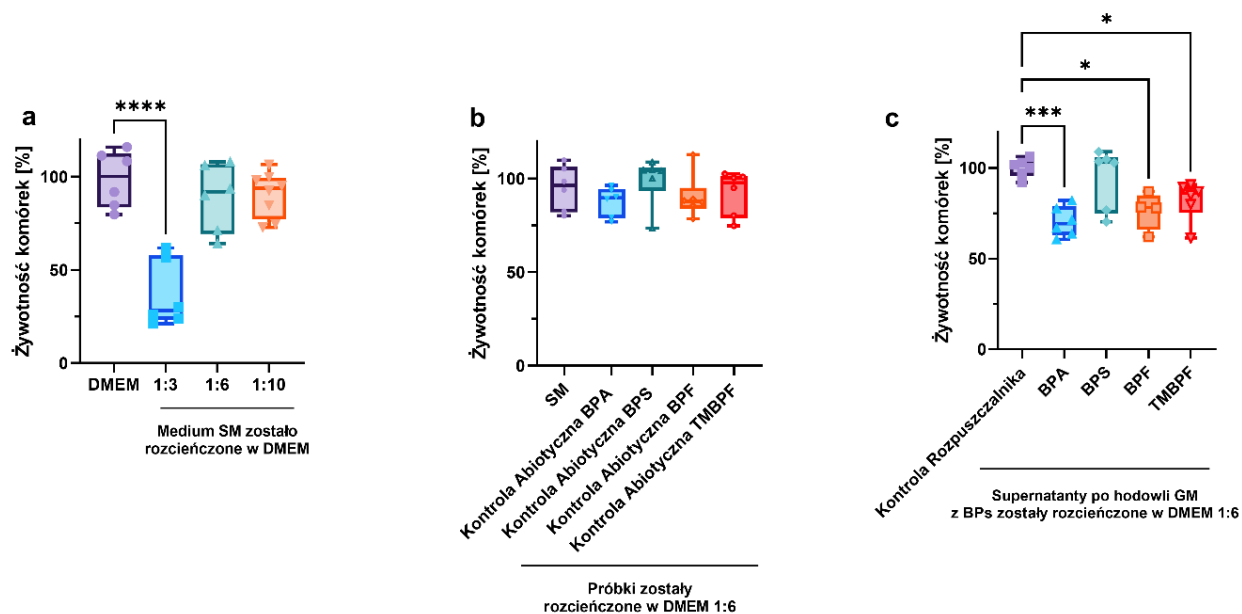
Rysunek 10. Mapa cieplna aktywności endokrynej uzyskana przy użyciu testów YES i YAS. Mapa cieplna prezentuje aktywność endokrynną BPA, BPS, BPF i TMBPF po 48 h hodowli z GM. Każda grupa eksperymentalna jest porównywana z odpowiednią grupą kontroli abiotycznej, która reprezentuje wyjściową aktywność endokrynną związku.

Aktywność estrogenowa i androgenowa prezentowana jest jako EC₂₀ (M). Kolorystyka wskazuje na następujące wyniki: zielony dla braku efektu przy testowanych stężeniach, żółty dla EC₂₀ znacząco wyższego niż w odpowiedniej kontroli abiotycznej, oraz pomarańczowy dla EC₂₀ podobnego do odpowiedniej kontroli abiotycznej.

5.1.6. Ocena cytotoksyczności supernatantów po hodowli mikrobioty jelitowej (GM) z bisfenolami (BPs)

ZADANIE BADAWCZE 6: Ocena wpływu mikrobioty jelitowej na cytotoksyczności wybranych związków endokrynnie czynnych.

Przeprowadzono analizę cytotoksyczności zewnątrzkomórkowych metabolitów GM po ekspozycji na BPs na linię komórkową Caco-2 stanowiącą model nabłonka jelita grubego. Aby wykluczyć wpływ składników pożywki mikrobiologicznej (SM) używanej do hodowli GM na uzyskane wyniki, wybrano optymalne rozcieńczenie SM w DMEM, które nie wykazywało cytotoksyczności wobec komórek. Stwierdzono, że rozcieńczenie SM w stosunku 1:6 w DMEM nie wpływało na żywotność komórek Caco-2. Następnie oceniono wyjściową cytotoksyczność BPs, wykorzystując kontrole abiotyczne przygotowane w SB, które przed dodaniem do hodowli Caco-2 zostały rozcieńczone 1:6 w DMEM. Żaden z badanych BPs nie wykazywał istotnego wpływu na żywotność komórek (**Rysunek 11b**). Następnie zbadano wpływ supernatantów po hodowli GM z BPs na żywotność komórek Caco-2 w porównaniu do hodowli GM z etanolem (grupa kontrolna rozpuszczalnika), aby zbadać potencjalne cytotoksyczne efekty metabolitów powstałych podczas hodowli z BPs (**Rysunek 11c**). Supernatanty uzyskane z hodowli GM po ekspozycji na BPA ($p < 0,001$), BPF ($p < 0,05$) i TMBPF ($p < 0,05$) powodowały istotne obniżenie żywotności komórek. Największy spadek zaobserwowano w hodowlach GM po ekspozycji na BPA, gdzie żywotność komórek zmniejszyła się o prawie 30%, następnie o około 24% w hodowlach eksponowanych na BPF i o 18% w hodowlach eksponowanych na TMBPF. Metabolity hodowli GM po ekspozycji na BPS nie miały istotnego wpływu na żywotność komórek Caco-2.



Rysunek 11. (a) Ocena optymalnego rozcieńczenia medium mikrobiologicznego (SM) do hodowli komórek Caco-2. Komórki Caco-2 były inkubowane przez 48 h w medium SM rozcieńczonym w stosunkach 1:3, 1:6 oraz 1:10 w DMEM. **(b)** Ocena wyjściowej cytotoksyczności BPs wykorzystując kontrole abiotyczne rozcieńczone 1:6 w DMEM **(c)** Wpływ supernatantów po hodowli GM z BPs na żywotność komórek Caco-2.

5.2. Dyskusja wyników z części nieopublikowanej

W niniejszej pracy zbadano wpływ BPs na ludzką GM pod kątem zmian w jej składzie taksonomicznym oraz funkcjach metabolicznych. W obliczu coraz bardziej restrykcyjnych regulacji w zakresie stosowania BPA, substancje takie jak BPS, BPF i TMBPF są wprowadzane do przemysłu jako bezpieczniejsze alternatywy. Konieczna jest kompleksowa ocena wpływu tego rodzaju substancji chemicznych na środowisko i organizm człowieka. Jednym z elementów takiej oceny jest określenie, w jaki sposób powyższe związki oddziałują z GM i wpływają na jej procesy metaboliczne. Zrozumienie tych interakcji jest kluczowe dla oceny bezpieczeństwa i skutków zdrowotnych związanych z zastępowaniem BPA innymi BPs.

Wpływ BPs na GM

Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki wykazały, że 48 h ekspozycja na BPs istotnie wpłynęła na strukturę taksonomiczną GM. Dla α -różnorodności, obserwowano istotne obniżenie Efektywnego Bogactwa Mikrobiologicznego oraz Efektywnej Liczby

Shannona w grupach poddanych ekspozycji na BPA i BPF, co wskazuje na redukcję zarówno liczby gatunków, jak i ich względnej obfitości. Ekspozycja na BPS prowadziła jedynie do zmniejszenia Efektywnej Liczby Shannona, sugerując, że mimo iż całkowita liczba gatunków nie zmniejszyła się znacząco, względne obfitości pewnych gatunków uległy zmianie. Oznacza to że, ekspozycja na BPS może prowadzić do dominacji pewnych taksonów, redukując równomierność, lub może zmniejszać wielkość populacji kilku taksonów bez ich eliminacji. Wyniki te kontrastują z rezultatami uzyskanymi przez Krause'a i in. (2022), którzy wykazali, że ekspozycja na BPA, BPS i BPF nie miała istotnego wpływu na α -różnorodność GM człowieka przy żadnym z testowanych stężeń (2,3; 28,3; 354,0 $\mu\text{g/mL}$). Różnice w wynikach mogą być spowodowane odmiennością metodologii, szczególnie czasem ekspozycji, który w naszym badaniu wynosił 48 h, w porównaniu do 24 h w badaniu Krause'a. Badania *in vivo*, przeprowadzone na szczurach Sprague-Dawley, wykazały, że przedłużona ekspozycja na BPA znacząco zmniejszała α -różnorodność GM (Zhao i in. 2022). Ponadto, zaobserwowano, że dieta zawierająca BPA obniża różnorodność gatunków, co skutkuje profilem GM porównywalnym do tego obserwowanego przy diecie wysokotłuszczowej (Lai i in., 2016). W przypadku analogów BPA, długotrwała ekspozycja na BPS przez 154 dni oraz ekspozycja we wczesnym okresie życia myszy nie wykazała istotnego wpływu na α -różnorodność (Chi i in., 2024b; Gomez i in., 2021). U ryb z rodzaju danio, ekspozycja na BPS spowodowała niewielki wzrost różnorodności według indeksu Shannona, jednak całkowita liczba gatunków pozostała niezmienną, w porównaniu do BPA i BPF, które nie wpłynęły istotnie na α -różnorodność (Catron i in., 2019). Wang i in. (2018), używając modelu przewodu pokarmowego SHIME, zaobserwowali, że ekspozycja na BPA zwiększyła różnorodność GM według indeksu Shannona w jelicie wstępującym i poprzecznym, jednak w jelicie zstępującym różnorodność ta uległa zmniejszeniu. W niniejszej pracy wykorzystano próbki kału jako inokulum, co pozwala na lepsze odwzorowanie dolnego odcinka jelita. To może tłumaczyć zbieżność naszych wyników z obserwacjami Wang i in. (2018) dotyczącymi tego odcinka przewodu pokarmowego. Zmniejszenie α -różnorodności GM po ekspozycji na BPs zaobserwowane w pracy jest niepokojące, gdyż α -różnorodność jest ściśle powiązana ze zdrowiem gospodarza. Obniżenie tego wskaźnika jest obserwowane w różnego rodzaju stanach chorobowych. Wysoka bioróżnorodność GM jest kluczowa dla utrzymania homeostazy jelitowej, a jej spadek może być powiązany z indukcją stanu zapalnego organizmu i ryzykiem chorób zapalnych (Gong i in., 2016).

W niniejszej pracy stwierdzono, że ekspozycja na wszystkie badane BPs prowadziła do zmian w β -różnorodności GM. Wyraźne grupowanie i rozdzielenie grup eksperymentalnych wskazuje, że badane BPs w zróżnicowany sposób oddziaływały na społeczność GM. Te różnice mogą wynikać z różnej toksyczności i specyficznych mechanizmów działania poszczególnych związków chemicznych. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że BPA miał największy potencjał zaburzenia struktury taksonomicznej GM, po nim kolejno sklasyfikowano BPS i BPF. Wyraźny negatywny wpływ BPA na GM można przypisać wysokiej toksyczności tego związku wobec komórek bakteryjnych, co prowadzi do inhibicji metabolizmu i redukcji aktywności wzrostowej (Tian i in., 2022). TMBPF wykazał najmniejszy wpływ na β -różnorodność. Jego niska toksyczność może potencjalnie wynikać z zaobserwowanego wysokiego poziomu bioadsorpcji przez GM podczas hodowli *in vitro*. Uzyskane wyniki są zgodne z badaniami Krause i in. (2022), którzy także prowadzili badania w modelu *in vitro* i wykazali podobne zakłócające efekty ekspozycji na BPS i BPF na skład społeczności GM, przy czym BPA wywołał najbardziej znaczącą modyfikację GM. Co interesujące, obserwowane zaburzenia w profilu GM wystąpiły jedynie przy wyższych dawkach BPs, wynoszących 354 $\mu\text{g/mL}$, co jest porównywalne ze stężeniami użytymi w niniejszej pracy (Krause i in., 2022). Carton i in. (2019) wykazali, że BPS charakteryzował się najbardziej istotnym wpływem na społeczność GM u ryb z rodzaju danio, w porównaniu do BPA i BPF. Różnice we wpływie BPs na profil taksonomiczny GM między poszczególnymi badaniami mogą wynikać z zastosowania różnych modeli badawczych, takich jak badania *in vivo* versus *in vitro*, a także z różnic gatunkowych w składzie GM.

Analiza PICRUST2 sugeruje, że BPA, BPF i BPS prawdopodobnie w większym stopniu będą wpływały na szlaki metaboliczne GM niż TMBPF. Prognozy znajdują potwierdzenie w uzyskanych wynikach dotyczących wpływu BPs na profil zewnątrzkomórkowych metabolitów GM oraz produkcję SCFAs. Obserwowane zmiany mogą wynikać z lizy komórek spowodowanej toksycznymi stężeniami BPs, jak również z zaburzeń metabolizmu mikroorganizmów i odpowiedzi GM na stres (Krause i in., 2022; Tian i in., 2022). Ponieważ metabolity mikrobiologiczne odgrywają kluczową rolę w komunikacji między GM a gospodarzem, zaobserwowane zmiany wymagają dalszych badań, aby zrozumieć ich potencjalny wpływ na organizm gospodarza (Agus i in., 2021). Duan i in. (2021) wykazali, że GM osób z otyłością charakteryzuje się zaburzeniami w relatywnej obfitości szlaków metabolizmu węglowodanów i lipidów. Zgodnie z tymi wynikami, w niniejszej pracy wykazano, że BPA i BPS znacząco zaburzały szlaki

metaboliczne węglowodanów i lipidów. W przeciwieństwie do tego, BPF wpływał głównie na metabolizm lipidów, a TMBPF przede wszystkim na metabolizm węglowodanów. Biorąc pod uwagę, że BPs są uważane za obesogeny, te wyniki są szczególnie niepokojące (Oliviero i in., 2022). W pracy wykazano również, że ekspozycja na BPs wpłynęła na produkcję SCFAs, które należą do kluczowych metabolitów GM. SCFAs są bezpośrednio wykorzystywane przez komórki nabłonka jelitowego jako źródło energii, wspierając funkcjonowanie komórek i wzmacniając barierę jelitową (Krause i in., 2022; Zhao i in., 2024). SCFAs biorą również udział w wielu szlakach fizjologicznych, w tym w reakcjach immunologicznych i endokrynnych oraz w komunikacji osi jelita-mózg (Portincasa i in., 2022). Zaobserwowano najwyższy spadek całkowitej produkcji SCFAs po ekspozycji na BPA, a w mniejszym stopniu po ekspozycji na BPF i BPS. Ten wzorzec jest zgodny z wynikami Krause i in. (2022), którzy również odnotowali podobny wpływ tych związków na poziomy SCFAs. Co interesujące, TMBPF nie wpłynął na produkcję SCFAs, co może wynikać z jego stosunkowo niskiej toksyczności i odmiennego profilu toksykologicznego w porównaniu do pozostałych BPs (Maffini i in., 2020; Soto i in., 2017). Zmiany w stężeniach SCFAs, jak również w procentowym udziale poszczególnych kwasów, wywołane przez ekspozycję na BPs, mogą potencjalnie negatywnie wpływać na zdrowie gospodarza. Zaburzenia poziomu SCFAs są powiązane z patogenezą zaburzeń metabolicznych i wątroby, w tym otyłości, cukrzycy typu 2 i niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (D. Zhang i in., 2023). W przeciwieństwie do wyników niniejszej pracy, Schäpe i in. (2017) nie odnotowali istotnych zmian w stężeniach SCFAs po ekspozycji na BPS, używając modelu SIHUMIX, co może wynikać z zastosowania znacznie niższego stężenia (45 μM) w porównaniu do 1000 μM użytego w niniejszej pracy. Ta rozbieżność podkreśla zależne od stężenia efekty BPs na produkcję SCFAs.

Główne SCFAs w jelicie to kwas octowy, propionowy i masłowy, które zazwyczaj występują w jelitach zdrowych ludzi w proporcji około 60:20:20 (den Besten i in., 2013a; D. Zhang i in., 2023). Jednak w niniejszym badaniu stwierdzono, że grupa kontrolna rozpuszczalnika, stosowana jako odniesienie, wykazywała inną proporcję, wynoszącą 30:15:56. To podkreśla odmienne cechy metaboliczne GM hodowanej *in vitro* w porównaniu z warunkami *in vivo*. Rozbieżność ta uwydatnia ograniczenia modelu hodowli okresowej, w którym stosowanie jednego medium hodowlanego nie jest w stanie zapewnić odpowiednich warunków do hodowli całej populacji GM, szczególnie dla niektórych wymagających taksonów. Ponadto, w tym modelu może dochodzić do akumulacji bakteryjnych metabolitów podczas procesu fermentacji, co również może zaburzać

strukturę GM (den Besten i in., 2013b; Średnicka i in., 2023). W niniejszej pracy ekspozycja GM na BPA i BPS prowadziła do obniżenia poziomu kwasu octowego, podczas gdy poziom kwasu propionowego uległ obniżeniu wyłącznie po ekspozycji na BPA. Natomiast poziom kwasu masłowego wykazał niewielki wzrost w grupie poddanej ekspozycji na BPA. Kwas octowy i propionowy są głównie produkowane przez bakterie z typu Bacteroidetes, natomiast bakterie z typu Firmicutes są silniej związane z produkcją kwasu masłowego (Ramos Meyers i in., 2022). Uzyskane wyniki wykazały istotny spadek populacji Bacteroidetes w próbkach GM po ekspozycji na BPA (>3,5 log), co prawdopodobnie przyczyniło się do obniżenia poziomów kwasu octowego i propionowego. Z kolei ekspozycja na BPS spowodowała mniej wyraźny spadek Bacteroidetes (< 1 log). Funkcjonalna redundancja, powszechna w społeczności GM, sugeruje, że zmiany w składzie społeczności nie zawsze prowadzą do zaburzeń funkcjonalnych (Chi i in., 2021). Zaobserwowany wzrost poziomu kwasu masłowego w hodowlach GM po ekspozycji na BPA może być związany z większą względną obfitością bakterii z typu Firmicutes, takich jak *Coprococcus*, *Fusicatenibacter*, *Subdoligranulum*, *Faecalibacterium*, *Dorea* oraz niezidentyfikowane bakterie z rodziny *Lachnospiraceae* (Singh i in., 2023; Zhang i in., 2023). Li i in. (2020) oraz Reddivari i in. (2017) również zaobserwowali obniżenie poziomów kwasów octowego i propionowego w hodowlach GM po ekspozycji na BPA. Natomiast w przeciwieństwie do ich badań, w niniejszej pracy nie zaobserwowano redukcji poziomu kwasu masłowego.

Oprócz głównych SCFAs, GM produkuje mniejsze ilości rozgałęzionych kwasów tłuszczowych (ang. branched-chain fatty acids, BCFA), takich jak kwas izomasłowy i izowalerianowy. BCFA oraz kwas walerianowy powstają głównie podczas fermentacji aminokwasów rozgałęzionych (waliny, leucyny i izoleucyny), przede wszystkim przez bakterie z rodzaju *Bacteroides* i *Clostridium* (Rios-Covian i in., 2020). W niniejszej pracy stwierdzono, że ekspozycja GM na BPA, BPS i BPF obniżyła poziomy kwasu walerianowego, natomiast wszystkie testowane BPs obniżały produkcję kwasów izowalerianowego i izomasłowego. Sekwencjonowanie 16S rDNA ujawniło znaczne zmniejszenie liczebności rodzajów bakterii po ekspozycji na BPs, co potwierdza zaobserwowane zmiany w produkcji BCFA.

SCFAs działają jako ligandy dla specyficznych receptorów błonowych, takich jak FFAR2, FFAR3, GPR109a i Olfr78, które ulegają ekspresji w całym przewodzie pokarmowym (Priyadarshini i in., 2018; Zhang i in., 2023). FFAR2 wykazuje najwyższe powinowactwo do kwasu octowego (C2) i propionowego (C3), ale wykazuje niższe

powinowactwo do kwasu masłowego (C4) i walerianowego (C5) (Zhang i in., 2023). Aktywacja FFAR2 przez SCFAs, w głównej mierze przez octan i propionian, odgrywa kluczową rolę w modulacji metabolizmu lipidów oraz w zwiększeniu wydzielania PYY, GLP-1, hormonów regulujących sytość i wydzielanie insuliny (Chambers i in., 2015). W związku z tym obniżenie produkcji SCFAs przez GM spowodowane ekspozycją na BPs może potencjalnie prowadzić do zaburzeń sygnalizacji metabolicznej i w efekcie oddziaływać na sygnalizację odczuwania głodu oraz sytości. W modelach zwierzęcych i badaniach na ludziach wykazano, że kwasy octowy, propionowy i masłowy wykazują właściwości przeciwotyłociowe, a ich suplementacja w diecie wysokotłuszczowej poprawiała wrażliwość na insulinę i chroniła przed przyrostem masy ciała w badaniach na zwierzętach (Heimann i in., 2016).

Poprzez zrealizowanie zadań badawczych 2, 3 zrealizowano cel 1 oraz potwierdzono hipotezę [H1]: Związki endokrynnie czynne prowadzą do zaburzenia struktury taksonomicznej i profilu metabolicznego mikrobioty jelitowej.

Eliminacja BPs w hodowlach GM

W niniejszej pracy stwierdzono istotne zmniejszenie stężeń BPA, BPF, BPS i TMBPF w supernatantach po hodowli GM z BPs. Natomiast nie odnotowano obniżenia stężeń BPs po homogenizacji całej hodowli, co może wynikać z bioadsorpcji BPs przez bakterie. Niektóre gatunki bakterii mogą bezpośrednio wiązać określone ksenobiotyki do swoich ścian komórkowych, usuwając je z roztworu (Średnicka i in., 2021). Adsorpcja fizyczna jest odwracalnym i metabolicznie pasywnym procesem w którym biorą zarówno z żywe, jak i martwe komórkami mikroorganizmów (Feng i in., 2018; Zoghi i in., 2014a). W kilku badaniach wykazano, że bakterie LAB mogą wiązać BPA z różną szybkością i efektywnością (Endo i in., 2007; Lee i in., 2023; Solouki i in., 2018; Zhu i in., 2017). Hydrofobowość ksenobiotyków jest kluczowym parametrem wpływającym na efektywność wiązania tych związków do ściany komórkowej bakterii (Solouki i in., 2018). TMBPF był najbardziej hydrofobowym spośród wszystkich badanych BPs, z wartością LogP wynoszącą 4,03, zgodnie z danymi SwissADME (Bugnon i in., 2024; Grosdidier i in., 2011). Zwiększona hydrofobowość tego związku może być przypisana czterem grupom metylowym przyłączonym do jego pierścieni fenolowych. W niniejszej pracy zaobserwowano najwyższą absorpcję przez komórki bakteryjne w grupie TMBPF, z wskaźnikiem absorpcji wynoszącym 89%, prawdopodobnie ze względu na hydrofobowy

charakter tego związku. Przy klasyfikacji BPs na podstawie ich wartości LogP, kolejność od najbardziej do najmniej hydrofobowego jest następująca: TMBPF > BPA > BPF > BPS, co odpowiada zaobserwowanym wskaźnikom adsorpcji w naszym badaniu. BPS jest najbardziej hydrofilowym BPs, ponieważ zawiera polarny mostek sulfonowy w porównaniu do bardziej hydrofobowych struktur BPA i BPF (Reininger i Oehlmann, 2024).

W niniejszej pracy nie zaobserwowano biodegradacji BPs przez GM. Większość mikroorganizmów nie posiada odpowiednich enzymów zdolnych do biodegradacji ksenobiotyków (Długoński, 2016). Niemniej jednak, kilka prac wykazało zdolność do biodegradacji BPA przez szczepy bakterii, które występują również w składzie GM, takich jak *Lactocaseibacillus rhamnosus* (dawniej *Lactobacillus reuteri*) (Ju i in., 2019), *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Lactiplantibacillus plantarum* (dawniej *Lactobacillus plantarum*), *Enterococcus faecalis* (Kyrila i in., 2021). Mikrobiologiczna degradacja BPA prowadzi do powstania metabolitów, takich jak hydrochinon, 4-hydroksyacetofenon, kwas 4-hydroksybenzoesowy i 4-izopropenylfenol (Kyrila i in., 2021). Jednakże w naturalnych warunkach, EDCs i inne ksenobiotyki są trudno biodegradowalne, ponieważ większość z nich ma niską rozpuszczalność w wodzie co utrudnia ich transport do wnętrza komórek (Długoński, 2016). Zgodnie z danymi SwissADME, BPA, BPF i TMBPF były umiarkowanie rozpuszczalne z $\log S < -4$, podczas gdy jedynie BPS był rozpuszczalny z $\log S < -2$. Ponadto, mikroorganizmy preferują wykorzystanie prostych związków organicznych jako źródło węgla i energii, gdy są one obecne w środowisku, zamiast ksenobiotyków o złożonych strukturach chemicznych (Długoński, 2016). Ta preferencja jest szczególnie widoczna w środowisku GI, gdzie bakterie głównie opierają się na niestrawionych substratach pokarmowych w górnym odcinku przewodu (Rowland i in., 2018) oraz w hodowlach *in vitro* wykorzystujących bogate pożywki mikrobiologiczne. Głównym źródłem węgla w tych pożywkach jest często glukoza, jak to miało miejsce w przypadku pożywki SM używanej w niniejszej pracy (Średnicka i in., 2023). Mikroorganizmy preferują naturalne związki organiczne, które mogą być łatwo transportowane do komórek i są bezpośrednio zaangażowane w główne szlaki metaboliczne (Długoński, 2016).

Poprzez zrealizowanie zadania badawczego 4, częściowo zrealizowano cel 2 i potwierdzono hipotezę [H2]: Mikrobiota jelitowa posiada zdolność do eliminacji związków endokrynnie czynnych.

Wpływ GM na aktywność endokrynną BPs

W przeprowadzonych badaniach BPA, BPS i BPF działały jako agoniści ER, z wyjątkiem TMBPF, co jest zgodne z wynikami opublikowanymi przez innych autorów (Kitamura, 2005; Kojima i in., 2019; Ruan i in., 2015). Efekty endokrynne BPs są przypisywane ich strukturalnemu podobieństwu do endogennego hormonu 17- β -estradiolu. Zdolność do wiązania się BPs z ER wynika z obecności dwóch grup hydroksylowych w pozycji para oraz hydrofobowego charakteru tych związków, co pozwala im na dokładne dopasowanie się do kieszeni wiążącej ER. Skuteczność (ang. efficacy) działania estrogenowego trzech BPs, sklasyfikowana jako BPF > BPA > BPS, jest zgodna z ustaleniami Reiningera i Oehlmana (2024). W przeciwieństwie do innych BPs, wcześniejsze badania (Maffini i in., 2020; Soto i in., 2017) wykazały, że TMBPF nie posiada aktywności estrogennej, co jest zgodne z otrzymanymi wynikami. Brak działania estrogenowego TMBPF wynika prawdopodobnie z obecności grup metylowych blisko grup hydroksylowych, które są obecne w strukturze BPF. Grupy metylowe mogą potencjalnie chronić grupy hydroksylowe przed interakcją z ER. Dodatkowo, struktura TMBPF zawiera mostek metylenowy, który zapewnia ograniczoną elastyczność, co może dodatkowo utrudniać jego zdolność do wiązania się z receptorem (Soto i in., 2017). W naszym badaniu zaobserwowano znaczący spadek aktywności estrogenowej wszystkich BPs, które były agonistami ER, po hodowli z GM. W przypadku BPA, BPS i BPF spadek aktywności estrogennej wiązał się z częściową adsorpcją tych związków przez komórki bakteryjne, co może częściowo wyjaśniać zmniejszoną aktywność estrogenową. Wiązanie EDCs do ścian komórkowych bakterii zmniejszałoby ich dostępność biologiczną, a tym samym obniżało estrogenną aktywność supernatantu po hodowli (Hernández-Mendoza i in., 2022; Shao i in., 2022). Zgodnie z literaturą, BPA, BPS, BPF i TMBPF nie działały jako agoniści względem AR (Dvorakova i in., 2018; Park i in., 2024; Reiningera i Oehlmann, 2024). Ponadto, w supernatantach po hodowli z GM z BPs również nie stwierdzono aktywności androgennej.

Wpływ metabolitów GM po ekspozycji na BPs na komórki nabłonka jelita

Inkubacja komórek Caco-2 z supernatantami po hodowli GM z BPA, BPF i TMBPF prowadziła do zmniejszenia ich żywotności, podczas supernatant po hodowli GM z BPS nie wpływał na ich żywotność. W związku z tym, że w niniejszym badaniu nie stwierdzono biotransformacji BPs przez GM, obserwowane obniżenie żywotności komórek można prawdopodobnie przypisać działaniu metabolitów wytworzonych przez GM, ale nie będących bezpośrednio pochodnym BPs. Wykazano, że badane BPs znacząco wpływają na profil metabolitów GM, powodując zarówno wzrost, jak i obniżenie poziomów poszczególnych metabolitów. Warto podkreślić, że zaobserwowano wyraźny spadek produkcji SCFAs pod wpływem ekspozycji na BPs, który występował również w grupie po ekspozycji na BPS. Fakt, że ekspozycja na BPS nie wpływa na żywotność komórek Caco-2, w przeciwieństwie do BPA, BPF i TMBPF, sugeruje, że metabolity wytwarzane w odpowiedzi na ekspozycję na BPS są prawdopodobnie nietoksyczne, mniej szkodliwe lub mogą mieć nawet działanie ochronne bądź neutralne w porównaniu do metabolitów powstających w odpowiedzi na pozostałe BPs. Wiele badań, takich jak te przeprowadzone przez Braniste i in. (2011), Reddivari i in. (2017) oraz H. Zhang i in. (2024), wskazuje na negatywny wpływ BPA na funkcjonowanie jelit w modelach *in vivo*. W niniejszym badaniu BPs bezpośrednio nie wykazywały cytotoksycznego działania na komórki Caco-2 *in vitro*, nawet przy wysokich stężeniach. Natomiast supernatanty po hodowli GM eksponowanej na BPs znacząco obniżały żywotność komórek, co sugeruje, że pośrednie mechanizmy – takie jak metabolity produkowane przez GM – mogą odgrywać kluczową rolę w toksyczności BPs wobec jelit. Badania Zhang i in. (2024) wykazały, że BPA wywołuje zmiany w metabolitach GM, w tym zwiększone poziomy LPS w okrężnicy oraz zmniejszone poziomy SCFAs, takich jak octan, izomaślan, maślan i propionian. Zmiany te były powiązane z uszkodzeniami jelit i łożyska u ciężarnych owiec. Co więcej, transplantacja mikrobioty owiec eksponowanych na BPA do myszy pozbawionych mikrobioty wywołała podobne skutki, co silnie sugeruje, że GM oraz ich metabolity mogą być odpowiedzialne za apoptozę, stres oksydacyjny i stres retikulum endoplazmatycznego w jelitach i łożysku w odpowiedzi na ekspozycję na BPA. Podobne wyniki uzyskano w badaniach nad królikami, gdzie perinatalna ekspozycja na BPA zmieniła profil GM i ich metabolitów, prowadząc do zapalenia jelit i wątroby, zwiększonej przepuszczalności jelit oraz podwyższonych poziomów LPS w surowicy potomstwa. Obserwowano również zmniejszenie różnorodności GM oraz obniżone poziomy SCFAs. Co istotne, suplementacja SCFAs złagodziła indukowaną przez BPA przepuszczalność jelit *in vitro*, co wskazuje, że

zmiany w profilu metabolitów GM mogą odgrywać kluczową rolę w wywoływaniu niekorzystnych skutków zdrowotnych związanych z ekspozycją na BPA (Reddivari i in., 2017). Zarówno nasze wyniki, jak i te uzyskane przez Reddivari i in. (2017) i Zhang i in. (2024) wskazują, że bezpośrednia ekspozycja komórek na BPs nie oddaje pełnego obrazu toksyczności obserwowanej w modelach *in vivo*. Kluczową rolę w tych efektach mogą odgrywać metabolity wytwarzane przez mikrobiotę, które pośredniczą w toksycznych skutkach ekspozycji na BPs.

Poprzez zrealizowanie zadania badawczego 5 i 6, częściowo zrealizowano cel 2 i potwierdzono hipotezę [H3]: Mikrobiota jelitowa modyfikuje aktywność biologiczną związków endokrynnie czynnych, wpływając na ich cytotoksyczność oraz potencjał endokrynną.

6. STWIERDZENIA I WNIOSKI

Do osiągnięcia celów badawczych pracy doktorskiej, postawiono trzy hipotezy badawcze, które zostały zweryfikowane poprzez realizację sześciu zadań badawczych. Na podstawie uzyskanych wyników oraz ich analizy sformułowano następujące stwierdzenia i wnioski końcowe:

1. Zastosowanie podłoża SM wzbogaconego o 5% krwi owczej i 1,5 mg/L witaminy K₃ do hodowli GM umożliwiło zachowanie najwyższej różnorodności oraz aktywności metabolicznej GM oraz znacząco wzbogaciło szlaki degradacji ksenobiotyków; podłoże SM zostało wybrane do realizacji kolejnego etapu badań.
2. BPA, BPS i BPF istotnie wpływają na profil taksonomiczny i metaboliczny GM, szczególnie w kontekście produkcji SCFAs.
3. TMBPF wywiera mniej nasilone efekty na skład taksonomiczny GM oraz profil metabolitów w porównaniu do BPA, BPS i BPF, co wskazuje, że może być bezpieczniejszą alternatywą dla innych BPs.
4. GM posiada potencjał do bioadsorpcji BPA, BPS, BPF i TMBPF, przy czym stopień bioadsorpcji tych związków wzrasta wraz z ich hydrofobowością, co odpowiada kolejności: TMBPF > BPA > BPS > BPF.
5. GM posiada potencjał do obniżenia aktywności estrogenowej BPs, co wskazuje na potencjalną rolę GM w minimalizowaniu działania endokrynnego tych związków.
6. Podczas hodowli GM z BPA, BPF i TMBPF powstają metabolity, które negatywnie wpływają na żywotność komórek nabłonka jelitowego.

7. SPIS LITERATURY

1. Abbasi, F., De-la-Torre, G. E., KalantarHormozi, M. R., Schmidt, T. C., & Dobaradaran, S. (2024). A review of endocrine disrupting chemicals migration from food contact materials into beverages. *Chemosphere*, 355, 141760. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2024.141760
2. Abdelsalam, N. A., Ramadan, A. T., ElRakaiby, M. T., & Aziz, R. K. (2020). Toxicomicrobiomics: The Human Microbiome vs. Pharmaceutical, Dietary, and Environmental Xenobiotics. *Frontiers in Pharmacology*, 11. doi: 10.3389/fphar.2020.00390
3. Adnan, M. R., Lee, C. N., & Mishra, B. (2022). Adverse effects of phytoestrogens on mammalian reproductive health. *Veterinary Medicine and Animal Sciences*, 10(1), 1. doi: 10.7243/2054-3425-10-1
4. Aguilar-Rojas, A., Olivo-Marin, J.-C., & Guillen, N. (2020). Human intestinal models to study interactions between intestine and microbes. *Open Biology*, 10(10). doi: 10.1098/rsob.200199
5. Aguirre, M., Ramiro-Garcia, J., Koenen, M. E., & Venema, K. (2014). To pool or not to pool? Impact of the use of individual and pooled fecal samples for in vitro fermentation studies. *Journal of Microbiological Methods*, 107, 1–7. doi: 10.1016/j.mimet.2014.08.022
6. Agus, A., Clément, K., & Sokol, H. (2021). Gut microbiota-derived metabolites as central regulators in metabolic disorders. *Gut*, 70(6), 1174–1182. doi: 10.1136/gutjnl-2020-323071
7. Ahmadi, S., Wang, S., Nagpal, R., Mainali, R., Soleimani-Zad, S., Kitzman, D., & Yadav, H. (2019). An *In Vitro* Batch-culture Model to Estimate the Effects of Interventional Regimens on Human Fecal Microbiota. *Journal of Visualized Experiments*, 149. doi: 10.3791/59524
8. Alharbi, H. F., Algonaiman, R., Alduwayghiri, R., Aljutaily, T., Algheshairy, R. M., Almutairi, A. S., Alharbi, R. M., Alfurayh, L. A., Alshahwan, A. A., Alsadun, A. F., & Barakat, H. (2022). Exposure to Bisphenol A Substitutes, Bisphenol S and Bisphenol F, and Its Association with Developing Obesity and Diabetes Mellitus: A Narrative Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(23), 15918. doi: 10.3390/ijerph192315918

9. Alonso-Magdalena, P., Ropero, A. B., Soriano, S., García-Arévalo, M., Ripoll, C., Fuentes, E., Quesada, I., & Nadal, Á. (2012). Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 355(2), 201–207. doi: 10.1016/j.mce.2011.12.012
10. Al-Tamimi, M. A. H. M., Palframan, R. J., Cooper, J. M., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2006). In vitro fermentation of sugar beet arabinan and arabinooligosaccharides by the human gut microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2), 407–414. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02780.x
11. Bastings, J. J. A. J., Venema, K., Blaak, E. E., & Adam, T. C. (2023). Influence of the gut microbiota on satiety signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 34(4), 243–255. doi: 10.1016/j.tem.2023.02.003
12. Bellali, S., Lagier, J.-C., Raoult, D., & Bou Khalil, J. (2019). Among Live and Dead Bacteria, the Optimization of Sample Collection and Processing Remains Essential in Recovering Gut Microbiota Components. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi: 10.3389/fmicb.2019.01606
13. Bellali, S., Lagier, J.-C., Million, M., Anani, H., Haddad, G., Francis, R., Kuete Yimagou, E., Khelaifia, S., Levasseur, A., Raoult, D., & Bou Khalil, J. (2021). Running after ghosts: are dead bacteria the dark matter of the human gut microbiota? *Gut Microbes*, 13(1). doi: 10.1080/19490976.2021.1897208
14. Ben Seghir, B., Kouadri, I., Messaoudi, M., Rebiai, A., Zeghoud, S., Hemmami, H., & Ben Amor, I. (2023). Food Chain Contamination and Impact of Xenobiotics on Human Health. In *Xenobiotics in Urban Ecosystems* (pp. 109–129). Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-031-35775-6_6
15. Birkeland, E., Gharagozlian, S., Valeur, J., & Aas, A.-M. (2023). Short-chain fatty acids as a link between diet and cardiometabolic risk: a narrative review. *Lipids in Health and Disease*, 22(1), 40. doi: 10.1186/s12944-023-01803-5
16. Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. doi: 10.1038/s41587-019-0209-9

17. Braniste, V., Audebert, M., Zalko, D., & Houdeau, E. (2011). Bisphenol A in the Gut: Another Break in the Wall? (pp. 127–144). doi: 10.1007/978-3-642-22775-2_9
18. Bugnon, M., Röhrig, U. F., Goullieux, M., Perez, M. A. S., Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2024). SwissDock 2024: major enhancements for small-molecule docking with Attracting Cavities and AutoDock Vina. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W324–W332. doi: 10.1093/nar/gkae300
19. Calero-Medina, L., Jimenez-Casquet, M. J., Heras-Gonzalez, L., Conde-Pipo, J., Lopez-Moro, A., Olea-Serrano, F., & Mariscal-Arcas, M. (2023). Dietary exposure to endocrine disruptors in gut microbiota: A systematic review. *Science of The Total Environment*, 886, 163991. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.163991
20. Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869
21. Carabotti, M., Scirocco, A., Antonietta Maselli, M., & Severi, C. (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems (Vol. 28). Retrieved from www.annalsgastro.gr
22. Catron, T. R., Keely, S. P., Brinkman, N. E., Zurlinden, T. J., Wood, C. E., Wright, J. R., Phelps, D., Wheaton, E., Kvasnicka, A., Gaballah, S., Lamendella, R., & Tal, T. (2019). Host Developmental Toxicity of BPA and BPA Alternatives Is Inversely Related to Microbiota Disruption in Zebrafish. *Toxicological Sciences*, 167(2), 468–483. doi: 10.1093/toxsci/kfy261
23. Chambers, E. S., Morrison, D. J., & Frost, G. (2015). Control of appetite and energy intake by SCFA: what are the potential underlying mechanisms? *Proceedings of the Nutrition Society*, 74(3), 328–336. doi: 10.1017/S0029665114001657
24. Charitos, I. A., Topi, S., Gagliano-Candela, R., De Nitto, E., Polimeno, L., Montagnani, M., & Santacroce, L. (2022). The Toxic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) on Gut Microbiota: Bisphenol A (BPA) A Review. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 22(7), 716–727. doi: 10.2174/1871530322666220325114045
25. Chen, A., Hu, Y., Zhang, Y., Li, Z., Zeng, Y., & Pang, X. (2022). Cryopreservation of stool samples altered the microbial viability quantitatively and

- compositionally. *Archives of Microbiology*, 204(9), 557. doi: 10.1007/s00203-022-03169-1
26. Chi, L., Tu, P., Ru, H., & Lu, K. (2021). Studies of xenobiotic-induced gut microbiota dysbiosis: from correlation to mechanisms. *Gut Microbes*, 13(1). doi: 10.1080/19490976.2021.1921912
27. Chi, Y., Zhu, L., Wang, Y., Peng, C., Lin, Y., Ji, S., & Wei, J. (2024). Long-term Bisphenol S exposure induced gut microbiota dysbiosis, obesity, hepatic lipid accumulation, intestinal lesions and dyslipidemia in mice. *Toxicology*, 504, 153798. doi: 10.1016/j.tox.2024.153798
28. Clarke, G., Sandhu, K. V., Griffin, B. T., Dinan, T. G., Cryan, J. F., & Hyland, N. P. (2019). Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions. *Pharmacological Reviews*, 71(2), 198–224. doi: 10.1124/pr.118.015768
29. Collins, S. L., & Patterson, A. D. (2020). The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(1), 19–32. doi: 10.1016/j.apsb.2019.12.001
30. Crowther, G. S., Chilton, C. H., Todhunter, S. L., Nicholson, S., Freeman, J., Baines, S. D., & Wilcox, M. H. (2014). Development and Validation of a Chemostat Gut Model To Study Both Planktonic and Biofilm Modes of Growth of *Clostridium difficile* and Human Microbiota. *PLoS ONE*, 9(2), e88396. doi: 10.1371/journal.pone.0088396
31. Custer, G. F., Gans, M., van Diepen, L. T. A., Dini-Andreote, F., & Buerkle, C. A. (2023). Comparative Analysis of Core Microbiome Assignments: Implications for Ecological Synthesis. *MSystems*, 8(1). doi: 10.1128/msystems.01066-22
32. Danzl, E., Sei, K., Soda, S., Ike, M., & Fujita, M. (2009). Biodegradation of Bisphenol A, Bisphenol F and Bisphenol S in Seawater. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(4), 1472–1484. doi: 10.3390/ijerph6041472
33. De, J., Farias, M., & Krepsky, N. (2022). Bacterial degradation of bisphenol A and its analogues: An overview. doi: 10.21203/rs.3.rs-1631241/v1
34. den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325–2340. doi: 10.1194/jlr.R036012

35. Di Tommaso, N., Gasbarrini, A., & Ponziani, F. R. (2021). Intestinal Barrier in Human Health and Disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(23), 12836. doi: 10.3390/ijerph182312836
36. Dikeocha, I. J., Al-Kabsi, A. M., Miftahussurur, M., & Alshawsh, M. A. (2022). Pharmacomicrobiomics: Influence of gut microbiota on drug and xenobiotic metabolism. *The FASEB Journal*, 36(6). doi: 10.1096/fj.202101986R
37. Długoński, J. (2016). *Microbial Biodegradation: From Omics to Function and Application* (J. Długoński, Ed.). Caister Academic Press. doi: 10.21775/9781910190456
38. Donaldson, G. P., Lee, S. M., & Mazmanian, S. K. (2016). Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 14(1), 20–32. doi: 10.1038/nrmicro3552
39. Duan, M., Wang, Y., Zhang, Q., Zou, R., Guo, M., & Zheng, H. (2021). Characteristics of gut microbiota in people with obesity. *PLOS ONE*, 16(8), e0255446. doi: 10.1371/journal.pone.0255446
40. Dvorakova, M., Státní, A. V., & Ústav, Z. (2018). Alternative methods *in vitro* for screening of endocrine disruptors. Retrieved from www.nel.edu
41. ECHA. (2024, August 4). Candidate List of substances of very high concern for Authorisation. <https://Echa.europa.eu/Candidate-List-Table>.
42. Egalini, F., Marinelli, L., Rossi, M., Motta, G., Prencipe, N., Rossetto Giaccherino, R., Pagano, L., Grottoli, S., & Giordano, R. (2022). Endocrine disrupting chemicals: effects on pituitary, thyroid and adrenal glands. *Endocrine*, 78(3), 395–405. doi: 10.1007/s12020-022-03076-x
43. Encarnaçãõ, T., Pais, A. A., Campos, M. G., & Burrows, H. D. (2019). Endocrine disrupting chemicals: Impact on human health, wildlife and the environment. *Science Progress*, 102(1), 3–42. doi: 10.1177/0036850419826802
44. Endo, Y., Kimura, N., Ikeda, I., Fujimoto, K., & Kimoto, H. (2007). Adsorption of bisphenol A by lactic acid bacteria, *Lactococcus*, strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(1), 202–207. doi: 10.1007/s00253-006-0632-y
45. Ericsson, A. C., Gagliardi, J., Bouhan, D., Spollen, W. G., Givan, S. A., & Franklin, C. L. (2018). The influence of caging, bedding, and diet on the composition of the microbiota in different regions of the mouse gut. *Scientific Reports*, 8(1), 4065. doi: 10.1038/s41598-018-21986-7

46. Komisja Europejska. (2024, February 9). Food safety – restrictions on bisphenol A (BPA) and other bisphenols in food contact materials https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-your-say/initiatives/13832-Food-safety-restrictions-on-bisphenol-A-BPA-and-other-bisphenols-in-food-contact-materials_en
47. Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 55–71. doi: 10.1038/s41579-020-0433-9
48. Feng, P., Ye, Z., Kakade, A., Virk, A. K., Li, X., & Liu, P. (2018). A Review on Gut Remediation of Selected Environmental Contaminants: Possible Roles of Probiotics and Gut Microbiota. *Nutrients*, 11(1), 22. doi: 10.3390/nu11010022
49. Feng, W., Liu, J., Cheng, H., Zhang, D., Tan, Y., & Peng, C. (2022). Dietary compounds in modulation of gut microbiota-derived metabolites. *Frontiers in Nutrition*, 9. doi: 10.3389/fnut.2022.939571
50. FitzGerald, R., Loveren, H. Van, Civitella, C., Castoldi, A. F., & Bernasconi, G. (2020). Assessment of new information on Bisphenol S (BPS) submitted in response to the Decision 1 under REACH Regulation (EC) No 1907/2006. *EFSA Supporting Publications*, 17(4). doi: 10.2903/sp.efsa.2020.EN-1844
51. Fontana, A., Panebianco, C., Picchianti-Diamanti, A., Laganà, B., Cavalieri, D., Potenza, A., Pracella, R., Binda, E., Copetti, M., & Paziienza, V. (2019). Gut Microbiota Profiles Differ among Individuals Depending on Their Region of Origin: An Italian Pilot Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(21), 4065. doi: 10.3390/ijerph16214065
52. Franklin, C. L., & Ericsson, A. C. (2017). Microbiota and reproducibility of rodent models. *Lab Animal*, 46(4), 114–122. doi: 10.1038/labon.1222
53. Fusco, W., Lorenzo, M. B., Cintoni, M., Porcari, S., Rinninella, E., Kaitsas, F., Lener, E., Mele, M. C., Gasbarrini, A., Collado, M. C., Cammarota, G., & Ianiro, G. (2023). Short-Chain Fatty-Acid-Producing Bacteria: Key Components of the Human Gut Microbiota. *Nutrients*, 15(9), 2211. doi: 10.3390/nu15092211
54. Gálvez-Ontiveros, Y., Moscoso-Ruiz, I., Almazán Fernández de Bobadilla, V., Monteagudo, C., Giménez-Martínez, R., Rodrigo, L., Zafra-Gómez, A., & Rivas, A. (2023). Levels of Bisphenol A and its analogs in nails, saliva, and urine of children: a case control study. *Frontiers in Nutrition*, 10. doi: 10.3389/fnut.2023.1226820

55. Gardner DG, & Shoback D (Eds.). (2017). *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology* (10th ed.). McGraw-Hill Education.
56. Ghosh, S. S., Wang, J., Yannie, P. J., & Ghosh, S. (2020). Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. *Journal of the Endocrine Society*, 4(2). doi: 10.1210/jendso/bvz039
57. Ghosh, S., Whitley, C. S., Haribabu, B., & Jala, V. R. (2021). Regulation of Intestinal Barrier Function by Microbial Metabolites. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 11(5), 1463–1482. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.02.007
58. Giambò, F., Costa, C., Teodoro, M., & Fenga, C. (2022). Role-Playing Between Environmental Pollutants and Human Gut Microbiota: A Complex Bidirectional Interaction. *Frontiers in Medicine*, 9. doi: 10.3389/fmed.2022.810397
59. Gomez, M. V, Dutta, M., Suvorov, A., Shi, X., Gu, H., Mani, S., & Yue Cui, J. (2021). Early Life Exposure to Environmental Contaminants (BDE-47, TBBPA, and BPS) Produced Persistent Alterations in Fecal Microbiome in Adult Male Mice. *Toxicological Sciences*, 179(1), 14–30. doi: 10.1093/toxsci/kfaa161
60. Gong, D., Gong, X., Wang, L., Yu, X., & Dong, Q. (2016). Involvement of Reduced Microbial Diversity in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016, 1–7. doi: 10.1155/2016/6951091
61. Gonkowski, S., Tzatzarakis, M., Dermitzaki, E., Makowska, K., & Wojtkiewicz, J. (2022). Hair Sample Analysis of Residents from Olsztyn, Northeastern Poland, to Evaluate Levels of Bisphenol S and Bisphenol A: A Pilot Study. *Medical Science Monitor*, 28. doi: 10.12659/MSM.936738
62. Goodman, A. L., Kallstrom, G., Faith, J. J., Reyes, A., Moore, A., Dantas, G., & Gordon, J. I. (2011). Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15), 6252–6257. doi: 10.1073/pnas.1102938108
63. Govarts, E., Gilles, L., Rodriguez Martin, L., Santonen, T., Apel, P., Alvito, P., Anastasi, E., Andersen, H. R., Andersson, A. M., Andryskova, L., Antignac, J. P., Appenzeller, B., Barbone, F., Barnett-Itzhaki, Z., Barouki, R., Berman, T., Bil, W., Borges, T., Buekers, J., ... Schoeters, G. (2023). Harmonized human biomonitoring in European children, teenagers and adults: EU-wide exposure data of 11 chemical substance groups from the HBM4EU Aligned Studies (2014–

- 2021). *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 249, 114119. doi: 10.1016/J.IJHEH.2023.114119
64. Grosdidier, A., Zoete, V., & Michielin, O. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl), W270–W277. doi: 10.1093/nar/gkr366
65. Gu, J., Zhu, Y., Guo, M., Yin, X., Liang, M., Lou, X., Chen, J., Zhou, L., Fan, D., Shi, L., Hu, G., & Ji, G. (2022). The potential mechanism of BPF-induced neurotoxicity in adult zebrafish: Correlation between untargeted metabolomics and gut microbiota. *Science of The Total Environment*, 839, 156221. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156221
66. Hamid, N., Junaid, M., & Pei, D.-S. (2021). Combined toxicity of endocrine-disrupting chemicals: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 215, 112136. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112136
67. Han, H., Yi, B., Zhong, R., Wang, M., Zhang, S., Ma, J., Yin, Y., Yin, J., Chen, L., & Zhang, H. (2021). From gut microbiota to host appetite: gut microbiota-derived metabolites as key regulators. *Microbiome*, 9(1), 162. doi: 10.1186/s40168-021-01093-y
68. Hasan, N., & Yang, H. (2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ*, 7, e7502. doi: 10.7717/peerj.7502
69. Heimann, E., Nyman, M., Pålbrink, A.-K., Lindkvist-Petersson, K., & Degerman, E. (2016). Branched short-chain fatty acids modulate glucose and lipid metabolism in primary adipocytes. *Adipocyte*, 5(4), 359–368. doi: 10.1080/21623945.2016.1252011
70. Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Martínez-Porchas, M. (2022). Influence of Probiotics on the Animal Gut Microbiota and Their Impact on the Bioavailability of Toxic Agents: An Opinion Paper. *Frontiers in Nutrition*, 9. doi: 10.3389/fnut.2022.870162
71. Hou, K., Wu, Z.-X., Chen, X.-Y., Wang, J.-Q., Zhang, D., Xiao, C., Zhu, D., Koya, J. B., Wei, L., Li, J., & Chen, Z.-S. (2022). Microbiota in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 135. doi: 10.1038/s41392-022-00974-4
72. Hu, C., Niu, X., Chen, S., Wen, J., Bao, M., Mohyuddin, S. G., Yong, Y., Liu, X., Wu, L., Yu, Z., Ma, X., & Ju, X. (2021). A Comprehensive Analysis of the Colonic Flora Diversity, Short Chain Fatty Acid Metabolism, Transcripts, and

- Biochemical Indexes in Heat-Stressed Pigs. *Frontiers in Immunology*, 12. doi: 10.3389/fimmu.2021.717723
73. Isenring, J., Bircher, L., Geirnaert, A., & Lacroix, C. (2023). In vitro human gut microbiota fermentation models: opportunities, challenges, and pitfalls. *Microbiome Research Reports*, 2(1), 2. doi: 10.20517/mrr.2022.15
74. Jasińska, A., Soboń, A., Różalska, S., & Średnicka, P. (2021). Bisphenol A Removal by the Fungus *Myrothecium roridum* IM 6482—Analysis of the Cellular and Subcellular Level. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 10676. doi: 10.3390/ijms221910676
75. Jin, Y., Chi, J., Lo Monaco, K., Boon, A., & Gu, H. (2023). Recent review on selected xenobiotics and their impacts on gut microbiome and metabolome. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 166, 117155. doi: 10.1016/j.trac.2023.117155
76. Joshi, S. N., & Bhatt, P. (2023). Effects of bisphenol A, phthalates and triclosan on gut microbiome and its impact on host pathophysiology across different species. *International Journal of Scientific Reports*, 9(3), 80–91. doi: 10.18203/issn.2454-2156.IntJSciRep20230379
77. Ju, J., Shen, L., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W. (2019). Degradation potential of bisphenol A by *Lactobacillus reuteri*. *LWT*, 106, 7–14. doi: 10.1016/j.lwt.2019.02.022
78. Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. doi: 10.1093/nar/28.1.27
79. Kelly, S. L., & Kelly, D. E. (2013). Microbial cytochromes P450: biodiversity and biotechnology. Where do cytochromes P450 come from, what do they do and what can they do for us? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1612), 20120476. doi: 10.1098/rstb.2012.0476
80. Kiess, W., Häussler, G., & Vogel, M. (2021). Endocrine-disrupting chemicals and child health. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 35(5), 101516. doi: 10.1016/j.beem.2021.101516
81. Kitamura, S. (2005). Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *Toxicological Sciences*, 84(2), 249–259. doi: 10.1093/toxsci/kfi074
82. Kojima, H., Takeuchi, S., Sanoh, S., Okuda, K., Kitamura, S., Uramaru, N., Sugihara, K., & Yoshinari, K. (2019). Profiling of bisphenol A and eight of its

- analogues on transcriptional activity *via* human nuclear receptors. *Toxicology*, 413, 48–55. doi: 10.1016/j.tox.2018.12.001
83. Kose, O., Rachidi, W., Beal, D., Erkekoglu, P., Fayyad-Kazan, H., & Kocer Gumusel, B. (2020). The effects of different bisphenol derivatives on oxidative stress, DNA damage and DNA repair in RWPE-1 cells: A comparative study. *Journal of Applied Toxicology*, 40(5), 643–654. doi: 10.1002/jat.3934
84. Krause, J. L., Engelmann, B., Nunes da Rocha, U., Pierzchalski, A., Chang, H. D., Zenclussen, A. C., von Bergen, M., Rolle-Kampczyk, U., & Herberth, G. (2022). MAIT cell activation is reduced by direct and microbiota-mediated exposure to bisphenols. *Environment International*, 158, 106985. doi: 10.1016/j.envint.2021.106985
85. Kumar, M., Sarma, D. K., Shubham, S., Kumawat, M., Verma, V., Prakash, A., & Tiwari, R. (2020). Environmental Endocrine-Disrupting Chemical Exposure: Role in Non-Communicable Diseases. *Frontiers in Public Health*, 8. doi: 10.3389/fpubh.2020.553850
86. Kyrila, G., Katsoulas, A., Schoretsaniti, V., Rigopoulos, A., Rizou, E., Doulgeridou, S., Sarli, V., Samanidou, V., & Touraki, M. (2021). Bisphenol A removal and degradation pathways in microorganisms with probiotic properties. *Journal of Hazardous Materials*, 413, 125363. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.125363
87. Lagier, J.-C., Dubourg, G., Million, M., Cadoret, F., Bilen, M., Fenollar, F., Levasseur, A., Rolain, J.-M., Fournier, P.-E., & Raoult, D. (2018). Culturing the human microbiota and culturomics. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 540–550. doi: 10.1038/s41579-018-0041-0
88. Lai, K.-P., Chung, Y.-T., Li, R., Wan, H.-T., & Wong, C. K.-C. (2016). Bisphenol A alters gut microbiome: Comparative metagenomics analysis. *Environmental Pollution*, 218, 923–930. doi: 10.1016/j.envpol.2016.08.039
89. Lambré, C., Barat Baviera, J. M., Bolognesi, C., Chesson, A., Coconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Grob, K., Lampi, E., Mengelers, M., Mortensen, A., Rivière, G., Silano (until December †), V., Steffensen, I., Tlustos, C., Vernis, L., Zorn, H., Batke, M., Bignami, M., ... Van Loveren, H. (2023). Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, 21(4). doi: 10.2903/j.efsa.2023.6857

90. Lee, S.-W., Lim, J.-M., Jang, T.-H., Park, J.-H., Seralathan, K.-K., & Oh, B.-T. (2023). Lactiplantibacillus sp. D10-2: potential bacteria for eliminating bisphenol A and reducing BpA-induced lipid accumulation. *International Microbiology*, 27(3), 707–718. doi: 10.1007/s10123-023-00425-2
91. Li, L., Abou-Samra, E., Ning, Z., Zhang, X., Mayne, J., Wang, J., Cheng, K., Walker, K., Stintzi, A., & Figeys, D. (2019). An *in vitro* model maintaining taxon-specific functional activities of the gut microbiome. *Nature Communications*, 10(1), 4146. doi: 10.1038/s41467-019-12087-8
92. Li, X., Zhang, Y., Zhao, C., Zhang, B., Peng, B., Zhang, Y., Wang, J., & Wang, S. (2022). Positive effects of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) intervention on insulin resistance and gut microbial dysbiosis induced by bisphenol A. *Journal of Functional Foods*, 93, 105083. doi: 10.1016/j.jff.2022.105083
93. Li, Y., Reivan Ortiz, G. G., Uyen, P. T. M., Cong, P. T., Othman, S. I., Allam, A. A., Unar, A., & Afridi, H. I. (2023). Environmental impact of endocrine-disrupting chemicals and heavy metals in biological samples of petrochemical industry workers with perspective management. *Environmental Research*, 231, 115913. doi: 10.1016/j.envres.2023.115913
94. Li, Z., Mao, W., Yao, L., Zhao, N., Zhang, Y., Zhao, M., & Jin, H. (2022). First report on occurrence of bisphenol A isomers in human serum and whole blood. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127549. doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2021.127549
95. Liu, J., Tan, Y., Cheng, H., Zhang, D., Feng, W., & Peng, C. (2022a). Functions of Gut Microbiota Metabolites, Current Status and Future Perspectives. *Aging and Disease*, 13(4), 1106. doi: 10.14336/AD.2022.0104
96. Logtenberg, M. J., Vink, J. C. M., Serierse, R. M., An, R., Hermes, G. D. A., Smidt, H., & Schols, H. A. (2020). Pooled faecal inoculum can predict infant fiber fermentability despite high inter-individual variability of microbiota composition. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 24, 100235. doi: 10.1016/j.bcdf.2020.100235
97. López-Moreno, A., Torres-Sánchez, A., Acuña, I., Suárez, A., & Aguilera, M. (2021). Representative *Bacillus* sp. AM1 from Gut Microbiota Harbor Versatile Molecular Pathways for Bisphenol A Biodegradation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4952. doi: 10.3390/ijms22094952

98. Lu, Y., Zhou, G., Ewald, J., Pang, Z., Shiri, T., & Xia, J. (2023). MicrobiomeAnalyst 2.0: comprehensive statistical, functional and integrative analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W310–W318. doi: 10.1093/nar/gkad407
99. Ma, J., Piao, X., Mahfuz, S., Long, S., & Wang, J. (2022). The interaction among gut microbes, the intestinal barrier and short chain fatty acids. *Animal Nutrition*, 9, 159–174. doi: 10.1016/j.aninu.2021.09.012
100. Maffini, M. V., & Canatsey, R. D. (2020). An expanded toxicological profile of tetramethyl bisphenol F (TMBPF), a precursor for a new food-contact metal packaging coating. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110889. doi: 10.1016/j.fct.2019.110889
101. Mallen, T. R., Abston, K. D., Parizek, N. J., Negley, J., Shores, K. S., Canatsey, R. D., Dubail, S., Maier, M. S., & Maffini, M. V. (2023). Characterization of a new polymeric food contact coating with emphasis on the chemical analysis and safety assessment of non-intentionally added substances (NIAS). *Food and Chemical Toxicology*, 173, 113635. doi: 10.1016/j.fct.2023.113635
102. Mandal, M. B., Sharma, P., & Dixit, D. (2023). Effects of Plastic Chemical Bisphenol a on Gut Functions. *Journal of Medical Evidence*, 4(3), 247–257. doi: 10.4103/JME.JME_51_23
103. Marci, R. (Ed.). (2023). *Environment Impact on Reproductive Health*. Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-031-36494-5
104. Matijašić, M., Meštrović, T., Čipčić Paljetak, H., Perić, M., Barešić, A., & Verbanac, D. (2020). Gut Microbiota beyond Bacteria—Mycobiome, Virome, Archaeome, and Eukaryotic Parasites in IBD. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 2668. doi: 10.3390/ijms21082668
105. Matoso, V., Bargi-Souza, P., Ivanski, F., Romano, M. A., & Romano, R. M. (2019). Acrylamide: A review about its toxic effects in the light of Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD) concept. *Food Chemistry*, 283, 422–430. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.054
106. Matsuzaki, R., Gunnigle, E., Geissen, V., Clarke, G., Nagpal, J., & Cryan, J. F. (2023). Pesticide exposure and the microbiota-gut-brain axis. *The ISME Journal*, 17(8), 1153–1166. doi: 10.1038/s41396-023-01450-9

107. Meng, L. Y., Tao, W. F., Li, J., Zhu, M., Zhong, D. B., Zhou, J., Qin, X., & Wei, R. G. (2024). Effects of Bisphenol A and Its Substitute, Bisphenol F, on the Gut Microbiota in Mice. *Biomedical and Environmental Sciences*, 37(1), 19–30. doi: 10.3967/bes2024.003
108. Moon, S., Yu, S. H., Lee, C. B., Park, Y. J., Yoo, H. J., & Kim, D. S. (2021). Effects of bisphenol A on cardiovascular disease: An epidemiological study using National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2016 and meta-analysis. *Science of The Total Environment*, 763, 142941. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142941
109. Moreno-Gómez-Toledano, R., Arenas, M. I., Vélez-Vélez, E., Coll, E., Quiroga, B., Bover, J., & Bosch, R. J. (2021). Bisphenol a Exposure and Kidney Diseases: Systematic Review, Meta-Analysis, and NHANES 03–16 Study. *Biomolecules*, 11(7), 1046. doi: 10.3390/biom11071046
110. Moreno-Gómez-Toledano, R., Delgado-Marín, M., Cook-Calvete, A., González-Cucharero, C., Alcharani, N., Jiménez-Guirado, B., Hernandez, I., Ramirez-Carracedo, R., Tesoro, L., Botana, L., Sánchez-Esteban, S., Diez-Mata, J., Zamorano, J. L., Bosch, R. J., Zaragoza, C., & Saura, M. (2023). New environmental factors related to diabetes risk in humans: Emerging bisphenols used in synthesis of plastics. *World Journal of Diabetes*, 14(8), 1301–1313. doi: 10.4239/wjd.v14.i8.1301
111. Namat, A., Xia, W., Xiong, C., Xu, S., Wu, C., Wang, A., Li, Y., Wu, Y., & Li, J. (2021). Association of BPA exposure during pregnancy with risk of preterm birth and changes in gestational age: A meta-analysis and systematic review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220, 112400. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112400
112. Niderkorn, V., Morgavi, D. P., Pujos, E., Tissandier, A., & Boudra, H. (2007). Screening of fermentative bacteria for their ability to bind and biotransform deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in an in vitro simulated corn silage model. *Food Additives and Contaminants*, 24(4), 406–415. doi: 10.1080/02652030601101110
113. Oliviero, F., Marmugi, A., Vigiúé, C., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., & Mselli-Lakhal, L. (2022). Are BPA Substitutes as Obesogenic as BPA? *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4238. doi: 10.3390/ijms23084238

114. Ong, H.-T., Samsudin, H., & Soto-Valdez, H. (2022). Migration of endocrine-disrupting chemicals into food from plastic packaging materials: an overview of chemical risk assessment, techniques to monitor migration, and international regulations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(4), 957–979. doi: 10.1080/10408398.2020.1830747
115. Ozyurt, B., Ozkemahli, G., Yirun, A., Ozyurt, A. B., Bacanli, M., Basaran, N., Kocer-Gumusel, B., & Erkekoglu, P. (2023). Comparative evaluation of the effects of bisphenol derivatives on oxidative stress parameters in HepG2 cells. *Drug and Chemical Toxicology*, 46(2), 314–322. doi: 10.1080/01480545.2022.2028823
116. Page, M. J., Kell, D. B., & Pretorius, E. (2022). The Role of Lipopolysaccharide-Induced Cell Signalling in Chronic Inflammation. *Chronic Stress*, 6, 247054702210763. doi: 10.1177/24705470221076390
117. Papanicolas, L. E., Choo, J. M., Wang, Y., Leong, L. E. X., Costello, S. P., Gordon, D. L., Wesselingh, S. L., & Rogers, G. B. (2019). Bacterial viability in faecal transplants: Which bacteria survive? *EBioMedicine*, 41, 509–516. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.02.023
118. Park, C. G., Adnan, K. M., Cho, H., Ryu, C. S., Yoon, J., & Kim, Y. J. (2024). A combined *in vitro-in silico* method for assessing the androgenic activities of bisphenol A and its analogues. *Toxicology in Vitro*, 98, 105838. doi: 10.1016/j.tiv.2024.105838
119. Park, C., Song, H., Choi, J., Sim, S., Kojima, H., Park, J., Iida, M., & Lee, Y. (2020). The mixture effects of bisphenol derivatives on estrogen receptor and androgen receptor. *Environmental Pollution*, 260, 114036. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114036
120. Patel, A. B., Shaikh, S., Jain, K. R., Desai, C., & Madamwar, D. (2020). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.562813
121. Pathak, R. K., & Kim, J.-M. (2024). Structural insight into the mechanisms and interacting features of endocrine disruptor Bisphenol A and its analogs with human estrogen-related receptor gamma. *Environmental Pollution*, 345, 123549. doi: 10.1016/j.envpol.2024.123549
122. Peivasteh-roudsari, L., Barzegar-bafrouei, R., Sharifi, K. A., Azimisalim, S., Karami, M., Abedinzadeh, S., Asadinezhad, S., Tajdar-oranj, B., Mahdavi, V.,

- Alizadeh, A. M., Sadighara, P., Ferrante, M., Conti, G. O., Aliyeva, A., & Mousavi Khaneghah, A. (2023). Origin, dietary exposure, and toxicity of endocrine-disrupting food chemical contaminants: A comprehensive review. *Heliyon*, 9(7), e18140. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e18140
123. Pham, V. T., & Mohajeri, M. H. (2018). The application of in vitro human intestinal models on the screening and development of pre- and probiotics. *Beneficial Microbes*, 9(5), 725–742. doi: 10.3920/BM2017.0164
124. Popli, S., Badgujar, P. C., Agarwal, T., Bhushan, B., & Mishra, V. (2022). Persistent organic pollutants in foods, their interplay with gut microbiota and resultant toxicity. *Science of The Total Environment*, 832, 155084. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.155084
125. Popowski, D., Pawłowska, K. A., Deipenbrock, M., Hensel, A., Kruk, A., Melzig, M. F., Piwowarski, J. P., & Granica, S. (2021). Antiadhesive activity of hydroethanolic extract from bean pods of *Phaseolus vulgaris* (common bean) against uropathogenic *E. coli* and permeability of its constituents through Caco-2 cells monolayer. *Journal of Ethnopharmacology*, 274, 114053. doi: 10.1016/j.jep.2021.114053
126. Portincasa, P., Bonfrate, L., Vacca, M., De Angelis, M., Farella, I., Lanza, E., Khalil, M., Wang, D. Q.-H., Sperandio, M., & Di Ciaula, A. (2022). Gut Microbiota and Short Chain Fatty Acids: Implications in Glucose Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1105. doi: 10.3390/ijms23031105
127. Priyadarshini, M., Kotlo, K. U., Dudeja, P. K., & Layden, B. T. (2018). Role of Short Chain Fatty Acid Receptors in Intestinal Physiology and Pathophysiology. In *Comprehensive Physiology* (pp. 1091–1115). Wiley. doi: 10.1002/cphy.c170050
128. Puche-Juarez, M., Toledano, J. M., Moreno-Fernandez, J., Gálvez-Ontiveros, Y., Rivas, A., Diaz-Castro, J., & Ochoa, J. J. (2023). The Role of Endocrine Disrupting Chemicals in Gestation and Pregnancy Outcomes. *Nutrients*, 15(21), 4657. doi: 10.3390/nu15214657
129. Puschhof, J., Pleguezuelos-Manzano, C., & Clevers, H. (2021). Organoids and organs-on-chips: Insights into human gut-microbe interactions. *Cell Host & Microbe*, 29(6), 867–878. doi: 10.1016/j.chom.2021.04.002

130. Qi, Y., Yu, L., Tian, F., Zhao, J., & Zhai, Q. (2023). In vitro models to study human gut-microbiota interactions: Applications, advances, and limitations. *Microbiological Research*, 270, 127336. doi: 10.1016/j.micres.2023.127336
131. Qiu, W., Zhan, H., Hu, J., Zhang, T., Xu, H., Wong, M., Xu, B., & Zheng, C. (2019). The occurrence, potential toxicity, and toxicity mechanism of bisphenol S, a substitute of bisphenol A: A critical review of recent progress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173, 192–202. doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.114
132. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. doi: 10.1093/nar/gks1219
133. Ramos Meyers, G., Samouda, H., & Bohn, T. (2022). Short Chain Fatty Acid Metabolism in Relation to Gut Microbiota and Genetic Variability. *Nutrients*, 14(24), 5361. doi: 10.3390/nu14245361
134. Reddivari, L., Veeramachaneni, D. N. R., Walters, W. A., Lozupone, C., Palmer, J., Hewage, M. K. K., Bhatnagar, R., Amir, A., Kennett, M. J., Knight, R., & Vanamala, J. K. P. (2017). Perinatal Bisphenol A Exposure Induces Chronic Inflammation in Rabbit Offspring via Modulation of Gut Bacteria and Their Metabolites. *MSystems*, 2(5). doi: 10.1128/mSystems.00093-17
135. Reininger, N., & Oehlmann, J. (2024). Regrettable substitution? Comparative study of the effect profile of bisphenol A and eleven analogues in an in vitro test battery. *Environmental Sciences Europe*, 36(1), 76. doi: 10.1186/s12302-024-00900-1
136. Reitmeier, S., Hitch, T. C. A., Treichel, N., Fikas, N., Hausmann, B., Ramer-Tait, A. E., Neuhaus, K., Berry, D., Haller, D., Lagkouvardos, I., & Clavel, T. (2021). Handling of spurious sequences affects the outcome of high-throughput 16S rRNA gene amplicon profiling. *ISME Communications*, 1(1). doi: 10.1038/s43705-021-00033-z
137. Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14. doi: 10.3390/microorganisms7010014

138. Rios-Covian, D., González, S., Nogacka, A. M., Arboleya, S., Salazar, N., Gueimonde, M., & de los Reyes-Gavilán, C. G. (2020). An Overview on Fecal Branched Short-Chain Fatty Acids Along Human Life and as Related With Body Mass Index: Associated Dietary and Anthropometric Factors. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.00973
139. Rizzo, R., Bortolotti, D., Rizzo, S., & Schiuma, G. (2023). Cellular Mechanisms of Endocrine Disruption. In *Environment Impact on Reproductive Health* (pp. 15–48). Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-031-36494-5_2
140. Rochester, J. R., & Bolden, A. L. (2015). Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol a substitutes. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 123, Issue 7, pp. 643–650). Public Health Services, US Dept of Health and Human Services. doi: 10.1289/ehp.1408989
141. Rodríguez-Ruano, S. M., Juhaňáková, E., Vávra, J., & Nováková, E. (2020). Methodological Insight Into Mosquito Microbiome Studies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. doi: 10.3389/fcimb.2020.00086
142. Roszko, M. Ł., Kamińska, M., Szymczyk, K., Piasecka-Jóźwiak, K., & Chabłowska, B. (2018). Endocrine disrupting potency of organic pollutant mixtures isolated from commercial fish oil evaluated in yeast-based bioassays. *PLOS ONE*, 13(5), e0197907. doi: 10.1371/journal.pone.0197907
143. Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*, 57(1), 1–24. doi: 10.1007/s00394-017-1445-8
144. Ruan, T., Liang, D., Song, S., Song, M., Wang, H., & Jiang, G. (2015). Evaluation of the in vitro estrogenicity of emerging bisphenol analogs and their respective estrogenic contributions in municipal sewage sludge in China. *Chemosphere*, 124, 150–155. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.12.017
145. Salvucci, E. (2019). The human-microbiome superorganism and its modulation to restore health. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70(7), 781–795. doi: 10.1080/09637486.2019.1580682

146. Sangeetha, S., Vimalkumar, K., & Loganathan, B. G. (2021). Environmental Contamination and Human Exposure to Select Endocrine-Disrupting Chemicals: A Review. *Sustainable Chemistry*, 2(2), 343–380. doi: 10.3390/suschem2020020
147. Sardelli, L., Perottoni, S., Tunesi, M., Boeri, L., Fusco, F., Petrini, P., Albani, D., & Giordano, C. (2021). Technological tools and strategies for culturing human gut microbiota in engineered in vitro models. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(8), 2886–2905. doi: 10.1002/bit.27816
148. Sarkar, K., & Sil, P. C. (2021). Effect of diet, pharmaceuticals, and environmental toxicants on gut microbiota imbalance and increased intestinal membrane permeability. In *Toxicological Risk Assessment and Multi-System Health Impacts from Exposure* (pp. 403–413). Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-323-85215-9.00007-6
149. Sasaki, M., Akahira, A., Oshiman, K., Tsuchido, T., & Matsumura, Y. (2005). Purification of Cytochrome P450 and Ferredoxin, Involved in Bisphenol A Degradation, from *Sphingomonas* sp. Strain AO1. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8024–8030. doi: 10.1128/AEM.71.12.8024-8030.2005
150. Schäpe, S. S., Krause, J. L., Masanetz, R. K., Riesbeck, S., Starke, R., Rolle-Kampczyk, U., Eberlein, C., Heipieper, H.-J., Herberth, G., von Bergen, M., & Jehmlich, N. (2020). Environmentally Relevant Concentration of Bisphenol S Shows Slight Effects on SIHUMIX. *Microorganisms*, 8(9), 1436. doi: 10.3390/microorganisms8091436
151. Selwyn, F. P., Cheng, S. L., Klaassen, C. D., & Cui, J. Y. (2016). Regulation of Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes in Germ-Free Mice by Conventionalization and Probiotics. *Drug Metabolism and Disposition*, 44(2), 262–274. doi: 10.1124/dmd.115.067504
152. Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*, 14(8), e1002533. doi: 10.1371/journal.pbio.1002533
153. Shao, X., Xu, B., Chen, C., Li, P., & Luo, H. (2022). The function and mechanism of lactic acid bacteria in the reduction of toxic substances in food: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(21), 5950–5963. doi: 10.1080/10408398.2021.1895059
154. Shetty, S. A., Marathe, N. P., Lanjekar, V., Ranade, D., & Shouche, Y. S. (2013). Comparative Genome Analysis of *Megasphaera* sp. Reveals Niche

- Specialization and Its Potential Role in the Human Gut. PLoS ONE, 8(11), e79353. doi: 10.1371/journal.pone.0079353
155. Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11. doi: 10.3389/fendo.2020.00025
156. Singh, M., Crosthwait, J., Sorisky, A., & Atlas, E. (2024). Tetra methyl bisphenol F: another potential obesogen. *International Journal of Obesity*, 48(7), 923–933. doi: 10.1038/s41366-024-01496-5
157. Singh, V., Lee, G., Son, H., Koh, H., Kim, E. S., Unno, T., & Shin, J.-H. (2023). Butyrate producers, “The Sentinel of Gut”: Their intestinal significance with and beyond butyrate, and prospective use as microbial therapeutics. *Frontiers in Microbiology*, 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.1103836
158. Solouki, S., Fazeli, M. R., & Solouki, S. (2018). Efficiency of multispecies probiotic supplements in Bioremoval of bisphenol A: An *in vitro* study. *Applied Food Biotechnology*, 5(1), 37–45. doi: 10.22037/afb.v5i1.18191
159. Soto, A. M., Schaeberle, C., Maier, M. S., Sonnenschein, C., & Maffini, M. V. (2017). Evidence of Absence: Estrogenicity Assessment of a New Food-Contact Coating and the Bisphenol Used in Its Synthesis. *Environmental Science & Technology*, 51(3), 1718–1726. doi: 10.1021/acs.est.6b04704
160. Stiefel, C., & Stintzing, F. (2023). Endocrine-active and endocrine-disrupting compounds in food – occurrence, formation and relevance. *NFS Journal*, 31, 57–92. doi: 10.1016/j.nfs.2023.03.004
161. Szafran, A. T., Stossi, F., Mancini, M. G., Walker, C. L., & Mancini, M. A. (2017). Characterizing properties of non-estrogenic substituted bisphenol analogs using high throughput microscopy and image analysis. *PLOS ONE*, 12(7), e0180141. doi: 10.1371/journal.pone.0180141
162. Średnicka, P., Juszczuk-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
163. Średnicka, P., Roszko, M. Ł., Popowski, D., Kowalczyk, M., Wójcicki, M., Emanowicz, P., Szczepańska, M., Kotyrba, D., & Juszczuk-Kubiak, E. (2023). Effect of *in vitro* cultivation on human gut microbiota composition using 16S

- rDNA amplicon sequencing and metabolomics approach. *Scientific Reports*, 13(1), 3026. doi: 10.1038/s41598-023-29637-2
164. Tang, N., Wang, D., Chen, X., Zhang, M., Lv, W., & Wang, X. (2022). Maternal bisphenol A and triclosan exposure and allergic diseases in childhood: a meta-analysis of cohort studies. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(55), 83389–83403. doi: 10.1007/s11356-022-21575-2
165. Tao, X., Huang, W., Pan, L., Sheng, L., Qin, Y., Chen, L., Yu, L., Wu, G., Wan, J., & Li, H. (2023). Optimizing *ex vivo* culture conditions to study human gut microbiome. *ISME Communications*, 3(1). doi: 10.1038/s43705-023-00245-5
166. Thoene, M., Dzika, E., Gonkowski, S., & Wojtkiewicz, J. (2020). Bisphenol S in Food Causes Hormonal and Obesogenic Effects Comparable to or Worse than Bisphenol A: A Literature Review. *Nutrients*, 12(2), 532. doi: 10.3390/nu12020532
167. Tian, K., Yu, Y., Qiu, Q., Sun, X., Meng, F., Bi, Y., Gu, J., Wang, Y., Zhang, F., & Huo, H. (2022). Mechanisms of BPA Degradation and Toxicity Resistance in *Rhodococcus equi*. *Microorganisms*, 11(1), 67. doi: 10.3390/microorganisms11010067
168. Tripathi, M., Singh, P., Singh, R., Bala, S., Pathak, N., Singh, S., Chauhan, R. S., & Singh, P. K. (2023). Microbial biosorbent for remediation of dyes and heavy metals pollution: A green strategy for sustainable environment. *Frontiers in Microbiology*, 14. doi: 10.3389/fmicb.2023.1168954
169. Usman, A., & Ahmad, M. (2019). Computational study suggesting reconsideration of BPA analogues based on their endocrine disrupting potential estimated by binding affinities to nuclear receptors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 154–161. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.12.071
170. Usman, A., Ikhlas, S., & Ahmad, M. (2019). Occurrence, toxicity and endocrine disrupting potential of Bisphenol-B and Bisphenol-F: A mini-review. *Toxicology Letters*, 312, 222–227. doi: 10.1016/j.toxlet.2019.05.018
171. Vartoukian, S. R. (2016). Cultivation strategies for growth of uncultivated bacteria. *Journal of Oral Biosciences*, 58(4), 143–149. doi: 10.1016/j.job.2016.08.001

172. Vijayaraghavan, K., & Yun, Y.-S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26(3), 266–291. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.02.002
173. vom Saal, F. S., & Vandenberg, L. N. (2021). Update on the Health Effects of Bisphenol A: Overwhelming Evidence of Harm. *Endocrinology*, 162(3). doi: 10.1210/endocr/bqaa171
174. von Martels, J. Z. H., Sadaghian Sadabad, M., Bourgonje, A. R., Blokzijl, T., Dijkstra, G., Faber, K. N., & Harmsen, H. J. M. (2017). The role of gut microbiota in health and disease: *In vitro* modeling of host-microbe interactions at the aerobe-anaerobe interphase of the human gut. *Anaerobe*, 44, 3–12. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.01.001
175. Vorkamp, K., Esteban López, M., Gilles, L., Göen, T., Govarts, E., Hajeb, P., Katsonouri, A., Knudsen, L. E., Kolossa-Gehring, M., Lindh, C., Nübler, S., Pedraza-Díaz, S., Santonen, T., & Castaño, A. (2023). Coordination of chemical analyses under the European Human Biomonitoring Initiative (HBM4EU): Concepts, procedures and lessons learnt. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 251, 114183. doi: 10.1016/j.ijheh.2023.114183
176. Wang, X., Ha, D., Yoshitake, R., Chan, Y. S., Sadava, D., & Chen, S. (2021). Exploring the Biological Activity and Mechanism of Xenoestrogens and Phytoestrogens in Cancers: Emerging Methods and Concepts. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8798. doi: 10.3390/ijms22168798
177. Wang, Y., Dai, W., Li, Y., Wu, Z., Kan, Y., Zeng, H., & He, Q. (2023). Bisphenol S induces oxidative stress-mediated impairment of testosterone synthesis by inhibiting the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 37(3). doi: 10.1002/jbt.23273
178. Wang, Yonghua, Rui, M., Nie, Y., & Lu, G. (2018). Influence of gastrointestinal tract on metabolism of bisphenol A as determined by *in vitro* simulated system. *Journal of Hazardous Materials*, 355, 111–118. doi: 10.1016/j.jhazmat.2018.05.011
179. Wang, Yonghua, Wang, B., Wang, Q., Liu, Y., Liu, X., Wu, B., & Lu, G. (2021). Intestinal toxicity and microbial community disorder induced by bisphenol F and bisphenol S in zebrafish. *Chemosphere*, 280, 130711. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.130711

180. Wu, M., Wang, S., Weng, Q., Chen, H., Shen, J., Li, Z., Wu, Y., Zhao, Y., Li, M., Wu, Y., Yang, S., Zhang, Q., & Shen, H. (2021). Prenatal and postnatal exposure to Bisphenol A and Asthma: a systemic review and meta-analysis. *Journal of Thoracic Disease*, 13(3), 1684–1696. doi: 10.21037/jtd-20-1550
181. Wu, W., Li, M., Liu, A., Wu, C., Li, D., Deng, Q., Zhang, B., Du, J., Gao, X., & Hong, Y. (2020). Bisphenol A and the Risk of Obesity a Systematic Review With Meta-Analysis of the Epidemiological Evidence. In *Dose-Response* (Vol. 18, Issue 2). SAGE Publications Inc. doi: 10.1177/1559325820916949
182. Yang, C., Mai, J., Cao, X., Burberry, A., Cominelli, F., & Zhang, L. (2023). ggpicrust2: an R package for PICRUST2 predicted functional profile analysis and visualization. *Bioinformatics*, 39(8). doi: 10.1093/bioinformatics/btad470
183. Yao, Y., Cai, X., Fei, W., Ye, Y., Zhao, M., & Zheng, C. (2022). The role of short-chain fatty acids in immunity, inflammation and metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(1), 1–12. doi: 10.1080/10408398.2020.1854675
184. Yilmaz, B., Terekeci, H., Sandal, S., & Kelestimur, F. (2020). Endocrine disrupting chemicals: exposure, effects on human health, mechanism of action, models for testing and strategies for prevention. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 21(1), 127–147. doi: 10.1007/s11154-019-09521-z
185. Yousi, F., Kainan, C., Junnan, Z., Chuanxing, X., Lina, F., Bangzhou, Z., Jianlin, R., & Baishan, F. (2019a). Evaluation of the effects of four media on human intestinal microbiota culture *in vitro*. *AMB Express*, 9(1), 69. doi: 10.1186/s13568-019-0790-9
186. Zhang, Y.-F., Ren, X.-M., Li, Y.-Y., Yao, X.-F., Li, C.-H., Qin, Z.-F., & Guo, L.-H. (2018). Bisphenol A alternatives bisphenol S and bisphenol F interfere with thyroid hormone signaling pathway *in vitro* and *in vivo*. *Environmental Pollution*, 237, 1072–1079. doi: 10.1016/j.envpol.2017.11.027
187. Zhang, D., Jian, Y.-P., Zhang, Y.-N., Li, Y., Gu, L.-T., Sun, H.-H., Liu, M.-D., Zhou, H.-L., Wang, Y.-S., & Xu, Z.-X. (2023). Short-chain fatty acids in diseases. *Cell Communication and Signaling*, 21(1), 212. doi: 10.1186/s12964-023-01219-9
188. Zhang, H., Zha, X., Zhang, B., Zheng, Y., Elsabagh, M., Wang, H., & Wang, M. (2024). Gut microbiota contributes to bisphenol A-induced maternal intestinal and placental apoptosis, oxidative stress, and fetal growth restriction in pregnant

- ewe model by regulating gut-placental axis. *Microbiome*, 12(1), 28. doi: 10.1186/s40168-024-01749-5
189. Zhao, N., Mao, L., Zhao, M., & Hu, Z. (2022). Associations between Gut Microbiota and Metabolism of Bisphenol A in Sprague-Dawley Rat. doi: 10.21203/rs.3.rs-1747140/v1
190. Zhao, Q., Yang, F., Pu, Q., Zhao, R., Jiang, S., & Tang, Y. (2024). Integrative metabolomics and gut microbiota analyses reveal the protective effects of DHA-enriched phosphatidylserine on bisphenol A-induced intestinal damage. *Journal of Functional Foods*, 117, 106229. doi: 10.1016/j.jff.2024.106229
191. Zhu, Y., Yang, C., Luo, B.-B., Zhou, K., & Liu, S. (2017). Efficiency of dairy strains of lactic acid bacteria to bind bisphenol A in phosphate buffer saline. *Food Control*, 73, 1203–1209. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.10.039
192. Zoghi, A., Khosravi-Darani, K., & Sohrabvandi, S. (2014). Surface Binding of Toxins and Heavy Metals by Probiotics. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 14(1), 84–98. doi: 10.2174/1389557513666131211105554

Tabela A1. Wyniki analizy PICRUSt przewidywanych szlaków funkcjonalnych GM po ekspozycji na BPA. Do identyfikacji różnic w obfitości szlaków Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) zastosowano analizę LinDA przy użyciu pakietu ggpicrust2 ($P < 0,05$). Przedstawiono wybrane szlaki o najwyższym poziomie istotności statystycznej.

Szlak KEGG	Wartość <i>p</i>	Nazwa szlaku	Klasa szlaku
ko04020	1.89E-15	Szlak sygnalizacji wapniowej	Przetwarzanie informacji o środowisku; Transdukcja sygnału
ko00524	7.17E-30	Biosynteza neomycyny, kanamycyny i gentamycyny	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00521	6.62E-15	Biosynteza streptomycyny	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00940	1.76E-12	Biosynteza fenylopropanoidów	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00944	6.84E-12	Biosynteza flawonów i flawonoli	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00040	4.37E-19	Wzajemne konwersje pentozy i glukuronianu	Metabolizm; Metabolizm węglowodanów
ko00052	7.06E-16	Metabolizm galaktozy	Metabolizm; Metabolizm węglowodanów
ko00562	3.37E-13	Metabolizm fosforanu inozytolu	Metabolizm; Metabolizm węglowodanów
ko00051	1.08E-11	Metabolizm fruktozy i mannozy	Metabolizm; Metabolizm węglowodanów
ko00531	7.39E-36	Degradacja glikozaminoglikanu	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00511	1.98E-33	Degradacja innych glikanów	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00603	6.85E-32	Biosynteza glikosfingolipidów - serie globo i isoglobo	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00604	5.58E-28	Biosynteza glikosfingolipidów - seria ganglio	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów

Szlak KEGG	Wartość <i>p</i>	Nazwa szlaku	Klasa szlaku
ko00600	4.50E-27	Metabolizm sfingolipidów	Metabolizm; Metabolizm lipidów
ko00121	6.89E-24	Wtórna biosynteza kwasów żółciowych	Metabolizm; Metabolizm lipidów
ko00785	3.56E-24	Metabolizm kwasu liponowego	Metabolizm; Metabolizm kofaktorów i witamin
ko00130	2.37E-14	Biosynteza ubichinonu i innych terpenoidów i chinonów	Metabolizm; Metabolizm kofaktorów i witamin
ko00362	6.00E-15	Degradacja benzoesu	Metabolizm; Ksenobiotyki, biodegradacja i metabolizm
ko00623	2.78E-12	Degradacja toluenu	Metabolizm; Ksenobiotyki, biodegradacja i metabolizm
ko00627	1.75E-11	Degradacja aminobenzoesu	Metabolizm; Ksenobiotyki, biodegradacja i metabolizm

Tabela A2. Wyniki analizy PICRUST przewidywanych szlaków funkcjonalnych GM po ekspozycji na BPS. Do identyfikacji różnic w obfitości szlaków Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) zastosowano analizę LinDA przy użyciu pakietu ggpicrust2 ($p < 0,05$). Przedstawiono wybrane szlaki o najwyższym poziomie istotności statystycznej.

Szlak KEGG	Wartość <i>p</i>	Nazwa szlaku	Klasa szlaku
ko00311	1.17E-14	Biosynteza penicyliny i cefalosporyny	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00944	1.05E-12	Biosynteza flawonów i flawonoli	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00524	1.33E-12	Biosynteza neomycyny, kanamycyny i gentamycyny	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00040	3.55E-17	Wzajemne konwersje pentozy i glukuronianu	Metabolizm; Metabolizm węglowodanów
ko00052	5.43E-11	Metabolizm galaktozy	Metabolizm; Metabolizm węglowodanów
ko00051	1.07E-09	Metabolizm fruktozy i mannozy	Metabolizm; Metabolizm węglowodanów
ko00603	5.83E-19	Biosynteza glikosfingolipidów - serie globo i isoglobo	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00511	6.09E-19	Degradacja innych glikanów	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00531	1.34E-13	Degradacja glikozaminoglikanu	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00600	7.23E-16	Metabolizm sfingolipidów	Metabolizm; Metabolizm lipidów
ko00121	1.67E-10	Biosynteza wtórnych kwasów żółciowych	Metabolizm; Metabolizm lipidów

Szlak KEGG	Wartość <i>p</i>	Nazwa szlaku	Klasa szlaku
ko00130	2.22E-15	Biosynteza ubichinonu i innych terpenoidów i chinonów	Metabolizm; Metabolizm kofaktorów i witamin
ko00785	1.20E-13	Metabolizm kwasu liponowego	Metabolizm; Metabolizm kofaktorów i witamin
ko00830	4.90E-12	Metabolizm retinolu	Metabolizm; Metabolizm kofaktorów i witamin
ko00623	1.51E-11	Degradacja toluenu	Metabolizm; Ksenobiotyki, biodegradacja i metabolizm
ko00362	4.86E-11	Degradacja benzoesanu	Metabolizm; Ksenobiotyki, biodegradacja i metabolizm
ko00980	1.82E-10	Metabolizm ksenobiotyków przez cytochrom P450	Metabolizm; Ksenobiotyki, biodegradacja i metabolizm
ko00982	1.82E-10	Metabolizm leków - cytochrom P450	Metabolizm; Ksenobiotyki, biodegradacja i metabolizm

Tabela A3. Wyniki analizy PICRUSt przewidywanych szlaków funkcjonalnych GM po ekspozycji na BPF. Do identyfikacji różnic w obfitości szlaków Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) zastosowano analizę LinDA przy użyciu pakietu ggpicrust2 ($p < 0,05$). Przedstawiono wybrane szlaki o najwyższym poziomie istotności statystycznej.

Szlak KEGG	Wartość <i>p</i>	Nazwa szlaku	Klasa szlaku
ko00360	1.67E-12	Metabolizm fenyloalaniny	Metabolizm; Metabolizm aminokwasów
ko00944	7.04E-16	Biosynteza flawonów i flawonoli	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00524	5.11E-14	Biosynteza neomycyny, kanamycyny i gentamycyny	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00311	1.09E-12	Biosynteza penicyliny i cefalosporyny	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00531	4.03E-26	Degradacja glikozaminoglikanu	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00511	6.24E-26	Degradacja innych glikanów	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00603	4.51E-22	Biosynteza glikosfingolipidów - serie globo i isoglobo	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00540	1.31E-18	Biosynteza lipopolisacharydów	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00604	3.35E-16	Biosynteza glikosfingolipidów - seria ganglio	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00600	1.56E-17	Metabolizm sfingolipidów	Metabolizm; Metabolizm lipidów
ko00121	8.18E-15	Biosynteza wtórnych kwasów żółciowych	Metabolizm; Metabolizm lipidów
ko00130	2.50E-23	Biosynteza ubichinonu i innych terpenoidów i chinonów	Metabolizm; Metabolizm kofaktorów i witamin

Szlak KEGG	Wartość <i>p</i>	Nazwa szlaku	Klasa szlaku
ko00785	3.71E-23	Metabolizm kwasu liponowego	Metabolizm; Metabolizm kofaktorów i witamin
ko00830	4.96E-19	Metabolizm retinolu	Metabolizm; Metabolizm kofaktorów i witamin
ko01053	4.93E-17	Biosynteza peptydów nierybosomalnych z grupy sideroforowej	Metabolizm; Metabolizm terpenoidów i poliketydów
ko00623	1.29E-18	Degradacja toluenu	Metabolizm; Ksenobiotyki, biodegradacja i metabolizm
ko00980	1.00E-15	Metabolizm ksenobiotyków przez cytochrom P450	Metabolizm; Ksenobiotyki, biodegradacja i metabolizm
ko00982	1.00E-15	Metabolizm leków - cytochrom P450	Metabolizm; Ksenobiotyki, biodegradacja i metabolizm

Tabela A4. Wyniki analizy PICRUST przewidywanych szlaków funkcjonalnych GM po ekspozycji na TMBPF. Do identyfikacji różnic w obfitości szlaków Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) zastosowano analizę LinDA przy użyciu pakietu ggpicrust2 ($p < 0,05$). Przedstawiono wybrane szlaki o najwyższym poziomie istotności statystycznej.

Szlak KEGG	Wartość <i>p</i>	Nazwa szlaku	Klasa szlaku
ko00940	1.43E-09	Biosynteza fenylopropanoidów	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00524	1.67E-08	Biosynteza neomycyny, kanamycyny i gentamycyny	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00521	3.89E-05	Biosynteza streptomycyny	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00944	0.00011189	Biosynteza flawonów i flawonoli	Metabolizm; Biosynteza innych metabolitów wtórnych
ko00040	5.21E-12	Wzajemne konwersje pentozy i glukuronianu	Metabolizm; Metabolizm węglowodanów
ko00052	8.77E-09	Metabolizm galaktozy	Metabolizm; Metabolizm węglowodanów
ko00051	2.51E-07	Metabolizm fruktozy i mannozy	Metabolizm; Metabolizm węglowodanów
ko00520	5.53E-05	Metabolizm aminokwasów i cukrów nukleotydowych	Metabolizm; Metabolizm węglowodanów
ko00511	4.70E-22	Degradacja innych glikanów	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00603	1.16E-20	Biosynteza glikosfingolipidów - serie globo i isoglobo	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00531	2.81E-15	Degradacja glikozaminoglikanu	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00604	2.80E-08	Biosynteza glikosfingolipidów - seria ganglio	Metabolizm; Biosynteza i metabolizm glikanów
ko00600	1.26E-18	Metabolizm sfingolipidów	Metabolizm; Metabolizm lipidów

Szlak KEGG	Wartość <i>p</i>	Nazwa szlaku	Klasa szlaku
ko00121	1.04E-07	Biosynteza wtórnych kwasów żółciowych	Metabolizm; Metabolizm lipidów
ko00785	1.36E-10	Metabolizm kwasu liponowego	Metabolizm; Metabolizm kofaktorów i witamin
ko00130	7.93E-08	Biosynteza ubichinonu i innych terpenoidów i chinonów	Metabolizm; Metabolizm kofaktorów i witamin
ko00830	1.94E-06	Metabolizm retinolu	Metabolizm; Metabolizm kofaktorów i witamin
ko00460	3.06E-06	Metabolizm cyjanoaminokwasów	Metabolizm; Metabolizm innych aminokwasów
ko00440	2.09E-05	Metabolizm fosfonianów i fosfinianów	Metabolizm; Metabolizm innych aminokwasów
ko00362	5.60E-09	Degradacja benzoesanu	Metabolizm; Ksenobiotyki, biodegradacja i metabolizm

Komisja Etyki Badań Naukowych z
Udziałem Ludzi działającej
przy Instytucie Nauk o Żywieniu Człowieka SGGW

**UCHWAŁA KOMISJI ETYKI BADAŃ NAUKOWYCH Z UDZIAŁEM
LUDZI przy Instytucie Nauk o Żywieniu Człowieka SGGW w sprawie
zgodności projektu badania naukowego z zasadami etyki z**

dnia 19.07.2021

Nr Uchwały 23/2021

TYTUŁ BADANIA

**Interakcje związków endokrynnie czynnych obecnych w żywności z mikroflorą
jelitową człowieka w modelu in vitro**

KIEROWNIK BADANIA

Imię i nazwisko Kierownika projektu: mgr Paulina Średnicka
Imię i nazwisko wykonawcy (-ów): mgr Paulina Średnicka, dr hab. inż. Marek Roszko, prof. IBPRS, dr hab. Edyta Juszczyk-Kubiak, prof. IBPRS
Miejsce prowadzenia badań/badania: Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy
Czas prowadzenia badań/ badania: Od momentu uzyskania zgody Komisji Etyki Badań Naukowych do sierpnia 2023 roku.

Po zapoznaniu się z przedstawioną dokumentacją dotyczącą projektu badania naukowego o w/w tytule, Komisja Etyki Badań Naukowych z Udziałem Ludzi przy Instytucie Nauk o Żywieniu Człowieka SGGW działając na podstawie § 11, § 15, § 16 i § 17 Regulaminu Komisji Etyki Badań Naukowych z Udziałem Ludzi działającej przy Instytucie Nauk o Żywieniu Człowieka postanawia w przedmiocie zgodności projektu badania naukowego z zasadami etycznymi wydać opinię:

Pozytywną

UZASADNIENIE opinii

Wniosek spełnia wymagania formalne i nie narusza zasad etyki w zakresie badań z udziałem ludzi.

Warszawa, 19.07.2021.

.....
Podpis Przewodniczącego Komisji

Oświadczenie o wkładzie merytorycznym Autorów
w opracowaniu publikacji ^{1/}

Paulina Średnicka

Imię i nazwisko

Pracownia Biotechnologii i Inżynierii Molekularnej,
Zakład Mikrobiologii,
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno - Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego
- Państwowy Instytut Badawczy
Jednostka Organizacyjna / Instytut / miejsce realizacji pracy doktorskiej

Oświadczenie dotyczy publikacji pt.

Influence of Bisphenol A and Its Analogues on Human Gut Microbiota Composition and Metabolic
Activity: Insights from an *In Vitro* Model

Tytuł artykułu

Science of Total Environment

Publikacja w trakcie recenzji

Nazwa czasopisma, rok, numer, strony, DO¹

Średnicka Paulina*, Roszko Marek, Emanowicz Paulina, Wójcicki Michał, Popowski Dominik,
Kanabus Joanna, Juszczuk-Kubiak Edyta

Autorzy: Imię i nazwisko; Imię i nazwisko, Imię i nazwisko; Imię i nazwisko (²)

Lp.	Nazwisko i imię Autora	Opis wkładu merytorycznego	Ew. szacunkowy udział %	Afiliacja	Podpis Autora
1	Średnicka Paulina	Koncepcja badania, metodologia, analiza formalna i statystyczna, przeprowadzenie badań, zasoby, wizualizacja, przygotowanie oryginalnej wersji manuskryptu, recenzja i edycja.	70%	Instytut Biotechnologii Przemysłu RolnoSpożywczego im. Waława Dąbrowskiego Państwowy Instytut Badawczy	<i>Średnicka</i>

¹ Wypełnia pierwszy Autor, a jeśli pierwszy Autor jest spoza Jednostki organizacyjnej współprowadzącej SD, do której przypisany jest doktorat, najwyżej wymieniany wśród Autorów pracownik danej jednostki współprowadzącej SD

¹ Zaznaczyć przy odpowiednim nazwisku: */ autor korespondencyjny, **/doktorant. Pozostali autorzy - nazwiska bez zaznaczenia gwiazdką/gwiazdkami.

2	Rozzko Marek	Koncepcja badania, metodologia, nadzór.	5%		
3	Emanowicz Paulina	Prowadzenie badań, recenzja i edycja.	5%		Paulina Emanowicz
4	Wójcicki Michał	Prowadzenie badań, recenzja i edycja.	5%		Michał Wójcicki
5	Popowski Dominik	Metodologia, prowadzenie badań, analiza formalna i statystyczna, wizualizacja, recenzja i edycja	5%		
6	Kanabus Joanna	Prowadzenie badań	5%		Joanna Kanabus
7	Juszczuk-Kubiak Edyta	Koncepcja badania, metodologia, zasoby, nadzór, recenzja i edycja	5%		Edyta Kubiak