



Dr hab. Edyta Reszka, prof. IMP
Zakład Genetyki Molekularnej i Epigenetyki
Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. J. Nofera
Łódź

Łódź, 2 marca 2017r.

OCENA

**rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Mokrej pt.
„Ocena wpływu bisfenolu A i jego wybranych analogów na jednojądrzaste komórki krwi
obwodowej człowieka”,**

**wykonanej pod kierunkiem dr hab. Jaromira Michałowicza, prof. UŁ, w Katedrze Biofizyki
Skażeń Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego.**

Bisfenol A czyli 2,2-bis(p-hydroksyfenylo)propan (BPA), został zsyntetyzowany po raz pierwszy przez rosyjskiego chemika Aleksandra Pawłowicza Dianina w 1891 roku. Na dużą skalę rozpoczęto wykorzystywać ten związek chemiczny w latach 50-tych ubiegłego wieku, głównie do utwardzania tworzyw poliwęglanowych oraz do produkcji żywic epoksydowych. BPA stosuje się powszechnie do produkcji butelek, pojemników na żywność oraz puszek do przechowywania żywności i napojów, ale również do produkcji wielu używanych powszechnie artykułów i sprzętu niezwiązanych z żywnością.

Chociaż uważa się, że ludzie narażeni są przewlekłe na raczej niskie stężenia BPA, głównie poprzez żywność i wodę pitną oraz przez drogi oddechowe i przez skórę, to BPA stanowi istotny problem zdrowia publicznego. Pierwsze naukowe doniesienia na temat możliwego negatywnego wpływu BPA na zdrowie, dotyczyły zaburzenia gospodarki hormonalnej. Na początku lat 30-tych ubiegłego wieku, brytyjski biochemik Edward Charles Dodds wykazał, że BPA posiada słabe działanie estrogenowe w stymulacji układu hormonalnego u samic szczurów. Udowodniono, że BPA działa jako ksenoestrogen, wykazując powinowactwo do różnych receptorów, w tym estrogenowych ERA i ERB, receptora androgenowego AR oraz estrogen-related receptor- γ (ERR- γ). Istnieją poważne dowody w oparciu o badania in vitro, badania na zwierzętach, czy badania epidemiologiczne u ludzi, wskazujące, że BPA zwiększa ryzyko raka, zaburzeń rozwojowych, cukrzycy, otyłości, zespołu metabolicznego, astmy, chorób serca, chorób krążenia i może przyczyniać się do bezpłodności, czy zmniejszonej płodności.

Z powodu potencjalnie dużej szkodliwości BPA na zdrowie człowieka, ostatnia dekada, przyniosła szereg ograniczeń dotyczących stosowania BPA do produkcji poliwęglanów czy żywic epoksydowych. Rozważa się lub rozpoczęto już stosowanie analogów BPA, takich jak bisfenol S (BPS) w produkcji papieru termicznego i innych produktach; bisfenol F (BPF) w produkcji konserw i napojów; a bisfenol AF (BPAF) stosuje się do wytwarzania żywic epoksydowych i fluoroelastomerów. Podobieństwo strukturalne analogów bisfenoli do BPA może powodować, że BPS, BPF i BPAF wywołują podobne negatywne skutki zdrowotne jak w przypadku BPA. Co istotnie, wykazano już, że analogi BPA, podobnie jak BPA mogą zaburzać gospodarkę hormonalną.

Brak badań na temat działania BPA oraz jego analogów BPS, BPF i BPAF na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) oraz wyniki badań epidemiologicznych wskazujące na związek między narażeniem na BPA a upośledzeniem funkcji układu immunologicznego u ludzi, skłoniły Doktorantkę do przeprowadzenia opisanych w Dysertacji badań. Celem rozprawy była ocena wpływu BPA i jego wybranych analogów na jednojądrzaste

Ośrodek Współpracujący z WHO





komórki krwi obwodowej człowieka, poprzez różne mechanizmy komórkowe, w tym cytotoksyczność, działanie prooksydacyjne i genotoksyczne.

Tak przedstawiony cel pracy Doktorantka zrealizowała w oparciu o trzy oryginalne publikacje:

- I. Michałowicz J, Mokra K, Bąk A. Bisphenol A and its analogs induce morphological and biochemical alterations in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Toxicology In Vitro*. 29, 1464-1472, 2015. doi:10.1016/j.tiv.2015.05.012.
- II. Mokra K, Kocia M, Michałowicz J. Bisphenol A and its analogs exhibit different apoptotic potential in peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food and Chemical Toxicology*. 84, 79-88, 2015. doi: 10.1016/j.fct.2015.08.007.
- III. Mokra K, Kuźmińska-Surowaniec A, Woźniak K, Michałowicz J. Evaluation of DNA-damaging potential of bisphenol A and its selected analogs in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food and Chemical Toxicology*. 100, 62-69, 2017. doi: 10.1016/j.fct.2016.12.003.

Rozprawa doktorska pani mg Katarzyny Mokrej ma formę spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych z części A listy publikacji określonych przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego (105 punktów), posiadających współczynnik wpływu Impact Factor (10,506 punktów), znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR); co spełnia kryteria art. 13, ust. 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595).

Indywidualny udział Doktorantki w powstaniu powyższych artykułów, stanowiących rozprawę doktorską został przez nią określony na 55, 65 i 60%, odpowiednio. Doktorantka wykazała również szczegółowo swój wkład przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników pracy doktorskiej, tym samym spełniając warunki podane w art. 13, ust. 4 ustawy.

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska zawiera: spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników, streszczenie w języku polskim oraz angielskim, dorobek naukowy, oświadczenia współautorów prac oraz kopie trzech publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, spełniając w kryteria art. 13, ust. 6 ustawy.

Autorka dysertacji zaplanowała szczegółowo zakres prac badawczych, które podzieliła na trzy duże eksperymenty, zaprezentowane następnie w trzech opublikowanych artykułach. Doktorantka zastosowała krótkoterminowe (1 godzina i 4 godziny) narażenie komórek PBMC na różne stężenia BPA oraz 3 jego analogów: BPS, BPF oraz BPAF. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie przez Doktorantkę bardzo szerokiej gamy metod badawczych, wymagających dużego doświadczenia i wiedzy badawczej. Wymienię tylko niektóre z nich zastosowane w dysertacji: techniki cytometrii przepływowej do badania żywotności komórek, stresu oksydacyjnego, zmian apoptotycznych, transbłonowego potencjału mitochondrialnego; techniki luminometryczne do pomiaru ATP; techniki fluorymetryczne do analizy uszkodzeń białek i peroksydacji lipidów; techniki spektrofotometryczne; techniki mikroskopii fluorescencyjnej; test immunoenzymatyczny; test kometowy.

W pierwszej publikacji (I) Doktorantka analizowała żywotność komórek PBMC, ich zmiany morfologiczne, uszkodzenia oksydacyjne białek i lipidów oraz stężenie ATP, jako efekt działania BPA i jego analogów; w publikacji II – wpływ BPA i jego analogów na mechanizm apoptozy w komórkach

Ośrodek Współpracujący z WHO





PBMC; a w publikacji III – uszkodzenia DNA spowodowane narażeniem komórek PBMC na BPA i jego analogi.

Realizując tak szeroko zakrojone badania, pani mgr Katarzyna Mokra uzyskała wiele interesujących wyników, które następnie szczegółowo przedyskutowała z danymi literaturowymi. Lektura dysertacji wskazuje niezbicie, że Doktorantka jest dojrzałym badaczem, realizującym cele naukowe we właściwy sposób, nie naruszając podstawowych zasad pracy naukowej; wykazała cechy starannego i rzetelnego pracownika naukowego dbałego o wiarygodne przedstawienie wykonanych eksperymentów i uzyskanych wyników; perfekcyjnie opanowała warsztat naukowy, wykazała się umiejętnością prowadzenia dyskusji naukowej i wyciągania ze swoich badań, ostrożnych i wyważonych następujących wniosków:

- BPA, BPF, a w szczególności BPAF zmniejszały żywotność jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka m.in. poprzez obniżenie poziomu ATP; badane związki indukowały oksydacyjne uszkodzenia białek i lipidów na drodze wzmagania produkcji reaktywnych form tlenu.
- BPA i jego analogi wykazywały zróżnicowany potencjał apoptotyczny w badanych komórkach; szlakiem w większym stopniu zaangażowanym w proces apoptozy była ścieżka mitochondrialna.
- BPA i jego analogi powodowały pęknięcia jednoniciowe oraz w znacznie mniejszym stopniu pęknięcia dwuniciowe DNA; powstałe uszkodzenia ulegały efektywnej, jednak niepełnej (poza komórkami preinkubowanymi z BPS) naprawie.
- BPA oraz BPAF indukowały oksydacyjne uszkodzenia białek i lipidów oraz pojedyncze pęknięcia nici DNA w badanych komórkach w stężeniach porównywalnych do poziomu BPA oznaczanego we krwi populacji ogólnej.
- Uzyskane wyniki (w zakresie analizowanych parametrów oraz badanego typu komórek) wskazują na zasadność zastępowania BPA przez BPS w syntezie tworzyw sztucznych, natomiast poddają w wątpliwość stosowanie w tym celu BPAF.

Oceniając pracę doktorską należy podkreślić, że Doktorantka wykonała żmudne, trudne technicznie i ciekawe badania, wymagające dużego zaangażowania zarówno w pracę laboratoryjną, jak i wymagające dużej wiedzy na temat toksycznego działania BPA oraz stosowanych technik badawczych. Zakres metod badawczych stosowanych przez Doktorantkę w rozprawie doktorskiej jest niezwykle imponujący.

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska jest niewątpliwie oryginalna. Należy podkreślić, że pomysł i koncepcja pracy doktorskiej są pionierskie. Nie prowadzono do tej pory badań *in vitro*, gdzie analizowano by efekty narażenia na BPA i jego analogów na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka, poprzez różne mechanizmy komórkowe, w tym cytotoksyczność, działanie prooksydacyjne i genotoksyczne. Następną mocną stroną pracy doktorskiej jest wybór nie tylko BPA, ale również jego kluczowych analogów, związków alternatywnych dla BPA, które są już wprowadzane do masowej produkcji. Dodatkowo, Doktorantka zastosowała stężenia BPA i jego analogów w bardzo szerokim zakresie, a badania efektów narażenia na niskie (w zakresie środowiskowych) stężenia wydają się szczególnie cenne.

Moim zdaniem, tak unikalne wyniki badań mogą stanowić dobrą podstawę do przeprowadzenia analiz z wykorzystaniem innych modeli komórkowych, badań na zwierzętach oraz badań epidemiologicznych u ludzi. Badania Doktorantki stanowią cenne uzupełnienie do kontynuowania i rozszerzenia badań z zakresu działania zapalnego, mutagennego, klastogennego i epigenetycznego BPA i jego analogów.

Ośrodek Współpracujący z WHO






Przy tak profesjonalnej realizacji tematu rozprawy doktorskiej, trudno dopatrzeć się braków, uchybień, czy niedopowiedzeń, bo wszelkie kwestie merytoryczne oraz metodologiczne zostały przedstawione rzetelnie i bardzo szczegółowo. Potwierdzone to przecież zostało przez ocenę i ewentualne komentarze w trakcie ewaluacji trzech spójnych artykułów przesłanych do redakcji czasopism. Z obowiązku recenzenta, chciałabym jednak zwrócić uwagę na jedną kwestię z prośbą o ustosunkowanie się do niej i komentarz Doktorantki.

Doktorantka analizowała szeroki zakres stężeń BPA i jego analogów, odnosząc je do narażenia środowiskowego i zawodowego lub przypadkowego; stężeń BPA porównywalnych do tych oznaczanych we krwi populacji ogólnej. Chciałabym prosić Doktorantkę o odniesienie się do rekomendowanej przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) tymczasowej dawki tolerowanego dziennego pobrania (TDI) dla BPA, która od grudnia 2014 roku wynosi 4 µg/kg masy ciała/dzień. Czy można potwierdzić, że narażenie na BPA i jego analogi w stężeniu zbliżonym do wartości TDI nie będzie powodować negatywnych skutków w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka?

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Mokrej, przygotowywana w postaci spójnego tematycznie zbioru opublikowanych artykułów, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wnoszącego istotne, nowe treści do rozwoju nauki oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki, a także jej umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, tj. spełnia warunki określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami).

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

**KIEROWNIK ZAKŁADU
GENETYKI MOLEKULARNEJ
I EPIGENETYKI**

dr hab. Edyta Reszka prof. IMP

