



Prof. dr hab. Halina Kleszczyńska

Wrocław, 17 maja 2018 r.

### Ocena

Rozprawy doktorskiej mgr Anety Wolskiej

pt.: "Wpływ bisfenolu A i jego wybranych analogów na erytrocyty człowieka"

Duża liczba przedmiotów codziennego użytku zawiera substancje toksyczne dla organizmu, niestety często ludzie nie są tego świadomi. Do takich należy bisfenol A (BPA), który jest składnikiem plastikowych butelek, pojemników, puszek i zabawek, a także występuje w urządzeniach elektronicznych, banknotach, materiałach stomatologicznych i kosmetykach. Głównym i zarazem najgroźniejszym źródłem narażenia organizmu człowieka na bisfenol A jest woda pitna i żywność, przechowywane w opakowaniach plastikowych lub puszkach. Badania dowodzą bowiem, że przedostaje się on z opakowań do żywności, w ilości zależnej od parametrów fizykochemicznych środowiska. Grupą osób najbardziej narażonych na bisfenol A są pracownicy zakładów przemysłowych produkujących: żywice epoksydowe i fenolowe, poliestry, poliakrylany, poliwęglany i papier termiczny. Może on wnikać do wnętrza organizmu drogą oddechową, pokarmową lub przez skórę.

Wykazano, że toksyczny dla organizmu ludzkiego bisfenol A jest obecny w tkankach i płynach ustrojowych osób nie tylko narażonych zawodowo, a jego odpowiednio wysokie stężenie w organizmie, jak stwierdzono na podstawie badań epidemiologicznych, powoduje między innymi wzrost ryzyka wystąpienia chorób serca, cukrzycy, alergii. Może on także wpływać na wzrost otyłości i bezpłodności.

W związku z rosnącym z roku na rok stężeniem bisfenolu A w otaczającym człowieka środowisku, prowadzone są badania nad jego strukturalnymi analogami (bisfenol S, bisfenol F i bisfenol AF), które sukcesywnie zastępują bisfenol A. Z założenia związki te powinny wykazywać mniejszą toksyczność oraz charakteryzować się zbliżonymi do BPA właściwościami.

Widząc konieczność włączenia się do badań związanych z ochroną organizmu człowieka przed toksycznym działaniem bisfenolu A, pani mgr Aneta Wolska podjęła się w swojej pracy



doktorskiej bardzo ważnych badań określających aktywność biologiczną BPF, BPS i BPAF w odniesieniu do erytrocytów człowieka, które są dobrym wskaźnikiem zmian, w tym patologicznych, wywołanych przez działanie ksenobiotyków na organizm.

Wcześniej zostały przeprowadzone badania nad wpływem bisfenolu A i jego analogów na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka (praca doktorska, Katarzyna Mokra – Ocena wpływu bisfenolu A i jego wybranych analogów na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka). W pełni uzasadnionym, dalszym etapem badań, wzbogacającym już zdobytą wiedzę, jest poznanie wpływu bisfenolu A i jego analogów na nieposiadające jądra erytrocyty człowieka.

Celem pracy doktorskiej mgr Anety Wolskiej było określenie wpływu bisfenolu A i jego wybranych analogów (BPS, BPF i BPAF) na erytrocyty człowieka. W szczególności zbadanie wpływu tych substancji na hemolizę, parametry morfologiczne i apoptotyczne erytrocytów człowieka, a także określenie skutków działania bisfenoli na: stres oksydacyjny, aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz na właściwości błony erytrocytu.

Przedłożona mi do recenzji praca doktorska pani mgr Anety Wolskiej "Wpływ bisfenolu A i jego wybranych analogów na erytrocyty człowieka" została zrealizowana pod kierunkiem pana dra hab. Jaromira Michałowicza prof. nadzw. Uniwersytetu Łódzkiego, w Katedrze Biofizyki i Skazań Środowiska Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego.

Badania wykonane w ramach tej pracy doktorskiej były finansowane z dwóch źródeł, zewnętrznego, tj. grantu przyznanego przez NCN (nr UMO-2012/07/NZ7/01174), kierowanego przez pana dr hab. Jaromira Michałowicza prof. nadzw. UŁ i wewnętrznego, tj. dotacji celowej dla młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich, przyznanej przez Wydział Biologii i Ochrony Środowiska UŁ. W ramach tej dotacji Doktorantka brała udział w dwóch projektach przyznanych w latach 2016 i 2017 (nr 5811/E-345/M/2016 i 5811/E-345/M/2017).

Praca doktorska składa się z czterech spójnych tematycznie artykułów doświadczalnych, opublikowanych w czasopiśmie znajdujących się na liście JCR. Taka forma rozprawy doktorskiej jest zgodna z obowiązującą ustawą (Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki, oraz Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014 r. w sprawie szczegółowego



trybu warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu naukowego profesora.

Rozprawę doktorską stanowią doświadczalne prace twórcze, zawierające kolejne etapy zrealizowanych badań, które omówię.

1. Maćczak A., Bukowska B., Michałowicz J. (2015) Comparative study of the effect of BPA and its selected analogues on hemoglobin oxidation, morphological alterations and hemolytic changes in human erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 176–177 (2015) 62–70

W pracy tej zbadano wpływ bisfenolu A (BPA) i jego analogów (BPS, BPF, BPAF) na stopień hemolizy, parametry morfologiczne i stopień utlenienia hemoglobiny erytrocytów człowieka. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej; techniki cytometrii przepływowej i przy użyciu mikroskopu z kontrastem fazowym. Badania wykazały różną aktywność biologiczną badanych związków w odniesieniu do krwinek czerwonych człowieka, ocenioną na podstawie skutków indukowanych przez te substancje. BPA okazał się najsilniejszym oksydantem hemoglobiny, natomiast BPAF w najwyższym stopniu indukował hemolizę. BPA i BPAF odpowiadają za powstawanie echinocytów, natomiast BPF powoduje powstawanie stomatocytów. Jak podkreśla Doktorantka, różne skutki wywołane przez badane związki w oddziaływaniu z erytrocytami człowieka są prawdopodobnie związane z obecnością różnych podstawników, zawartych w cząsteczkach tych substancji chemicznych, co z kolei wpływa na ich odmienną hydrofobowość, która jak wiadomo decyduje o głębokości wnikania związków do błony erytrocytów.

W ostatnim zdaniu na stronie 11, pani mgr A. Wolska napisała „...zmiany hemolityczne i oksydacyjne odnotowano pod wpływem bisfenoli w stężeniach, które mogą oddziaływać na organizm człowieka wskutek narażenia zawodowego...”, Sformułowanie jest niefortunne, ponieważ oddziaływanie z organizmem może kończyć się widocznym skutkiem lub nie. Doktorantka natomiast chciała podkreślić, że zmiany hemolityczne i oksydacyjne były widoczne przy stężeniach, na jakie narażone są osoby z racji pełnionego zawodu. Ponadto, chociaż moja



ocena nie dotyczy publikacji już ocenionych przed opublikowaniem, pozwolę sobie na uwagę natury technicznej, związanej z wykresem nr 2 ABC. Ze względu na znikomy procent hemolizy większość słupków jest niewidoczna. W przyszłości można albo na osi pionowej nanieść interesujący przedział wartości, albo wyniki przedstawić w tabelach.

2. Maćczak A., Cyrkler M., Bukowska B., Michałowicz J. (2016) Eryptosis-inducing activity of bisphenol A and its analogs in human red blood cells (in vitro study). *Journal of Hazardous Materials* 307, 328–335

W pracy tej zbadano proces apoptozy erytrocytów będącej skutkiem działania bisfenoli. Otrzymane wyniki badań pozwoliły stwierdzić, że użyte bisfenole wykazują różną aktywność w indukowaniu procesu eryptozy. Powodują one wzrost stężenia wapnia w cytozolu, przy czym za największe zmiany był odpowiedzialny BPAF. W szczególności badania wykazały zmiany w rozkładzie fosfatydyloseryny w błonach erytrocytów pod wpływem bisfenoli, które były największe w wyniku działania dwóch analogów BPAF i BPF. Zarejestrowano również największy wzrost aktywności kaspazy-3 i kalpain, w wyniku działania BPAF, natomiast mniejszy wpływ i porównywalny miały bisfenol BPA i jego analog BPS. Wszystkie bisfenole powodują eryptozę, która jest skutkiem zmiany poziomu jonów wapnia w cytozolu, delokalizacją fosfatydyloseryny i aktywacji kaspazy-3 i kalpain. Obserwowany proces ma miejsce przy stężeniach, z jakimi mają do czynienia osoby narażone zawodowo na badane bisfenole.

3. Maćczak A., Cyrkler M., Bukowska B., Michałowicz J. (2017) Bisphenol A, bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce different oxidative stress and damage in human red blood cells (in vitro study). *Toxicology in Vitro*, 41, 143–149

Badania zamieszczone w tej pracy dotyczą wpływu bisfenolu BPA i jego analogów (BPS, BPF i BPAF) na stres oksydacyjny i na aktywność systemu antyoksydacyjnego w erytrocytach człowieka. W badaniach tych określono wpływ użytych bisfenoli na poziom reaktywnych form



tlenu (RFT), w tym na poziom wysoce reaktywnego rodnika hydroksylowego. Stopień utlenienia lipidów, zależny od stężenia RFT, określano metodą TBARS. Spektrofotometrycznie, wyznaczono też poziom zredukowanego glutationu, a także aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa i katalaza. Wyniki badań wykazały, że użyte substancje w różnym stopniu działają prooksydacyjnie na lipidy, powodując wzrost stężenia reaktywnych form tlenu, ponadto obniżają poziom zredukowanego glutationu, oraz zmniejszają aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Najaktywniejszymi oksydantami były BPA i BPAS, natomiast BPS praktycznie nie był aktywny w zakresie stężeń, na jakie może być narażony organizm ludzki. Podsumowując, Doktorantka stwierdziła, że niekorzystny, prooksydacyjny wpływ na erythrocyty ludzkie mają: BPA i dwa jego analogi, BPF i BPAF.

4. Maćczak A., Duchnowicz P., Sicińska P., Koter-Michalak M., Bukowska B., Michałowicz J. (2017) The in vitro comparative study of the effect of BPA, BPS, BPF and BPAF on human erythrocyte membrane; perturbations in membrane fluidity, alterations in conformational state and damage to proteins, changes in ATP level and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase and AChE activities. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 351-359

Praca ta zawiera badania nad wpływem bisfenoli na płynność błony erythrocytów, konformację białek błonowych, oporność osmotyczną erythrocytów, oraz na poziom wewnątrzkomórkowego ATP, grup tiolowych, a także na aktywność acetylocholinoesterazy i ATPazy sodowo-potasowej. Podobnie jak wykazały wcześniejsze badania BPA i jego analogi – BPF, BPS i BPAF mają zróżnicowaną aktywność biologiczną, ponieważ wywołują różne skutki w oddziaływaniu z erythrocytami człowieka. Doktorantka stwierdziła, że wszystkie poddane badaniom związki zwiększały oporność osmotyczną erythrocytów, zmieniały stan konformacyjny białek błonowych, odpowiadały za oksydacyjne uszkodzenie białek błonowych oraz obniżały aktywność ATPazy sodowo-potasowej i acetylocholinoesterazy. Najaktywniejszy w skutkach wywołanych w erythrocytach człowieka okazał się analog BPAF, w przeciwieństwie do BPS, który indukował niektóre zmiany.



Oceniana rozprawa doktorska oprócz kopii publikacji wchodzących w skład rozprawy zawiera następujące rozdziały: spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników, streszczenie w języku polskim i angielskim, dorobek naukowy oraz oświadczenia współautorów prac.

W ramach punktu nr 2 „Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników” Doktorantka we wprowadzeniu w sposób zwięzły i jasny, na podstawie licznych artykułów naukowych przedstawiła aktualnie istniejącą na świecie wiedzę, dotyczącą konsekwencji zdrowotnych, spowodowanych powszechnym zastosowaniem bisfenoli. Cytowana przez mgr A. Wolską literatura, głównie z ostatniego dziesięciolecia, świadczy o tym, że posiada Ona szeroką wiedzę z zakresu związanego z tematyką Jej rozprawy doktorskiej.

Wszystkie rozdziały napisane bardzo przejrzysto i bardzo dobrze, zarówno pod względem merytorycznym, jak i stylistycznym. W tekście pojawia się kilka razy słowo „wzmagać”, które dla mnie brzmi trochę katastroficznie, bo faktycznie chodzi o często obserwowane w badaniach zwiększenie/wzrost wartości badanej wielkości fizycznej, w funkcji innej.

Sumaryczna wartość IF prac wchodzących w skład rozprawy, zgodnie z rokiem opublikowania pracy, ma imponującą wartość - 15,225, podobnie jak a liczba punktów MNiSW - 145.

O dominującym udziale i zaangażowaniu Doktorantki w badania zawarte w publikacjach, wchodzących w skład pracy doktorskiej świadczą, zarówno pozycja pierwszego autora w każdym artykule, jak i wysokie udziały procentowe, wynoszące w kolejnych pracach odpowiednio: 60, 50, 55 i 50 %, a wynikające z pisemnych oświadczeń współautorów.

Doktorantka zastosowała w przeprowadzonych eksperymentach szereg nowoczesnych technik badawczych, stosowanych na całym świecie; do badania układów biologicznych na poziomie molekularnym i komórkowym oraz procesów zachodzących w organizmach. W szczególności wykorzystwała metody spektroskopowe, w tym spektrofotometryczną i fluorescencyjną naturalną oraz z zastosowaniem różnych sond fluorescencyjnych, jak również technikę cytometrii przepływową, a także elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR) i mikroskop z kontrastem fazowym.



Szczegółowa analiza imponującej ilości różnorodnych badań zawartych w publikacjach, stanowiących rozprawę doktorską, pozwala mi z pełnym przekonaniem stwierdzić, że Doktorantka osiągnęła określony w rozprawie cel badań. Uzyskane wyniki pozwoliły Jej na sformułowanie pięciu wniosków, z których cztery szczegółowe, bezpośrednio wynikają z kolejno przeprowadzonych badań, natomiast piąty jest podsumowaniem poprzednich i wskazującym na zasadność zastąpienia w przemyśle bisfenolu A, szkodliwego dla zdrowia, jego analogiem BPS, jako najmniej toksycznym w odniesieniu do krwinek czerwonych.

Podkreślić należy zarówno wysoki poziom przeprowadzonych badań w ramach pracy doktorskiej, zawartych w wysoko punktowanych czasopismach, jak również dużą aktywność naukową Doktorantki, która ponadto jest współautorką 14 prac i 29 komunikatów z naukowych konferencji krajowych i międzynarodowych, stanowiących dorobek naukowy pani mgr Anety Wolskiej.

Oceniając wartość naukową rozprawy, należy podkreślić, że badania w niej zawarte są nowatorskie, wzbogacają bowiem wiedzę biofizyczną, biologiczną i medyczną, dotyczącą toksycznego wpływu bisfenoli na organizm ludzki, na jakie narażone jest każdego dnia społeczeństwo.

W tym miejscu chciałam zapytać doktorantkę, w oparciu o przeprowadzone przez Nią badania doświadczalne oraz dostępną wiedzę literaturową, o różnice we wrażliwości komórek jądrzastych i bejjądrzastych na działanie bisfenolu A i jego analogów.

Pani mgr A. Wolska w swojej pracy wykazała także, iż najmniejszą toksycznością względem erytrocytów człowieka charakteryzował się bisfenol S, natomiast najwyższą bisfenol AF. Chciałabym prosić Doktorantkę o dodatkowe informacje, czy związki te w pracach innych badaczy również wykazywały tak znacząco zróżnicowany potencjał toksyczny względem badanych modeli komórkowych?

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr Anety Wolskiej w pełni spełnia wymogi określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku, o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 z późniejszymi zmianami).

W związku z powyższym, zwracam się z uprzejmą prośbą do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy pani mgr Anety Wolskiej




UNIwersytet  
Przyrodniczy  
we Wrocławiu

KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

i dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w celu uzyskania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biofizyka.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę ogromne znaczenie dla ochrony zdrowia podjętej tematyki pracy, oraz zakres i wysoki poziom przeprowadzonych badań, wnoszę o wyróżnienie tej pracy i nagrodzenie Doktorantki.

KIEROWNIK  
Katedry Fizyki i Biofizyki  
  
Prof. dr hab. Halina Kleszczyńska