



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Marty Wiszpolskiej

pt. „Wpływ bisfenolu A (BPA) na transkryptom wątroby i nerek myszy (łac. *Mus musculus*)”

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA PRACY

Praca doktorska została wykonana w Katedrze Fizjologii i Patofizjologii Człowieka, Collegium Medicum, Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem promotora prof. UWM dr hab. n.med. Marty Majewskiej oraz promotora pomocniczego prof. UWM dr hab. n.med. Ewy Lepiarczyk. Podstawą rozprawy doktorskiej są 2 oryginalne prace twórcze opublikowane w czasopismach *Cancers* (IF=5,2) i *Frontiers in Molecular Biosciences* (IF=5,0) w 2023 roku.

- Wiszpolska M, Lepiarczyk E, Maździarz MA, Pauksto Ł, Makowczenko KG, Lipka A, Łopieńska-Biernat E, Makowska K, Gonkowski S, Correia-de-Sá P, Majewska M. The Carcinogenic Potential of Bisphenol A in the Liver Based on Transcriptomic Studies. *Cancers* (Basel). 2023 Oct 17;15(20):5014.
- Wiszpolska M, Lepiarczyk E, Pauksto Ł, Makowczenko KG, Lipka A, Maździarz MA, Polak I, Makowska K, Gonkowski S, Correia-de-Sá P, Majewska M. A comprehensive transcriptomic analysis of the bisphenol A affected kidney in mice. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2023 Nov 24;10:1260716.

Doktorantka jest pierwszym autorem w/w publikacji a Jej wkład w ich powstanie, jak wynika z załączonych oświadczeń, był znaczący i obejmował udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, wykonaniu i analizie badań laboratoryjnych, interpretacji wyników, napisaniu publikacji oraz przygotowaniu publikacji do druku. Forma rozprawy doktorskiej jest typowa dla tego typu prac, których podstawą są artykuły naukowe. W 30 stronicowym opracowaniu zawarto następujące podrozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie, cel, zakres badań i hipotezy badawcze, metodyka, wyniki badań, podsumowanie i wnioski oraz piśmiennictwo. Do

rozprawy załączono analizę bibliometryczną dorobku naukowego Doktorantki potwierdzającą współautorstwo w 8 publikacjach (łącznie z pracami będącymi podstawą pracy doktorskiej), co wskazuje na aktywność naukową Doktorantki a cytowania tych prac dowodzą, że zostały zauważone przez środowisko naukowe.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy określenia wpływu bisfenolu A (BPA) na zmiany w profilu transkryptomycznym wątroby i nerek myszy. Pomimo faktu, że BPA jest jednym z najintensywniej badanych w ostatnim czasie ksenobiotykiem, którego przewlekła ekspozycja na organizm wiązana jest z istotnymi zmianami w regulacji procesów hormonalnych i metabolicznych, wiedza o molekularnych mechanizmach jego oddziaływania na wybrane tkanki jest niepełna. Podjęty zatem problem badawczy jest ważny z punktu widzenia poznawczego, szczególnie w przewidywaniu skutków zdrowotnych ekspozycji na ksenobiotyki. Bardzo wartościowym elementem pracy doktorskiej jest zastosowanie nowoczesnych badań transkryptomicznych (RNA-Seq) do wykrycia wczesnych zmian molekularnych, które mogą poprzedzać zmiany funkcjonalne wybranych narządów, co w badaniach medycznych może mieć znaczenie nie tylko dla zrozumienia mechanizmów chorób ale może pozwolić na ich podstawie na opracowanie nowych podejść diagnostycznych i terapeutycznych.

OCENA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Rozprawę doktorską rozpoczynają krótkie streszczenia, w języku polskim i angielskim, które zawierają ogólne informacje dotyczące zrealizowanych badań. Rozdział *Wprowadzenie* został starannie napisany. Doktorantka przedstawiła w nim kluczowe dane na temat BPA i jego wpływ na organizm ludzki, znaczenie wątroby i nerek w metabolizmie i eliminacji substancji toksycznych oraz dysfunkcję mitochondriów i stres oksydacyjny. Odniosła się do wielu nowych pozycji literaturowych, co świadczy o jej przygotowaniu merytorycznym do omawianego problemu badawczego. Ponieważ badania zostały wykonane na modelu zwierzęcym - mysim, warto byłoby także odnieść się do wiedzy na temat różnic w detoksykacji BPA u myszy i człowieka. Ze względu na szybsze tempo detoksykacji, głównie na drodze glukuronidacji u myszy, informacje takie byłyby cenne dla interpretacji uzyskanych wyników badań oraz ich ekstrapolacji na zdrowie człowieka. Proszę o odniesienie się do tej kwestii podczas obrony pracy doktorskiej. Przedstawione treści dobrze wprowadzają czytającego do tematyki pracy doktorskiej.

Drobne uwagi dotyczące tej części pracy doktorskiej:

- nazwanie BPA toksyną (str. 8) nie jest poprawne, gdyż „toksyna” oznacza substancję pochodzenia biologicznego, bardziej poprawne wydaje się być określenie BPA jako związku o działaniu toksycznym;
- ponieważ praca pisana jest w języku polskim, zamiast skróty et al., powinno być *i in.* lub *i wsp.*



W kolejnym rozdziale pracy doktorskiej *Cel, zakres badań i hipotezy badawcze* sformułowano ogólny cel badań dotyczący analizy wpływu bisfenolu A na profile transkryptomyczne wątroby i nerek myszy. Podjęty problem naukowy uznaję za oryginalny i o dużym znaczeniu poznawczym. Postawiono trzy hipotezy badawcze zakładające, że: (1) ekspozycja na BPA indukuje uszkodzenia wątroby i nerek przez modulację ekspresji genów, (2) BPA odpowiada za modyfikację długich niekodujących RNA oraz ich interakcję z genami kodującymi białka, (3) BPA wpływa na alternatywne składania transkryptów, co prowadzi do zmian w profilu transkryptomycznym wątroby i nerek.

Pierwsza z hipotez mówiąca o indukcji uszkodzenia wątroby i nerek wymagałaby preredagowania, gdyż w pracy nie przeprowadzono analiz funkcjonalnych narządów (brak histopatologii, oznaczenia parametrów takich jak ALT/AST, kreatynina, moczu), które potwierdzałyby rzeczywiste uszkodzenie. Czy w trakcie realizacji badań podjęto próby wykonania jakichkolwiek analiz funkcjonalnych, które dostarczyłyby danych na temat zmienionego fenotypu narządów objętych analizami transkryptomicznymi?

Do weryfikacji postawionych hipotez wykorzystano wysokoprzepustowe sekwencjonowanie transkryptomów wątroby i nerek myszy poddanych ekspozycji na BPA. Metoda taka umożliwia kompleksową ocenę odpowiedzi molekularnej tkanek na ekspozycję chemiczną, poprzez jednoczesną analizę ekspresji tysięcy genów i jest standardem w tego typu badaniach. Cenne jest zastosowanie takiego samego podejścia metodycznego w dwóch przeprowadzonych doświadczeniach, co pozwala na porównanie między sobą uzyskanych wyników. Ograniczeniem może być brak uzupełniających metod funkcjonalnych czy walidacji na poziomie białka.

W rozdziale *Metodyka* opisano doświadczenie na zwierzętach, które przeprowadzono zgodnie w wytycznymi Lokalnej Komisji etyki ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie oraz stosowane metody badawcze tj. izolację RNA i wysokoprzepustowe sekwencjonowanie transkryptomu, analizy *in silico* oraz walidację wyników za pomocą qPCR. Badania przeprowadzono na trzymiesięcznych samicach myszy (C57BL6/J/CMDB). Czym podyktowany był wybór tylko płci żeńskiej? Czy w przypadku badania związku o działaniu endokrynnym, jak BPA, w doświadczeniu uwzględniono zmienności hormonalne wynikające z faz cyklu estralnego?

Zastosowana dawka BPA 50 mg/kg m.c. jest wysoka w porównaniu do ekspozycji środowiskowych, ale określono ją w badaniach jako LOAEL - najniższa dawka substancji, przy której zaobserwowano szkodliwy efekt biologiczny. Jak oceniono efekt biologiczny kiedy nie przeprowadzono pomiarów wpływu na fenotyp (funkcję narządów)? Czy dokonywano pomiarów BPA w formie wolnej we krwi lub moczu lub jego metabolitów BPA u zwierząt eksponowanych na ten związek? Czy testowano także

niższe dawki i czy kontrolowano jednorodność rzeczywistego pobrania BPA w trakcie trwania eksperymentu?

Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone przez firmę zewnętrzną. Czy Doktorantka brała udział w przygotowaniu bibliotek? Część dotycząca wykrywania genów o zróżnicowanej ekspresji, identyfikacja DEG, DEL, TAR i zdarzeń DAS została informatywnie opisana. Podobnie część dotycząca walidacji wyników za pomocą qPCR nie budzi zastrzeżeń.

W rozdziale *Wyniki* Doktorantka opisuje uzyskane wyniki sekwencjonowania transkryptomu wątroby i nerek badanych myszy. Uzyskane dane zgodnie z ogólnie przyjętymi standardami, zostały zdeponowane w publicznym repozytorium (Europejskim Archiwum Nukleotydów), co pozwala na ich weryfikację czy ponowną analizę przez innych badaczy. Uzyskane wyniki ujawniły, że liczba genów kodujących białka, które podlegały zróżnicowanej ekspresji w badanych tkankach była raczej niska i wynosiła tylko 101 w wątrobie i 433 w nerkach. Biorąc pod uwagę, że wątroba jest głównym miejscem metabolizmu BPA, obserwowany wynik jest dość zaskakujący. Czym może to być spowodowane? Czy niska liczba DEGs świadczy o braku efektu biologicznego czy jest konsekwencją układu eksperymentalnego i podejścia analitycznego? Należy zaznaczyć, że w doświadczeniu dotyczącym wpływu BPA na transkryptom wątroby grupa badana obejmowała 5 osobników (w doświadczeniu dotyczącym nerki 6), była to zatem graniczna liczba akceptowana w badaniach z wykorzystaniem RNA-Seq. Ciekawym wątkiem badawczym było uwzględnienie w analizach także długich niekodujących RNA oraz wykonanie analizy powiązania lncRNA–mRNA, które w wielu takich badaniach często są pomijane a mogą dostarczać cennych danych o mechanizmach epigenetycznych, które mogą być obserwowane wcześniej, ze względu na ich rolę regulatorową, niż zmiany w DEG. Bardzo interesujący wynik uzyskany w pracy doktorskiej dotyczył wykazania, że po ekspozycji na BPA dochodziło do zmian w alternatywnym składaniu transkryptów. Zmiany te były szczególnie widoczne w nerce, co może odzwierciedlać większą wrażliwość tego narządu na stres metaboliczny i energetyczny indukowany przez BPA. Czy Doktorantka uważa, że obserwowane zmiany są wtórną odpowiedzią komórek na stres indukowany przez ksenobiotyk czy jest to jego bezpośredni wpływ? Ponieważ zaburzenia alternatywnego składania transkryptów są powszechnie obserwowane w nowotworach, czy wystąpienie tego zjawiska w tkankach ekspozowanych na BPA może sprzyjać zmianom pronowotworowym? W kolejnej części pracy wykonano analizę sieci ontologii genów oraz szlaków sygnalizacyjnych DEG, DEL i DAS, które zostały przeprowadzone zgodnie ze standardami bioinformatycznymi. Zidentyfikowano szereg procesów dotyczących regulacji metabolizmu RNA i białek, funkcji mitochondriów i rybosomów, fosforylacji oksydacyjnej, metabolizmu i detoksykacji ksenobiotyków, stresu oksydacyjnego czy chemicznej karcynogenezy. Na uznanie zasługuje bardzo ładna prezentacja wyników w czytelnej formie graficznej w obu publikacjach. Uzyskane wyniki zostały obszernie omówione w części dyskusyjnej w publikacjach. W publikacji dotyczącej wątroby wyeksponowano wątki dotyczące nowotworów wątroby czy niealkoholowego stłuszczenia wątroby,



które jedynie mogą mieć znaczenie dla wyboru genów/procesów wartych objęcia dalszymi badaniami funkcjonalnymi. Część dyskusyjna publikacji dotyczącej nerki, ze względu na uzyskanie znaczącej odpowiedzi transkryptomicznej, odwołuje się do ważnych procesów takich jak stres oksydacyjny czy funkcjonowanie mitochondriów czy rybosomów, natomiast wnioskowanie o dwóch szlakach KEGG „chorobie Alzheimera” i „chorobie Parkinsona” czy procesie nowotworowym, może posłużyć do nakreślenia kolejnych obszarów badań.

Za najważniejsze wyniki pracy doktorskiej uznać należy:

- wykazanie, że BPA powoduje zmiany w ekspresji genów kodujących białka oraz niekodujące RNA w wątrobie i nerkach, przy czym odpowiedź transkryptomiczna jest znacznie silniej wyrażona w nerkach, co może wskazywać na kluczową rolę tego narządu w odpowiedzi na długotrwałą ekspozycję na BPA u myszy;
- zidentyfikowanie wielu kluczowych procesów i szlaków biologicznych związanych z odpowiedzią komórkową na BPA, które w dużej mierze są narządowo-specyficzne;
- opisanie zmian w alternatywnym składaniu transkryptów prowadzące do powstania nowych form transkrypcyjnych, które potencjalnie mogą mieć znaczenie dla dysfunkcji badanych narządów;
- wykazanie, że technika RNA-seq stanowi dobre narzędzie do badania molekularnych mechanizmów związanych z ekspozycją na ksenobiotyki.

W ostatnim rozdziale *Podsumowanie i wnioski* Doktorantka sformułowała siedem wniosków, które nawiązują do postawionych wcześniej hipotez. Część z nich ma spekulatywny charakter, gdyż praca badawcza nie dostarczyła dowodów na bezpośredni wpływ BPA np. na dysfunkcje narządów czy predyspozycję do nowotworzenia, których nie badano.

Podsumowując, stwierdzam, że założone cele pracy doktorskiej zostały zrealizowane za pomocą adekwatnych metod badawczych. Doktorantka wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań i poradziła sobie bardzo dobrze z interpretacją wielu szczegółowych wyników, co świadczy o jej dużej wiedzy teoretycznej w tym zakresie. W pracy uzyskano wiele cennych wyników, których wartość została także potwierdzona ich opublikowaniem w dwóch artykułach naukowych. Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi istotny wkład w badania nad wpływem ksenobiotyków na organizm, dostarczając kompleksowych danych transkryptomicznych po ekspozycji myszy na BPA. Uzyskane wyniki są nie tylko ważne ze względów poznawczych ale otwierają nowe perspektywy w badaniach biomedycznych nad poznaniem wczesnych markerów molekularnych indukowanych przez ksenobiotyki.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „*Wpływ bisfenolu A (BPA) na transkryptom wątroby i nerek myszy (lac. Mus musculus)*” autorstwa Pani mgr Marty Wiszpolskiej spełnia wszystkie wymogi formalne określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.). Wnoszę zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o przyjęcie przedstawionej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr Marty Wiszpolskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Signed by /
Podpisano przez:

Izabela Maria
Szczerbal

Date / Data:
2026-01-12 13:58

Poznań, dn. 12 stycznia 2026r.

/~ prof. dr hab. Izabela Szczerbal/