



POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
W SZCZECINIE
KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII
I PARAZYTOLOGII MEDYCZNEJ
70-111 Szczecin, al. Powstańców Wlkp. 72
tel. +48 91 466 1672, fax +48 91 466 1671



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Szczecin, 18.10.2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Michael Allen Thoene

Wpływ bisfenolu A na neurochemiczną charakterystykę śródwątrobowych włókien nerwowych na dużym modelu zwierzęcym

Rozprawę doktorską stanowi cykl czterech spójnych tematycznie publikacji dotyczących wpływu bisfenolu A (BPA) na unerwienie współczulne i przywspółczulne wątroby, przy czym badania zrealizowano na modelu zwierzęcym, a obiektem była świnia domowa. Jedna praca przeglądowa i trzy oryginalne zostały opublikowane w latach 2017-2018 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports*. Są to następujące prace:

1. Thoene M, Rytel L, Nowicka N, Wojtkiewicz J. The state of bisphenol research in the lesser developed countries of the EU: a mini-review. *Toxicol Res (Camb)* 2018; 7: 371-380 (IF= 1.890; MNiSW=25),
2. Thoene M, Rytel L, Dzika E, Włodarczyk A, Kruminis-Kaszkiel E, Konrad P, Wojtkiewicz J. Bisphenol A causes liver damage and selectively alters the neurochemical coding of intrahepatic parasympathetic nerves in juvenile porcine models under physiological conditions. *Int J Mol Sci.* 2017; 18: E2726 (IF=3.687; MNiSW=30),
3. Thoene M, Godlewski J, Rytel L, Dzika E, Bejer-Olenska E, Wojtkiewicz J. Alterations in porcine intrahepatic sympathetic nerves after bisphenol A administration. *Folia Histochem Cytobiol.* 2018; 1:113-121 (IF=1.586; MNiSW=15),
4. Thoene MA, Rytel L, Dzika E, Gonkowski I, Włodarczyk A, Wojtkiewicz J. Immunohistochemical characteristics of porcine intrahepatic nerves under physiological conditions and after Bisphenol A administration. *Folia Morphol (Warsz).* 2018; doi: 10.5603/FM.a2018.0027 (IF=0.497; MNiSW=15).

Wszystkie prace są opracowaniami zbiorowymi, w których Doktorant jest pierwszym autorem. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (*impact factor*, IF) czasopism, w których

zamieszczono te prace zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 7.66, a punktacja według Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) 85.

W rozprawie doktorskiej krótko omówiono przeprowadzone badania. Zawarto w niej kolejno streszczenie rozprawy i słowa kluczowe w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, cel badań, wnioski oraz piśmiennictwo, a także dołączono kopie publikacji. W streszczeniu Doktorant przedstawił podsumowanie zagadnień omówionych w publikacjach. We wprowadzeniu Pan Magister Michael Allen Thoene w sposób syntetyczny omówił wykorzystanie bisfenolu A i jego toksyczność. Cele badawcze pracy doktorskiej są dobrze sformułowane. Rozdział „Wnioski” powinien być nazwany ‘Podsumowanie i wnioski’, ponieważ dwa pierwsze wnioski są podsumowaniem wyników. Pozostałe dwa wnioski odpowiadają celom badań. Jednak podsumowanie pod wypunktowanymi wnioskami nie wynika z przeprowadzonych badań. Stwierdzenie, że „działanie BPA ukierunkowane na wewnątrzwartrobowe włókna współczulne może negatywnie wpływać na zmiany w zachowaniu młodzieży” ma charakter spekulatywny. Ponadto brakuje krótkiego omówienie wyników badań.

Do rozprawy doktorskiej zostały dołączone pisemne oświadczenia współautorów wyżej wymienionych publikacji o ich udziale procentowym w przygotowaniu poszczególnych prac. Na tej podstawie można stwierdzić, że wkład pracy Doktoranta w przygotowaniu omawianych publikacji był wiodący (od 70 do 80%). Polegał on na udziale w opracowaniu koncepcji i określeniu celu badań, przeprowadzeniu doświadczenia, pracach laboratoryjnych, interpretacji uzyskanych wyników badań i przygotowaniu publikacji. Świadczy to o dużym zaangażowaniu i znacznej dojrzałości badawczej Doktoranta.

Podjęte przez Doktoranta badania dotyczą bardzo ważnego problemu związanego z ochroną zdrowia człowieka. Bisfenol A (2,2-bis(4-hydroksyfenylo)propan) jest związkem organicznym wykorzystywanym do produkcji tworzyw poliwęglanowych, w tym plastikowych butelek i innych opakowań, zabawek, papieru termicznego, a także stomatologicznych materiałów kompozytowych, soczewek i plastrów opatrunkowych. Pochodna bisfenolu A (eter diglicydyłowy bisfenolu A) stosowana jest do produkcji żywic epoksydowych wykorzystywanych do powlekania wewnętrznych powierzchni puszek, butelek i rur wodociągowych. W niewielkich ilościach BPA może przenikać do produktów spożywczych z opakowań zawierających ten związek w wyniku ich uszkodzenia. Ponadto stwierdzono, że wysoka temperatura oraz substancje o pH kwaśnym lub zasadowym znajdujące się w produktach spożywczych zwiększają prawdopodobieństwo dostania się tego związku do żywności. Szerokie zastosowanie tworzyw sztucznych jest przyczyną emisji tego

związku do środowiska, głównie do wód powierzchniowych, osadów dennych i powietrza stanowiąc dodatkowe zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Narażenie na BPA następuje drogami pokarmową, oddechową oraz skórą. Jak stwierdzili inni badacze obecność bisfenolu A ujawniono w moczu, a także płynie owodniowym, łożysku, krwi pępowinowej i mleku kobiet. Bisfenol A jest związkiem endokrynnie czynnym. Badania *in vitro* wykazały, że BPA antagonizuje skutki działania estrogenów, a także hormonów tarczycy. Stwierdzono, że narażenie na BPA może prowadzić między innymi do rozwoju otyłości, cukrzycy, chorób serca, alergii i astmy. Badania eksperymentalne ujawniły, że ekspozycja na BPA powoduje zaburzenia w zachowaniu, stany przednowotworowe prostaty i gruczołów piersiowych. Ponadto stwierdzono, że związek ten hamuje proliferację neuronalnych komórek progenitorowych, zmniejsza tempo neurogenezy w obrębie hipokampa noworodków myszy, których matki podczas ciąży otrzymywały BPA. Bisfenol A zaburza cykl komórkowy oraz migrację neuronów. Działa on także silnie hepatotoksycznie uszkadzając komórki wątroby, może generować wolne rodniki. Jednakże mechanizm oddziaływania BPA nie jest dokładnie poznany. W związku z danymi potwierdzającymi możliwy negatywny wpływ BPA na organizm człowieka, w wielu krajach wprowadzono zakazy bądź ograniczenia dotyczące wykorzystania tego związku. Odpowiednie regulacje prawne zmniejszające możliwy zakres stosowania BPA wprowadziła także Polska. Zgodnie z zasadą ostrożności obowiązuje zakaz stosowania tej substancji do produkcji butelek z poliwęglanu do karmienia niemowląt. Na terenie Unii Europejskiej ustalono dawkę tolerowanego dziennego pobrania (TDI), która wynosi 0,05 mg/kg masy ciała (m.c.).

Celem pierwszej pracy Doktoranta opublikowanej w *Toxicology Research* była ocena rodzaju i zakresu badań dotyczących BPA prowadzonych w krajach, które wstąpiły do Unii Europejskiej w roku 2004 i później. Przeprowadzono analizę pełnotekstowych publikacji naukowych dostępnych w bazach: PubMed, EbscoHost, Elsevier i ProQuest. Omówiono badania opublikowane w czasopiśmie naukowych w języku angielskim w latach 2006-2017. Stwierdzono, że badań z tego zakresu było niewiele i prowadzono je przede wszystkim na terenie Słowenii, Polski oraz Czech. Głównie dotyczyły one środowiskowego narażenia na BPA oraz wpływu tego związku na organizm człowieka. Doktorant przeprowadził rzetelną i wnikliwą analizę danych literaturowych. Stwierdził, że mała liczba badań z tego zakresu może wiązać się z brakiem świadomości obywateli dotyczących zagrożeń związanych z wykorzystywaniem BPA i może prowadzić do zwiększenia ryzyka ekspozycji na ten związek.

Mimo licznych badań dotyczących oddziaływania BPA na komórki nerwowe wpływ tego związku na unerwienie wątroby nie jest do końca poznany. Dlatego celem badań eksperymentalnych Doktoranta było określenie wpływu BPA w dawkach bezpiecznej dla człowieka (0,05 mg/kg m. c.) oraz dziesięciokrotnie większej (0,5 mg/kg m.c.) na unerwienie współczulne i przywspółczulne wątroby na modelu zwierzęcym. Do badań jako organizm modelowy wykorzystano świnię domową ze względu na jej podobieństwo anatomiczne i fizjologiczne do układu pokarmowego człowieka. Na prowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Badań na Zwierzętach w Olsztynie. Lochy mieszańców rasy *Duroc x Pietrain* (n=15) podzielono na trzy grupy. Wyróżniono grupę kontrolną oraz dwie doświadczalne, którym codziennie przez 28 dni podawano BPA w dawce 0,05 lub 0,5 mg/kg m.c. Jednak w żadnej z przedstawionych prac nie podano liczby osobników w grupie. Do oceny histopatologicznej wątroby wykorzystano barwienie metodą PAS (*Periodic Acid-Schiff*) oraz rutynowe (eozyna i hematoksylina). W badaniach zastosowano także metodę pojedynczych i podwójnych barwień immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem odpowiednich przeciwciał. Jako markery do oceny zmian w kodowaniu chemicznym włókien współczulnych i przywspółczulnych wykorzystano pęcherzykowy transporter acetylocholino (VACHT), substancję P (SP), transkrypt regulowany kokainą i amfetaminą (CART) oraz peptyd kodowany genem kalcytoniny (CGRP). A także β -hydrolazę dopaminową (D β H), galaninę (GAL) i polipeptyd aktywujący przysadkową cyklazę adenylnową (PACAP). Doktorant dobrze zaplanował eksperyment, którego wyniki przedstawił w trzech pracach.

W pracy zamieszczonej w *International Journal of Molecular Sciences* określono wpływ BPA na zmiany histopatologiczne w wątrobie, włókna przywspółczulne wątroby oraz zbadanie ewentualnych zmian we wzorach chemicznego kodowania tych neuronów. Stwierdzono, że podanie BPA wpływa na parametry wątroby, powoduje wzrost aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AspAT) i alaninowej (ALAT). U świń poddanych ekspozycji BPA odnotowano zmiany histopatologiczne w obrębie wątroby, w tym poszerzenie naczyń włosowatych typu zatokowego wątroby, przekrwienie oraz wyczerpanie zasobów glikogenu. Mankamentem tego artykułu jest niewłaściwa jakość ryciny 1 zamieszczonej w wydrukowanej formie publikacji. Obrazuje ona zmiany histologiczne w obrębie wątroby. Jakość tej ryciny w wersji artykułu on-line jest bardzo dobra. Obydwie zastosowane dawki BPA spowodowały zwiększenie ilości neuronów VACHT⁺/GAL⁺ w wątrobie. Natomiast wzrost ilości neuronów VACHT⁺/CART⁺ wywołała jedynie większa dawka PBA. Nie odnotowano wpływu podania BPA na ilość włókien nerwowych VACHT⁺ i VACHT⁺/SP⁺ oraz VACHT⁺/PACAP⁺. Na podstawie przedstawionych wyników badań

stwierdzono, że BPA wpływa na kodowanie chemiczne włókien przywspółczulnych w wątrobie, nawet przy zastosowaniu bezpiecznych poziomów ekspozycji.

Praca opublikowana w *Folia Histochemica et Cytobiologica* stanowi kontynuację badań opisanych w poprzedniej publikacji. Doktorant zauważył, że zastosowane dawki BPA wpłynęły na wzrost liczby neuronów współczulnych. Stwierdził on wzrost ilości włókien nerwowych zawierających CART i GAL nawet po zastosowaniu małej dawki BPA. Związek ten wpłynął również na liczbę włókien $D\beta H^+/CART^+$ i $D\beta H^+/GAL^+$. Natomiast zwiększenie ilości włókien współczulnych $D\beta H^+/SP^+$ i $D\beta H^+/CGRP^+$ spowodowało podanie jedynie większej dawki BPA. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że zanieczyszczenie żywności BPA może wpływać na unerwienie wątroby powodując zmiany w jej metabolizmie.

W czwartej pracy zamieszczonej *Folia Morphologica* stwierdzono, że BPA spowodował wzrost ilości włókien nerwowych zawierających CART, GAL i PACAP, natomiast jedynie większa dawka BPA wywołała wzrost liczby neuronów SP^+ i $CGRP^+$. Pewnym niedociągnięciem w tym artykule jest brak zaznaczenia zmian istotnych statystycznie w tabeli 2 oraz brakuje podpisu pod ryciną 1.

We wszystkich pracach nie wszystkie skróty były wyjaśnione, kiedy po raz pierwszy pojawiły się w tekście i nie używano ich konsekwentnie. Na przykład stosowane są w pracy dwa skróty β -hydrolazy dopaminowej - $D\beta H$ i DBH . Ponadto wszystkie skróty stosowane w tabelach powinny być wyjaśnione. Powyższe uwagi nie obniżają wartości naukowej ocenianych prac.

Przedstawione do oceny prace mają dużą wartość merytoryczną. Są oryginalnymi opracowaniami aktualnego i istotnego problemu dotyczącego wpływu bisfenolu A na organizm modelowy. W badaniach po raz pierwszy określono wpływu BPA na kodowanie chemiczne włókien nerwowych zlokalizowanych w wątrobie. A wyniki w znacznym stopniu poszerzają wiedzę na temat mechanizmów działania bisfenolu A na organizm ssaków. Problem badawczy podjęty przez Doktoranta jest bardzo istotny, opracowanie zawiera elementy nowatorskie i wnosi nowe dane w zakresie biologii medycznej. Świadczy to także o bardzo dobrej znajomości przedstawionego problemu i umiejętności posługiwania się różnymi metodami badawczymi. Badania były bardzo dobrze zaplanowane, przeprowadzone, a ich wyniki opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych. Mają one charakter nowatorski o charakterze poznawczym. Ponadto Doktorat wykazał się dużymi umiejętnościami w krytycznym omówieniu otrzymanych wyników. Wysoki poziom naukowy opublikowanych prac i znaczący w nich udział Doktoranta dokumentuje bardzo dobry opanowany przez niego warsztat badawczy.

Uzasadnienie:

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana Magistra Michael Allen Thoene w pełni spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 z ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr. 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami), dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego, Collegium Medicum Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, o dopuszczenie Magistra Michael Allen Thoene do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na nowatorski charakter badań, ich kompleksowość i dużą wartość merytoryczną wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Michael A. Thoene.

PROFESOR NADZWYCZAJNY
Katedry i Zakładu Biologii
i Parazytologii Medycznej
dr hab. n. med. Danuta Kosik-Bogacka