



Warszawa, 22.02.2025r

dr hab. Ewa Lange, prof. SGGW
Katedra Dietetyki,
Instytutu Nauk o Żywieniu Człowieka,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Rada Dyscypliny Technologii Żywności i Żywnienia
Instytut Biotechnologii Przemysłu
Rolno-Spożywczego
im. prof. W. Dąbrowskiego –
Państwowy Instytut Badawczy

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pauliny Średnickiej

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

**wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Marka Roszko, prof. IBPRS-PIB oraz
dr hab. Edyty Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB**

**w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego
im. prof. W. Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy**

Podstawą formalno-prawną wykonania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy z dnia w dniu 20.11.2024 roku Uchwałą. Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Średnickiej oparta jest o wymogi określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023, poz. 742 z późn. zm.), w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauki rolnicze, dyscyplinie technologia żywności i żywnienia



Charakter i profil mikrobioty jelitowej człowieka jest powiązany nie tylko z funkcją przewodu pokarmowego, ale poprzez wpływ na metabolizm oraz działanie układów i kluczowych narządów, ma również wpływ na stan zdrowia człowieka oraz występowanie i leczenie wielu schorzeń. Wpływ mikrobioty związanej jest z jej bezpośrednim działaniem na funkcje błony śluzowej przewodu pokarmowego, czynność endokrynną i zmniejszanie potencjalnie toksycznego działania wielu związków znajdujących się w żywności. Na funkcjonowanie organizmu mogą też wpływać metabolity wytwarzane przez mikroorganizmy. Z drugiej strony bisfenole, zaliczane do związków endokrynnie czynnych, dostarczanych z żywnością, mogą zaburzać funkcjonowanie nie tylko układu hormonalnego człowieka, ale wpływać na zwiększenie ryzyka rozwoju wielu dietozależnych chorób przewlekłych, związanych m.in. z zaburzeniem metabolizmu tkanki tłuszczowej czy układu krążenia. Celowym wydaje się więc podejmowanie badań dotyczących wpływu związków endokrynnie czynnych takich jak bisfenole na profil i właściwości metaboliczne mikrobioty jelitowej człowieka. Istotne dla opracowania odpowiednich strategii ograniczających negatywny wpływ bisfenoli na zdrowie człowieka mają też badania umożliwiające poznanie mechanizmów działania mikrobioty jelitowej na metabolizm tych związków. Tematyka, cel i zakres badań jest próbą wyjaśnienia tych zależności i wpisuje się w obszar dyscypliny Technologia żywności i żywienia

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska oparta jest zarówno o publikacje stanowiące istotny element zakresu pracy, jak również o wyniki badań opisanych jako nieopublikowane, a weryfikujące postawione w pracy hipotezy badawcze. Publikacje ujęte w dysertacji są publikacjami przeglądowymi, które uzasadniają podjęcie tematyki badań (publikacja P1 i P2) oraz publikacjami oryginalnymi, w tym jedna, której wyniki uzasadniają zastosowanie w dalszych eksperymentach badawczych określonej metodyki hodowli inokulum mikrobioty jelitowej (publikacja P3) i druga opisującą uzyskane w pracy wyniki interakcji mikrobioty jelitowej i bisfenoli (publikacja P4).

- 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,
- PUBLIKACJA 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. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112306,
- PUBLIKACJA 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. DOI: 10.1038/s41598-023-29637-2,

- PUBLIKACJA P4: Średnicka P., Roszko M., Emanowicz P., Wójcicki M., Popowski D., Kanabus J., Juszcuk-Kubiak, E. (2024). Influence of bisphenol A and its analogues on human gut microbiota composition and metabolic activity: Insights from an in vitro model. *Science of the Total Environment*, 956, 177323. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.177323,

Sumaryczny współczynnik wpływu IF, przedstawionych w rozprawie doktorskiej publikacji wynosi: 19,079, a łączną ich punktacja wg. wykazów MNiSzW - 460. We wszystkich publikacjach Pani mgr Paulina Średnicka jest pierwszym i wiodącym autorem, a jej wkład został oceniony na 50% w trzech publikacjach, a w czwartej na 70%. Deklarowany wkład w przygotowanie tych publikacji związany jest z opracowaniem koncepcji i celu, dobór źródeł, przygotowaniu, redakcji tekstu i opracowaniu układu manuskryptów, a w publikacji P3 i P4 związany był też z prowadzeniem badań oraz analizą uzyskanych wyników i odpowiedziami na recenzje artykułów.

Układ dysertacji jest typowy dla rozpraw doktorskich, uwzględniając podział na część związaną z cyklem publikacji i na część stanowiącą omówienie wyników opisanych jak „niepublikowane”. Układ ten jest spójny i stanowi powiązane ze sobą obszary. Istotną częścią jest obszerny i logicznie przedstawiony *Przegląd piśmiennictwa* odnoszący się głównie do publikacji przeglądowej P1. W tej części przedstawiono najważniejsze informacje dotyczące zarówno związków endokrynnie czynnych powiązanych z żywnością, w tym szczególnie bisfenoli oraz charakterystykę, funkcję i wpływ mikrobioty jelitowej na zdrowie człowieka. Zwrócono uwagę na możliwe różnice w działaniu różnych form bisfenoli. Publikacja P2 jest pogłębionym przeglądem systematycznym dotyczącym wpływu probiotyków i mikrobioty jelitowej na pochodzące z żywności zanieczyszczenia, w tym związki endokrynnie czynne i bisfenole oraz potencjalne mechanizmy detoksyfikacji ksenobiotyków przez mikrobiotę jelit. Publikacja ta została wydana w renomowanym czasopiśmie z listy JCR (*Food and Chemical Toxicology*) i na dzień dzisiejszy cytowana była już 68. razy, co wskazuje na przemyślane i wartościowe przedstawienie tej tematyki.

Artykuły wymienione w cyklu publikacyjnym stanowią dobre uzupełnienie i pogłębienie informacji przedstawionej w monografii. Częścią przeglądu piśmiennictwa jest także odniesienie się do możliwych modeli badań *in vitro* wykorzystywanych w ocenie funkcji mikrobioty jelitowej i wpływu na nią m.in. substancji znajdujących się w żywności, w tym substancji o właściwościach endokrynnych. Ten rozdział jest wzbogacony w ryciny i tabele stanowiące dobre uzupełnienie przekazywanych treści.

Obszerny i aktualny przegląd literatury stanowi logiczną podstawę do sformułowanego przez Doktorantkę celu pracy i hipotez badawczych. Cel pracy odniesiono do dwóch szczegółowych celów



badawczych określających zbadanie interakcji między różnymi formami bisfenoli a mikrobiotą jelitową człowieka. Na tej podstawie sformułowano trzy hipotezy badawcze:

- Związki endokrynnie czynne prowadzą do zaburzenia struktury taksonomicznej i profilu metabolicznego mikrobioty jelitowej.
- Mikrobiota jelitowa posiada zdolność do eliminacji związków endokrynnie czynnych.
- Mikrobiota jelitowa modyfikuje aktywność biologiczną związków endokrynnie czynnych, wpływając na ich cytotoksyczność oraz potencjał endokrynni

Zakres pracy przedstawiono jako 6. szczegółowych zadań badawczych obejmujących opracowanie metodyki badań *in vitro* z wykorzystaniem inokulum jelita grubego człowieka oraz określenie wpływu różnych form bisfenoli na profil i produkcję metabolitów, w tym krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, przez mikrobiotą jelitową, jak również jej wpływu na czynność estrogenową / androgenową i cytotoksyczność bisfenoli.

W określeniu hipotez i zadań badawczych może bardziej odpowiednie było by odniesienie ich bezpośrednio do bisfenoli, jako wybranych w tej pracy związków endokrynnie czynnych dostarczanych z żywnością. W pracy nie oznaczano tych zależności dla innych związków z tej grupy. Podsumowaniem zakresu pracy jest przejrzyste przedstawiony schemat wykonywanych badań. Zakładając jednak dołączenie do dysertacji opublikowanej po zakończeniu kształcenia w Szkole Doktorskiej, publikacji oznaczonej jako P4, warto było by jednak uwzględnić ją w tym schemacie, tym bardziej, że Doktorantka jest kluczowym autorem tej publikacji, a jej wskaźniki bibliometryczne wskazują na dużą wagę tego artykułu.

Obszerną częścią pracy jest rozdział *Materiał i metody badawcze*, który dokładnie opisuje zarówno pozyskanie materiału biologicznego do części eksperymentalnej pracy, jak i wszystkie metody zastosowane w hodowli mikrobioty jelitowej i w dalszej ocenie jej charakterystyki oraz jej interakcji z bisfenolami. Część poświęcona przygotowaniu hodowli mikrobioty jelita grubego człowieka oparto na wynikach i spostrzeżeniach zawartych w publikacji P3, która opisuje wpływ różnych pożywek na różnorodność i profil metabolomiczny otrzymanych kultur. Wyniki tej części pracy wykazują, że większej różnorodności taksonów bakteryjnych sprzyjała większa zawartością składników odżywczych w pożywkach. Wyniki tej części pracy mają istotne znaczenie poznawcze i stanowiły podstawę do wyboru metody hodowli *in vitro* w następnych etapach pracy. Ta część metodyczna pracy ma istotny aspekt aplikacyjny na co wskazuje liczba dotychczasowych cytowań tej publikacji. Na uwagę zasługuje też dokładny opis metod określających wskaźniki metabolizmu mikrobioty jelitowej poddanej działaniu bisfenoli oraz potencjalnego wpływu mikrobioty jelitowej na stan zdrowia poprzez określenie jej



wpływu na aktywność estrogenową / androgenową i cytotoksyczność różnych form bisfenoli na komórki nabłonka jelit.

Jednak czy w ramach przygotowania modelu badań *in vitro* z wykorzystaniem inokulum jelita grubego Doktorantka posiadała, oprócz informacji wynikających z weryfikacji przyjętych kryteriów włączenia, informacje o stylu życia, w tym sposobie żywienia, osób od których pobrano próbki kału do próby reprezentatywnej wykorzystanej w badaniu? Co oznaczał „tradycyjny sposób żywienia”, czy oprócz produktów mięsnych racje pokarmowe osób, od których pozyskano próbki kału, uwzględniały w racji pokarmowej produkty mleczne, w tym fermentowane napoje mleczne? Czy mogło to mieć wpływ na uzyskaną charakterystykę mikrobioty?

Dodatkowo zakładając, że każda pożywka kształtuje specyficzny profil taksonomiczny mikroorganizmów, jakie powinny być założenia jej wyboru do badań *in vitro* mających symulować warunki w jelicie grubym człowieka, czy tylko istotna jest różnorodność / obfitość mikroorganizmów, czy może istotne jest też porównanie do warunków obserwowanych *in vivo* u różnych grup osób, szczególnie osób chorych (wpływ wieku, rodzaju diety, zaburzeń funkcjonowania przewodu pokarmowego i układu odpornościowego, stosowanych leków itp.)?

Doktorantka nie wyjaśnia też dlaczego podjęto decyzje o wyselekcjonowaniu próbek kału od 15 osób, a do dalszych badań wykorzystywano pięciokrotne powtórzenie zmieszanych próbek kału.

W dalszej części monografii przedstawiono wyniki oceniające wpływ wybranych bisfenoli na profil taksonomiczny, różnorodność i profil metabolomiczny mikrobioty jelitowej człowieka, w oparciu o wcześniej wyłonioną metodykę badań *in vitro*. Szczególną uwagę zwrócono na wpływ obecności bisfenoli na produkcję krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych przez mikrobiotę jelitową. W doświadczeniu tym oceniono też zdolność mikrobioty jelita grubego człowieka do usuwania badanych bisfenoli oraz ich wpływu na aktywność estrogenową i androgenową. Dużą wartością tej części badań jest wskazanie zróżnicowanego wpływu różnych form bisfenoli, co może mieć istotne znaczenie aplikacyjne dla produkcji materiałów mających kontakt z żywnością.

Ciekawym zadaniem badawczym były też badania z wykorzystaniem linii komórek gruczolaka jelita grubego Caco-2 jako modelu *in vitro* komórek nabłonka jelita grubego mające na celu określenia wpływu mikrobioty jelitowej na cytotoksyczność badanych bisfenoli. Zwrócono uwagę, że wpływ na żywotność komórek linii Caco-2 związany jest najprawdopodobniej z działaniem bisfenoli na produkcję metabolitów przez mikroorganizmy stanowiące inokulum mikrobioty jelita grubego człowieka. Czy jednak na prowadzone wnioskowanie mogło mieć wpływ to, że znaczna część oznaczonych metabolitów mikrobioty jelitowej nie została zidentyfikowana?



Uzyskane wyniki zostały przeanalizowane i przedyskutowane w powiązaniu z wynikami innych autorów, także z obserwacjami *in vivo*. Taka interpretacja ma szczególne znaczenie ponieważ badania *in vitro* powinny stanowić podstawę do dalszych badań z wykorzystaniem modeli zwierzęcych i badań u ludzi, co ma szczególne znaczenie w związku z możliwym wpływem mikrobiomu jelitowego i jego metabolitów na przeminę hormonalną oraz metabolizm lipidów i węglowodanów u ludzi. Pani mgr Paulina Średnicka starała się powiązać uzyskane wyniki i wskazać na potencjalne mechanizmy interakcji bisfenoli i mikrobioty jelita grubego człowieka.

Na podstawie przeprowadzonej analizy wyników Pani mgr Paulina Średnicka w przejrzysty sposób dokonała syntezy uzyskanych obserwacji, tak by w czytelny sposób odpowiedzieć na założone w pracy cele badawcze i zweryfikować postawione hipotezy.

Pozytywnie zweryfikowano założenie, że bisfenol A oraz jego analogi: bisfenol S, bisfenol F i tetrametylobisfenolu F wpływają na strukturę taksonomiczną i profil metabolomiczny mikrobioty jelitowej człowieka, w tym zmniejszenie produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Mikrobiota jelitowa wykazywała jednak zdolność do eliminacji bisfenoli, której stopień wzrastał wraz z ich hydrofobowością oraz zmniejszenia aktywności estrogenowej tej grupy związków, związane głównie z ich adsorpcją przez mikrobiotę. Najmniejszy wpływ na skład taksonomiczny mikrobioty jelitowej, profil jej metabolitów i potencjalną eliminację bisfenoli wykazywał tetrametylobisfenolu F. Wykazano również, że bisfenole mogą wykazywać cytotoksyczność w odniesieniu do komórek nabłonka jelita grubego poprzez zwiększenie produkcji szkodliwych lub zmniejszenie powstawania korzystnych metabolitów przez mikroflorę jelita grubego. Uzyskane wyniki i ich podsumowanie pozwoliło na pozytywną weryfikację wszystkich trzech hipotez badawczych odnoszących się do postawionych hipotez badawczych.

Powiązanie tak wielu wyników / czynników i czytelne ich przedstawienie, w logicznej powiązanej ze sobą kolejności, wskazują na dojrzałość badawczą Doktorantki i umiejętność interpretacji uzyskanych wyników. Pani mgr Paulina Średnicka sformułowała 6. syntetycznych wniosków i stwierdzeń odnoszących się do zadań badawczych. Mają one duży potencjał aplikacyjny, szczególnie w odniesieniu do badań *in vitro* związanych z określeniem interakcji mikrobioty jelitowej człowieka i substancji będących składnikami czy zanieczyszczeniami żywności. Istotnym spostrzeżeniem, mającym także istotne znaczenie dla stosowania bisfenoli w produkcji materiałów związanych z żywnością, jest też wskazanie na różny wpływ poszczególnych form tych związków. Mikrobiota jelitowa może minimalizować negatywny wpływ bisfenoli na czynność endokrynną, ale też



bisfenole mogą zmniejszać, poprzez wpływ na produkcję metabolitów mikrobiomu, żywotność komórek nabłonka jelit.

Przedstawioną do oceny dysertację kończy obszerny spis piśmiennictwa, obejmujący 193. pozycje, w znaczącej większości anglojęzyczne, wydane po 2020 roku.

W pracy zawarto też Aneks, w którym umieszczono czwarty artykuł, wraz z oświadczeniami współautorów, który ukazał się po ukończeniu Szkoły Doktorskiej i nie został dołączony do cyklu trzech wcześniejszych publikacji oraz wykaz wykorzystywanych w pracy skrótów i streszczenie w języku polskim i angielskim.

Umieszczony na końcu pracy artykuł opublikowany został już po zakończeniu kształcenia w Szkole Doktorskiej AgroBiotech PhD. Szkoda jednak, że nie znalazł się ostatecznie w całym cyklu publikacji stanowiących podstawę dysertacji, bo zawiera wszystkie wyniki opisane w części zatytułowanej przez doktorantkę „Wyniki nieopublikowane”. Umieszczenie tej publikacji, która ma najlepsze ze wszystkich wskaźniki bibliometryczne i duży potencjał częstego cytowania przez innych autorów, na końcu pracy może wydać się mylący, bo sugeruje, że w chwili składania dysertacji była ona już opublikowana. Dodatkowo w początkowym zestawieniu artykułów Doktorantka uwzględniła go w wykazie jako publikację P4 (strona 17-19).

Wykonane, wielokierunkowe, ale powiązane ze sobą analizy, jak również przedstawienie i analiza uzyskanych wyników, ich synteza umożliwiająca wyjaśnienie obserwowanych zależności oraz sformułowanie odpowiadających postawionym celom wniosków, świadczy o umiejętnościach badawczych i dojrzałości naukowej Pani mgr Pauliny Średnickiej. Warto dodać, że oprócz wymienionych przez Doktorantkę publikacji, jest ona także współautorem 11. publikacji z listy JCR (o dużych wskaźnikach cytowalności), co wskazuje na jej duży potencjał zarówno związany z pracą naukową, jak i umiejętnością współpracy w zespołach badawczych.

Tematyka podjętych badań, ich wielokierunkowość oraz ich innowacyjny i aplikacyjny charakter, jak również czytelny, logiczny sposób ich analizy wskazuje na dużą wartość naukową przedstawionej do oceny dysertacji, a umieszczone w recenzji pytania w żaden sposób nie wpływają na pozytywną opinię dotyczącą pracy doktorskiej Pani mgr Pauliny Średnickiej. Całość stanowi oryginalne i wartościowe opracowanie dotyczące interakcji mikrobioty jelitowej człowieka i związków stanowiących zanieczyszczenie żywności jakimi są, należące do związków endokrynnie czynnych, bisfenole. Szeroki zakres podjętych badań, ich aplikacyjny charakter oraz systematyczne i krytyczne



podejście do uzyskanych wyników stanowią cenny wkład w badania z zakresu technologii żywności i żywienia.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Średnickiej pod tytułem „*Interakcje związków endokrynnie czynnych obecnych w żywności z mikrobiotą jelitową człowieka*”, w pełni odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 poz. 742 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Technologia żywności i żywienia, Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego – Państwowy Instytut Badawczy, o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Średnickiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

dr hab. Ewa Lange, prof. SGGW

**Katedra Dietetyki,
Instytut Nauko Żywieniu o
Człowieka,
Szkoła Główna Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie**

ul. Nowoursynowska 159 c
02-776 Warszawa
+48 22 59 370 18
kd@sggw.edu.pl
www.sggw.pl