



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych
i Weterynaryjnych

Prof. dr hab. Justyna Rogalska,
Katedra Fizjologii Zwierząt i Neurobiologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Lwowska 1
87-100 Toruń
e-mail: rogal@umk.pl

OCENA

rozprawy doktorskiej Pana magistra inżyniera Pawła Józefa Wydorskiego

pt. „Konsekwencje oddziaływania pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości na epigenetyczną regulację ekspresji genów, apoptozę i stres oksydacyjny w błonie śluzowej macicy świni domowej (*Sus scrofa domestica* L.) w okresie około-implantacyjnym”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska poświęcona została analizie wpływu pola elektromagnetycznego o ekstremalnie niskiej częstotliwości (ELF-EMF) na wybrane mechanizmy molekularne zachodzące w błonie śluzowej macicy świni domowej w krytycznym okresie około-implantacyjnym. Badania obejmowały trzy obszary: regulację epigenetyczną ekspresji genów (z uwzględnieniem metylacji DNA, modyfikacji histonów i biogenezy mikroRNA), potencjał do apoptozy i generowania stresu oksydacyjnego.

Zagadnienia te wpisują się w aktualne dyskusje dotyczące rosnącej liczby urządzeń generujących pola elektromagnetyczne, które coraz częściej uznawane są za element zanieczyszczenia środowiskowego i mogą wpływać na funkcjonowanie organizmów zwierzęcych.

Rozprawa doktorska składa się z trzech oryginalnych prac opublikowanych w latach 2023–2024 w czasopismach *Reproduction*, *Fertility and Development*, *Theriogenology* i *International Journal of Molecular Sciences*. Łączny impact factor czasopism wynosi 10,3, a liczba punktów MEiN – 420. We wszystkich publikacjach Pan Paweł Wydorski jest pierwszym autorem, co wskazuje na wiodącą rolę w planowaniu badań, realizacji eksperymentów, analizie wyników i przygotowaniu manuskryptów. Badania finansowano ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektów OPUS 13 i PRELUDIUM 20, co potwierdza ich znaczenie naukowe.

Przedstawiona rozprawa jest starannie przygotowana pod względem edytorskim. Komentarz autorski ma logiczną strukturę: zawiera wstęp z przeglądem literatury, jasno sformułowaną hipotezę i cele, opis materiałów i metod, podsumowanie wyników oraz syntetyczne wnioski. Tekst charakteryzuje się wysoką kulturą języka, precyzyjnym słownictwem i estetycznym układem graficznym. Publikacje wchodzące w skład dysertacji czyta się z dużą przyjemnością; argumentacja jest przeprowadzona konsekwentnie, a wnioski dobrze uzasadnione danymi doświadczalnymi. Wkład doktoranta w powstanie publikacji został potwierdzony oświadczeniami współautorów i nie budzi wątpliwości.

Autor w komentarzu autorskim jasno definiuje problem badawczy, wskazując, że dotychczasowe prace skupiały się na wpływie ELF-EMF na steroidogenezę i transkryptom w układzie rozrodczym. Kwestia oddziaływania pola na mechanizmy epigenetyczne, apoptozę i stres oksydacyjny w macicy nie była dotąd szczegółowo analizowana. W oparciu o przegląd literatury sformułowano hipotezę, że krótkotrwała ekspozycja na ELF-EMF (50 Hz, indukcja magnetyczna 8 mT, 2 h) może wywołać istotne zmiany epigenetyczne w błonie śluzowej macicy i wpływać na przebieg implantacji.

Główne cele rozprawy obejmowały: (1) określenie wpływu ELF-EMF na poziom metylacji DNA w promotorach wybranych genów o zmienionej ekspresji (m.in. *EGR2*, *ID2*, *PTGER4*, *IL1RAP*, *NOS3*); (2) analizę ekspresji genów i białek zaangażowanych w metylację DNA (*DNMT1*, *DNMT3a*), modyfikacje histonów (*EZH2*, *UHRF1*, *MBD1*) i biogenezę mikroRNA (*DGCR8*, *DICER1*) oraz ocenę poziomu globalnej metylacji DNA i aktywności deacetylaz histonowych; (3) ocenę wpływu ELF-EMF na ekspresję genów i białek związanych z apoptozą (*CASP3*, *CASP7*, *GADD45G*, *CIDEB*) i stresem oksydacyjnym (*NOS1*, *NOS2*, *NOS3*, *TP53I3*) oraz na aktywność kaspaz i biosyntezę tlenu azotu. Realizację celów pracy podzielono na zadania badawcze, które zostały szczegółowo opisane w części komentarza autorskiego Materiał i metody. Model badań stanowiły skrawki błony śluzowej macicy ciężarnych świń (15–16 dzień ciąży) inkubowane *in vitro* i ekspozowane na ELF-EMF. Autor zastosował różnorodne techniki i metody badawcze: reakcją Real-time PCR, Western blot, cytometrię przepływową, metody kolorymetryczne i fluorescencyjne oraz immunoenzymatyczne. Taki wachlarz metod umożliwił wielokierunkową analizę zjawisk.

Wyniki badań doktoranta dostarczają nowych informacji na temat konsekwencji działania ELF-EMF w układzie rozrodczym. W pierwszej publikacji, wchodzącej w skład rozprawy wykazano, że ekspozycja na pole o częstotliwości 50 Hz w błonie śluzowej macicy prowadzi do zwiększenia poziomu metylacji promotorów genów zaangażowanych w proliferację i różnicowanie komórek utrzymywanie ciążki żółtego i stymulację angiogenezy (*EGR2*, *ID2* i *PTGER4*), i obniżenia metylacji promotorów *IL1RAP* i *NOS3* zaangażowanych, odpowiednio, w wewnątrzkomórkowy kompleks sygnalizacji komórkowej dla systemu *IL1 β* i produkcję tlenu azotu. Jak podkreśla autor zmiany w metylacji DNA mogą zaburzać profil transkryptomyczny endometrium i zakłócać procesy towarzyszące implantacji zarodka. To ważna obserwacja, która wskazuje na możliwość oddziaływania ELF-EMF na utrzymanie ciąży poprzez modyfikacje epigenetyczne.

Druga publikacja dotyczyła analizy wybranych regulatorów epigenetycznych. Stwierdzono wzrost ekspresji mRNA i białek *DNMT1*, *DNMT3a*, odpowiedzialnych odpowiednio za utrzymanie metylacji i metylację DNA *de novo*, a także zmiany ekspresji mRNA i koncentracji białek *UHRF1*, *MBD1* i *EZH2*, które wchodzą w skład kompleksów odpowiadających za interakcję z metylacją DNA lub metylacją i acetylacją histonów, dzięki

czemu przyczyniają się do obniżenia i/lub wyciszenia ekspresji genów. Wykazano także, że pole elektromagnetyczne może wpływać na biogenezę mikroRNA i tym samym modulować ekspresję wielu genów. Wyniki te stanowią istotne uzupełnienie wiedzy o wpływie czynników środowiskowych na epigenom.

Trzecia praca poświęcona jest ocenie procesów apoptozy i stresu oksydacyjnego. Porównanie endometrium eksponowanego i nieeksponowanego na ELF-EMF wykazało różnice w ekspresji genów i poziomie białek zaangażowanych w indukcję apoptozy i odpowiedź komórkową na stres. Zaobserwowane zmiany potwierdzają, że pole o ekstremalnie niskiej częstotliwości może inicjować procesy apoptozy oraz generować stres oksydacyjny w błonie śluzowej macicy, co może zaburzać jej receptywność. W konkluzji doktorant stwierdza, że oddziaływanie ELF-EMF może wpływać na proliferację, angiogenezę i funkcję endometrium.

Wnioski wysunięte przez doktoranta wskazują, że krótka ekspozycja na ELF-EMF powoduje wzrost globalnej metylacji DNA, indukuje zmiany w promotorach genów uczestniczących w proliferacji, migracji i utrzymaniu ciała żółtego oraz modyfikuje ekspresję regulatorów epigenetycznych, apoptotycznych i oksydacyjnych. Autor wskazuje jednak na konieczność rozszerzenia badań na modele *in vivo* w celu oceny długotrwałych konsekwencji oddziaływania pola elektromagnetycznego na samice we wczesnej ciąży. Wyniki uzyskane w ramach ocenianej pracy doktorskiej w istotny sposób uzupełniają istniejącą wiedzę, wskazując na potencjalne ryzyko wpływu ELF-EMF na sukces reprodukcyjny.

Uwagi i pytania do Autora

1. W badaniach zastosowano pole o częstotliwości 50 Hz i indukcji magnetycznej 8 mT przez 2 godziny. W komentarzu autorskim brakuje jednak szerszego uzasadnienia dla doboru wartości indukcji magnetycznej i czasu ekspozycji. Warto byłoby odnieść się do aktualnych norm środowiskowych i literatury oraz wyjaśnić, czy takie parametry są reprezentatywne dla ekspozycji, jakiej mogą doświadczać ludzie w środowisku.
2. Dobór genów poddanych ocenie metylacji promotorów oraz ekspresji mRNA został uzasadniony wynikami wcześniejszych badań transkryptomicznych. Czy doktorant mógłby wskazać, jakie kryteria (np. funkcja biologiczna, stopień zmian ekspresji) były kluczowe w wyborze tych genów ?
3. W dyskusji podkreślono, że podniesiony poziom metylacji DNA może prowadzić do obniżenia ekspresji genów. Z drugiej strony, w przypadku niektórych genów (np. *NOS3*) odnotowano spadek poziomu metylacji przy jednoczesnym wzroście ekspresji. Czy autor mógłby szerzej omówić zależność między globalnymi zmianami metylacji a miejscowymi zmianami w promotorach poszczególnych genów oraz ich skutkami funkcjonalnymi?
4. W badaniach wykazano złożony, niejednoznaczny wpływ ELF-EMF na szlaki prowadzące do apoptozy i stresu oksydacyjnego. Czy autor jest w stanie określić, jakie implikacje mają te zmiany dla przebiegu implantacji i utrzymania ciąży?
5. Autor wskazuje również, że wzorzec ekspresji pewnych genów (*DNMT1* i *DNMT3a*) oraz w poziomie odpowiadających im białek w błonie śluzowej i błonie mięśniowej macicy w odpowiedzi na ekspozycję na pola elektromagnetyczne o ekstremalnie niskiej częstotliwości (ELF-EMF), jest odmienny. Z czego może wynikać występowanie tkankowo-specyficznych różnic w kreowaniu wzorca metylacji DNA.

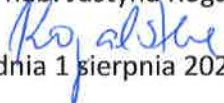
Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr inż. Pawła Józefa Wydorskiego stanowi istotny wkład w rozwój wiedzy o wpływie pól elektromagnetycznych na układ rozrodczy. Badania dostarczają nowych danych wskazujących, że krótkotrwała ekspozycja na ELF-EMF może modyfikować epigenom błony śluzowej macicy oraz indukować procesy apoptozy i stresu oksydacyjnego, co może wpływać na receptywność endometrium i sukces implantacji. Wyniki te są szczególnie ważne w kontekście rosnącej obecności urządzeń generujących pola elektromagnetyczne w otoczeniu człowieka i zwierząt. Autor udowodnił, że posiada szeroką wiedzę teoretyczną z zakresu biologii rozrodu oraz umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych.

Przedstawiona do oceny rozprawa prezentuje oryginalne rozwiązanie problemu naukowego poprzez analizę nieopisanego wcześniej wpływu ELF-EMF na mechanizmy epigenetyczne, apoptozę i stres oksydacyjny w błonie śluzowej macicy. W związku z tym spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2024.1571 ze zm.). Zwracam się zatem do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o nadanie Panu mgr inż. Pawłowi Wydorskiemu stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ze względu na bardzo wysoką jakość przedstawionych badań, ich znaczenie aplikacyjne, a także ogromny nakład pracy, jaki doktorant włożył zarówno w realizację badań, jak również w ich opracowanie merytoryczne wnioskuję o wyróżnienie rozprawy. Badania zrealizowane przez p. Wydorskiego mają charakter innowacyjny i zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych.

Prof. dr hab. Justyna Rogalska


Toruń, dnia 1 sierpnia 2025 r.