



Dr hab. Piotr Pawlak, prof. UPP

05.08.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pawła Wydorskiego

wykonanej w Katedrze Anatomii i Fizjologii Zwierząt, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
pod kierunkiem prof. dr hab. Anity Franczak
promotor pomocniczy: dr hab. Agata Żmijewska, prof. UWM

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska 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" to 57-stronicowe opracowanie, na które składają się trzy oryginalne, spójne tematycznie oryginalne prace naukowe, wszystkie opublikowane w dobrych czasopismach o uznanej renomie: *Reproduction*, *Fertility and Development*, *Theriogenology* oraz *International Journal of Molecular Sciences*. We wszystkich pracach autor rozprawy jest pierwszym autorem, przedstawił także stosowne oświadczenia wykazując własny oraz innych autorów wkład merytoryczny w powstanie prac. Pracę wykonano pod opieką Pani Profesor Anity Franczak, której zespół od lat pracuje nad mechanizmami odpowiedzialnymi za prawidłowy rozród samic z wykorzystaniem nowoczesnych metod wysokoprzepustowych (transkryptomicznych i proteomicznych).

W ostatnich dekadach obserwuje się wyjątkowo szybki i trudny do przeszacowania postęp technologiczny. Rozwój innowacyjnych produktów wiąże się bezpośrednio z ich powszechną dostępnością, a nawet codziennym użytkowaniem. Rozbudowa systemów przesyłu energii oraz mnogość urządzeń elektrycznych wykorzystywanych na co dzień stanowią poważny problem wypełniający definicję zanieczyszczenia środowiska. Najczęściej problem ten kojarzony jest z m.in. intensywnym rolnictwem, stosowaniem pestycydów, produkcją przemysłową szkodliwych substancji, skażeniem środowiska czy obecnością w każdej niszy mikro- i nanoplastików. Dodatkowo jednak urządzenia generujące pole elektromagnetyczne stanowią źródło tzw. elektrosmogu, a jednocześnie są przedmiotami codziennej potrzeby. Mowa tu o tzw. polu o ekstremalnie niskiej częstotliwości (ang. extremely low-frequency electromagnetic field - ELF-EMF), generowanym przez domowe urządzenia elektryczne, linie energetyczne, zasilacze, ładowarki czy silniki elektryczne. Obecne badania zmierzają do ustalenia czy i w jakim stopniu urządzenia wytwarzające pole o ekstremalnie niskiej częstotliwości mogą wpływać na organizmy żywe, w tym także na poszczególne tkanki. Stwarza to bardzo dobry obszar badawczy umożliwiający zrozumienie mechanizmów oddziaływania, a właściwie interakcji środowiska na metabolizm i podstawowe procesy biologiczne. Do tej pory opublikowane prace, a także przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, wskazują na istotny wpływ pola ELF-EMF na zmiany na poziomie molekularnym, komórkowym, a także fizjologicznym, zależnie jednak od czasu jego oddziaływania. W rozprawie doktorskiej, Autor zdecydował się na weryfikację wpływu ELF-EMF na zmiany w obrazie molekularnym błony śluzowej macicy w postaci zmian epigenetycznych wpływających na profil ekspresji genów, zarówno na poziomie transkryptu jak i białka. Ewentualne zmiany w endometrium w okresie około implantacyjnym mogłyby wpływać na

procesy implantacji zarodka, podtrzymania ciąży a w konsekwencji na sukces reprodukcyjny.

Hipoteza badawcza została jasno sformułowana i zakłada, że pole elektromagnetyczne o ekstremalnie niskiej częstotliwości (ELF-EMF) wpływa na epigenetyczną regulację ekspresji genów, apoptozę i stres oksydacyjny w błonie śluzowej macicy świni domowej w okresie około-implantacyjnym. Postawiono cztery główne cele badawcze, do których Autor konsekwentnie odnosi się w rozdziale wyniki w formacie, od najbardziej ogólnych po bardziej szczegółowe i dogłębne. We wstępie przedstawiono ogólne, istotne dla omawianego problemu obszary badawcze oraz zreferowano do tej pory opublikowaną literaturę, która wydaje się być stosunkowo nowym, ale rozwijanym kierunkiem badawczym. Uważam, że ciekawym aspektem do przedyskutowania w rozprawie jest mechanizm działania czynników zaangażowanych w metylację/demetylację DNA, a przede wszystkim dynamiki tego procesu.

Na stronie 19, Autor użył niejasnego sformułowania „potencjał do apoptozy”, a liczba genów podlegających zmienionej ekspresji w ścieżce apoptotycznej jest mała i trudno na tym etapie wyjaśnić ewentualną jej aktywację na ich podstawie. Czy to oznacza, że inne geny zaangażowane w tą ścieżkę nie wykazały zmienionego poziomu ekspresji pod wpływ ELF-EMF? Uważam, że sformułowanie „proces apoptozy jest koordynowany przez rodzinę białek należących do kaspaz”, nie jest poprawne lub nie oddaje złożoności tego procesu i mnogich czynników zaangażowanych w różne jego etapy. Apoptoza może być indukowana przez sygnały zewnętrzne i wewnętrzne. Szlak zewnętrzny działa głównie za pośrednictwem receptorów śmierci (członków nadrodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów, TNFR), które dodatkowo aktywują kaspazę 8. Szlak wewnętrzny jest aktywowany przez członków rodziny białek BCL-2 w odpowiedzi na m.in. nadmiar reaktywnych form tlenu (ROS) lub stres metaboliczny. Niemniej jednak, apoptoza kończy się aktywacją kaspaz 3, 6 i 7 (z grupy tzw. egzekutorów), jako ostatnim etapem fragmentacji DNA i degradacji białek.

W biologii eksperymentalnej wykorzystanie modeli zwierzęcych, a w szczególności tkanek pobranych podczas procedur weterynaryjnych czy procesów przemysłowych pozawala na poszukiwanie międzygatunkowych analogii (lub odstępstw) w regulacji procesów biologicznych, w tym biomedycynie ludzkiej. Czy Autor, poza wymienionymi zaletami wykorzystania tkanek świni domowej wskazałby także inne, adekwatne do analizowanych czynników środowiskowych (lub tkanki innych gatunków warte analizy)? Opis materiałów i metod jest właściwie tożsamy z tym przedstawionym w oryginalnych pracach twórczych, ale jest opisany szczegółowo i dobrze rozwinięty, do ewentualnego wykorzystania także przez innych badaczy. Autor pracy musiał wykazać się sprawnością w pracy w kontakcie z dużymi tkankami, zwierzętami, hodowlami in vitro, analizami molekularnymi i komórkowymi, co wskazuje na bardzo dobry warsztat metodyczny. Na ewentualnie wyjaśnienie zasługuje szczegółowy opis pobierania skrawków błony śluzowej macicy. W szczególności czy skrawki przydzielone do dwóch grup – kontrolnej oraz eksperymentalnej pochodziły z tego samego (pobliskiego) fragmentu czy przyporządkowano je losowo.

Wyniki przedstawiono w podziale na logiczne, krótkie podrozdziały. Bardzo dobrze zestawiono na rycinie nr 2, w formie grafiki, szereg obserwowanych zmian w poziomie metylacji, i ekspresji genów (odpowiednio promotorów, transkryptu i białka), aktywacji apoptozy, koncentracji azotanów i azotynów oraz innych zmiennych, z uwzględnieniem istotnych statystycznie wyników. Do pozostałych wyników można swobodnie sięgnąć w załączonych do rozprawy kopii prac oryginalnych. W pracy najwięcej miejsca poświęcono zmianom epigenetycznym, w oparciu o analizę metylacji DNA (globalną i promotorów wybranych a priori genów). W tym celu zastosowano technikę MS-PCR, która ma pewne ograniczenia w stosunku



do innych stosowanych w tego typu badaniach. Jakie argumenty kierowały Autorem rozprawy wybierając metylo-specyficzny PCR, a nie wykorzystanie np. techniki pirosekwencjonowania w celu precyzyjnego oszacowania stopnia metylacji? Czy brak korelacji (w przypadku niektórych genów) poziomu mRNA i zmian metylacji nie będzie wynikiem trudności w optymalizacji albo efektywności PCR lub zróżnicowanej pomiędzy badanymi próbami populacji komórek?

Podsumowanie rozprawy liczy 6 stron, na których Doktorant zrozumiale omawia uzyskane wyniki jednocześnie odnosząc je do wcześniej publikowanych, a także wskazuje konieczność rozszerzenia badań. Koniec pracy wieńczy rozdział podsumowanie, w którym sformułowano sześć głównych wniosków, które spójnie nawiązują do uzyskanych wyników. Wyniki rozprawy wskazują, że ekspozycja na ELF-EMF wywołuje zmiany epigenetyczne, w tym w wzorca metylacji DNA oraz białek związanych z biogenezą mikroRNA (wzrost koncentracji DICER1, DGCR8), a także ekspresji genów i białek regulatorowych. Co ciekawe nie dla wszystkich genów o zmienionej ekspresji zanotowano zmiany w poziomie metylacji sekwencji promotorowych. Zastosowane warunki eksperymentalne prowadzą m.in. do zmiany ekspresji niektórych genów zaangażowanych w apoptozę czy stres oksydacyjny np. NOS3 i CASP7, co może wskazywać na zahamowanie apoptozy oraz indukcję stresu oksydacyjnego. Wyniki sugerują, że ELF-EMF może wpływać negatywnie na funkcje błony śluzowej macicy oraz procesy niezbędne dla prawidłowej implantacji zarodka, co jednak wymaga dalszych badań. Wskazano także możliwe występowanie tkankowo-specyficznych różnic w odpowiedzi na czynniki eksperymentalne ze względu na zmieniony profil m.in. genów i białek odpowiedzialnych za metylację de novo. Zastanawiająca jest próba wyjaśnienia wpływu różnych czasów ekspozycji czynnika eksperymentalnego na obserwowane zmiany na poziomie molekularnym oraz przeniesienie ich na warunki in vivo. Niewątpliwie najcenniejszym elementem badań byłoby w dalszej perspektywie wyjaśnienie czy indukowane zmiany mają charakter trwały. Dodatkowo, badania funkcjonalne, zmierzające do opisu procesu implantacji zarodka, o którym Autor pisze m.in. we wstępie komplementowałyby uzyskane wyniki i wskazywały w jakim stopniu obserwowane zmiany prowadzą do zaburzeń na wczesnych etapach ciąży.

Podsumowując uważam, że przedstawiona praca doktorska ma wysoką wartość merytoryczną, udokumentowaną cennymi wynikami, a ponadto została napisana przystępnie i fachowym językiem. Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Pawła Wydorskiego spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024.1571 ze zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pana mgr Pawła Wydorskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, dyscyplinie nauki biologiczne.

KIEROWNIK KATEDRY

dr hab. Piotr Pawlak, prof. UPP