



Dr hab. Dorota Bonarska-Kujawa
Katedra Fizyki i Biofizyki

Wrocław, 10.03.2017 r

Recenzja pracy doktorskiej mgr Katarzyny Mokrej na temat „Ocena wpływu bisfenolu A i jego wybranych analogów na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka”.

Każdego dnia człowiek styka się z przedmiotami użytecznymi w życiu codziennym wykonanymi z tworzyw sztucznych, których składnikami są polimery i żywice epoksydowe. Tworzywa takie znajdują szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym, elektronicznym, papierniczym i w wielu innych dziedzinach. Niezbadany jest jednak w pełni wpływ tych substancji na organizm ludzki, a w szczególności na układ odpornościowy człowieka, odpowiedzialny za ochronę organizmu przed szkodliwym działaniem czynników zewnętrznych.

Badania wykonane przez panią mgr Katarzynę Mokrą w ramach rozprawy doktorskiej wiążą się ściśle z istotnym problemem jakim jest duże narażenie organizmu człowieka na powszechnie stosowane w życiu codziennym składniki tworzyw sztucznych, do których należą m. in. analogi bisfenolu A (BPA). Bisfenole stanowią bowiem grupę związków powszechnie stosowanych do produkcji poliwęglanów i poliestrów znajdujących zastosowanie w artykułach codziennego użytku takich jak: plastikowe opakowania do żywności, butelki na napoje, zabawki, jak również jako implanty i cewniki stosowane w medycynie. Utrzymująca się na wysokim poziomie produkcja bisfenolu A, która w 2013 roku wyniosła 6,8 mln ton, oprócz dużych korzyści, skłania do myślenia i pytania o ewentualne działania niepożądane na organizm tego związku. Przeprowadzone dotychczas badania toksykologiczne wskazują na możliwość przenikania bisfenoli do organizmu człowieka na drodze wziewnej, pokarmowej i dermalnej oraz kumulowania się tych substancji w tkankach i płynach ustrojowych. Wyniki badań epidemiologicznych wskazują na potencjalnie rakotwórczy oraz endokrynnny wpływ BPA na organizm. Ponadto zwraca się uwagę na zależność pomiędzy podwyższonym poziomem bisfenoli we krwi i w moczu a rozwojem chorób takich jak: cukrzyca, otyłość, alergia i astma, głównie u dzieci, co może mieć związek z upośledzeniem funkcji układu immunologicznego przez te związki. Do chwili obecnej nie zostały poznane mechanizmy oddziaływania bisfenoli z komórkami krwi, w szczególności z leukocytami, które pełnią zasadniczą rolę w funkcjonowaniu układu odpornościowego w organizmie człowieka.

Badania podjęte przez panią mgr Katarzynę Mokrą, w ramach pracy doktorskiej dotyczą więc ważnego problemu związanego z ochroną zdrowia człowieka. Doktorantka zbadała wpływ bisfenolu A oraz jego wybranych analogów na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej. Badania o charakterze toksykologicznym, a także uwzględniające zagadnienia biofizyczne i fizjologiczne w leukocytach pod wpływem oddziaływania z bisfenolami, nie zostały dotąd przeprowadzone.

Praca została wykonana w Katedrze Biofizyki Skażeń Środowiska, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego, pod kierunkiem pana dr hab. Jaromira Michałowicza, prof. nadzw. UŁ. Badania zrealizowane w ramach pracy doktorskiej były finansowane z dwóch źródeł: grantu NCN (UMO-2012/07/NZ7/01174) pt. „Analiza mechanizmu oddziaływania wybranych bisfenoli na erytrocyty i jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka” oraz z indywidualnego



stypendium stanowiącego dofinansowanie badań realizowanych w zakresie tematu: „Ocena wpływu bisfenolu A i jego wybranych analogów na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka”.

Rozprawę doktorską stanowi cykl trzech spójnych tematycznie prac doświadczalnych, dotyczących wpływu bisfenolu A i jego wybranych analogów na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka, które zostały opublikowane w czasopiśmie z bazy *Journal Citation Reports* o zasięgu międzynarodowym. W skład rozprawy doktorskiej wchodzi następujące prace:

1. Michałowicz J., Mokra K., Bąk A. *Bisphenol A and its analogs induce morphological and biochemical alterations in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study)*. *Toxicology in Vitro* 2015, 29:1464-1472.

2. Mokra K., Kocia M., Michałowicz J. *Bisphenol A and its analogs exhibit different apoptotic potential in peripheral blood mononuclear cells (in vitro study)*. *Food and Chemical Toxicology* 2015, 84:79-88.

3. Mokra K., Kuźmińska-Surowiec A., Woźniak A., Michałowicz J. *Evaluation of DNA-damaging potential of bisphenol A and its selected analogs in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study)*. *Food and Chemical Toxicology* 2017, 100:62-69.

Warto podkreślić, że sumaryczna wartość IF publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi zgodnie z rokiem opublikowania 10.506, oraz 105 punktów MNiSW.

Do rozprawy doktorskiej zostały również dołączone pisemne oświadczenia współautorów wyżej wymienionych prac o ich udziale procentowym w poszczególnych publikacjach oraz dorobek naukowy pani mgr Mokrej.

W pierwszej pracy Doktorantka jest drugim autorem, a w pracy drugiej i trzeciej pierwszym. Zgodnie z oświadczeniami współautorów procentowy udział Doktorantki w poszczególnych pracach jest dominujący i stanowi odpowiednio 55, 65 i 60 %. Ponadto z oświadczeń współautorów prac wynika, że pani mgr Katarzyna Mokra uczestniczyła aktywnie w badaniach na etapie ich planowania, następnie wykonała cały szereg różnych oznaczeń, które potrafiła opracować i opisać w formie publikacji (praca 2 i 3). Świadczy to nie tylko o dużym zaangażowaniu Doktorantki w przeprowadzonych badaniach na każdym etapie ich realizacji, ale również o godnej uwagi dojrzałości naukowo-badawczej pani mgr Mokrej.

Ponadto o dużej aktywności naukowej Doktorantki świadczy Jej dorobek naukowy, który zgromadziła poza pracami stanowiącymi rozprawę doktorską, a na który składają się dwie publikacje opublikowane w czasopiśmie z listy JCR w wysoko indeksowanych czasopiśmie: *Toxicology in Vitro* oraz *Environmental Toxicology and Pharmacology* (odpowiednio 30 i 20 pkt MNiSW oraz IF 3.238 i 1.862). Jest też współautorką czterech publikacji stanowiących rozdziały w monografiach pt. „Badania Rozwój Młodych Naukowców w Polsce. Żywność i Bisfenole” oraz 14 komunikatów konferencyjnych, przedstawionych na 9 konferencjach naukowych, w tym dwóch konferencjach międzynarodowych. Należy również podkreślić, że sumaryczny IF dorobku publikacyjnego łącznie z pracami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi 15.706 oraz 171 pkt MNiSW. Dorobek naukowy pani mgr Katarzyny Mokrej jest imponujący, świadczy o dużym potencjale naukowym Doktorantki i oceniam go bardzo wysoko.



UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

WYDZIAŁ PRZYRODNICZO-TECHNOLOGICZNY

Poza spisem i kopiami publikacji do rozprawy doktorskiej Doktorantka dołączyła również następujące rozdziały: omówienie celu naukowego uzyskanych w pracach wyników, streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim.

Omówienie celu naukowego rozprawy i uzyskanych wyników krótko podsumowuje zrealizowany przez Doktorantkę temat badawczy ujęty w następujących podrozdziałach: wprowadzenie, cel pracy, omówienie prac wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej, wnioski oraz literatura uzupełniająca. We wprowadzeniu pani mgr Katarzyna Mokra w sposób syntetyczny zarysowała problematykę związaną z powszechnym zastosowaniem bisfenoli i ich toksycznością, na podstawie doniesień literaturowych opublikowanych głównie w latach 2009-2015. Krótko uzasadniła wybór materiału badawczego, jaki został użyty w badaniach stanowiących rozprawę doktorską. Wybór bisfenolu A i jego analogów bisfenolu F, S i AF został podyktowany ich dużą zawartością w wielu komercyjnie dostępnych produktach, jak butelki plastikowe i zabawki. Doktorantka wykonała również bardzo rzetelną i wnikliwą analizę doniesień literaturowych dotyczących biodostępności, aktywności biologicznej, a także toksyczności tych związków. Ze względu na ciągłe narażenie organizmu człowieka na kontakt z tymi związkami dobór materiału badawczego uważam za bardzo ważny. Uzasadniony również został wybór obiektu badawczego, jaki stanowią komórki jednojądrzaste krwi obwodowej człowieka. Wybór tych komórek jest w pełni uzasadniony, jeśli chcemy poznać reakcję układu immunologicznego organizmu człowieka w obecności ksenobiotyków, jakim są związki z grupy bisfenoli.

Jednocześnie zainteresowało mnie kilka informacji zawartych we wprowadzeniu do omówienia celu naukowego i uzyskanych wyników. Doktorantka napisała, że: „w przemyśle wykorzystywanych jest obecnie 16 różnych bisfenoli, z czego roczną produkcję BPA w 2013 roku oszacowano na 6,8 mln ton [GrandviewResearch 2014].” Czy wiadomo w takim razie jaki to jest procent w odniesieniu do wszystkich 16 wykorzystywanych w przemyśle bisfenoli? We wstępie można również przeczytać, że szereg państw na świecie, w tym państwa UE, wprowadziło ograniczenia w stosowaniu BPA w produktach z tworzyw sztucznych przeznaczonych dla dzieci. Rzeczywiście na wielu tego typu produktach dostępnych w sprzedaży widnieje informacja „BPA free”. Czy Doktorantka posiada wiedzę, jakimi związkami najczęściej zastępowany jest bisfenol A w produktach dla dzieci? Czy są to badane analogi BPS, BPF, BPAF, czy może inne związki?

Celem badawczym pracy doktorskiej, poprawnie sformułowanym przez Doktorantkę, była ocena wpływu BPA oraz jego analogów BPS, BPF i BPAF na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka.

W dalszej części pani mgr Katarzyna Mokra krótko omówiła prace wchodzące w skład rozprawy. Warto dodać, że przedstawiona do oceny w ramach rozprawy seria publikacji, odzwierciedla założony na etapie planowania projekt badań, który został w całości zrealizowany. Oceniana praca doktorska składa się z trzech publikacji, których tematem przewodnim jest: Ocena wpływu bisfenolu A i jego wybranych analogów na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka. Krew, z której leukocyty zostały wypreparowane do badań, była pozyskana z Banku Krwi w Łodzi od 20 zdrowych i niepalących wolontariuszy w wieku 18-55 lat. Żywotność tych komórek wynosiła ponad 95 %, a ich gęstość wykorzystywana w większości analiz to milion komórek na mililitr.

W świetle opublikowanych wyników rodzi się jednak następujące pytanie: jak długo i w jakich warunkach można i należy przechowywać leukocyty, aby były przydatne do badań i wykazywały się



żywołnością powyżej 95 %? Czy zostały wykonane badania wstępne w tym kierunku lub, czy są na ten temat doniesienia literaturowe? Czy Doktorantka jest również w stanie powiedzieć, w jaki sposób uzyskane wyniki w odniesieniu do osób dorosłych można odnieść do dzieci?

Na szczególną uwagę w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej zasługuje bogaty i precyzyjnie zaplanowany, pod kątem realizacji celu pracy, warsztat badawczy Doktorantki. Pani mgr Katarzyna Mokra wykonała różnymi i umiejętnie dobranymi metodami biofizycznymi i analitycznymi szereg badań i oznaczeń, w których określała oddziaływania wybranych bisfenoli z leukocytami. Doktorantka wykonała następujące badania dla tych komórek modyfikowanych bisfenolami: oznaczenia morfologii i żywotność, apoptozy i nekrozy, oznaczenia poziomu reaktywnych form tlenu, uszkodzenia białek i lipidów na drodze utleniania, oznaczenia poziomu ATP i uszkodzenia DNA. Na uwagę zasługuje duża różnorodność wykonanych przez Doktorantkę badań z wykorzystaniem fluorescencyjnych technik badawczych: cytometrii przepływowej, spektroskopii i mikroskopii przy użyciu szeregu znaczników fluorescencyjnych. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły Doktorance w pełni zrealizować cel badań.

W trakcie analizowania tej części rozprawy nasunęły mi się dwie uwagi. Przy omawianiu prac stanowiących rozprawę Doktorantka najwięcej uwagi poświęciła otrzymanym wynikom, które niewątpliwie są najistotniejszym osiągnięciem Doktorantki. W mojej ocenie warto jednak byłoby poświęcić nie mniej uwagi zastosowanym w badaniach metodom i technikom badawczym, aby uwypuklić bogaty warsztat badawczy wykorzystany przez Doktorantkę. Wiele istotnych informacji, z punktu widzenia wykonanych badań, tj.: pochodzenie materiału badawczego lub metoda izolacji komórek jednojądrzastych krwi jest dostępna tylko w załączonych pracach. Ponadto w tej części pracy znalazło się kilka niezręcznych wyrażen językowych tj.: „silniejsze oksydacyjne uszkodzenia białek”, „najsilniejsze uszkodzenia DNA” czy „wpływ nekrotyczny”.

Na podstawie uzyskanych wyników pani mgr Katarzyna Mokra sformułowała interesujące wnioski:

1. Związki z grupy bisfenoli zmniejszały żywotność jednojądrzastych komórek krwi na drodze obniżania poziomu ATP i wzmaganie produkcji reaktywnych form tlenu, przez co indukowały uszkodzenia białek i lipidów na drodze oksydacji.
2. Badane związki wykazały się zróżnicowanym potencjałem apoptotycznym zachodzącym głównie poprzez ścieżkę mitochondrialną.
3. BPA i jego analogi powodowały pęknięcia jednoniciowe oraz w mniejszym stopniu dwuniciowe DNA komórek leukocytów, które ulegały efektywnej, jednak niepełnej naprawie.
4. Związki BPA i BPAF indukowały wyżej wymienione uszkodzenia w stężeniach porównywalnych do poziomu BPA oznaczonego we krwi populacji ogólnej.
5. Uzyskane wyniki wskazują na zasadność zastępowania związku BPA związkiem BPS w syntezie tworzyw sztucznych i poddaje w wątpliwość stosowanie w tym celu związku BPAS.

Przedstawione wnioski, stanowią jednoczenie w mojej ocenie oryginalne osiągnięcie Doktorantki, gdyż zawierają ważne i nowe aspekty poznawcze dotyczące skutków ekspozycji jednojądrzastych komórek krwi człowieka na wybrane związki z grupy bisfenoli. Wnioski 1, 2 i 3 są prawidłowo sformułowane i wynikają bezpośrednio z wykonanych badań. Za najciekawszy i godny dalszych badań toksykologicznych na innych modelach lub organizmach uznaję wniosek 5, natomiast 4



UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

WYDZIAŁ PRZYRODNICZO-TECHNOLOGICZNY

wniosek uważam za niepełny. Należałoby podać poziom BPA oznaczony we krwi populacji ogólnej i powołać się na literaturę. Dane te można znaleźć w publikacji, ale przy omawianiu prac w tej części rozprawy moim zdaniem ich zabrakło. Mam też pytanie do pani mgr Katarzyny Mokrej, czy ma w planach kontynuację badań na innych składnikach morfotycznych krwi lub innych komórkach?

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską pani mgr Katarzyny Mokrej. Na jej dużą wartość merytoryczną składają się umiejętnie zaplanowane, przeprowadzone i opublikowane w renomowanych czasopismach badania, podejmujące aktualny i ważny temat związany z ochroną zdrowia. Przedstawione w niej badania mają w pełni charakter nowatorski. Doktorantka wykazała się przy tym dużymi umiejętnościami samodzielnego prowadzenia badań eksperymentalnych oraz znajomością problematyki z zakresu toksykologii, biologii i biofizyki. W swojej rozprawie przedstawiła oryginalne badania, które wzbogacają naukę o badania o charakterze poznawczym, a także w przyszłości aplikacyjnym. Rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Mokrej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami. Uważam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa jest podstawą do nadania Doktorantce stopnia naukowego Doktora w dziedzinie nauk biologicznych, w dyscyplinie biofizyka.

Zwracam się więc z uprzejmą prośbą do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Katarzyny Mokrej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę niezwykle bogaty dorobek naukowy pani mgr Katarzyny Mokrej, zakres i jakość przeprowadzonych przez nią badań, zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej i nagrodzenie Doktorantki.

Dr hab. inż. Dorota Bonarska-Kujawa