



Dr hab. Dorota Bonarska-Kujawa
Katedra Fizyki i Biofizyki
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 18.11.2018

Ocena

pracy doktorskiej mgr Eweliny Woźniak pt:

„Mechanizm genotoksycznego działania i wybrane efekty epigenetyczne glifosatu, jego preparatu herbicydowego – Roundup 360 PLUS oraz metabolitu – kwasu aminometylofosfonowego w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka”

Rozprawa doktorska mgr Eweliny Woźniak dotyczy istotnego zagadnienia związanego z ochroną środowiska naturalnego, a także życia i zdrowia ludzi narażonych na działanie substancji toksycznych powszechnie stosowanych w rolnictwie, jako środki ochrony roślin. Rosnące zużycie preparatów herbicydowych, w szczególności tych zawierających glifosat, jako substancję czynną, jest podyktowane zapotrzebowaniem na zwiększanie wydajności upraw roślinnych. Działanie herbicydów zwiększa plony, ale równolegle stanowi rosnące zagrożenie dla życia i zdrowia ludzi bezpośrednio stykających się z nimi. Substancje czynne i metabolity preparatów ochrony roślin stanowią także pośrednie zagrożenie toksykologiczne, poprzez przenikanie do środowiska naturalnego, gdzie w sposób niekontrolowany mogą zanieczyszczać wodę, glebę i żywność. Glifosat, jako substancja czynna wielu środków ochrony roślin, jest stosowany w rolnictwie od ponad 40 lat. Wprowadzenie do upraw roślin genetycznie modyfikowanych, odpornych na glifosat, spowodowało, że w ostatnich 20 latach wzrosło znacząco jego zużycie. Szacuje się, że obecnie na każdy hektar ziemi ogółem na całym świecie przypada aż ok. 0,5 kg glifosatu. Choć początkowo uważano glifosat za związek całkowicie bezpieczny, obecnie pojawia się jednak coraz więcej doniesień o potencjalnie rakotwórczym działaniu tego związku i jego pochodnych. Wyniki są na tyle niepokojące, że Międzynarodowa Agencja Badań na Rakiem zmieniła klasyfikację tego związku na „prawdopodobnie rakotwórczy”. Komisja Europejska natomiast nie zgodziła się z taką klasyfikacją glifosatu i przedłużyła stosowanie tej substancji czynnej herbicydów do 2022 roku. W związku z tym, obecnie na całym świecie są prowadzone intensywne badania, mające na celu wyjaśnienie ewentualnego epigenetycznego i genotoksycznego działania glifosatu, jego preparatów i metabolitów. W badania te z powodzeniem wpisują się eksperymenty przeprowadzone przez panią mgr Ewelinę Woźniak, mające na celu określenie genotoksycznych i epigenetycznych skutków oddziaływania glifosatu, jego



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

preparatu herbicydowego Roundup 360 PLUS oraz metabolitu kwasu aminometylofosfonowego (AMPA) z jednojądrzastymi komórkami krwi obwodowej człowieka.

Praca doktorska pani mgr Woźniak ma klasyczny układ, zawarty na 176 stronach. Napisana jest bardzo dobrze i starannie pod względem stylistycznym i merytorycznym. Po szczegółowym spisie treści znajduje się wyjaśnienie licznych skrótów stosowanych w pracy liczące 5 stron. Bardzo dobrze opracowany i szczegółowy Wstęp, składający się z 5 podrozdziałów i zajmujący 28 stron, stanowi znakomite wprowadzenie do tematyki badawczej rozprawy. Dostarcza on szeregu bardzo istotnych informacji, popartych aktualną literaturą, o preparatach herbicydowych zawierających glifosat oraz zagrożeniu wynikającym z ich stosowania, a także dotyczy biomarkerów stosowanych do oceny narażenia środowiskowego na pestycydy.

Cel badań oraz dobór materiału badawczego zostały przedstawione w dwóch kolejnych rozdziałach poprzedzających szczegółowo opisane w 16 podrozdziałach metody badawcze.

W przedstawionej mi do oceny dysertacji, cel pracy został sformułowany prawidłowo na stronie 29 oraz zrealizowany poprzez ciekawe i nowatorskie badania. Wybrane przez Doktorantkę obiekty badawcze, zastosowane nowoczesne metody i techniki pomiarowe, jak również wyznaczone szczegółowo zadania badawcze, dawały gwarancję zrealizowania postawionego celu.

Dobór użytych związków i preparatu, jak również dobór ich stężeń, zostały poparte doniesieniami literaturowymi i wcześniej przeprowadzonymi badaniami. Zakresy stężeń glifosatu i AMPA oraz preparatu Roundup odpowiadały stężeniom występującym w narażeniu środowiskowym i zawodowym. Dobór obiektu badawczego, w postaci jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka, również wydaje się uzasadniony. Zabrakło mi jednak w tej części pracy wyraźnego uzasadnienia Doktorantki wyboru takiego obiektu badawczego.

Plan pracy badawczej został logicznie opracowany przez Doktorantkę. Na szczególną uwagę zasługuje bardzo bogaty warsztat badawczy pani mgr Woźniak obejmujący szereg nowoczesnych technik pomiarowych z zakresu: mikroskopii, spektroskopii fluorescencyjnej, cytometrii przepływowej, mikroplótkowej analizy spektrofotometrycznej i immunoenzymatycznej, PCR w czasie rzeczywistym i izolacji DNA i RNA. Opis zastosowanych metod jest szczegółowy i przejrzysty. Na szczególną uwagę zasługuje umiejętność projektowania starterów do badań genetycznych w oparciu o bioinformatyczne bazy danych Primer-BLAST NCBI-NIH oraz NCBI Reference Sequences oraz współpraca Doktorantki w



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

tym zakresie z zespołem badawczym Zakładu Genetyki Molekularnej i Epigenetyki Instytutu Medycyny Pracy im. prof. Jerzego Nofera w Łodzi.

W tej części pracy zainteresował mnie proces izolacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka. Doktorantka napisała na str. 34, w rozdziale 3.2., że: „zastosowana metoda, nie pozwala na otrzymanie wyłącznie limfocytów”, czy znane są Doktorantce metody izolacji pozwalające otrzymać wyłącznie limfocyty? Ciekawi mnie też dodatek antybiotyków penicyliny i streptomecyny w medium hodowlanym, użytym do izolacji jednojądrzastych komórek krwi. Czy te antybiotyki mogą mieć wpływ na wyniki badań i czy nie oddziałują one w sposób istotny z błonami jednojądrzastych komórek krwi?

W rozdziale 4.1. do oznaczenia żywotności komórek z wykorzystaniem błękitu trypanu Doktorantka wykorzystwała ciekawą technikę mikroskopową. Mam pytanie, w jaki sposób przebiegał proces liczenia komórek żywych i martwych i na jakiej próbie był on wykonany? Wyniki badań zostały szczegółowo przedstawione w rozdziale Wyniki na 83 stronach w formie opisowej oraz zamieszczone na przejrzystych i czytelnych 31 wykresach oraz w 50 tabelach. Ponadto zostały syntetycznie opisane w rozdziale Podsumowanie wyników w formie krótkiego opisu i trzech tabel. Doktorantka w swoich badaniach wykazała, że w wyniku narażenia jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka na działanie glifosatu, jego metabolitu AMPA i preparatu herbicydowego Roundup, dochodzi w nich do szeregu zmian. Substancje te indukują uszkodzenia nici DNA, generują reaktywne formy tlenu, obniżają globalną metylację DNA oraz zmieniają metylację w obrębie sekwencji promotorowej genów supresorowych i protoonkogenów. Dochodzi także do zmiany profilu ekspresji genów zaangażowanych w kluczowe procesy epigenetyczne na skutek pośredniego oddziaływania tych substancji z DNA.

W rozdziale 7 Doktorantka sformułowała wnioski, które zawierają nowe i ważne aspekty poznawcze. Wskazała, że wszystkie badane substancje działają genotoksycznie i zaburzają mechanizmy epigenetyczne w jednojądrzastych komórkach krwi. Roundup okazał się najbardziej genotoksyczny i jednocześnie najsilniej wpływający na procesy epigenetyczne. Zmiany wywoływane przez ten preparat występowały już w stężeniach odpowiadających narażeniu środowiskowemu. Glifosat i AMPA działały genotoksycznie w stężeniach, na jakie narażone są osoby zawodowo kontaktujące się z tymi substancjami, a epigenetycznie w stężeniach odpowiadających narażeniu ze strony środowiska.

W świetle uzyskanych wyników i sformułowanych wniosków bardzo ciekawa wnikliwa i rzeczowa jest Dyskusja umieszczona przez Doktorantkę w rozdziale 8 na 16 stronach. W oparciu o dane literaturowe mgr Ewelina Woźniak konfrontuje wyniki swoich badań z innymi doniesieniami na temat toksycznego działania herbicydów zawierających glifosat. Zarówno z badań Doktorantki, jak i z danych



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

literaturowych jasno wynika, że preparaty herbicydowe zawierające glifosat, typu Roundup, są bardziej cytotoksyczne niż sam glifosat. Natomiast związek AMPA, będący metabolitem glifosatu wykazuje najmniejszą genotoksyczność. Doktorantka wnioskuje również, że najprawdopodobniej działanie genotoksyczne badanych preparatów jest pośrednie i wynika głównie z właściwości oksydacyjnych badanych związków, nie jest zaś skutkiem tworzenia adduktów z DNA. Jednak dalsze badania nad substancjami herbicydowymi wydają się niezbędne, aby w pełni wyjaśnić molekularny mechanizm ich działania. Autorka rozprawy podkreśla też, że proces powstawania nowotworów jest bardzo skomplikowany, a zmiany, które są wywoływane przez badane związki, mogą się do niego skutecznie przyczyniać poprzez generowanie w komórkach niestabilności genetycznej.

W dyskusji zwraca uwagę łatwość, z jaką Doktorantka konfrontuje swoje wyniki z danymi literaturowymi, oraz próba wyjaśnienia mechanizmów działania badanych substancji na przejrzystych rycinach. W dyskusji zaciekała mnie też jedna informacja zamieszczona na str. 143 dotycząca korelacji narażenia rolników na długotrwałą ekspozycję na działanie pestycydów z niestabilnością genową w ich komórkach krwi. Czy są znane jakieś badania epidemiologiczne, które łączyłyby stałą ekspozycję tej grupy zawodowej na działanie herbicydów z występowaniem nowotworów?

Pracę kończy streszczenie w języku polskim i angielskim oraz obszerny spis literatury obejmujący 123 pozycje z ostatnich 30 lat, w tym głównie z ostatniego dziesięciolecia.

Na końcu pracy Doktorantka umieściła wykaz swoich publikacji i monografii, obejmujący odpowiednio 10 i 14 pozycji. Warto podkreślić, że dorobek pani mgr Eweliny Woźniak, o sumarycznej liczbie punktów MNiSW 325 i łącznym IF równym 24.453, świadczy o Jej dużej aktywności naukowej. W swoim dorobku pani mgr Woźniak zgromadziła prace opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym znajdujących się na liście JCR takich jak: Food and Chemical Toxicology, Scientific Reports i Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanism (posiadające po 40 pkt MNiSW oraz IF odpowiednio 3.977, 4.122 i 5.179). Pozostałe artykuły opublikowała w innych czasopismach polskich i zagranicznych oraz w monografiach pokonferencyjnych. Jest też współautorką 19 prezentacji ustnych i komunikatów konferencyjnych, przedstawionych na 19 konferencjach naukowych, w tym dziewięciu międzynarodowych. Dorobek naukowy pani mgr Eweliny Woźniak jest imponujący, świadczy o dużym potencjale naukowym Doktorantki i oceniam go bardzo wysoko.

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem pani promotor prof. dr hab. Bożeny Bukowskiej w Katedrze Biofizyki Skażeń Środowiska, w Instytucie Biofizyki, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego oraz przy współpracy z: Katedrą Genetyki Molekularnej UŁ,



KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

Instytutem Medycyny Pracy im. prof. Jerzego Nofera w Łodzi, a także z Instytutem Przemysłu Organicznego w Warszawie. Praca doktorska realizowana była w ramach dotacji na działalność polegającą na prowadzeniu badań naukowych lub prac rozwojowych służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w latach 2017/2018.

Podsumowując, bardzo wysoko oceniam rozprawę doktorską zrealizowaną przez panią mgr Ewelinę Woźniak. Doktorantka podjęła ciekawy i ważny temat, dotyczący skutków działania toksycznych dla organizmu substancji oraz zrealizowała postawione cele badawcze. Na dużą wartość merytoryczną przedstawionej mi do recenzji pracy składają się umiejętnie zaplanowane, przeprowadzone i opracowane badania z zastosowaniem wielu technik badawczych, wnikliwie poprowadzona dyskusja i umiejętnie wyciągnięte wnioski, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Przedstawione w niej badania mają w pełni charakter nowatorski i mogą stanowić inspirację do kontynuowania badań nad szkodliwością stosowanych powszechnie środków ochrony roślin. Doktorantka wykazała się ponadto dużymi umiejętnościami samodzielnego prowadzenia badań eksperymentalnych, a także współpracy z innymi grupami badawczymi oraz znajomością problematyki z zakresu genetyki, cytobiologii, toksykologii i biofizyki. W swojej rozprawie przedstawiła oryginalne badania, które wzbogacają naukę o nowe aspekty o charakterze poznawczym. Rozprawa doktorska pani mgr Woźniak spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku. 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 Eweliny Woźniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę niezwykle bogaty dorobek naukowy pani mgr Woźniak, zakres i jakość przeprowadzonych przez Nią badań, zwracam się do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Dr hab. inż. Dorota Bonarska-Kujawa

KIEROWNIK
Katedry Fizyki i Biofizyki

Dr hab. inż. Dorota Bonarska-Kujawa