

Olsztyn, 22 listopada 2018 r.

Prof. dr hab. Zbigniew Wieczorek, prof. zw.
Katedra Fizyki i Biofizyki
Wydział Nauki o Żywności
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 4
10-917 Olsztyn

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Woźniak zatytułowanej „Mechanizm genotoksycznego działania i wybrane efekty epigenetyczne glifosatu, jego preparatu herbicydowego – Roundup 360 PLUS oraz metabolitu – kwasu aminometylofosfonowego w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka” wykonanej w Katedrze Biofizyki Skażeń Środowiska w Instytucie Biofizyki Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Bożeny Bukowskiej, prof. zw.

Oceniana rozprawa doktorska przedstawia wyniki kompleksowych badań nad efektami wywołanymi 24 godziną inkubacją jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka zawieszonych w buforze fosforanowym z dodatkiem preparatu herbicydowego Roundup 360 PLUS, jego substancji czynnej glifosatu i metabolitu glifosatu - kwasu aminometylofosfonowego (AMPA) w różnych stężeniach obejmujących zakres narażenia środowiskowego i zawodowego. Glifosat jest obecnie najpowszechniej używanym herbicydem. Jak wynika z danych zgromadzonych przez Charlesa Benbrooka w 2014 roku zużyto na świecie prawie 826 tys. Mg tej substancji czynnej (*Environ Sci Eur (2016) 28:3*). Jest stosunkowo trwałym związkiem, co powoduje, że właściwie jest wykrywany we wszystkich elementach środowiska.

W związku z kontrowersjami dotyczącymi szkodliwości dla ludzi stosowania preparatów herbicydowych opartych na glifosacie i jego pochodnych na świecie toczy się gorąca publiczna i naukowa dyskusja dotycząca tej kwestii. Tylko w bazie *Web of Science Core Collection* pod hasłem „*glyphosate*” można znaleźć 10119 publikacji, począwszy od pierwszych trzech publikacji z roku 1974 (rok rozpoczęcia stosowania glifosatu), a skończywszy na 718 w 2018 roku (dane na dzień sporządzania recenzji).

Glifosat stosowany jest od ponad czterdziestu lat i jeszcze do niedawna był uważany za nieszkodliwy dla zwierząt i ludzi. Niektóre wyniki badań sugerują jednak, że wpływa negatywnie na układ nerwowy i rozrodczy zwierząt, a także może wywoływać nowotwory.

Dopiero w 2015 roku Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem Światowej Organizacji Zdrowia uznała, że istnieją przekonujące dowody na to, że glifosat może powodować raka u zwierząt laboratoryjnych i dlatego został zaklasyfikowany jako związek prawdopodobnie rakotwórczy dla ludzi (grupa 2A). Mimo tego Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności stwierdził w 2017 roku, że dowody na rakotwórczość glifosatu są bardzo ograniczone i niejednoznaczne i na tej podstawie Komisja Europejska przedłużyła możliwość stosowania glifosatu jako substancji czynnej herbicydów do 2022 roku. Wyniki badań prezentowanych w ocenianej rozprawie wpisują się w toczącą się dyskusję, dostarczając jednoznacznych argumentów zwolennikom wprowadzenia zakazu stosowania tego herbicydu.

Tytuł pracy dość dobrze określa zawartość rozprawy, chociaż pierwsza część tytułu „Mechanizm genotoksycznego działania” sugeruje poznanie podstaw molekularnych genotoksycznego działania badanych substancji w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. Po przeczytaniu rozprawy pozostaje pewien niedosyt, ponieważ przedstawione wyniki uprawdopodobniają pośrednie działanie tych substancji na DNA poprzez indukcję w komórce reaktywnych form tlenu, natomiast nie znajdziemy wyjaśnienia, w jaki sposób dochodzi do powstawania tych reaktywnych form tlenu.

Oceniana rozprawa doktorska jest obszernym, oryginalnym opracowaniem o klasycznym układzie treści, podzielonym na kilka rozdziałów następujących po sobie w logicznej kolejności, z których: „Wstęp”, „Materiał badawczy”, „Metody” i „Wyniki” zostały podzielone na szereg podrozdziałów. Całość opatrzona jest spisem treści, wykazem stosowanych skrótów, streszczeniem w języku polskim i angielskim, wykazem cytowanej literatury oraz wykazem publikacji, rozdziałów i doniesień, których autorką lub współautorką jest Autorka rozprawy. Nie mam zastrzeżeń do formalnego układu pracy.

Rozdział „Wstęp” (str. 1 - 28) stanowi wyczerpujące przedstawienie tła dla badań podjętych przez Autorkę dostarczając podstawowych informacji literaturowych przygotowujących czytelnika do odbioru dalszych części pracy. W opinii recenzenta może jedynie w podrozdziale „Budowa i właściwości chemiczne glifosatu” trochę więcej uwagi można było poświęcić właściwościom chemicznym glifosatu wynikającym z jego budowy, a szczególnie jeśli chodzi o możliwość istnienia aż w pięciu stanach jonowych, czy możliwość chelatowania jonów metali.

Następnie Autorka wskazuje w oddzielnym rozdziale główne cele badań: a) określenie wpływu, b) porównanie toksyczności glifosatu, jego preparatu herbicydowego Roundup 360 PLUS i metabolitu kwasu aminometylofosfonowego (AMPA) na jednojądrzaste komórki krwi

obwodowej człowieka, do osiągnięcia których niezbędna była realizacja bardzo wielu zadań badawczych. Począwszy od oceny jedno- i dwuniciowych pęknięć DNA poprzez ocenę uszkodzeń oksydacyjnych puryn i pirymidyn, analizę kinetyki naprawy powstałych uszkodzeń DNA, ocenę reaktywności form tlenu, analizę tworzenia adduktów DNA, następnie ocenę globalnej metylacji DNA i ocenę metylacji zaprojektowanych sekwencji promotorowych, skończywszy na analizie ekspresji zestawu genów związanych z regulacją cyklu komórkowego i ekspresji genów związanych z procesami epigentycznymi.

Po tym następuje prezentacja materiałów i metod wykorzystanych do realizacji zamierzonego celu. Wydaje się, że bardziej trafnym byłoby tu połączenie tych dwóch rozdziałów, ponieważ w rozdziale „Materiał badawczy” znajdują się często opisy procedur, a więc metod uzyskania określonego materiału do badań. Bardziej podoba mi się układ zastosowany w artykule w czasopiśmie Food and Chemical Toxicology, gdzie opublikowana została część wyników prezentowanych w ocenianej rozprawie. W tym miejscu muszę skierować pytanie do Autorki. Na stronie 35 użyto po raz pierwszy, a później wielokrotnie określenia czynności „odmywano związki” (na stronie 36 „odmycie preparatu”), zamiennie z usunięciem pestycydu, które nie bardzo wiadomo jak rozumieć. Bardzo proszę Autorkę rozprawy o przedstawienie w czasie publicznej obrony doktoratu, na czym polegała procedura odmywania i jakie były jej efekty?

W następnym rozdziale Autorka przedstawia wyniki swoich badań realizowanych na każdym z etapów. Jest to najobszerniejsza część dysertacji, zajmuje aż 83 strony. Przedstawione wyniki obejmują ogromną serię dobrze zaplanowanych i przeprowadzonych doświadczeń. Zaprezentowane wyniki pozwalają uprawdopodobnić tezę, że podstawową przyczyną działania glifosatu jest generowanie stresu oksydacyjnego prowadzącego do uszkodzeń oksydacyjnych DNA, zmian epigenetycznych takich jak zmiany w metylacji DNA, modyfikacji histonów, modyfikacji ekspresji genów regulujących procesy epigenetyczne i cykl komórkowy. Mam tu tylko uwagę do jednego eksperymentu. Wśród zadań badawczych znalazła się cyt.: „analiza tworzenia adduktów z DNA”. Jako metodę służącą sprawdzeniu cyt.: „czy badane związki bezpośrednio wiążą się z DNA” Autorka rozprawy wykorzystwała test relaksacyjny (konformacyjny) używając plazmidu pUC19. Założyła, cyt.: „że w przypadku bezpośredniego łączenia się preparatu i badanych związków z DNA, mogą wystąpić pojedyncze lub podwójne pęknięcia DNA”, co w konsekwencji będzie prowadziło do zmiany struktury przestrzennej plazmidu. Nie bardzo wiadomo, jak miałyby dochodzić do rozrywania wiązań w DNA, skoro wiadomo, że do tego konieczny jest

np. rodnik hydroksylowy. Nasuwa się pytanie skąd ten rodnik miałby się pojawić, jeśli inkubowano plazmidy z glifosatem w wodzie destylowanej. Nie znam pracy naukowej, która pokazywałaby, że glifosat generuje w wodzie destylowanej reaktywne formy tlenu.

Z obowiązku recenzenta muszę podnieść kilka kwestii, które prawdopodobnie wynikają z niedociągnięć redakcyjnych i dotyczą sposobu prezentacji wyników. Po pierwsze w tytułach dwunastu tabel: 5.6; 5.8; 5.10; 5.12; 5.14; 5.16; 5.18; 5.20; 5.21; 5.23; 5.31; 5.33 podano, że zawierają one dane w postaci: średnia \pm SEM. Niestety nie zostały podane w tych tabelach wartości SEM, a pokazywane są tabele przedstawiające wyniki testów istotności różnic. W tej sytuacji nie ma możliwości sprawdzenia czy testy istotności przeprowadzono prawidłowo. Po drugie nawet jeśli w tabelach zostały lub zostałyby podane wartości SEM to i tak tabele zawierające za każdym razem wyniki testu Tukeya w odniesieniu do konkretnego eksperymentu: 5.2; 5.4; 5.5; 5.7; 5.9; 5.11; 5.13; 5.15; 5.17; 5.19; 5.22; 5.25; 5.26; 5.27; 5.28; 5.29; 5.30; 5.32; 5.34; 5.35; 5.36; 5.37; 5.38; 5.39; 5.40; 5.41; 5.42; 5.43; 5.44; 5.45; 5.46; 5.47; 5.48; 5.49; 5.50 są niepotrzebne, ponieważ na wykresach i w tabelach poprzedzających tabele z wynikami testu Tukeya zaznaczono w powszechnie przyjęty sposób poziom istotności różnic. Dodatkowo generowanie tak dużej liczby tabel sprzyja pomyłkom, bo w tabelach 5.35 i 5.36 błędnie wpisano poziom istotności 0,5 zamiast 0,05, a w tabeli 5.49 błędnie wpisano w przypadku Roundupu stężenie 0,05 μ M zamiast 0,5 μ M.

Rozprawę kończy kilkunastostronicowa dyskusja wyników poprzedzona ich krótkim podsumowaniem i zestawieniem wniosków. Dyskusja stoi na wysokim poziomie, wywody i interpretacje są logiczne i bardzo dobrze powiązane z wynikami prezentowanymi w pracach innych autorów. Autorka świetnie rozeznaje się w literaturze przedmiotu posługując się najnowszą, aż 54 % cytowanych prac ukazało się w ostatnich 5 latach (lata 2014 – 2018). Zgadzam się z Autorką rozprawy, że badania wpływu glifosatu, jego preparatu herbicydowego – Roundup 360 PLUS oraz metabolitu – kwasu aminometylofosfonowego na zmiany epigenetyczne w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka mają charakter pionierski.

Ogólnie jestem pod wrażeniem wielkości ładunku naukowego zaprezentowanych w pracy badań, logiki kolejnych kroków badawczych, systematyczności w dążeniu do zrealizowania celu. Wprawdzie wykorzystane w badaniach metody należy raczej zaliczyć do standardowych, to rzadko spotka się w rozprawach doktorskich tak szerokie spektrum eksperymentów i całościowy charakter badań. W mojej ocenie praca znacznie przekracza zawartością wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

Z obowiązku recenzenta muszę stwierdzić, że strona edycyjna rozprawy jest dobra, chociaż pojawiają się drobne braki i niedociągnięcia. Autorka nie ustrzegła się błędów edytorskich, takich jak powtórzeń czy opuszczeń wyrazów, sporadycznych błędów gramatycznych, opuszczenia niektórych cytowań w spisie literatury, cytowania niezgodnego z przyjętymi zasadami, braku niektórych używanych skrótów, czy wykorzystanie angielskiej notacji liczb. Wszystkie te błędy traktuję jako mało istotne i informację o nich przekażę bezpośrednio Autorce. Pragnę podkreślić, że wskazane drobne braki i niedociągnięcia nie obniżają wartości merytorycznej rozprawy.

Bezsporne są osiągnięcia Autorki ocenianej rozprawy, do których przede wszystkim zaliczam: wykazanie genotoksycznego działania preparatu herbicydowego Roundap 360 PLUS, glifosatu i jego metabolitu AMPA; udowodnienie generowania zmian epigenetycznych przez te substancje; wykazanie, że zmiany genetyczne i epigenetyczne wywołane działaniem preparatu herbicydowego Roundap 360 PLUS występują już w stężeniach odpowiadających narażeniu środowiskowemu.

W celu realizacji tak szerokiego zakresu badań Autorka musiała opanować bogaty warsztat badawczy, umiejętnie łącząc możliwości biologii molekularnej, metod biofizycznych, biochemicznych i biotechnologicznych. W tym miejscu pragnę zauważyć, jak istotna dla Doktorantki była możliwość prowadzenia badań w dużych, interdyscyplinarnych zespołach naukowych, bez których realizacja ambitnego celu pracy byłaby niemożliwa. Doktorantka mogła, ale przede wszystkim potrafiła skorzystać z dopracowanych w tych zespołach metod badawczych i świetnego zaplecza aparaturowego.

Sumując stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska mgr Eweliny Woźniak, przygotowana pod opieką prof. dr hab. Bożeny Bukowskiej, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jak również wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki i dowodzi umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Autorka rozprawy spełnia z nadwyżką wymagania stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora zgodnie z ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity: Dz.U. z 2017 r., poz. 1789). Wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę aktualność tematyki badań oraz osiągnięcia naukowe Autorki zawarte w ocenianej pracy, które mogą przyczynić się do poznania wpływu

i wyjaśnienia potencjalnych zagrożeń wynikających ze stosowania preparatów herbicydowych produkowanych na bazie glifosatu, wnoszę o wyróżnienie rozprawy mgr Eweliny Woźniak.

Ewelina Woźniak