



Dr hab. Hanna Pruchnik

Wrocław, 3.07.2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Jarosiewicz na temat
„Wpływ związków bromofenolowych ograniczających palność materiałów organicznych
na erytrocyty człowieka”**

Praca doktorska mgr Moniki Jarosiewicz została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Bożeny Bukowskiej w Katedrze Biofizyki Skazań Środowiska Instytutu Biofizyki na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Badania prowadzone w ramach tej rozprawy były finansowane z dotacji celowej dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich (rok 2016, B1611000001167.02; rok 2017, B1711000001518.02; rok 2018, B1811000001800.02).

Badania podjęte przez Doktorantkę są niezwykle istotne, dotyczą bowiem ważnych zagadnień związanych z ochroną środowiska i zdrowia człowieka. Przedmiotem badań są bromowane związki ograniczające palność (BFRs), których produkcja cały czas rośnie i obecnie stanowią one około 25% wszystkich antypirenów. BFRs jako składniki żywicy epoksydowej czy też tworzyw poliwęglanowych stosowane są wielu obszarach gospodarki: budownictwie, transporcie, przemyśle tekstylnym, meblarstwie, elektrotechnice, telekomunikacji. Znajdują się zatem w naszym otoczeniu (meble, wykładziny, izolacja termiczna, wtyczki, złącza, obudowy komputerów, telewizorów), przenikają do środowiska naturalnego (gleba, woda). Szczególnie na działanie BFRs narażone są osoby pozostające z nimi w stałym kontakcie z racji wykonywanego zawodu, jak np.: produkcja, przetwarzanie oraz recykling tworzyw sztucznych, demontaż elektroniki, fabryki obwodów elektronicznych. W pełni zgadzam się ze stwierdzeniem Doktorantki, że powszechne narażenie ludzi na owe związki oraz niedostateczna wiedza na temat ich potencjalnie negatywnego wpływu na organizmy ludzi i zwierząt wymaga dalszych testów aktywności biologicznej BFRs, a szczególności znikoma liczba doniesień dotycząca ich wpływu na komórki krwi człowieka, uzasadnia podjęcie tego typu badań.



Celem badawczym pracy doktorskiej była ocena i porównanie wpływu pięciu bromowanych związków ograniczających palność na erytrocyty człowieka w warunkach *in vitro* oraz próba określenia mechanizmów ich działania.

Na przedstawioną do oceny rozprawę doktorską składają się cztery prace (trzy oryginalne i jedna przeglądowa), tworzące spójną tematyczną całość, opublikowane w czasopismach z listy JCR o łącznym współczynniku oddziaływania IF 13,441 (125 pkt MNiSW):

1. Jarosiewicz M., Bukowska B. (2017) *Tetrabromobisphenol a-toxicity, environmental and occupational exposures [Tetrabromobisfenol a-toksyczność, narażenie środowiskowe i zawodowe]*, *Medycyna Pracy*, 68, 121-134
2. Jarosiewicz M., Duchnowicz P., Włuka A., Bukowska B. (2017) *Evaluation of the effect of brominated flame retardants on hemoglobin oxidation and hemolysis in human erythrocytes*, *Food and Chemical Toxicology*, 109, 264-271
3. Jarosiewicz M., Michałowicz J., Bukowska B. (2019) *In vitro assessment of eryptotic potential of tetrabromobisphenol A and other bromophenolic flame retardants*, *Chemosphere*, 215, 404-412
4. Jarosiewicz M., Krokosz A., Marczak A., Bukowska B. (2019) *Changes in the activities of antioxidant enzymes and reduced glutathione level in human erythrocytes exposed to selected brominated flame retardants*, *Chemosphere*, 227, 93-99

Praca doktorska, oprócz kopii powyższych publikacji, zawiera omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis dorobku naukowego Doktorantki oraz oświadczenia współautorów. Warto zaznaczyć, że we wszystkich publikacjach wchodzących w skład rozprawy Pani mgr Monika Jarosiewicz jest pierwszym autorem, a w trzech spośród nich autorem korespondencyjnym. Według oświadczeń współautorów wkład Doktorantki w powstanie publikacji był dominujący (80%, 70%, 70% i 60%), była Ona nie tylko współautorką koncepcji danego artykułu, zaplanowała i wykonała prawie wszystkie eksperymenty, ale też opracowała i opisała ich wyniki. Wszystko to świadczy o niezwyklej pracowitości i zaangażowaniu w pracę naukową Doktorantki, a także o tym, iż zapoznała się Ona bardzo dobrze z realizowaną tematyką i opanowała szereg metod badawczych.



We wprowadzeniu do rozdziału „*Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników*” Doktorantka w zwięzły sposób opisała problemy związane z powszechnym stosowaniem bromowanych związków ograniczających palność, uzasadniła wybór materiału badawczego oraz obiektu badawczego. Do testów wybrano najczęściej używany w przemyśle tetrabromobisfenol A (TBBPA), dodatkowo jego substytut - tetrabromobisfenol S (TBBPS), który ze względu na obecność grup sulfonowych powinien być mniej toksyczny w porównaniu z TBBPA oraz trzy bromofenole różniące się liczbą atomów bromu, a których obecność stwierdzono zarówno w środowisku jak i w organizmach ludzi: 2,4-dibromofenol (2,4-DBP), 2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TBP) oraz pentabromofenol (PBP). Zarówno wybór takich związków, jak i obiektu badań jakim są krwinki czerwone człowieka, uważam za odpowiedni i jak najbardziej zasadny. Bardzo interesujący opis tematu został wykonany w oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe (33 pozycje). Z obowiązku recenzenta nadmienię, że w spisie literatury uzupełniającej zabrakło dwóch pozycji cytowanych w podrozdziale „*Wprowadzenie*” (Hall i wsp., 2015; Blythe i wsp., 2006), trudno też uniknąć drobnych „literówek”, np. str.7 „Fuji i wsp.”, str.10 „PCP”.

W kolejnym podrozdziale, mgr Monika Jarosiewicz krótko omówiła prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje fakt, że układ artykułów w rozprawie doktorskiej został starannie przemyślany i w pełni odpowiada postawionemu celowi badań.

Pierwsza, przeglądowa praca stanowi przykładowe wprowadzenie do tematu, którym zajmuje się Doktorantka. Mgr Monika Jarosiewicz dokonała bardzo wnikliwej analizy najnowszej, głównie z ostatnich sześciu lat, literatury dotyczącej obecności tetrabromobisfenolu A (TBBPA) w środowisku i jego działania na organizmy żywe. W licznych badaniach wykazano występowanie TBBPA w glebie, wodzie, osadach rzecznych i ściekowych. Wykazano również, że związek ten kumuluje się w tłuszczach, jest obecny w tkankach i płynach ustrojowych ludzi (osocze, mleko matek, tkanka tłuszczowa), dokąd przedostaje się drogą pokarmową (dieta bogata w ryby i owoce morza), oddechową oraz przez kontakt ze skórą (np. sprzęt elektroniczny). Jak podkreśla Doktorantka, do tej pory nie przeprowadzono badań, które określałyby efekty działania niskich dawek TBBPA na organizm człowieka.

W drugiej, oryginalnej pracy porównano wpływ bromobisfenoli (TBBPA i TBBPS) oraz bromofenoli (2,4-DBP, 2,4,6-TBP, PBP) na proces hemolizy oraz utleniania hemoglobiny.



Pomiary wykonano w szerokim zakresie stężeń (od 0,01 do 100 µg/ml) dla różnych czasów inkubacji próbek. Znanymi metodami spektrometrycznymi określono stopień hemolizy i zmiany w poziomie methemoglobiny. Stwierdzono, że zarówno liczba atomów bromu, jak i liczba pierścieni aromatycznych w cząsteczce ma wpływ na zdolność związku do utleniania hemoglobiny oraz uszkodzenia błony erytrocytów. Badania pozwoliły na wyłonienie optymalnego czasu inkubacji z uniepalniaczami oraz przedhemolitycznego stężenia badanych związków, dane te wykorzystano w następnych etapach badań toksyczności BFRs.

W trzeciej publikacji oceniano zmiany apoptyczne w erytrocytach, występujące na skutek działania testowanych bromobisfenoli i bromofenoli. Metodą cystometrii przepływowej, przy użyciu odpowiednich znaczników fluorescencyjnych zbadano poziom reaktywnych form tlenu (RFT), oceniono eksternalizację fosfatydyloseryny, oznaczono poziom wapnia wewnątrzkomórkowego, zbadano aktywność kaspazy-3 oraz aktywność kapalin. Stwierdzono, że wszystkie testowane związki spowodowały wzrost RFT już przy bardzo niskich stężeniach, odpowiadających narażeniu środowiskowemu.

W czwartej publikacji kontynuowano i pogłębiono badania dotyczące wpływu BFRs na aktywność systemu antyoksydacyjnego w erytrocytach. Przy użyciu metod spektrometrycznych oceniano zmiany w aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz poziom glutationu zredukowanego (GSH). Stwierdzono, że wszystkie związki spowodowały obniżenie dysmutazy ponadtlenkowej, natomiast najwcześniej zmiany wywołały te same bromofenole (TBBPA, 2,4-DBP oraz PBP), które wykazywały najsilniejsze działanie utleniające. Najbardziej znaczący spadek aktywacji enzymów antyoksydacyjnych powodował TBBPA.

Na podstawie uzyskanych wyników, Doktorantka sformułowała wnioski przybliżające mechanizm toksycznego działania badanych bromowanych związków ograniczających palność:

„Badane związki wywołują stres oksydacyjny w krwinkach czerwonych podwyższając poziom RFT oraz obniżając aktywność systemu antyoksydacyjnego.”

„Bromowane uniepalniacze indukują eryptozę poprzez generowanie RFT, aktywację kaspazy-3 oraz eksternalizację fosfatydyloseryny.”

„TBBPA, 2,4-DBP oraz PBP wykazują działanie utleniające już w niskim stężeniu środowiskowym (1 ng/ml).”



„Największy potencjał eryptotyczny, hemolityczny i oksydacyjny wykazuje TBBPA, natomiast najmniejszy, stosowany jako jego substytut TBBPS. Uzyskane wyniki (w zakresie analizowanych parametrów oraz badanego typu komórek) wskazują na zasadność zastępowania TBBPA przez TBBPS.”

Wyniki przeprowadzonych badań niewątpliwie wnoszą nowe informacje na temat działania BFRs na organizmy żywe, są wartościowe w aspekcie poznawczym i mają znaczenie aplikacyjne, mogą być wykorzystane w projektowaniu syntetycznych materiałów polimerowych.

Mam jedynie kilka pytań do Doktorantki: 1) W przypadku TBBPA stwierdzono wpływ pH na toksyczność tego związku, czy takie badania były wykonane też dla pozostałych testowanych związków? 2) Czy planowane są dalsze badania z BFRs na innych obiektach badawczych, np. z komórkami śródbłonna naczyń? 3) Czy planowane są badania *in vivo*, np. na szczurach dla TBBPS?

Reasumując, bardzo dobrze oceniam pracę doktorską Pani mgr Moniki Jarosiewicz. Badania zawarte w rozprawie zostały starannie zaplanowane, wykonane i opublikowane w renomowanych czasopismach. Tematyka pracy dotyczy aktualnych, bardzo ważnych dla zdrowia ludzi i zwierząt zagadnień. Na podkreślenie zasługuje duży wkład pracy Doktorantki oraz umiejętność logicznego przeanalizowania wyników i ich konfrontacji z danymi literaturowymi. Na uznanie zasługuje też bardzo wysoki dorobek naukowy mgr Moniki Jarosiewicz, jest Ona współautorką 6 prac oryginalnych i dwóch prac przeglądowych z listy JCR o łącznym współczynniku oddziaływania 26,924 (MNiSW 245 pkt.), 6 rozdziałów w monografiach pokonferencyjnych oraz 30 doniesień konferencyjnych. Warto też zaznaczyć, że za swoje badania Doktorantka uzyskała wyróżnienie przyznane przez Rektora UŁ, otrzymała też wyróżnienie za najlepszy poster na 41 Międzynarodowym Seminarium „Chemistry for Agriculture”. Ponadto, mgr Monika Jarosiewicz angażowała się w działalność na rzecz dobra Uniwersytetu Łódzkiego, za co otrzymała wyróżnienie *Universitas Lodziensis Alumno Laude Dignissimo*, w latach 2016-2018 była w Komitecie Organizacyjnym Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów Nauk o Życiu „BioOpen”, a w ostatnim roku pełniła funkcję przewodniczącej tego Komitetu. Na szczególne uznanie zasługuje, że Doktorantka była kierownikiem projektu PRELUDIUM 14 (2017/27/N/NZ7/00548) pt. „Struktura i funkcja błony



erytrocytów człowieka narażonych na wybrane bromoorganiczne związki uniepalniające (*in vitro*)”, otrzymała również finansowanie wyjazdu zagranicznego w ramach projektu PROM (2018).

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Moniki Jarosiewicz jest wartościowym dorobkiem naukowym, stanowi istotną nowość, wyniki w niej zawarte wnoszą znaczący wkład w rozwój badań nad toksycznym mechanizmem działania związków bromofenolowych ograniczających palność materiałów organicznych.

Stwierdzam, że przedłożona przez mgr Monikę Jarosiewicz rozprawa w pełni odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Moniki Jarosiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Zważywszy na bardzo dobry dorobek naukowy Doktorantki oraz jakość i znaczenie przeprowadzonych przez nią badań, zwracam się uprzejmie do Wysokiej Rady o wyróżnienie ocenianej rozprawy.

Wrocław, 3 lipca 2019 roku