

Poznań, dnia 24 czerwca AD 2019

O C E N A
rozprawy doktorskiej
mgr Moniki JAROSIEWICZ
ze Stacjonarnych Studiów Doktoranckich
Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej
„WPLYW ZWIĄZKÓW BROMOFENOLOWYCH
OGRANICZAJĄCYCH PALNOŚĆ MATERIAŁÓW ORGANICZNYCH
NA ERYTROCYTY CZŁOWIEKA”,
której promotorem jest prof. dr hab. Bożena Bukowska,
kierownik Katedry Biofizyki Skażeń Środowiska Instytutu Biofizyki
Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Łódzkiego

Na ocenianą rozprawę doktorską składają się cztery publikacje (trzy prace oryginalne i praca przeglądowa), stanowiące spójny z tematem rozprawy cykl artykułów oraz drukowany dokument zawierający kopie powyższych czterech publikacji, oświadczenia współautorów prac, omówienie celu, wyników, streszczenia i dorobek naukowy Doktorantki.

Publikacje dotyczą weryfikacji *in vitro* bezpośredniego wpływu pięciu wybranych związków bromofenolowych na strukturę i funkcję krwinek czerwonych człowieka. Cztery prace, których łączny IF wynosi 13,441 i 125 pkt MNiSW, opublikowane zostały w indeksowanych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports.

Badania finansowane były w latach 2016-2018 z dotacji celowej dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich, zgodnie z kodami projektów : B16 11000001167.02 , B17 11000001518.02 , B18 11000001800.02 .

Dobór tematu rozprawy uważam za właściwy, bardzo trafny i oczekiwany zarówno przez innowacyjny przemysł, jak i centra zdrowia publicznego.

Zgadzam się z Doktorantką, że związki uniepalniające syntetyczne materiały (Flame retardants, FRs) mają za zadanie obniżyć ryzyko wystąpienia pożaru, a także wydłużyć czas na bezpieczną ewakuację ludzi i zwierząt z miejsca pożaru. Bromowane związki ograniczające palność (BFRs) w liczbie ponad 80 różnych substancji, stanowią około 25% wszystkich FRs.

Pierwsza praca pogładowa: *Moniki Jarosiewicz i Bożeny Bukowskiej*;
„ *Tetrabromobisfenol A – toksyczność, narażenie środowiskowe i zawodowe*”; *Medycyna Pracy* 2017, 68, 121-134, stanowi doskonałe kompendium odnośnie środowiskowego i zawodowego narażenia na tetrabromobisfenol A (TBBPA). Powszechne zastosowanie TBBPA

spowodowało skażenie gleby, wody i powietrza narażając ludzi i zwierzęta na ekspozycję tym związkiem. Właściwości hydrofobowe TBBPA sprzyjają jego bioakumulacji w tkankach ludzi (szczególnie w tkance tłuszczowej, erytrocytach, osoczu i mleku matki), a także w organizmach ryb i owoców morza. Dlatego tak pilną sprawą jest poznanie mechanizmów toksycznego wpływu tej substancji i jej pochodnych na organizmy ssaków.

Druga publikacja oryginalna: *Moniki Jarosiewicz, Piotra Duchnowicza, Anny Włuka i Bożeny Bukowskiej; „Evaluation of the effect of brominated flame retardants on hemoglobin oxidation and hemolysis in human erythrocytes”;* *Food and Chemical Toxicology 2017, 109, 264-271* przybliży nam mechanizm *in vitro* toksycznego oddziaływania na komórki człowieka.

Erytrocyty (RBC) stanowią doskonały model komórek bezjądrzastych do badania wpływu ksenobiotyków na funkcję hemoglobiny transportującej tlen, równowagę pro-/antyoksydacyjną, a także oporność i stabilność błony krwinek oraz związanej z nią apoptotycznej śmierci tych komórek, zwanej eryptozą.

Porównano potencjał hemolityczny i oksydacyjny dwóch tetrabromobisfenoli A i S (TBBPA i TBBPS) oraz trzech bromofenoli: 2,4-dibromofenolu (2,4-DBP), 2,4,6-tribromofenolu (2,4,6-TBP) i pentabromofenolu (PBP), uwzględniając narastające stężenie związku, jak i wydłużenie czasu inkubacji komórek ze związkiem (24, 48 i 72 godziny). Pozwoliło to Doktorantce na ustalenie zarówno bezpiecznego i najdłuższego czasu inkubacji krwinek czerwonych (48 godzin) oraz przedhemolitycznego stężenia badanych pięciu związków.

Uzyskane w powyższych badaniach wyniki pozwoliły Doktorantce na wyciągnięcie następującego **WNIOSKU cząstkowego**:

- „ Bromofenole powodują wzrost stopnia hemolizy i stężenia methemoglobiny w erytrocytach człowieka; potencjał hemolityczny i oksydacyjny zależy zarówno od liczby pierścieni aromatycznych, jak i liczby bromu w cząsteczce”.

W trzeciej pracy oryginalnej : *Moniki Jarosiewicz, Jaromira Michałowicza i Bożeny Bukowskiej; „In vitro assessment of eryptotic potential of tetrabromobisphenol A and other bromophenolic flame retardants”;* *Chemosphere 2019, 215, 404-412* oceniając eryptozę stosowano ustalone uprzednio optymalny czas inkubacji erytrocytów i przedhemolityczne stężenia TBBPA, TBBPS, 2,4-DBP, 2,4,6-TBP, PBP.

Do oceny eryptozy Doktorantka wykorzystwała nowoczesną i wiarygodną technikę cytometrii przepływowej, stosując swoiste sondy fluorescencyjne:

- stężenie reaktywnych form tlenu (RFT) określono stosując sondę fluorescencyjną diocetanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH2-DA);

- eksternalizację fosfatydyloseryny oceniono przy użyciu aneksyny V, wyznakowanej izotiocyanianem fluoresceiny;

- stężenie wapnia wewnątrzkomórkowego oznaczono za pomocą znacznika fluorescencyjnego Fluo3 AM;

- aktywność kaspazy-3 badano przy użyciu specyficznego substratu DEVD-FMK, sprzężonego z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC);

-aktywności kalpain badano przy użyciu specyficznego substratu t-butoksykarbonylo-Leu-Met, sprzężonego z 7-amino-4-chlorometylkumaryną (CMAC).

Zgadzam się z hipotezą Doktorantki, że badane przez nią *in vitro* cytotoksyczne substancje (TBBPA, TBBPS, 2,4-DBP, 2,4,6-TBP, PBP) „przyczyniają się do wejścia komórki na drogę eryptozy na skutek indukcji przez nie stresu oksydacyjnego. W odpowiedzi na stres oksydacyjny prokaspaza-3 jest hydrolizowana do formy aktywnej. Następnie kaspaza-3 hamuje aktywność translokazy aminofosfolipidowej, odpowiedzialnej za transport fosfatydyloseryny do wewnętrznej monowarstwy błony. W konsekwencji na powierzchni błony erytrocytarnej eksponowana jest fosfatydyloseryna, co powoduje rozpoznanie komórki przez makrofagi i ich fagocytozę”

Uzyskane w powyższych badaniach wyniki pozwoliły Doktorantce na wyciągnięcie następujących **WNIOSKÓW cząstkowych**:

- „ **Bromowane uniepalacze 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)**”.

Doświadczalną weryfikację powyższej hipotezy, że badane cytotoksyczne substancje zaburzają równowagę pro-/antyoksydacyjną i poprzez wzrost stężenia RFT następuje aktywacja kaspazy 3 i apoptotyczna śmierć krwinki czerwonej, przeprowadzono w czwartej publikacji oryginalnej: *Moniki Jarosiewicz, Anity Krokosz, Agnieszki Marczak i Bożeny Bukowskiej; „Changes in the activities of antioxidant enzymes and reduced glutathione level in human erythrocytes exposed to selected brominated flame retardants; Chemosphere 2019, 227, 93-99.*

W celu określenia aktywności enzymatycznej posłużono się uznanymi metodami spektrofotometrycznymi:

- aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oznaczono metodą Misra i Fridovich;

- aktywność peroksydazy glutationowej (GSH-Px) oznaczono metodą Rice-Evans i wsp.;

- aktywność katalazową hemolizatu (CAT), jako sumę aktywności katalazy i aktywności katalazowej hemoglobiny, oznaczono metodą Aebi;

- stężenie glutationu zredukowanego (GSH) oznaczono metodą Ellman'a.

Uzyskane w powyższych badaniach wyniki pozwoliły Doktorantce na wyciągnięcie następującego **WNIOSKU cząstkowego**:

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

Powyższe trzy prace oryginalne, w których Doktorantka jest pierwszym autorem pozwoliły Jej na przedstawienie czterech wniosków cząstkowych oraz w pełni upoważniły Ją do wysunięcia **WNIOSKU GENERALNEGO ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**, o dużym znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym:

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

Przedstawione lapidarnie i interesująco omówienie czterech prac wchodzących w zakres rozprawy doktorskiej, ubogacone dobrą znajomością 33 pozycji literatury uzupełniającej, świadczy o imponującej wiedzy Doktorantki.

Udokumentowany dorobek naukowy Doktorantki obejmujący:

- 6 prac oryginalnych i 2 prace przeglądowe o sumarycznym IF 26,924 oraz 245 pkt. MNiSW;
- 6 rozdziałów w monografiach pokonferencyjnych;
- 30 doniesień zjazdowych;
- kierowanie projektem badawczym o kodzie 2017/27/N/NZ7/00548, finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki,
budzą podziw i uznanie recenzenta.

Na podkreślenie, zdaniem recenzenta, zasługują uzyskane przez Doktorantkę wyróżnienie przyznane JM Rektora UŁ, wyróżnienie za działalność doktorancką, nagroda za najlepszy poster w Karpaczu, udział w konferencji Biofizycznej w Baltimore, a także przewodniczenie komitetowi organizacyjnemu Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów.

Ambitny cel pracy został przez Doktorantkę zrealizowany. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że oceniana przeze mnie praca spełnia wszystkie wymagania stawiane ustawowo rozprawom doktorskim, nawet znacznie je przewyższając, a uzyskane wyniki oryginalnych badań, ze względów poznawczych jak i aplikacyjnych w technologii przemysłowej oraz decyzje medycyny pracy i centrum zdrowia publicznego, stanowią sukces naukowy zarówno Doktorantki jak i Pani Promotor.

Dlatego zwracam się do Szanownego Pana Dziekana prof. dr hab. Andrzeja Kruka i Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Moniki JAROSIEWICZ, ze Stacjonarnych Studiów Doktoranckich Genetyki Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej, do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie ocenianej rozprawy.

Z wyrazami szacunku



Prof. dr hab. nauk med. LECH TORLIŃSKI
42061101515 – em. profesor zwyczajny
Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
(Katedra Chemii i Biochemii Klinicznej,
ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań)
adres prywatny: ul. Olchowa 4m2, 61-475 Poznań,
kom. 605 306 443, E-mail: lechtor1942@gmail.com