



Ocena pracy doktorskiej

**pt. „Ocena właściwości prooksydacyjnych, genotoksycznych i
proapoptotycznych wybranych uniepalniaczy bromofenolowych
w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka”**

przygotowanej przez p. mgr Annę Barańską

pod kierunkiem p. prof. dr hab. Jaromira Michałowicza

w Katedrze Biofizyki Skazań Środowiska Instytutu Biofizyki Uniwersytetu Łódzkiego

Wiele syntetycznych związków organicznych zaprojektowanych w celu poprawy jakości i bezpieczeństwa życia człowieka może mieć negatywny wpływ na różne elementy biosfery i może stanowić zagrożenie dla zdrowia ludzi. Związki bromofenolowe są stosowane w różnych gałęziach przemysłu i wykorzystywane m.in. do produkcji barwników, środków ochrony roślin, związków przeciwgrzybiczych i wielu produktów życia codziennego. Powszechne stosowanie związków bromofenolowych spowodowało wzrost ich obecności w glebie, wodzie i powietrzu, a także w organizmach żywych. Związki bromofenolowe, stosowane w celu ograniczenia palności materiałów syntetycznych, znajdują się w wielu produktach obecnych w życiu codziennym człowieka, w tym w tekstyliach, obiciach mebli, samochodach, kablach, obudowach urządzeń elektronicznych itp. i mogą być z nich stopniowo uwalniane. Związki bromofenolowe zostały wykryte w kurzu pomieszczeń użytkowych, wodzie pitnej i produktach spożywczych, szczególnie pochodzenia

zwierzęcego. Związki bromofenolowe mogą wnikać do organizmu człowieka przez skórę, układ pokarmowy i oddechowy a ich obecność wykryto w wielu narządach człowieka m.in. w nerkach, płucach i tkance tłuszczowej. W pracy doktorskiej, wykonanej w Katedrze Biofizyki Skażeń Środowiska pod kierunkiem p. prof. dr hab. Jaromira Michałowicza, p. mgr Anna Barańska podjęła próbę zbadania wpływu wybranych uniepalniaczy bromofenolowych na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka. Doktorantka wzięła pod uwagę cztery związki z tej grupy, w tym tetrabromobisfenol A (TBBPA), tetrabromobisfenol S (TBBPS), 2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TBP) oraz pentabromofenol (PBP).

Recenzowana praca ma typowy układ dysertacji doktorskiej przygotowanej w oparciu o opublikowane prace oryginalne. W skład pracy doktorskiej wchodzi cztery publikacje oryginalne oraz jedna przeglądowa poprzedzone streszczeniami w języku polskim i angielskim, rozdziałem zawierającym wprowadzenie, cel pracy, materiał badawczy i metody, omówienie wyników i wnioski. W rozprawie znajduje się wykaz cytowanych pozycji, ale brakuje wykazu zastosowanych skrótów.

Ocena wprowadzenia i zasadności celu pracy

We wprowadzeniu p. mgr Anna Barańska krótko omawia zastosowanie związków bromofenolowych w przemyśle, w szczególności ich wykorzystanie w celu ograniczenia palności związków syntetycznych, a także wymienia niektóre badania, w których wykazano obecność tych substancji w bezpośrednim środowisku i organizmie człowieka. Wiele miejsca poświęca najszerzej stosowanemu i najlepiej przebadanemu TBBPA, który został uznany za związek szkodliwy i jest stopniowo zastępowany przez TBBPS. Wprowadzenie jest przygotowane w sposób kompetentny uzasadniający celowość podjętych badań.

Ocena metodyki badań oraz wartości merytorycznej uzyskanych wyników

W pracach oryginalnych stanowiących podstawę dysertacji przeprowadzono ocenę wpływu genotoksycznego, prooksydacyjnego i proapoptotycznego wybranych uniepalniaczy bromofenolowych na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka, które zostały wyizolowane z kożuszka leukocyтарно-пłytkowego z krwi zdrowych dawców. W przeprowadzonych badaniach zastosowano szereg metod

biologii komórkowej i molekularnej z użyciem m.in. cytometrii przepływowej, luminometrii, spektrofotometrii, mikroskopii fluorescencyjnej i elektroforezy. Metody zostały dobrane prawidłowo i opisane w publikacjach wyczerpująco.

Rozdział „Omówienie wyników” obszernie przedstawia wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę i opublikowanych w czterech pracach oryginalnych. Każda publikacja jest krótko podsumowana. Praca opublikowana w czasopiśmie *Chemosphere* przedstawia wpływ wybranych uniepalniaczy bromofenolowych na przeżywalność jednojądrzastych komórek krwi obwodowej. Największe zmiany odnotowano w wyniku działania TBBPA, przy czym spadkowi przeżywalności komórek towarzyszyło obniżenie poziomu ATP w komórkach, wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (RFT), peroksydacja lipidów oraz oksydacyjne uszkodzenia białek. W pracy opublikowanej w czasopiśmie *Frontiers in Immunology* wykazano, że po inkubacji komórek z uniepalniaczami bromofenolowymi, w szczególności TBBPA, generowane są jednoniciowe pęknięcia DNA, w mniejszym stopniu dwuniciowe, uszkodzenia zasad azotowych, głównie puryn, przy czym są to raczej efekty wtórne działania RFT. W kolejnych dwóch pracach opublikowanych w czasopiśmie *Molecules* przedstawiono, posługując się różnymi metodami, działanie proapoptotyczne badanych związków. We wszystkich opublikowanych pracach wykazano, że badane związki bromofenolowe mają różny potencjał cytotoksyczny wynikający z indukcji szeregu zmian na poziomie molekularnym w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka, przy czym największe zmiany indukowane są przez TBBPA i PBP, natomiast najmniej aktywny jest TBBPS. Oznacza to, że wyniki przeprowadzonych badań w pełni potwierdzają zasadność zastępowania w produktach przemysłowych tetrabromobisfenolu A (TBBPA) tetrabromobisfenolem S (TBBPS).

Nie mam wątpliwości, że wyniki badań mają wartość merytoryczną i pozwalają na wyciągnięcie przedstawionych w rozprawie wniosków, aczkolwiek w niektórych fragmentach pracy dostrzegam drobne niedoskonałości. W opisie wyników przedstawionych w pracy oryginalnej opublikowanej w *Chemosphere* stwierdzenie, że wykazano związek pomiędzy zmniejszeniem się puli ATP w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka a spadkiem ich żywotności ma raczej charakter spekulacji, gdyż taki związek nie został udowodniony w pracy, a opisane zjawiska można traktować na podstawie uzyskanych wyników tylko jako współistniejące.

Dlatego należałoby raczej użyć sformułowania „prawdopodobnie ma swój udział”. W opisie wyników przedstawionych w pracy opublikowanej w *Frontiers in Immunology* użyto sformułowania „Wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (obserwowany w niniejszej pracy) oraz form reaktywnych cząsteczek przyczynia się do uszkodzania struktury DNA przez ksenobiotyki”. Czym są „formy reaktywnych cząsteczek”? Ponadto, w zdaniu tym niewłaściwie opisano związek przyczynowo skutkowy. Czy nie powinno być, że ksenobiotyki (uniepalniacze bromofenolowe) generują RFT, które wywołują uszkodzenia DNA? Kolejnym przykładem nieprecyzyjnych sformułowań może być „TBBPA w niższym stężeniu (0,1 µg/ml) spowodował niewielki wzrost poziomu utlenionych pirymidyn, natomiast wszystkie badane związki spowodowały istotne zmiany w badanym parametrze wyłącznie w najwyższym stężeniu 1 µg/ml.” Zastrzeżenia może budzić sformułowanie „niższym”, gdyż nie ma punktu odniesienia. Analizując wyniki przedstawione na rycinie 3 w w/w publikacji, do których odnosi się Doktorantka, napisałabym raczej: „TBBPA już w stężeniu 0,1 µg/ml wywołuje statystycznie znamienne wzrost poziomu utlenionych pirymidyn, natomiast w przypadku pozostałych związków do uzyskania zmian istotnych statystycznie konieczne było zastosowanie stężenia 1 µg/ml.” We wniosku 1 napisano „większe zmiany”, ale ponownie brak punktu odniesienia; zdanie powinno być uzupełnione „niż w ...”. Niektóre sformułowania nie są właściwe np., „rozszczipienie PARP1” powinno być zastąpione „cięciem PARP1”; toksyczność w odniesieniu do komórek to cytotoksyczność, gdyż słowo toksyczność jest stosowane w odniesieniu do badań przeprowadzanych *in vivo*. Jodek propidyny wiąże się z DNA komórki, do których wnika przez uszkodzoną błonę komórkową, a zatem nie tylko komórek nekrotycznych (jak napisano w rozprawie doktorskiej), ale również komórek późno-apoptotycznych. Czy przymiotnik androstanowe można stosować w odniesieniu do receptorów? Czy geny mogą być steroidogenne?

W skład rozprawy doktorskiej wchodzi również obszerny artykuł przeglądowy na temat bromofenoli, ich szerokiego wykorzystania w przemyśle, powszechnego występowania w biosferze i wynikających z tego niekorzystnych konsekwencji dla żywych organizmów. Współautorstwo artykułu przeglądowego, ale także piśmiennictwo zastosowane w ramach pracy doktorskiej świadczą o dobrej znajomości tematyki badań.

Ocena strony redakcyjnej pracy doktorskiej

Konstrukcja rozprawy jest poprawna poza brakiem wykazu skrótów. W warstwie edytorskiej brakuje bardzo wielu odstępów między wyrazami (prawie 20), natomiast odstęp został wprowadzony w wyrazie adduktów (ad duktów).

Ocena dorobku naukowego

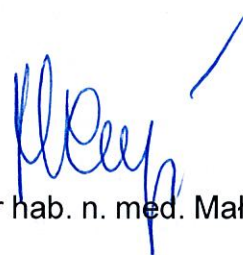
Liczba prac oryginalnych opublikowanych w ramach doktoratu jest zdecydowanie ponadprzeciętna dla dyscypliny. Wyniki składające się na rozprawę opublikowano w czterech pracach oryginalnych o łącznym współczynniku wpływu (IF) 25,726 i punktach MEiN 560. Na podkreślenie zasługuje fakt, że we wszystkich pracach oryginalnych Doktorantka jest pierwszym autorem, co oznacza Jej istotny wkład w powstanie opublikowanych wyników. Swój udział w przygotowaniu publikacji oryginalnych Doktorantka oceniła na 60%-65%. Potwierdzają to również oświadczenia pozostałych współautorów publikacji, które zostały zamieszczone w dysertacji. Należy jednak zauważyć, że dwie prace oryginalne opublikowane w *Molecules (MDPI)* są identyczne pod względem koncepcyjnym i metodycznym, przy czym w jednej z nich porównano zdolność TBBA i TBBS do indukcji apoptozy, natomiast w drugiej takie porównanie przeprowadzono dla dwóch innych związków bromofenolowych, 2,4,6-TBP i PBP. Umieszczenie wyników w jednej pracy pozwoliłoby na lepszą analizę porównawczą, ale rozumiem, że w świetle obecnie obowiązujących mechanizmów ewaluacji taka forma prezentacji wyników była bardziej atrakcyjna. W skład rozprawy wchodzi również praca przeglądowa opublikowana w prestiżowym dla dyscypliny czasopiśmie *Science of the Total Environment* (IF = 10,754; punkty MEiN = 200).

Wnioski końcowe recenzji

W podsumowaniu stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska p. mgr Anny Barańskiej, przygotowana pod kierunkiem p. prof. dr hab. Jaromira Michałowicza, dotyczy interesujących i aktualnych zagadnień związanych z wpływem antropogenicznych zanieczyszczeń środowiska na organizm ludzki i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Uzyskane wyniki zostały zinterpretowane w oparciu o obserwacje własne, doświadczenia Zespołu oraz doniesienia literaturowe. Wątpliwości wyrażone w recenzji powinny zostać rozstrzygnięte w czasie obrony pracy doktorskiej.

W związku z powyższym pozytywnie oceniam rozprawę doktorską p. mgr Anny Barańskiej. Uważam, że rozprawa spełnia wymogi formalne określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z tym, wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Biologiczne wnioski o przyjęcie rozprawy doktorskiej p. mgr Anny Barańskiej i kontynuowanie postępowania o nadanie Jej stopnia doktora.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę tematykę badań, walory poznawcze pracy, szerokie potraktowanie problemu naukowego, a także dorobek publikacyjny Doktorantki składam wnioski do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Biologiczne o wyróżnienie pracy doktorskiej p. mgr Anny Barańskiej.



/Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Czyż/

Łódź, 20 marca 2023 r