



Warszawa, 24.06.2022 r.

OCENA

Pracy doktorskiej mgr Mariki Turek

pt. "Wykorzystanie bioluminescencyjnych bakterii *A. fischeri* w badaniach ekotoksyczności ksenobiotyków jonowych i niejonowych"

Wraz z rosnącą świadomością dotyczącą zagrożeń środowiskowych, wzrasta nacisk na prowadzenie oceny ekotoksyczności nowych grup substancji chemicznych. Początkowo ocena ta obejmowała jedynie środki ochrony roślin oraz metale i trwałe zanieczyszczenia organiczne. Dyrektywa REACH wprowadziła konieczność wykonywania badań ekotoksykologicznych dla wszystkich substancji produkowanych w Unii Europejskiej i wprowadzanych na jej rynek w ilościach powyżej jednej tony, zaś Europejska Agencja ds. Leków wymaga dostarczenia badań ekotoksykologicznych wszystkich noworejestrowanych leków.

W ekotoksykologii stosowane są dwa rodzaje biotestów. Pierwszy na organizmach kluczowych dla ekosystemów np. glonach, rozwielitkach, wybranych rybach, organizmach bentosowych, dżdżownicach i pszczołach. Badania z ich użyciem, zalecane w standardach OECD do badań substancji chemicznych, wymagają często pogłębionej wiedzy biologicznej, są trudne do wykonania, zaś interpretacja wyników jest często niejednoznaczna. Druga grupa biotestów – na organizmach modelowych, łatwo dostępnych, o krótkim czasie inkubacji, daje wyniki powtarzalne, łatwe do przedstawienia i interpretacji matematycznej/statystycznej. **Doktorantka swoje badania biologiczne prowadziła z użyciem systemu Microtox® wykorzystującego bakterie luminescencyjne *Allivibrio fischeri* przeznaczonego do szybkiej oceny toksyczności, zwłaszcza w stacjach wodociągowych, oczyszczalniach ścieków, a także skringu ekotoksyczności.** System ten i jego „klony” jest stosowany obecnie w tysiącach laboratoriów na całym świecie. Dzięki zastosowaniu standaryzowanych przez producenta, lekko zmodyfikowanych szczepów bakterii o zwiększonej przepuszczalności błon komórkowych, odpowiedź organizmów jest szybka,

powtarzalna i porównywalna w różnych laboratoriach. **Stosując ten system, należy pamiętać o jego ograniczeniach.** Bakterie są organizmami prokariotycznymi, nie będą reagowały na substancje oddziałujące na receptory, fizjologię organizmów eukariotycznych. Stąd wysoka korelacja wyników testów na *A. fischeri* z wynikami testów na organizmach wyższych dotyczy przede wszystkim grup substancji o podstawowych mechanizmach działania na komórki np. oddziaływaniu na błony lub podstawowe, uniwersalne dla wszystkich żywych organizmów składniki komórek. Dodatkowo, jest to test oceny toksyczności ostrej i nie jest wskazany do oceny substancji bakteriostatycznych, np. większości antybiotyków. Po trzecie, płynem do rozcieńczeń w teście Microtox® jest 2% roztwór NaCl, oddziałujący często na badane substancje np. kompleksujący jony metali. Niestety, o tych ograniczeniach Doktorantka nie wspomniała ani w części literaturowej, ani przy omawianiu wyników badań własnych.

Rozprawa doktorska Pani Mariki Turek dotyczy dwóch grup substancji biologicznie czynnych: anionowych cieczy jonowych oraz leków. Analizując pierwszą grupę związków, w części literaturowej Doktorantka omówiła doniesienia naukowe dotyczące oceny ich toksyczności w teście Microtox®. W większości prac badano całe serie pochodnych, dzięki czemu możliwe było formułowanie prawidłowości dotyczących zależności toksyczności od struktury. I temu zagadnieniu Autorka poświęciła znaczną część pracy. W wyniku przeprowadzonych badań własnych określiła toksyczność cieczy jonowych o potencjalnych właściwościach herbicydowych: halogenooctanów amoniowych, 2,2' tiodioctanów amoniowych, fenoksyoctanów i fenyltiooctanów amoniowych. Jaki zakres stężeń badanych ksenobiotyków był stosowany do wyznaczania wartości EC50, skoro np. dla związku 11 wartość EC50=87300 mg/L (Tabela 11)? Jeśli były to wartości ekstrapolowane, powinno to być zaznaczone w pracy, a wyniki te nie powinny być brane pod uwagę w analizie statystycznej. Dodatkowo, z jednej strony wielokrotnie pada stwierdzenie, że badane związki były nietoksyczne dla bakterii (str. 70, 75, 126). Z drugiej strony analizowane są różnice w toksyczności. Takie niezręczne stwierdzenia wywołują dysonans poznawczy.

Dla wszystkich związków, stosując odpowiednie programy, obliczyła 18 deskryptorów: elektronowych, termodynamicznych oraz strukturalnych, a następnie wyznaczyła równanie QSAR. Na uwagę zasługuje znaczna liczba zastosowanych deskryptorów, z których, z wykorzystaniem algorytmu kroczącego, w równaniu QSAR pozostały trzy, istotnie wpływające na toksyczność badanej grupy ksenobiotyków. Pojawia się jednak pytanie, dlaczego, mimo świadomości, że liczba użytych w analizie *in silico* związków jest niewielka (14), Autorka pracy nie zdecydowała się na włączenie do tej analizy ksenobiotyków analizowanych przez innych autorów (podobnie jak to

uczyniła dla pochodnych niejonowych)? Przeprowadzona analiza wskazuje na umiejętność posługiwania się przez Doktorantkę metodami obliczeniowymi, zaś podjęta próba wyjaśnienia istniejących zależności – na rozumienie różnicy pomiędzy korelacją, a zależnością przyczynowo-skutkową. Niestety, w wielu przypadkach badacze ograniczają się jedynie do wykazania istnienia jak najwyższej istotności statystycznej, nie próbując nawet wyjaśnić jej sensu biologicznego.

W drugiej części badań własnych Pani Marika Turek oceniła toksyczność najczęściej stosowanych w Polsce antagonistów receptora angiotensyny II. Zdecydowanymi elementami nowości zastosowanymi w pracy były: podjęcie się oceny oddziaływania na bakterie *A. fisheri* substancji pomocniczych stosowanych w formulacjach leków oraz ocena toksyczności słabo rozpuszczalnych w wodzie substancji przy użyciu opatentowanej przez zespół, którego członkiem jest Doktorantka, modyfikacji metody testu bezpośredniego kontaktu (Microtox-SPT). Pomysł zastosowania testu Microtox-SPT jest ciekawy, pojawia się jednakże wątpliwość, czy w tym przypadku toksyczność (wartość EC50) może być wyrażana w mg/L badanej substancji (Tabela 18)? Toksyczność ta może być zależna od wielu innych czynników np. stopnia rozdrobnienia substancji badanej, czasu przygotowania próbek do badań, a także rodzaju płynu do rozcieńczeń (w teście Microtox-SPT stosowany jest 3,5% roztwór NaCl, w przeciwieństwie do 2% wykorzystywanego w teście Microtox®). Dodatkowo, wiele czynników fizycznych może wpływać na luminescencję próbki, np. obecność/trwałość zawiesiny, sorbcja bakterii na cząstkach stałych lub dodatkowe źródła energii (np. laktoza). Podobne wątpliwości pojawiają się przy ocenie wyników „ekotoksyczności” mas tabletkowych, zwłaszcza w stężeniach rzędu gramów na litr. Wiele z substancji wymienionych w Tabelach 16 oraz 21 tworzy w wodzie roztwory koloidalne, rozpraszające/pochłaniające światło i blokujące np. wymianę gazową (dostęp tlenu) do komórek bakterii. W tak wysokich stężeniach mogą także wpływać na ciśnienie osmotyczne roztworów. Czy było to brane pod uwagę? Część wyników zamieszczonych w Tabeli 21 wskazuje na to, że substancje albo były badane w olbrzymich stężeniach (skrobia, krospowidon: 4-7%), albo wyniki były ekstrapolowane. Dlatego uważam, że do wyników „ekotoksyczności” samych substancji pomocniczych, a także formulacji lekowych należy podejść z ostrożnością. Stwierdzenie na stronie 94: „...substancje pomocnicze nie są inertnymi substancjami i mogą wchodzić w różnorakie interakcje z API...” uważam za błędne. Prawidłowo skonstruowana formuła ma za zadanie m.in. ochronić API przed hydrolizą, izomeryzacją, polimeryzacją i fotodegradacją. Ani producenci, ani instytucje dopuszczające leki do obrotu nie zgodzą się na wprowadzenie na rynek leków, których skład nie jest stabilny i w których mogą zachodzić interakcje fizykochemiczne pomiędzy składnikami.

Najszerzym elementem rozprawy doktorskiej była ocena zależności zachodzących pomiędzy elementami mieszanin. Doktorantka zastosowała dwa modele, powszechnie stosowane w tego typu analizach: CA (Concentration Addition) oraz IA (Independent Action). Ponownie, niezależnie od jakości użytych danych wejściowych (toksyczności), mam duże uznanie dla umiejętności analizy danych. Poza podejściem czysto matematycznym Autorka pracy starała się analizować wyniki także pod względem interakcji fizykochemicznych (zmiany pH środowiska, zmian hydrofobowości związków). Analizy te stanowią jednak w dużej mierze spekulacje i nie są podparte przekonującymi dowodami. Być może lepszym podejściem byłaby ocena mniejszej liczby substancji, ale za to w różnych proporcjach. Interesującym np. wątkiem byłaby poszerzona ekotoksykologiczna analiza interakcji pomiędzy antagonistami receptora angiotensyny II i hydrochlorotiazidem.

Czy różne podejście modeli IA oraz CA w stosunku do istnienia wartości progowej toksyczności było brane pod uwagę? Czy w ocenie toksyczności substancji silnie alkalicznych (meglumina, węglan magnezu) modyfikowano pH medium? Jeśli nie, to w tych przypadkach nie powinno się mówić o toksyczności substancji (str. 113), lecz o niekorzystnych warunkach środowiskowych.

Swoje badania Doktorantka wykonała w Instytucie Chemii Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego im. Jana Długosza w Częstochowie, pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Bałczewskiego oraz dr Ewy Różyckiej-Sokołowskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa stanowi dysertację liczącą 188 stron, podzieloną na trzy części: literaturową, badania własne i część eksperymentalną, w której zamieszczono szczegółowe wyniki nieopublikowanych wcześniej analiz. Z uwagi na bardzo dużą liczbę danych doświadczalnych, w wielu miejscach Doktorantka odnosiła się do opublikowanych wcześniej prac eksperymentalnych zespołu badawczego, których lista została przedstawiona na końcu rozprawy. Taki układ nie pozwala jednakże na określenie indywidualnego wkładu Doktorantki w opublikowane prace. Można przypuszczać, że pełniła w nich istotną rolę, na co wskazuje fakt, iż w tych pracach była pierwszym autorem. Podobna uwaga dotyczy części eksperymentalnej, w której zamieszczono szczegółowe wyniki analiz, zarówno biologicznych, jak i fizykochemicznych, wykonanych wieloma, różnymi technikami badawczymi. Z treści rozprawy wynika, że jej Autorka wykonała wszystkie te analizy samodzielnie, jednakże powinno to być jaśniej wyartykułowane. Na podkreślenie zasługuje obszerna bibliografia obejmująca 300 pozycji, w większości oryginalnych, aktualnych publikacji naukowych.

Cel pracy został poprawnie sformułowany i koresponduje z dalszymi częściami rozprawy. W rozdziale „Wnioski” Autorka zebrała uzyskane wyniki w ramy uogólnionych stwierdzeń, które stanowią odpowiedź na pytania postawione w rozdziale „Cel pracy”.

Drobne uwagi:

Ryc. zamiast Rys. Rycina (Ryc.) jest pojęciem szerszym i obejmuje wszystkie rodzaje grafik zamieszczonych w pracy: schematów, fotografii, chromatogramów i wykresów;

Str. 19. Tytuł podrozdziału części literaturowej: „ksenobiotyki niejonowe: farmaceutyki” jest niezręczny. Znaczną część substancji czynnych leków stanowią związki, które mają charakter jonowy, a często amfoteryczny;

Str. 26. Czy przy pomiarze luminescencji powinno się stosować pojęcie absorbancja?

Str.35. Producenci (w sensie systematyki organizmów) nie są podzieleni na rzędy;

Str. 38. Nie wskazano na korelację testu Microtox® z toksycznością leków dla organizmów wyższych;

Str. 42. Czy zasadne jest wyrażanie EC50 mieszanin w mg/L?

Str. 68. Glifosat także jest herbicydem;

Str. 73. Pentachlorofenol → I kategoria toksyczności;

Str 75. Liczby atomów chloru, a nie ilości;

Str 79. Powinno być: Tabela 14;

Str. 107. Eksperymentalna toksyczność mieszaniny (EC50=56,97 mg/L) jest mniejsza od przewidywanej toksyczności?

Str.140. Powinno być: kryształy LOS-H przemyto wodą...

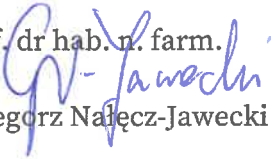
Str. 145. Czy, w przypadku stosowania dodatków rozpuszczalników (4% MeOH), stosowano odpowiednią kontrolę rozpuszczalnika?

Powyższe uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej. Za najważniejsze osiągnięcia uważam:

- Zaobserwowanie występowania interakcji ekotoksykologicznych pomiędzy antagonistami receptora angiotensyny II i hydrochlorotiazylem;
- Wyprowadzenie modelu QSAR dla badanych cieczy jonowych;
- Wskazanie deskryptorów fizykochemicznych mających największy wpływ na działanie biologiczne analizowanych substancji wobec bakterii luminescencyjnych *A. fischeri*.

Podsumowując, wyrażam przekonanie, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr Mariki Turek pt.: „Wykorzystanie bioluminescencyjnych bakterii *A. fisheri* w badaniach ekotoksyczności ksenobiotyków jonowych i niejonowych” spełnia wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora zgodnie z artykułem 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.) oraz przepisami zmieniającymi ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz. 1668)

Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie ds. Nadawania Stopni Naukowych i Stopni w Zakresie Sztuki Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego im. Jana Długosza w Częstochowie wniosek o dopuszczenie mgr Mariki Turek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. n. farm.

Grzegorz Nałęcz-Jawecki