



Dr hab. Hanna Pruchnik, prof. UPWr

Wrocław, 29.03.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Barańskiej
pt. „Ocena właściwości prooksydacyjnych, genotoksycznych i proapoptotycznych
wybranych uniepalniaczy bromofenolowych w jednojądrzastych komórkach krwi
obwodowej człowieka”**

Praca doktorska mgr Anny Barańskiej została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jaromira Michałowicza w Katedrze Biofizyki Skażeń Środowiska Instytutu Biofizyki na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Celem niniejszej rozprawy było porównanie wpływu czterech uniepalniaczy bromofenolowych, tj.: tetrabromobisfenolu A, tetrabromobisfenolu S, 2,4,6-tribromofenolu oraz pentabromofenolu na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka. Badania miały na celu określenie właściwości prooksydacyjnych, genotoksycznych oraz proapoptotycznych ww. związków w badanym modelu komórkowym.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi cykl pięciu publikacji z listy JCR wraz z 34 stronicowym opracowaniem. Dysertacja jest spójna i tworzy dobrze udokumentowaną logiczną całość (łącznie 123 strony). Została napisana w sposób przejrzysty i zwięzły. Pierwsza część rozprawy, omawiająca cykl publikacyjny, rozpoczyna się od spisu artykułów wchodzących w zakres dysertacji, zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, cel badań, spis materiałów i metod oraz syntetyczny opis uzyskanych wyników zakończony schematem przedstawiającym proponowany mechanizm działania bromoorganicznych uniepalniaczy w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. Wprowadzenie kończą wnioski i spis aktualnej, cytowanej literatury składający się z 40 pozycji. Następnie przedstawiony został dorobek naukowy Doktorantki. W kolejnej części znajdziemy kopie artykułów, a w ostatniej podpisane oświadczenia wszystkich współautorów publikacji.



Podstawą rozprawy są cztery prace oryginalne oraz jedna przeglądowa o sumarycznym współczynniku oddziaływania $IF=36,479$ i sumarycznej liczbie punktów MNiE – 760:

1. Włuka A., Woźniak A., Woźniak E., Michałowicz J. (2020). *Tetrabromobisphenol A, terabromobisphenol S and other bromophenolic flame retardants cause cytotoxic effects and induce oxidative stress in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study)*. Chemosphere, 261:127705.
2. Barańska A., Woźniak A., Mokra K., Michałowicz J. (2022). *Genotoxic mechanism of action of TBBPA, TBBPS and selected bromophenols in human peripheral blood mononuclear cells*. Frontiers in Immunology, 13:869741.
3. Barańska A., Sicińska P., Michałowicz J. (2022). *Apoptosis-inducing potential of selected bromophenolic flame retardants: 2,4,6-tribromophenol and pentabromophenol in human peripheral blood mononuclear cells*. Molecules, 27:5056.
4. Barańska A., Bukowska B., Michałowicz J. (2022). *Determination of apoptotic mechanism of action of tetrabromobisphenol A and tetrabromobisphenol S in human peripheral blood mononuclear cells: A comparative study*. Molecules, 27:6052.
5. Michałowicz J., Włuka A., Bukowska B. (2021). *A review on environmental occurrence, toxic effects and transformation of man-made bromophenols*. Science of the Total Environment, 811:152289.

Artykuły opublikowano w renomowanych czasopismach. Oznacza to, że omawiana praca naukowa została już zweryfikowana i pozytywnie oceniona przez niezależnych specjalistów. Zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami wkład Doktorantki w oryginalne publikacje jest znaczący i wynosi 60% w przypadku pierwszej pracy oraz po 65% procent w kolejnych trzech. Pani mgr Anna Barańska brała udział w opracowaniu koncepcji badań oraz planowaniu eksperymentów. Wykonała wszystkie testy dotyczące apoptycznego wpływu badanych bromofenoli na jednojądrzaste komórki krwi obwodowej człowieka oraz większość analiz cytotoksycznego, oksydacyjnego i genotoksycznego wpływu związków na komórki. Zinterpretowała, opracowała statystycznie i przedyskutowała uzyskane wyniki. Napisała cztery oryginalne prace naukowe, których jest pierwszym autorem oraz wybrane rozdziały artykułu przeglądowego stanowiące 35% całości, a mianowicie: wstęp, właściwości fizykochemiczne, produkcja i zastosowanie bromofenoli, występowanie w środowisku, narażenie ludzi na te związki oraz części rozdziału dotyczącego toksyczności bromofenoli. Bez wątpienia, można stwierdzić, iż Doktorantka ma szeroką wiedzę teoretyczną w zakresie realizowanego tematu badawczego oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.



Badania podjęte przez Doktorantkę są niezmiernie ważne, dotyczą zagadnień związanych z ochroną zdrowia człowieka i organizmów żywych. Przedmiotem badań są wybrane bromoorganiczne związki, szeroko stosowane w przemyśle jako środki ograniczające palność materiałów, a także jako składniki polimerów. Ze względu na powszechne wykorzystanie tworzyw sztucznych produkcja bromowanych związków rośnie i obecnie stanowią one około 25% wszystkich antypirenów na rynku. Na podstawie dotychczasowych badań wiadomo, że związki te przenikają do środowiska naturalnego, stwierdzono ich obecność w glebie, wodzie, produktach spożywczych, jak również w organizmie człowieka oraz zwierząt. Najczęściej stosowanymi bromofenolowymi uniepalniaczami są: tetrabromobisfenol A (TBBPA), tetrabromobisfenol S (TBBPS), 2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TBP) oraz pentabromofenol (PBP). Wiedza na temat ich potencjalnie negatywnego wpływu na organizmy ludzi i zwierząt jest niewystarczająca i konieczne są dalsze testy aktywności biologicznej. W szczególności, znikoma liczba doniesień dotycząca wpływu bromoorganicznych związków na komórki krwi człowieka uzasadnia podjęcie tego typu analiz. W związku z tym, wybór tematu badawczego: *„Ocena właściwości prooksydacyjnych, genotoksycznych i proapoptotycznych wybranych uniepalniaczy bromofenolowych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka”* jest jak najbardziej słuszny. Kolejne etapy badań, mające na celu określenie mechanizmu działania TBBPA, TBBPS, 2,4,6-TBP i PBP w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka, zostały opisane i przedyskutowane w czterech ww. wymienionych publikacjach (1-4). Jak już wspomniałam, z uwagi na fakt, że wszystkie publikacje zostały szczegółowo zrecenzowane przez specjalistów z danej dyscypliny, pozostała mi rola dokonania oceny całościowej znaczenia naukowego pracy.

Celem badań opisanych w pierwszej publikacji była ocena efektów cytotoksycznych oraz zmian w poziomie stresu oksydacyjnego pod wpływem TBBPA, TBBPS, 2,4,6-TBP i PBP w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka (PBMCs), które są kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego. Wyniki wykazały, że badane związki zmniejszają żywotność PBMCs i poziom ATP oraz zwiększają tworzenie reaktywnych form tlenu (w tym rodnika hydroksylowego). Ponadto badane substancje indukowały peroksydację lipidów oraz powodowały oksydacyjne uszkodzenia białek w inkubowanych komórkach. Zauważono



również, że największe zmiany powodował TBBPA, natomiast najslabsze działanie wykazywał TBBPS, który w przemyśle jest wprowadzany jako zamiennik TBBPA.

Celem badań przedstawionych w drugiej oryginalnej pracy była określenie mechanizmu oraz ocena potencjału genotoksycznego badanych niepalniaczy bromofenolowych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. Przy użyciu metody kometowej w wersji neutralnej i mikroskopii fluorescencyjnej oznaczano poziom uszkodzeń dwuniciowych DNA, oceniono poziom naprawy DNA. Przy użyciu metody kometowej w wersji alkalicznej i mikroskopii fluorescencyjnej oznaczano uszkodzenia oksydacyjne puryn i pirymidyn w DNA. Oceniono zdolności tworzenia adduktów z DNA przy użyciu plazmidu *E. coli* (pUC 19) oraz elektroforezy. Stwierdzono, iż badane substancje, powodują uszkodzenia oksydacyjne lipidów, białek oraz zasad purynowych i pirymidynowych w DNA; nie tworzą adduktów z DNA, prawdopodobnie indukują jedno- i dwuniciowe uszkodzenia DNA w sposób pośredni.

Ostatnim zadaniem badawczym, przedstawionym w pracy trzeciej i czwartej była ocena potencjału apoptotycznego TBBPA, TBBPS, 2,4,6-TBP oraz PBP w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. Przy wykorzystaniu szeregu metod przeprowadzono: ilościową ocenę zmian apoptotycznych z zastosowaniem podwójnego barwienia oraz detekcją z wykorzystaniem cytometrii przepływowej; analizę poziomu jonów wapnia w komórce z użyciem znacznika Fluo 3-AM i cytometrii przepływowej; analizę poziomu fragmentów o masie 85 kDa powstających w wyniku rozszczepienia PARP-1 z zastosowaniem przeciwciała monoklonalnego i pomiarem techniką cytometrii przepływowej. Oceniono aktywność kaspaz 3., 8., 9. przy zastosowaniu odpowiedniego substratu peptydowego; poziom pęknięć DNA z wykorzystaniem metody TUNEL; zmiany kondensacji chromatyny z wykorzystaniem podwójnego barwienia znacznikami oraz mikroskopii fluorescencyjnej, oznaczono również poziom mitochondrialnego potencjału transbłonowego. Stwierdzono, że badane substancje, głównie TBBPA i PBP (w mniejszym stopniu 2,4,6-TBP) zwiększały liczbę komórek apoptotycznych i nekrotycznych, natomiast TBBPS zwiększał głównie liczbę komórek ulegających apoptozie.

Zakończeniem całości cyklu jest praca przeglądowa będąca jednocześnie doskonałym wprowadzeniem do problemu naukowego, którym zajmuje się Doktorantka.



Po analizie wszystkich publikacji stwierdzam, że układ artykułów jest logiczny i w pełni odpowiada postawionemu celowi pracy, a przyjęte założenia badawcze zostały zweryfikowane i wyjaśnione. Wykazano, że wybrane do badań związki wykazują zróżnicowany potencjał prooksydacyjny, cytotoksyczny i genotoksyczny w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka. Zweryfikowano hipotezę o sposobie oddziaływania badanych substancji z DNA. Określono/zaproponowano mechanizm działania bromoorganicznych uniepalniaczy w badanych komórkach. Uzyskane wyniki wskazują na zasadność zastępowania w przemyśle TBBPA przez TBBPS, jako mniej toksyczną substancję.

Podczas lektury pracy doktorskiej nasunęły mi się pewne pytania, komentarze do dyskusji:

1. Doktorantka, zgadzając się z innymi badaczami zakłada, że *„mniejsza cytotoxyczność TBBPS w porównaniu do TBBPA może wynikać z obecności grupy sulfonowej w cząsteczce tego związku, która w mniejszym stopniu niż obecność grup metylowych w cząsteczce TBBPA decyduje o toksyczności tej substancji”*. Proszę o uzasadnienie tego założenia, np. podanie wyników pokazujących mniejszą toksyczność grupy sulfonowej w porównaniu do grup metylowych dla innych niż badane związków. Może pomocne byłoby wykorzystanie symulacji komputerowych, modelowania molekularnego w celu sprawdzenie oddziaływań TBBPA-DNA/lipid lub TBBPS-DNA/lipid?
2. Jakie powinny być kolejne etapy badań uniepalniaczy bromofenolowych w celu potwierdzenia *„zagrożenia, jakie stwarzają one dla zdrowia człowieka”*?
3. W pracy przeglądowej omówione są właściwości fizykochemiczne wybranych uniepalniaczy podana jest m.in. rozpuszczalność 2,4,6-TBP oraz PBP w wodzie. Jaka jest rozpuszczalność pozostałych dwóch związków TBBPA oraz TBBPS?
4. Co jest bardzo istotne, uszkodzenia oksydacyjne lipidów, białek i DNA oraz zmiany w wewnątrzkomórkowym poziomie jonów wapnia i transbłonowym potencjale mitochondrialnym stwierdzono w badanych komórkach pod wpływem uniepalniaczy bromofenolowych w stężeniach, które oznaczane były w organizmie człowieka w warunkach narażenia środowiskowego oraz zawodowego na te substancje. Czy potrzebne dane (oznaczenia stężeń) są na podstawie publikacji opisanych w pracy przeglądowej (5),



czy może innych, nie zamieszczonych zestawień statystycznych? Czy istnieją tego typu dane dla ludzi w Polsce?

5. W jaki sposób badane związki dostają się do wnętrza komórki? Czy znany jest mechanizm transportu związków przez błonę komórkową?

Podsumowując, w mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Anny Barańskiej jest bardzo wartościowa i stanowi istotną nowość. Tematyka pracy dotyczy aktualnych, ważnych dla zdrowia ludzi i zwierząt zagadnień. Wyniki w niej zawarte wnoszą znaczący wkład w rozwój badań nad cytotoksycznym mechanizmem działania bromowanych związków uniepalniających. Należy zaznaczyć, że badania o charakterze toksykologicznym w odniesieniu do jednojądrzastych komórek krwi obwodowej człowieka nie były dotychczas przeprowadzone. W niniejszej pracy zostało wykonanych wiele eksperymentów przy użyciu odpowiednio dobranych metod analitycznych z zakresu spektrofotometrii, spektrofluorymetrii, cytofluorymetrii oraz mikroskopii fluorescencyjnej, co świadczy o tym, iż Doktorantka zna dobrze nowoczesny warsztat badawczy i posiada wiedzę z obszaru biologii, biofizyki i biochemii. Badania zawarte w dysertacji zostały właściwie zaplanowane, wykonane i opublikowane w renomowanych czasopismach. Na podkreślenie zasługuje też dorobek naukowy Pani mgr Anny Barańskiej (sumaryczny IF = 43,517; 980 pkt MEiN), na który składa się łącznie 8 publikacji, 2 rozdziały w monografiach pokonferencyjnych, 22 komunikaty konferencyjne o zasięgu krajowym i międzynarodowym oraz fakt, iż badania prowadzone w ramach tej rozprawy były finansowane nie tylko z dotacji celowej dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich (B1811000001801.02, B1911000002126.02), ale również w ramach grantu, pt. „*Porównanie potencjału apoptotycznego wybranych uniepalniaczy bromofenolowych w jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej człowieka*” (PRELUDIUM 17, B2011000001034101), którego Doktorantka była kierownikiem. Wszystko to świadczy o samodzielności i dużym zaangażowaniu w pracę naukową Doktorantki, jak również o umiejętnościach pozyskiwania funduszy na badania.



UNIwersytet
PRZYRODNICZY
WE WROCLAWIU

KATEDRA FIZYKI I BIOFIZYKI

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Anny Barańskiej jest opracowaniem naukowym stanowiącym oryginalne rozwiązanie problemu badawczego i spełnia wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). Wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Doktorantki do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, w uznaniu wartościowych, oryginalnych wyników, które zostały opublikowane w specjalistycznych czasopismach naukowych oraz w uznaniu znajomości szeregu metod badawczych w tym narzędzi biologii molekularnej, jak również dogłębnego opracowania tematu rekomenduję wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Wrocław, 29.03.2023 r

