

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pana mgr Roberta Sornata pt. „Opracowanie i walidacja alternatywnej metody badania teratogenności z wykorzystaniem *Hydra attenuata* i *Brachydanio rerio*”

Podstawą opracowania recenzji było pismo z dnia 4.05.2023 (RIE-BD.512.33.2023) wystosowane przez Przewodniczącego Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Politechniki Śląskiej, Prof. dr hab. inż. Andrzeja Rusina, w którym powierzono mi wykonanie oceny rozprawy doktorskiej mgr Roberta Sornata

1. Wstęp

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została zrealizowana w ramach programu Ministerstwa Edukacji i Nauki „Doktorat wdrożeniowy” i zrealizowana pod kierunkiem dr hab. inż. Joanny Kalki z Katedry Biotechnologii Środowiskowej Politechniki Śląskiej oraz dr Anny Daniel-Wójcik jako promotora pomocniczego z Sieć Badawcza Łukasiewicz - Instytut Przemysłu Organicznego, oddział w Pszczynie. Jest to praca z zakresu dyscypliny naukowej inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka.

2. Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Układ pracy, struktura podziału treści, kolejność rozdziałów, kompletność tez itp.

Praca liczy ponad 200 stron, przy czym część teoretyczna stanowi ok ¼ całej pracy. Pozostała część pracy zawiera treści związane z badaniami własnymi i interpretacją wyników. Układ pracy jest jak najbardziej prawidłowy, rozprawa składa się z 18 rozdziałów, przy czym część teoretyczna obejmuje 11 rozdziałów, w których autor w sposób przemyślany i uporządkowany dokonuje przeglądu literaturowego obejmującego zagadnienia związane z realizacją swojego problemu badawczego. Część eksperymentalna pracy rozpoczyna się od jasno sprecyzowanego celu, zakresu i tez pracy. Następnie Doktorant przedstawia metody badań, uzasadnia wybór wytypowanych związków, charakteryzuje organizmy wodne użyte w eksperymencie oraz czytelnie opisuje sposób postępowania w trakcie testów. Następne

rozdziały obejmują już wyniki badań, ich interpretację oraz dyskusję. Całość pracy zakończona jest podsumowaniem i wnioskami, za którymi, co uważam za dobre rozwiązanie, zawarte są pogrupowane w tabelach wyniki badań dotyczące toksyczności poszczególnych środków ochrony roślin na hydrach i embrionach. Na uwagę zasługuje również fakt, że przed wprowadzeniem, Autor umieścił wykaz skrótów i oznaczeń co również czyni pracę nie tylko bardziej przystępną czytelnikowi, ale również świadczy o uporządkowanej organizacji pracy Doktoranta.

Zasadność podjętego tematu

Postępująca chemizacja środowiska wymusza poszukiwanie coraz to nowszych, alternatywnych sposobów na badanie wpływu zanieczyszczeń na organizmy żywe, dlatego obszar toksykologii i ekotoksykologii w tym zakresie jest aktualnie w fazie intensywnego rozwoju na całym świecie. Tradycyjnym sposobem identyfikacji i oceny zagrożeń toksykologicznych związanych z substancjami chemicznymi są badania eksperymentalne prowadzone na zwierzętach, jednakże w oparciu o aktualny stan wiedzy, niemożliwym jest całkowita rezygnacja z testów na zwierzętach. Testy toksyczności reprodukcyjnej są niestety, jednymi z najbardziej wymagających i najkosztowniejszych z całej dziedziny toksykologii z uwagi na fakt, że ma to ogromne i zasadnicze znaczenie dla bezpieczeństwa człowieka. Niestety, do przeprowadzenia tego rodzaju testu wymagana jest znaczna liczba zwierząt. Wychodząc naprzeciw oczekiwaniom opinii publicznej, presji politycznej i uwarunkowaniom ekonomicznym, obserwuje się tendencję do odejścia od stosowania testów na zwierzętach przy ocenie bezpieczeństwa substancji chemicznych. Dlatego coraz większym zainteresowaniem cieszą się metody alternatywne, które mogą zapewnić takie same lub wyższe poziomy informacji ograniczając cierpienie zwierząt zachowując jednocześnie wysoką jakość i rzetelność otrzymanych wyników.

Badania Doktoranta wpisują się właśnie w tą trudną, ale jednocześnie bardzo aktualną tematykę naukową. Bardzo trafnie już na początku pracy, Doktorant powołuje się na powszechnie uznawaną zasadę „3R”: replacement, reduction, refinement czyli zastąpienie, ograniczenie i doskonalenie, która ma na celu ochronę zwierząt.

Analiza przeglądu literaturowego

W pierwszych czterech rozdziałach Doktorant wprowadza nas w tematykę badań toksykologicznych w aspekcie historycznym i opisuje postępy w rozwoju toksyczności rozwojowej. W rozdziale 5 opisuje znaczenie teratologii oraz wskazuje czynniki teratogenne (biologiczne, chemiczne i fizyczne), które występują w środowisku człowieka, podkreślając istotny fakt, że własności teratogenne ścieków czy odcieków składowiskowych nie są obecnie badane z powodów ekonomicznych oraz etycznych (konieczność ograniczania badań na zwierzętach), co tym bardziej uzasadnia konieczność poszukiwań metod alternatywnych, które mogłyby być wykorzystywane w badaniach środowiskowych i wypełnić tę brakującą lukę. W rozdziale 6 autor słusznie uwypukla stale zmieniające się i zaostrzające wytyczne OECD dążące do poprawy dobrostanu zwierząt. Wytyczne te dotyczą m.in. toksyczności ostrych:

doustnej i skórnej, badania drażnienia skóry, działania żrącego czy drażnienia oka. Zgodnie z charakterem zmian narzucanych przez OECD nie ma żadnych wątpliwości, że fundamentem tych zmian jest wspomniana wcześniej zasada 3R dążąca do ograniczenia liczby zwierząt użytych do testów bądź ich zastąpienia testami alternatywnymi, które niewątpliwie będą w przyszłości sukcesywnie zastępować klasyczne badania toksyczności. Zatem rozdział ten jest doskonałym uzasadnieniem podjętego przez Doktoranta problemu badawczego. W rozdziale 7 i 8 Autor opisuje pokrewieństwo ewolucyjne bezkręgowców i kręgowców tłumacząc zasadność zastępowania klasycznych zwierzęcych modeli badawczych modelami alternatywnymi. Jako szandarowy przykład podaje pokrewieństwo ludzi i myszy (ok 90% wspólnego genomu), a także pokrewieństwo ludzi z *Danio rerio*, gdzie liczba wspólnych genów sięga 70%. Autor podkreśla zalety modeli badawczych opartych na zwierzętach niższych i wyższość tego rodzaju badań nad technikami in vitro na komórkach czy tkankach, które nie obejmują zależności i interakcji pomiędzy komórkami, tkankami i układami narządów tak jak ma to miejsce w przypadku całego, żywego organizmu. Rozdziały 9-11 zawierają informacje literaturowe dotyczące budowy i możliwości wykorzystania w testach alternatywnych organizmów wodnych użytych w części eksperymentalnej przedstawionej pracy, mianowicie *H. attenuata* i *B. rerio*. O ile danio pręgowany jest bardzo popularnym obiektem badań toksykologicznych i nie trzeba tego nadmiernie podkreślać, o tyle Doktorant, słusznie stara się uzasadnić wykorzystanie hydr w testach alternatywnych podkreślając ich powszechność występowania, małe wymagania, reprodukcyjność, łatwość hodowli w warunkach laboratoryjnych (rozmnażanie bezpłciowe przez pączkowanie), zdolność do regeneracji oraz wrażliwość na obecność substancji toksycznych. Autor zwraca również uwagę na znaczenie komórek macierzystych organizmów użytych do badań toksykologicznych, które w trakcie rozwoju organizmu, jako komórki prekursorowe, mają zdolność różnicowania się i migracji tworząc złożone struktury tkanek i narządów, co w przypadku narażenia na ksenobiotyk może prowadzić do dysfunkcji rozwojowej tych organizmów.

Podsumowując część literaturową, stwierdzam, że, autor udowodnił, że ma wyczerpującą i aktualną wiedzę dotyczącą badanego problemu naukowego. Prawidłowo dobrano i wykorzystano literaturę z renomowanych czasopism o zasięgu krajowym i międzynarodowym, korzystano z przewodników OECD, a także popularnych na całym świecie dostępnych baz danych zarówno toksykologicznych jak i chemicznych. Mam jednak dwa drobne zastrzeżenia. Moim zdaniem, podrozdział 5.3.4 „Środki ochrony roślin” powinien być opisany bardziej szczegółowo w porównaniu do pozostałych podrozdziałów w tym rozdziale, ponieważ to właśnie te substancje były przedmiotem badań w części eksperymentalnej. Krótka charakterystyka toksykologiczna wybranych do badań herbicydów wyczerpałaby ten podrozdział w całości. Uważam również, że trochę więcej doniesień literaturowych powinno być o badaniach toksyczności rozwoju przedporodowego szczurów i królików, bo to właśnie testy na tych zwierzętach mają być zastąpione alternatywnymi testami z udziałem *H. attenuata* i *D. rerio* proponowanymi przez Doktoranta w pracy. Drobny zastrzeżeniem jest również brak rysunków i tabel, które pojawiają się dopiero w części eksperymentalnej (tam 19 rysunków i 16 tabel w opisie wyników). Wprowadzenie od czasu do czasu w tekście pisanym

tabeli czy rysunku, czyni pracę bardziej przyjazną czytelnikowi. Niemniej jednak, powyższe zastrzeżenia nie wpływają na moją wysoką ocenę części teoretycznej rozprawy.

Analiza części eksperymentalnej

Część eksperymentalną rozprawy słusznie rozpoczynają cel i tezy pracy, które są jasno i zwięźle skonstruowane. Zakres badań uwzględniający podział badanych substancji czynnych na trzy grupy (silne teratogeny, powodujące toksyczność dla okresu przedporodowego w zakresie toksyczności matczynej oraz niewywierające wpływu na rozwój przedporodowy) jest również sprecyzowany i nie budzi żadnych zastrzeżeń. W rozdziale 14 Autor opisuje szczegółowo metody badawcze, które służą do oceny zarówno toksykologicznej jak i chemicznej badanych substancji czynnych. Opisuje kolejno, w sposób klarowny, warunki hodowli obu badanych organizmów, zasady postępowania w trakcie testów, w jaki sposób przygotowano i jakimi procedurami oznaczono stężenia substancji czynnych w wodzie/DMSO. Użycie rozpuszczalnika DMSO było bardzo dobrym wyborem, ponieważ jest to stosunkowo uniwersalny rozpuszczalnik akceptowalny w minimalnym stężeniu przez organizmy żywe. Co więcej, większość środków ochrony roślin jest praktycznie nierozpuszczalna w wodzie, dlatego jak najbardziej uzasadnionym jest dodanie rozpuszczalnika umożliwiającego przygotowanie szeregu rozcieńczeń niezbędnych do realizacji postawionych w ramach rozprawy celów. Z drugiej strony, zastosowanie DMSO ma pewne ograniczenia, które związane są z jego temperaturą topnienia (18,5°C). Oznacza to, że jakiegokolwiek testy toksykologiczne na organizmach żywych z udziałem tego rozpuszczalnika muszą odbywać się w temperaturze powyżej jego temperatury topnienia, aby substancja czynna mogła równomiernie rozpuścić się w całej objętości badanego roztworu. Badania toksykologiczne zaplanowane w ramach niniejszej rozprawy były prowadzone w temperaturze powyżej temperatury topnienia DMSO, zatem sposób przygotowania roztworów nie budzi żadnych zastrzeżeń, jeżeli naturalnie każda z badanych substancji czynnych była rozpuszczalna w wodzie i/lub DMSO w ilości umożliwiającej otrzymanie zakresu stężeń charakterystycznych dla danej substancji umożliwiających wykonanie testów na organizmach.

Wybór badanych substancji czynnych był przemyślany, podzielono je na trzy grupy (wymienione powyżej) o znanym oddziaływaniu (eko)toksykologicznym, dzięki czemu można było dokonać badań porównawczych z otrzymanymi wynikami z badań własnych, co stanowiło istotę i oryginalność podjętego problemu badawczego.

Analiza wyników w przypadku hydr obejmowała wyznaczenie wartości LC_{50} oraz EC_{50} zarówno dla testu toksyczności ostrej jak i na regenerację i na ich podstawie określono wskaźnik toksyczności TI rozumiany jako stosunek toksyczności ostrej do toksyczności testu na regenerację. W ten sposób Autor określał potencjał badanego związku do wywoływania zmian w procesie rozwoju organizmu, przy czym im większy był ten wskaźnik od 1, tym potencjał do wywoływania zmian był większy. Wyniki zostały opisane szczegółowo, w sposób czytelny i umieszczone w tabelach 4-6. Kolejne rozdziały to już szczegółowa analiza wyników dotyczących testów na embrionach danio przegowanego (rys. 6 - 19 , tab. 7 - 16). Autor analizuje kolejno wpływ poszczególnych grup substancji na rozwój embrionów

uwzględniając zmiany rozwojowe (deformacje ciała, skrócenie ciała, skrzywienie kręgosłupa, zmiany w płetwach, skrzywienie ogona) oraz zmiany ogólne (obrzęk osierdzia i żółtka, bicie serca czy jego wielkość). Bardzo istotnym rozdziałem jest opis weryfikacji metody, w którym Autor opisuje na jakich założeniach oparto się przy interpretacji wyników (zostało to opisane nie tylko w przedstawionej rozprawie doktorskiej, ale również częściowo w artykule naukowym z roku 2021 pt. „Developing a screening test for toxicity studies of prenatal development with the use of *Hydra attenuata* and embryos of zebrafish” czasopisma *Toxicology Reports*, w którym Doktorant jest współautorem i jednocześnie autorem wiodącym). Pomimo dużej ilości zmiennych wziętych do badań, dyskusja wyników jest wnikliwa i krytyczna. Uniwersalny charakter opracowanej oceny punktowej pozwala na określenie stopnia oddziaływania badanych substancji na testowane organizmy wodne i podkreśla oryginalność podjętego problemu badawczego. W podsumowaniu i wnioskach, na podstawie przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników, autor krytycznie stwierdza, że badanie procesu regeneracji hydry nie jest wystarczające do dokładnej klasyfikacji substancji czynnych środków ochrony roślin, ponieważ nie pozwalają na to obserwowane wskazania współczynników, co zostało potwierdzone analizą statystyczną. Obliczona dla hydry swoistość metody i czułość okazała się zbyt niska, co ogranicza przydatność hydry jako organizmu modelowego umożliwiającego predykcję działania teratogennego. Dla porównania, embriony danio pręgowanego, z uwagi na wysoką swoistość wobec badanych substancji, mogą zostać uznane za odpowiedni model badawczy, który pozwala prawidłowo zakwalifikować związki o działaniu embriotoksycznym, fetotoksycznym i teratogennym.

Podsumowując część eksperymentalną rozprawy doktorskiej stwierdzam, że zaplanowany przez Autora zakres prac został zrealizowany, zaś wyznaczone cele pracy zostały osiągnięte. Otrzymane wyniki badań nie w pełni potwierdzają sformułowane tezy pracy, ale dostarczają bardzo istotnych informacji dotyczących zastosowania hydr w dalszych poszukiwaniach alternatywnych testów przesiewowych z udziałem tych organizmów. Choć dostępne dziś metody alternatywne nie mogą jeszcze w pełni zastąpić testów na zwierzętach, presja środowisk zajmujących się ochroną praw zwierząt, jest tak duża, że poszukiwanie narzędzi służących predykcji oddziaływania ciągle nowosyntezowanych substancji chemicznych na organizmy żywe będzie nieustannie wyzwaniem toksykologów i ekotoksykologów na całym świecie.

3. Uwagi krytyczne

Na podkreślenie zasługuje staranne przemyślenie, zaplanowanie i wykonanie doświadczenia z ilością powtórzeń zapewniających analizę statystyczną wyników.

- Strona 4 – żeby zasada 3R była bardziej czytelna, w tekście oprócz wyjaśnienia w języku polskim, powinno być wyjaśnienie w języku angielskim (replacement, reduction, refinement)
- Nie mało drobnych błędów edytorskich (strona 50: 20 – 24 oC zamiast 20 – 24°C, pH około....; strona 51: CaCL2 zamiast CaCl₂, MgSO4 zamiast MgSO₄, NaHCO3 zamiast NaHCO₃,

KCl – brak pełnej nazwy związku; strona 61: EC50 a powinno być EC₅₀, L50 a powinno być LC₅₀ itd.)

- W pracy często pojawia się skrót DMSO – nigdzie nie podano pełnej nazwy tego rozpuszczalnika
- Strona 53: Autor opisuje, że analizę chemiczną przeprowadzono zgodnie ze standardowymi procedurami operacyjnymi: SPO/C/38, SPO/C/71 itd. Moim zdaniem powinno być to bardziej sprecyzowane czym te procedury się różnią.
- Strona 54: Należy podkreślić, że Doktorant wziął pod uwagę fakt, że poszczególne substancje czynne może cechować duża niestabilność w roztworze woda/DMSO lub samej wodzie, dlatego bardzo słusznie zastosowano procedurę wymiany odpowiednich stężeń roztworów. Świadczy to o wiedzy i umiejętności analitycznego sposobu myślenia Autora, co jest niezbędne w badaniach eksperymentalnych. Jednakże w tym miejscu, po raz pierwszy pojawia się pojęcie stężenia zawiesiny, co jest dla mnie niejasne, ponieważ Autor nie wspominał dotychczas o zawiesinach, jedynie o roztworach.
- Strona 58: Nazwy substancji czynnych powinny być ujednolicone tj. albo w języku polskim albo angielskim lub też nazwa angielska/nazwa polska np. glyphosate/glifosat. Skrót 2,4-D (Tab. 1) jest powszechnie stosowany i nie jest błędem, ale powinna zostać podana również pełna nazwa, mianowicie kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (tak jak to jest zrobione w przypadku Chlormequat – CCC, Tab. 3)
- Strona 60: Dichlorofenol – nie jest stosowany jako herbicyd, ale jako prekursor do syntezy pochodnych kwasów fenoksyoctowych, m.in. kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (herbicydu - 2,4-D).
- Strona 65: MCPA, 2,4-D oraz Diuron (nie Diuronu)
- Strona 69: Najmniej toksyczny jest chlormekwat, a nie najmniej toksyczna jest CCC
- O ile tabele dotyczące wyników testów badanych substancji czynnych na embrionach (Z-37 – Z-77) są opracowane dość przejrzysto o tyle, tabele (Z-1 – Z-36) przedstawiające wyniki testów na hydrach są mało czytelne i trudne do interpretacji. Dla porównania, tabele i rysunki w części opisowej pracy eksperymentalnej są czytelne i dobrze opracowane.
- Strona 109: brak wyjaśnienia skrótu BPA
- Zabrakło mi w pracy krótkiego wyjaśnienia jaka jest przewaga biologicznych metod oceny skażenia środowiska nad tradycyjnymi metodami chemicznymi (za i przeciw obu metod)

4. Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska charakteryzuje się wysokim poziomem merytorycznym i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Problematyka pracy jest przedmiotem badań wielu ośrodków naukowych na całym świecie, ponieważ wprowadzanie testów alternatywnych ograniczających cierpienia zwierząt przy jednoczesnym ograniczeniu kosztów i prostocie wykonania są ogromnym wyzwaniem współczesnego świata. Autor wykazał, że posiada dużą wiedzę i umiejętności w tym zakresie, potrafi dobrze zaplanować eksperyment i prawidłowo zinterpretować wyniki, co świadczy o Jego dojrzałości

naukowej. Zamieszczone w recenzji drobne uwagi krytyczne nie umniejszają wysokiej ocenie pracy. Tym samym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Roberta Sornata spełnia wymagania prac doktorskich zapisanych w Ustawie z dnia 20 lipca 2018r – Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce oraz wnioskuję o dopuszczenie rozprawy do publicznej obrony.

Podpisał Piotr Rychter