



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

ZAKŁAD TOKSYKOLOGII I BROMATOLOGII

Warszawa, 3 lipca 2023 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Roberta Sornata

Zatytułowanej: „Opracowanie i walidacja alternatywnej metody badania teratogenności z wykorzystaniem *Hydra attenuata* i *Brachydanio rerio*”

Wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Joanny Kalki, jako promotor oraz dr Anny Daniel-Wójcik jako promotor pomocniczej.

Recenzja została przygotowana na zlecenie Politechniki Śląskiej w oparciu o art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.), dotyczący wymagań stawianych rozprawom doktorskim

Prace badawcze opisane w przedstawionej rozprawie zostały zrealizowane w ramach programu MEiN pt. „Doktorat wdrożeniowy”-II edycja, we współpracy z Siecią Badawczą Łukasiewicz Instytutem Przemysłu Organicznego w Pszczynie.

Badania toksyczności substancji chemicznych stanowią jeden z najważniejszych etapów wprowadzania nowych związków chemicznych do użytku. Większość nowosyntetyzowanych substancji nie jest stosowana z uwagi na występowanie efektów ubocznych i niepożądanych. Na początku swojej dysertacji Pan mgr Robert Sornat przedstawił krótko historię badań toksykologicznych na zwierzętach, określając tym mianem, zgodnie z powszechną nomenklaturą toksykologiczną, tylko ssaki. Najwięcej uwagi poświęcił rozwojowi badań wpływu czynników toksycznych na reprodukcję i rozwój przedporodowy. Jak słusznie zauważył, znaczenie tych badań wzrosło po tragedii związanej z wprowadzeniem do obrotu talidomidu.

Następnie Doktorant ukazał wybrane czynniki teratogenne w otoczeniu/środowisku człowieka, w tym czynniki biologiczne, fizyczne, a także podstawowe przykłady czynników chemicznych, od powszechnie stosowanych takich jak alkohol i nikotyna, poprzez leki przeciwpadaczkowe, talidomid, metale, po środki ochrony roślin. Przy omawianiu talidomidu powinien wspomnieć, iż teratogeny jest jedynie izomer S, a obecne stosowanie w leczeniu izomeru R ograniczone jest do osób nie planujących posiadania dzieci. Podrozdział o metalach sugeruje, że większość metali tzw. ciężkich ma działanie teratogenne, gdyż powoduje zaburzenia

w syntezie białka i indukcję wolnych rodników. **Podając przykłady należy wystrzegać się zbyt daleko idących uogólnień.** Nawiązując do badanych w pracy związków toksycznych, Doktorant najszerzej omówił działanie teratogenne środków ochrony roślin, wskazując, że działanie teratogenne i szkodliwy wpływ na zdolności rozrodcze, także u mężczyzn, wykazują różne rodzaje związków, na skutek różnych mechanizmów działania. Niestety ponownie pojawiło się uogólnienie, wskazujące na to, że szkodliwe działanie w równym stopniu dotyczy pracowników stosujących środki ochrony roślin oraz ludzi spożywających żywność zanieczyszczoną pozostałościami pestycydów.

W rozdziale 6 Pan mgr Robert Sornat przedstawił ewolucję badań na ssakach uwarunkowaną zmianami podejścia etycznego i zmianami prawnymi dotyczącymi wykorzystania ssaków w badaniach naukowych. W ciągu niecałych 50 lat od przyjęcia Światowej Deklaracji Praw Zwierząt, w myśl zasady 3R zmodyfikowano metody badań na ssakach znacznie ograniczając ich liczbę w badaniach, szczególnie toksykologicznych, poprawiono ich dobrostan, a tam gdzie to możliwe – wprowadzono metody alternatywne. Doktorant szczegółowo omówił zmiany w zaleceniach OECD dotyczących testów toksykologicznych na tej grupie zwierząt. Przytaczając przykłady metod alternatywnych napisał, iż tylko ich rozwój może przyczynić się do znaczącej redukcji liczby stosowanych zwierząt laboratoryjnych. **Opis ten posłużył Doktorantowi jako wprowadzenie do ukazania uzasadnienia zasadniczego celu pracy – konieczności opracowania metod alternatywnych do badań embriotoksyczności i teratogenności.** Wybrane zostały dwa organizmy, stułbia pospolita (*Hydra attenuata*) do oceny wczesnego rozwoju embrionalnego oraz danio pręgowane (*Brachydanio rerio*) do oceny procesu organogenezy. Wybór tych organizmów został uzasadniony poprzez ukazanie pokrewieństwa ewolucyjnego bezkręgowców i kręgowców (rozdział 7), szczegółowy opis budowy *H. attenuata*, w tym mechanizmy jej regeneracji (rozdział 9) oraz wady i zalety *B. rerio* jako modelu badawczego (rozdział 10). Prześledzenie rozwoju embrionalnego tej ryby znacznie ułatwiłyby zestaw rycin ukazujących każdą z faz rozwojowych. O ile wybór danio pręgowanego nie budzi wątpliwości, ryba ta jest obecnie powszechnie wykorzystywana w różnego typu badaniach naukowych, w tym biomedycznych i toksykologicznych, o tyle wybór stułbii obarczony był wysokim ryzykiem niepowodzenia. Dotychczasowe eksperymenty prowadzone na tym organizmie były skoncentrowane na poznaniu mechanizmów regeneracji.

Część teoretyczna pracy **wskazuje na dobrą znajomość przez Doktoranta aktualnych metod badawczych stosowanych w toksykologii, wyzwań stojących przed naukowcami i praktykami wobec rosnącej świadomości etycznej prowadzącej do ograniczenia w badaniach liczby kręgowców, przede wszystkim ssaków,** a także na bardzo szczegółową wiedzę odnośnie stosowanych przez niego organizmów testowych. Pewien niedosyt rodzi zbyt fragmentaryczne ukazanie przykładów alternatywnych metod badania embriotoksyczności, zwłaszcza w kontekście środków ochrony roślin.

W części doświadczalnej Autor ocenił aktywność biologiczną 36 substancji podzielonych na trzy grupy: silnych teratogenów, związków powodujących toksyczność dla okresu przedporodowego w zakresie toksyczności matczynej oraz związków niewpływających na rozwój przedporodowy. Dane dotyczące działania wybranych substancji na ssaki uzyskał z dostępnych baz danych. W badaniach zastosował dwa testy na stułbii: toksyczności ostrej i oceny zdolności do regeneracji oraz powszechnie znany test na wczesnych stadiach rozwojowych ryb. Przy opisie metod badawczych brakuje informacji, na ile procedury testów są zgodne z procedurami standardowymi np. OECD 236, jakie ewentualne zmiany zostały wprowadzone, czy stosowano kontrole pozytywne, a także jakie kryteria jakości wyników (np. w kontrolach negatywnych) były stosowane. **W przypadku wdrożenia nowej metody do rutynowej kontroli, a taki jest jeden z celów doktoratu wdrożeniowego, bardzo istotne jest opracowanie i walidacja kryteriów ważności testu.** Na przykład OECD 236 zaleca stosowanie 3,4-dichloroaniliny jako kontroli pozytywnej przy każdej nowej serii badań.

Uzyskane wyniki Doktorant przedstawił w Załączniku do pracy, a także zebrał w tabelach, zaznaczając kolorami odpowiednie klasy toksyczności. **Niewątpliwym istotnym elementem w pracy jest zastosowanie w teście na stułbii współczynnika toksyczności TI wskazującego potencjał badanej substancji do wywoływania zmian w procesie rozwoju organizmu.** Współczynnik ten, także podzielony na klasy, ułatwił analizę wyników. Jednakże nasuwa się pytanie, czy podział ten został wykonany arbitralnie, czy na podstawie wcześniejszych badań, czy przy zastosowaniu metod analizy matematycznej? Uzyskane wyniki zostały przedstawione klasycznie, poprzez szczegółowy opis danych w każdej grupie badanej. Z uwagi na znaczną liczbę danych przy ich analizie pomocne by było zastosowanie bardziej zaawansowanych metod statystycznych np. analizy PCA, które mogłyby ułatwić wyciągnięcie dodatkowych wniosków.

W celu weryfikacji przydatności testów do oceny embriotoksyczności badanych substancji Doktorant wykorzystał wartości współczynnika TI z testów na stułbii oraz wartości rozpiętości R z testów na rybach. **Jest to podejście interesujące, dające ważne wskazówki odnośnie subletalnego działania badanych próbek, umożliwiające wyodrębnienie grup substancji o odpowiednim profilu toksycznego działania.** Jednakże, ponownie pojawia się pytanie czy wartości graniczne zostały ustalone z zastosowaniem odpowiednich metod optymalizacji i dlaczego wartości te są inne niż w publikacji Sornat i in., 2021 (<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.09.006>).

W dyskusji wyników Autor rozprawy przedstawił dane dotyczące mechanizmów działania embriotoksycznego i teratogennego badanych środków ochrony roślin. Wykazał, iż z uwagi na działanie na późne fazy rozwoju, można zrozumieć dlaczego nie zaobserwowano efektów embriotoksycznych dla niektórych substancji w teście na stułbii. Przebieg dyskusji wskazuje na dobrą znajomość przez Pana magistra różnych mechanizmów działania warunkującego toksyczność przedporodową, a także umiejętność krytycznego podejścia do własnych wyników badań. Na koniec dyskusji Doktorant przedstawił propozycję oceny

punktowej dla klasyfikacji wyników obu testów, gdyby miałyby być stosowane jako testy przesiewowe do oceny toksycznego działania na rozwój.

W podsumowaniu, będącym dalszym ciągiem dyskusji wyników, Autor wskazał na szerokie stosowanie testu na wczesnych stadiach rozwojowych ryb, także w badaniach pestycydów. W tym miejscu zabrakło informacji, czy badane w pracy związki były wcześniej analizowane przez innych autorów i czy uzyskane w pracy wyniki są zbieżne z danymi literaturowymi dotyczącymi badań na zarodkach ryb. Autor rozprawy przedstawił także trudności techniczne badań na zarodkach ryb oraz wskazał na możliwości obserwacji innych rodzajów efektów testowych po zastosowaniu odpowiedniej aparatury lub barwienia. Z uzyskanych wyników Doktorant wyciągnął 6 wniosków, a także przedstawił 4 rekomendacje dalszych badań.

Podsumowując merytoryczną ocenę rozprawy uważam, że **zaplanowany zakres badań został zrealizowany. Za najważniejsze osiągnięcia uważam:**

- 1) Zaproponowanie systemu klasyfikacji toksyczności przedporodowej opartego na wynikach testów przesiewowych uzyskanych przy użyciu na prostych metod diagnostycznych;
- 2) Uzyskanie bazy wyników toksyczności dla wczesnych stadiów rozwojowych ryby *B. rerio*, dla dużej grupy środków ochrony roślin.
- 3) Uzyskanie bazy wyników dla stułbii zarówno efektów letalnych, jak i subletalnych. Pomimo słabej zdolności predykcyjnej tego testu w stosunku do embriotoksyczności wyniki te są bardzo cenne z uwagi na możliwość powiązania ich z mechanizmami działania badanych substancji toksycznych i weryfikacji klasyfikacji toksyczności pestycydów dla ekosystemów wodnych.

Układ pracy

Praca stanowi klasyczną dysertację złożoną z części teoretycznej (rozdziały 1-11), celu pracy, części doświadczalnej (rozdziały 13-18) podzielonej na metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz piśmiennictwo. Liczy 210 stron, z czego na właściwą część pracy przypadają 132 strony, resztę stanowi załącznik prezentujący szczegółowe wyniki przeprowadzonych analiz zebrane w 77 tabelach. Tekst poprzedzony jest spisem treści oraz krótkim wykazem skrótów i oznaczeń. Brak jest spisu tabel, który ułatwiłby wyszukiwanie informacji, także z załącznika. Spis piśmiennictwa obejmuje ponad 200 pozycji, w większości artykułów z czasopism anglojęzycznych, ale także zaleceń/standardów międzynarodowych oraz fragmentów baz danych zawierających informacje o badanych związkach. Praca napisana poprawnym językiem, nieliczne błędy i uwagi przedstawiono poniżej.

Drobne uwagi do pracy

- Dlaczego stosowano nazwę hydra, jeśli istnieje polska nazwa stułbia? W pracy powinna być zamieszczona pełna systematyka obu organizmów testowych. Stosując nazwy łacińskie organizmów za pierwszym razem powinna być podana pełna nazwa gatunkowa (*Hydra attenuata*), a później – tylko jej skrót – *H. attenuata*.
- Dlaczego, w celu obliczenia wartości EC50 i LC50, stosowano metodę Krabera, a nie najczęściej polecaną metodę Probitową?
- W pracy powinny być właściwie stosowane słowa: „liczba” oraz „ilość” ; wartości liczbowe powinny być zaokrąglane do odpowiedniej liczby cyfr znaczących;
- Zamiast Rys. powinno być Ryc. Pojęcie rycina obejmuje wszelkie obrazy, wykresy, fotografie, a także rysunki;
- Strona 95. Jaki poziom (procent) reakcji toksycznych uznano za LCO, czyli pierwsze objawy?
- Strona 7. Wirus opryszczki – powinno być HSV;
- Strona 16. Czy podstawy prawne opisane w cytowanej pracy z 2012 są dalej aktualne?
- Strona 20. Czy cytowana praca: OECD, 2012 dotyczy aktualizacji z 2017 i 2020 roku?
- Tabela 4 (i następane). Brak jednostek stężeń przy danych LC50 i EC50;

Wniosek końcowy

Reasumując, podjęty przez Doktoranta temat stanowi bardzo aktualne zagadnienie z punktu widzenia toksykologii środowiskowej i wpisuje się w trend poszukiwania metod alternatywnych w stosunku do stosowanych obecnie badań na ssakach. Przedstawione powyżej uwagi krytyczne nie umniejszają mojej pozytywnej oceny całości pracy. Oceniana rozprawa doktorska stanowi oryginalny i indywidualny wkład doktoranta w rozwój nauk środowiskowych (dyscypliny: inżynieria środowiskowa) i spełnia wszystkie wymagania zawarte w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z późn. zm.). Mając na uwadze wszystkie powyższe fakty, z pełnym przekonaniem składam wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr. Roberta Sornata i dopuszczenie go do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY WUM
Grzegorz Nałęcz-Jawecki
prof. dr hab. Grzegorz Nałęcz-Jawecki