

POLITECHNIKA GDAŃSKA

dr hab. n. med. Anna Stanisławska-Sachadyn, prof. nadzw. PG

Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii

Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej

ul. Narutowicza 11/12, 80-233 Gdańsk

email: anna.stanislawski@pg.edu.pl

Gdańsk, 24 marca 2020

Recenzja Rozprawy Doktorskiej mgr inż. Mileny Chraniuk pt. „Markery toksyczności w liniach komórkowych ludzkiego układu oddechowego w warunkach oddziaływania lotnych związków organicznych (LZO)”

Rozprawa doktorska mgr inż. Mileny Chraniuk zatytułowana „Markery toksyczności w liniach komórkowych ludzkiego układu oddechowego w warunkach oddziaływania lotnych związków organicznych (LZO)”, która została wykonana w Zakładzie Toksykologii Środowiska na Wydziale Nauk o Zdrowiu z Oddziałem Pielęgniarstwa i IMMiT Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem promotora Pani Prof. Lidii Wolskiej przedstawia wyniki badań, których celem było określenie przydatności wybranych markerów do oceny toksycznego oddziaływania lotnych związków organicznych (LZO) na komórki układu oddechowego. Jako cele cząstkowe Doktorantka określiła: wytypowanie LZO należących do różnych klas najczęściej występujących w powietrzu wewnątrz, określenie stężeń LZO umożliwiających zbadanie zależności dawka – odpowiedź, wybranie biomarkerów zgodnie z ideą ścieżki AOP (ścieżka niekorzystnych rezultatów) z uwzględnieniem markerów cytotoxyczności oraz markerów dodatkowych, wykonanie jednolitych badań inhalacyjnych *in vitro* dla wybranych LZO, wykonanie podstawowych badań dla mieszanin, wstępne porównanie odpowiedzi wybranego biomarkera w modelach komórkowych i zwierzęcych.

Poza aspektem poznawczym warty wspomnienia jest aspekt praktyczny podjętego tematu. Temat pracy jest szczególnie istotny w kontekście zagadnień etycznych i wynikających z nich ograniczeń w zastosowaniu modeli zwierzęcych.

Zadanie było realizowane przez Doktorantkę przy wykorzystaniu komórek linii A549 (gruczolakorak płuca) oraz CI-huAEC (komórki nabłonka dróg oddechowych). Eksperymenty były prowadzone w systemie, który umożliwiał analizę komórek poddawanych ekspozycji na działanie LZO na pograniczu fazy ciekłej i gazowej. Po ustaleniu wpływu LZO na wybrane procesy zachodzące w komórkach w systemie *in vitro*, Doktorantka porównała otrzymane wyniki z danymi literaturowymi, w tym z rezultatami ekspozycji gryzoni na LZO.

Rozprawa doktorska mgr inż. Mileny Chraniuk liczy 209 stron, na które składają się: spis treści, wykaz skrótów, wstęp teoretyczny (48 stron), cel pracy, metodologia (30 stron), wyniki (54 strony), dyskusja (35 stron), wnioski (3 strony), spis literatury oraz załączniki. W manuskrypcie umieszczono 34 tabele, 34 ryciny oraz 44 wykresy.

Wstęp teoretyczny zawiera cztery podrozdziały, które są bezpośrednio powiązane z tematyką rozprawy: Lotne Związki Organiczne (LZO), LZO w powietrzu wewnątrz, wpływ LZO na organizm człowieka, modele badawcze i biomarkery stosowane w badaniach inhalacyjnych. We wstępie ujęte są takie zagadnienia jak rozwiązania prawne dotyczące stosowania LZO w różnych krajach, metabolizm LZO w organizmie człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem tkanki płuca, modele stosowane do oznaczania toksyczności LZO wraz z dyskusją ich przydatności i możliwości wykorzystania. Już w tym rozdziale, podobnie jak w całej pracy doktorskiej mgr inż. Chraniuk, zwraca uwagę multidyscyplinarność projektu, szczególnie cenna w badaniach z zakresu nauk o zdrowiu.

Rozdział „Metodyka” to szczegółowo i starannie przedstawiony wykaz użytych materiałów, sprzętów oraz metod badawczych. Zarówno dobór, jak i opis metodyki są poprawne i wyczerpujące. Moją uwagę ponownie zwróciło niełatwe zadanie łączenia w jednej pracy technik zarówno z zakresu biotechnologii, jak i chemii analitycznej. Na uwagę zasługuje opis systemu do ekspozycji komórek hodowanych na pograniczu fazy ciekłej i gazowej (ALI, ang. *Air-Liquid Interface*) na lotne związki organiczne oraz eksperymentów traktowania komórek LZO. Nie była to rutynowa procedura i wybór układu badawczego umożliwiającego ekspozycję komórek na działanie LZO w systemie ALI, a nie w hodowlach zanurzonych, przy jednoczesnej kontroli wpływu czystego powietrza na homeostazę komórek, stanowi o dużej wartości uzyskanych wyników. Po traktowaniu komórek LZO Doktorantka przeprowadziła serię analiz mających na celu ustalenie zmian w homeostazie komórkowej: zmiany w aktywności mitochondriów szacowała za pomocą testu WST-1, ocenę uszkodzeń błony komórkowej badała za pomocą testu LDH, poziom białka IL-8 będącego markerem stanu zapalnego oznaczyła stosując test ELISA, stopień przeżywalności komórek oznaczała przez barwienie roztworami barwników JC-1 oraz BODIPY, wykonała zdjęcia komórek na membranach wykorzystując mikroskop fluorescencyjny, poziom białka całkowitego oznaczała stosując test BCA Pierce’a, poziom białka HSP70 za pomocą testu ELISA, do oceny uszkodzeń lipidów (wykrywanie substancji reagujących z kwasem 2-tiobarbiturowym) wykorzystowała test TBARS, a pomiar poziomu glutationu

wykonała techniką HPLC. Przy tak szeroko prowadzonych badaniach może zdarzyć się niedopatrzenie. Brak rozdziału dotyczącego przeprowadzonych analiz statystycznych. Informacja, że do analiz statystycznych wykorzystano program GraphPad Prism pojawia się na str. 110 w rozdziale „Wyniki”, niemniej jednak odpowiedni rozdział powinien znaleźć się w rozdziale „Metodyka”, ponieważ nie jest oczywiste, czy ten program był wykorzystywany we wszystkich przedstawionych analizach statystycznych. Poza tym należy wskazać, jakich testów użyto do wyznaczenia istotności statystycznej.

Rozdział „Wyniki” rozpoczyna się od przedstawienia LZO wybranych do dalszych prac badawczych, z uwzględnieniem ich właściwości fizyko-chemicznych, wraz z dyskusją możliwości ich wykorzystania w badaniach na modelach komórkowych. Ponownie zwraca uwagę umiętność łączenia przez Doktorantkę wiedzy zwyczajowo przypisywanej różnym dziedzinom nauki. Przy omówieniu wyników pracy doktorskiej warto wspomnieć, że eksperymenty ekspozycji komórek na działanie LZO Doktorantka wykonała we współpracy z zespołem z hanowerskiego Instytutu Fraunhofera. Cenna umiętność współdziałania Doktorantki z badaczami z różnych zespołów ma kluczowe znaczenie w prowadzeniu z sukcesem badań naukowych. Rezultaty prac przedstawionych przez Doktorantkę wymagały bardzo dużego zaangażowania, były też pracochłonne i czasochłonne. Doktorantka ustaliła stopień toksyczności formaldehydu, heksanal, dekanu, styrenu, p-ksylenu, octanu n-butylu, benzenu, toluenu, heptanu, octanu etylu (w kolejności malejącej toksyczności) w odniesieniu do aktywności mitochondriów w linii A549. Analogiczne były wyniki cytotoksyczności analizowanych LZO po zbadaniu stopnia uszkodzenia błony komórkowej. Doktorantka ustaliła wpływ badanych LZO w szerokim zakresie stężeń na sekrecję IL-8. Oszacowała na ile dodatkowe markery mogą być przydatne do oceny szkodliwości LZO. W kolejnych eksperymentach zbadała w komórkach linii A549 stopień toksyczności mieszanin LZO w oparciu o wcześniej wybrane markery. Doktorantka zbadała także z użyciem testu WST-1 stopień toksyczności wybranych LZO w komórkach linii CI-huAEC, co jest szczególnie cenne w kontekście poszukiwania nowych modeli komórkowych do oceny toksyczności związków chemicznych.

Rezultaty przedstawione w recenzowanej pracy doktorskiej zostały szeroko przedyskutowane w odniesieniu do wyników innych autorów. Wyróżniają się podrozdziały dotyczące oceny markerów toksyczności. Doktorantka ocenia rezultaty swojej pracy w sposób bardzo rzeczowy, wskazując zarówno zalety, jak i wady wybranych markerów i dyskutując potencjalne problemy związane z ich przyszłym wykorzystaniem.

Bibliografia jest wyjątkowo obszerna i liczy 568 pozycji. Publikacje cytowane są w sposób poprawny, a ich liczba świadczy o szerokich studiach literaturowych podjętych przez Doktorantkę i jej dużym zaangażowaniu w tematykę pracy.

Praca doktorska p. Mileny Chraniuk jest poprawna językowo i terminologicznie. Natknęłam się na kilka potknięć językowych i terminologicznych, które wypiszę - nie wpływają one jednak na moją ocenę pracy:

- str. 23 „aktywność poszczególnych typów enzymów (izoforn) rośnie wg następującej kolejności: CYP1B1, CYP2B6 > CYP2E1” – w odniesieniu do enzymów kodowanych przez różne geny, ale należących do jednej klasy poprawne byłoby użycie terminu *izoenzymy*, nie *izoformy* enzymów.
- str. 51 „Reakcje hybrydyzacji ze znakowanymi sondami pozwalają łatwo zidentyfikować a także precyzyjniej określić insercje” – techniką FISH można raczej cenić zmiany typu liczby kopii np. amplifikacje.
- str. 123 „Uzyskane dane *poddano* nieparametrycznemu testowi Kruskala – Wallisa”
- str. 132 „Cytotoksyczność zmierzona po ekspozycji na mieszaninę formaldehyd - dekan *przybrała wartość* zbliżoną do cytotoksyczności uzyskanej po narażeniu na 29,6 ppm formaldehydu” – proponowałabym: poziom cytotoksyczności mieszaniny formaldehyd – dekan był porównywalny do oznaczonego w przypadku zastosowania 29,6 ppm formaldehydu.
- str. 150 „Jedynie stężenie 29,6 ppm *spowodowało* wydzielenie IL-8 w ilościach wyższych.. ” – proponowałabym: poddanie komórek ekspozycji na formaldehyd o stężeniu 29,6 ppm skutkowało wydzieleniem IL-8 w ilościach...;

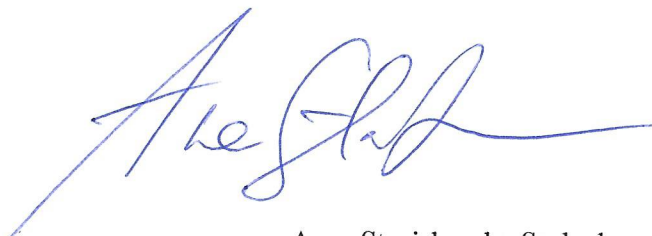
Doktorantka przygotowując rozprawę z pewnością zdobyła dużą wiedzę na temat komórkowych markerów toksyczności LZO, zapytam więc: jakie biomarkery i jakie modele mają szansę znaleźć wykorzystanie w praktyce?

Doktorantka jest współautorką 3 publikacji naukowych z listy JCR o łącznym współczynniku wpływu 11,749 (wg *Web of Science*, zgodnie z rokiem opublikowania) oraz brała udział w kilkunastu krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych, wykazując się zaangażowaniem w badania naukowe wykraczające poza tematykę przedstawioną w pracy doktorskiej. Ponadto, artykuł: “Gałęzowska G, Chraniuk M, Wolska L (2016) In vitro assays as a tool for determination of VOCs toxic effect on respiratory system: A critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 77:14-22” (IF₂₀₁₆=8,442) jest powiązany z tematyką badawczą Doktorantki.

Praca p. Mileny Chraniuk zawiera istotne elementy nowości naukowej. Stosując szerokie spektrum stężeń lotnych związków organicznych ustaliła, przy ekspozycjach powadzonych na pograniczu fazy ciekłej i gazowej w modelach *in vitro*, że jako biomarkery toksyczności mogą posłużyć zmiany w poziomie aktywności mitochondriów, stopień uszkodzenia błony komórkowej i poziom sekrecji IL-8. Ponadto Doktorantka zweryfikowała zastosowanie kilku innych potencjalnych biomarkerów.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Mileny Chraniuk zatytułowana „Markery toksyczności w liniach komórkowych ludzkiego układu oddechowego w warunkach oddziaływania lotnych związków organicznych (LZO)” spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w tym warunki art. 13 ustawy Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego o stopniach naukowych i tytule

naukowym. Wnoszę zatem do Rady Nauk o Zdrowiu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr inż. Mileny Chraniuk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę dotychczasowy dorobek naukowy i przedstawioną do recenzji rozprawę wnoszę o wyróżnienie doktoratu p. mgr inż. Mileny Chraniuk, pod warunkiem opublikowania rezultatów przedstawionych w pracy doktorskiej w ciągu roku od obrony pracy doktorskiej.



Anna Stanisławska-Sachadyn