

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Mariki Turek pt. „Wykorzystanie bioluminescencyjnych bakterii *A. fischeri* w badaniach ekotoksyczności ksenobiotyków jonowych i niejonowych”

Badania ekotoksykologiczne substancji chemicznych, zarówno pojedynczych związków jak i ich mieszanin, stanowią dziś nieodzowny element oceny ryzyka środowiskowego zanieczyszczeń. Prowadzone na różnych poziomach organizacji biologicznej, mają za zadanie poznanie możliwej odpowiedzi ostrej lub chronicznej organizmów narażonych na funkcjonowanie w skażonych ekosystemach. Szczególną rolę w baterii narzędzi ekotoksykologicznych pełni test zahamowania bioluminescencji bakterii *Aliivibrio fischeri*, ze względu na swoją uniwersalność oraz odpowiedź charakteryzującą biocenozę niemal wszystkich środowisk wodnych. Ze względu na swoją prostotę wykonania, ale przede wszystkim wysoki stopień standaryzacji. Dostępne komercyjnie testy takie jak Microtox® LUMISTox™ i ToxAlert® pozwalają na określenie toksyczności badanej próbki w oparciu o pomiar zahamowania bioluminescencji. Bioluminescencja bakterii jest ściśle związana z gęstością ich populacji oraz stanem metabolicznym. Bakterie luminescencyjne emitują światło, gdy znajdują się w optymalnym dla siebie środowisku. W warunkach normalnych komórki bakterii wykorzystują 10% energii pochodzącej z metabolizmu na świecenie. W obecności związków toksycznych dla mikroorganizmów z uwagi na zaburzenia procesów metabolicznych ich luminescencja jest hamowana.

Uzyskiwane wyniki badań ekotoksykologicznych, zwłaszcza te uzyskiwane za pomocą standardowych protokołów, stają się także coraz częściej podstawą poszukiwania teoretycznych zależności elementów struktury chemicznej badanego związku a aktywnością biologiczną. Bogaty dorobek metod ilościowych zależności struktura – aktywność (QSAR) pozwala dziś na wyprowadzanie wiarygodnych zależności odpowiedzi testów ekotoksykologicznych z wybranymi deskryptorami molekularnymi badanych cząsteczek chemicznych.

Biorąc powyższe pod uwagę należy uznać, że wybór tematyki pracy doktorskiej Pani mgr M. Turek jest bardzo aktualny i wpisuje się we współczesne trendy chemii środowiska, która coraz częściej włącza do swojego warsztatu metodologicznego badania ekotoksykologiczne. Rozprawa doktorska pod tytułem „Wykorzystanie bioluminescencyjnych bakterii *A. fischeri* w badaniach ekotoksyczności ksenobiotyków jonowych i niejonowych” powstała w Instytucie Chemii Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego im. Jana Długosza w Częstochowie pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Bałczewskiego i dr Ewy Różyckiej -Sokołowskiej. Praca liczy 188 stron, podzielona jest na trzy obszerne części (część literaturowa, badania własne,

część eksperymentalna), zawiera 46 rysunków, 35 tabel oraz odnosi się do 288 pozycji literaturowych.

W puli badanych związków chemicznych znalazły się ciecze jonowe z grupy halogenooctanów, tiodioctanów, fenoksyoctanów i fenyloctanów amoniowych, które strukturalnie były analogami wycofywanego z obiegu handlowego glifosatu, a ich projektowanie miało na celu znalezienie alternatywnego, bezpieczniejszego herbicydu. Badania ekotoksykologiczne nowo projektowanych cieczy jonowych wpisują się w szerszy, obecny w świecie przemysłu chemicznego trend ich prospektywnej oceny ryzyka, która winna towarzyszyć każdej strategii wprowadzania na rynek nowych preparatów chemicznych z zamiarem ich użycia na masową skalę. Jednym z celów szczegółowych przedstawionej do recenzji pracy było także zbadanie ekotoksyczności farmaceutycznych substancji czynnych (API) oraz substancji pomocniczych z wykorzystaniem G(-) bakterii *Aliivibrio fischeri* oraz stworzenie modeli QSAR pozwalających na przewidywanie aktywności biologicznej związków chemicznych z badanych grup na podstawie ich budowy a także projektowanie nowych jonowych związków herbicydowych bezpiecznych dla środowiska. Do badań wybrano stosowane w terapii nadciśnienia tętniczego leki z grupy antagonistów receptora angiotensyny II (ARBs) (walsartan, losartan-K i -H, irbesartan, kandesartan, telmisartan) oraz z grupy diuretyków (hydrochlorotiazyd), charakteryzujące się niską rozpuszczalnością, ich formułacje farmaceutyczne a także pojedyncze substancje pomocnicze stosowane w tych formułacjach. Zbadano toksyczność mieszanin w układach API-API, API substancja pomocnicza i substancja pomocnicza-substancja pomocnicza. Dane eksperymentalne uzyskane dla mieszanin porównano z przewidywanymi opartymi o dwa najczęściej stosowane modele CA (z ang. Concentration Addition) i IA (z ang. Independent Action). Aby potwierdzić istnienie synergistycznych lub antagonistycznych efektów, w badanych mieszaninach obliczono współczynnik MDR (ang. *Model Deviation Ratio*), który wskazuje na odchylenie wartości eksperymentalnej od wartości przewidywanej i określa stopień dopasowania modelu.

Także i w tym przypadku, wybór substancji czynnych ze względu na wysokie prawdopodobieństwo obecności tych związków w środowisku był bardzo trafny, wypełniając istotną lukę w naszej wiedzy o oddziaływaniu leków przeciwnadciśnieniowych na środowisko wodne. Większość dostępnych wyników badań ekotoksyczności leków dotyczy samych substancji biologicznie czynnych, natomiast do środowiska razem z nimi wprowadzane są także wchodzące w skład formułacji farmaceutycznych substancje pomocnicze, takie jak surfaktanty, emulgatory czy konserwanty. Część z nich jak np. konserwanty (ze względu na właściwości hamujące rozwój drobnoustrojów) czy surfaktanty (jako środki powierzchniowo czynne) wprowadzone do środowiska, mogą wywoływać efekty toksyczne lub jako składniki mieszanin zwiększać biodostępność czy toksyczność innych związków. Wiedza na temat toksyczności substancji pomocniczych jest niewielka. Dostępne doniesienia naukowe wykazują, że obecność substancji pomocniczych w mieszaninach zwiększa toksyczność leków.

Wyniki badań zostały opublikowane w sześciu artykułach wieloautorskich, w tym w tak prestiżowych czasopismach jak *Green Chemistry*, *Journal of Hazardous Materials* czy *Chemosphere*. Zastanawiam się, dlaczego mimo tak dobrego upowszechnienia wyników badań kandydatka zdecydowała się na książkową formę dysertacji? Naturalnym byłaby tu forma „zszywki” artykułów z krótkim przewodnikiem. Co prawda w rozprawie zawarto wyniki nieopublikowane, ale jak się domyślam są już pewnie w ich trakcie i dając sobie trochę czasu można było przyjąć taki właśnie model publikacji dysertacji.

Przechodząc do oceny samej rozprawy należy uznać, że większość z poruszanych zagadnień, zarówno w zakresie studiów literaturowych jak i opisu wyników własnych przedstawiono wystarczająco szczegółowo i wyczerpująco. Imponuje rozmach podjętych badań, które nie tylko koncentrują się na profilowaniu ekotoksykologicznym badanych związków, ale także obejmują syntezę chemiczną, charakterystykę fizykochemiczną oraz modelowanie QSAR. Większość z osiągnięć kandydatki należy ocenić wysoko. Najważniejsze osiągnięcia rozprawy to: (i) zaprojektowanie, synteza i pełna charakterystyka fizykochemiczna 24 soli amoniowych strukturą nawiązujących do glifosatu, (ii) pełna charakterystyka oddziaływania toksycznego wobec *V. fischeri* zsyntezowanych chiralnych i niechiralnych soli, a także dowiedzenie, iż niektóre z nich mogą stać się atrakcyjną, nietoksyczną alternatywą dla dotąd stosowanych herbicydów, (iii) potwierdzenie efektu wzrostu toksyczności wraz z wydłużaniem łańcucha alkilowego oraz wykazanie, iż może ona także rosnać wraz ze zwiększaniem liczby atomów chloru w grupie fenylovej zsyntezowanych chlorofenoksyoctanów, (iv) opracowanie i potwierdzenie użyteczności modyfikacji standardowego protokołu Microtox[®] do oceny ekotoksykologicznej słabo rozpuszczalnych API, (v) dowiedzenie występowania szeregu efektów antagonistycznych i synergistycznych w badanych mieszaninach oraz skuteczne zastosowanie modeli działania toksycznego do predykcji oddziaływania zsumowanego lub niezależnego. oraz (vi) wyprowadzenie zależności QSAR pomiędzy toksycznością a wybranymi deskryptorami molekularnymi dla cieczy jonowych oraz antagonistów receptora angiotensyny II.

Analiza wyników otrzymanych z wykorzystaniem zaproponowanej metody rodzi także pewne pytania. Otrzymane dla niektórych środków farmaceutycznych /formulacji wartości EC50 są bardzo wysokie np. dla masa tabletkowa TEL (Telmizek) ok. 20 g/l po 5 minutowej ekspozycji ok. 16 g/l przy 15 minutowej ekspozycji (Tabela 19). Czy zdaniem autorki taka gęstość zawiesiny nie zaburza pomiaru bioluminescencji. Czy nie rozważano, podobnie jak to jest w przypadku protokołu Microtox[®] Solid Phase Test, wprowadzenia do procedury wykonywania testu filtracji próbek po ekspozycji bakterii na badane związki. Czy wg Doktorantki jest możliwe, że za obserwowany efekt toksyczny odpowiada frakcja rozpuszczona leku i substancji pomocniczych? Czy wykonywano takie testy dla porównania?

Ponadto test zahamowania bioluminescencji nie może być jedynym testem stosowanym do oceny ekotoksyczności związków/mieszanin. Może on być stosowany jako test o charakterze przesiewowym, wstępnym, w celu porównania toksyczności związków z tej samej grupy, do budowania modeli QSAR jednakże dla rzetelnej oceny ekotoksyczności substancji i uzyskania pełnej informacji o ryzyku związanym z obecnością badanych związków w

środowisku rekomenduje się stosowanie baterii testów z wykorzystaniem organizmów reprezentujących różne ogniwa łańcucha troficznego i różne poziomy organizacji biologicznej. Wskazaniem do stosowania tego typu podejścia jest różny mechanizm działania substancji chemicznych w tym związków aktywnych biologicznie na organizmy niecelowe a także różna wrażliwość organizmów na zanieczyszczenia.

W pracy natknąłem się też na kilka błędów i uchybień, m.in.: (i) w prezentacji danych liczbowych zastosowano jako separator dziesiętny kropkę a nie, jak to powinno być w konwencji tekstów polskojęzycznych, przecinek, (ii) aniony PF_6^- , BF_4^- błędnie nazwano strukturami organicznymi, (iii) nieścisłością jest także stwierdzenie, że w literaturze brak jest szczegółowych badań dotyczących biodegradacji cieczy jonowych, (iv) źródła literaturowe w opisach rysunków poprzedza słowo „tłumaczenie” co jest pewnie jakimś systemowym błędem redakcyjnym, (v) błędnie nazwano anion bis(trifluorometylo-sulfonylo)imidkowy jako -imidowy, (vi) w pracy pojawia się termin „ilościowa zależność matematyczna”, który nie ma większego sensu.

Powyższe pytania i wątpliwości nie są bardzo istotne i w żadnej mierze nie podważają jakości prezentowanych wyników badań naukowych i mojej pozytywnej ich oceny. Podsumowując, twierdzę, że cel pracy został zrealizowany a sama rozprawa zawiera solidny i wartościowy materiał badawczy. Kandydatka wykazała się przy tym znajomością warsztatu ekotoksikologicznego, syntetycznego i analitycznego.

Kandydatka jest autorką 10 publikacji naukowych opublikowanych w czasopismach recenzowanych oraz 4 zgłoszeń patentowych. Kierowała też projektem Preludium NCN oraz była laureatką programu L'Oréal Dla Kobiet i Nauki w 2020 roku.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z przekonaniem twierdzę, że oceniana dysertacja doktorska spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Humanistyczno-Przyrodniczego im. Jana Długosza w Częstochowie o dopuszczenie mgr Mariki Turek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.