



**UNIwersytet Medyczny w Białymstoku**  
**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej**  
**Zakład Toksykologii**

ul. Adama Mickiewicza 2 C, 15-222 Białystok  
Tel.: 85 7485604; fax: 85 7485834; e-mail: toxic@umb.edu.pl

**Kierownik Zakładu: Prof. dr hab. n. med. Małgorzata M. Brzóska**  
e-mail: malgorzata.brzoska@umb.edu.pl

---

Białystok, 2018.04.20.

**RECENZJA**

**rozprawy na stopień doktora nauk farmaceutycznych**  
**mgr farm. Michała Klimczaka**

**pt. „Wpływ heksachloronaftalenu (HxCN) na wybrane wskaźniki**  
**toksyczności podprzewlekłej u samic szczura”**

**wykonanej w Zakładzie Toksykologii Międzywydziałowej Katedry Farmakologii**  
**Ogólnej, Klinicznej i Toksykologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi**

**Promotor: dr hab. n. med. Anna Kilanowicz-Sapota, prof. nadzw. UM w Łodzi**  
**Promotor pomocniczy: dr n. farm. Adam Daragó**

Intensywny rozwój cywilizacyjny oprócz niekwestionowanych korzyści dla człowieka, w tym ciągłej poprawy diagnostyki i skuteczności leczenia różnych chorób, niesie za sobą również zagrożenia dla jego zdrowia wynikające z zanieczyszczenia chemicznego środowiska życia. Wymaga to podejmowania odpowiednich działań celem zminimalizowania ryzyka zdrowotnego. Jednym z istotnych kroków w tym kierunku jest poznanie zagrożeń dla zdrowia stwarzanych przez substancje zanieczyszczające środowisko życia człowieka i żywność oraz wyjaśnienie mechanizmów ich działania szkodliwego. Jest to konieczne, aby można było oszacować ryzyko dla zdrowia populacji generalnej stwarzane przez te substancje, jak również poszukiwać skutecznych metod zapobiegania niekorzystnym dla zdrowia skutkom narażenia i ich leczenia.

Wśród szczególnie niebezpiecznych zagrożeń zdrowotnych XXI wieku wymienia się trwałe zanieczyszczenia organiczne (TZO). W 2015 r. w ramach Konwencji Sztokholmskiej, której głównym zadaniem jest eliminowanie zanieczyszczeń środowiska najgroźniejszych dla zdrowia człowieka, do grupy tej włączono polichlorowane naftaleny. Pomimo zaprzestania celowej produkcji obecność polichlorowanych naftalenów

stwierdza się powszechnie w środowisku naturalnym, ze względu na powstawanie tych związków jako produkt uboczny w procesach spalania i ich dużą trwałość. Konsekwencją tego jest występowanie polichlorowanych naftalenów w produktach spożywczych, które stanowią główne źródło narażenia populacji generalnej, oraz w tkankach i płynach ustrojowych człowieka, wliczając mleko matek karmiących. Profil toksykologiczny tych związków jest jednak dotychczas słabo scharakteryzowany. W obliczu przewlekłej ekspozycji środowiskowej populacji generalnej na polichlorowane naftaleny oraz ze względu na działanie toksyczne innych związków chloroorganicznych z grupy trwałych zanieczyszczeń organicznych uwagę zwraca brak kompleksowych badań i wiarygodnych danych dotyczących zagrożeń dla zdrowia wynikających z ekspozycji długotrwałej na te związki. Podjęcie przez Pana mgr Michała Klimczaka badań w zakresie oceny toksyczności podprzewlekłej heksachloronaftalenu jest zatem w pełni uzasadnione. Badania te bardzo dobrze wpisują się w główne kierunki zainteresowań toksykologii współczesnej.

Przedłożona do recenzji rozprawa ma układ typowy dla prac doktorskich w formie monografii. Dysertacja liczy 153 strony standardowego wydruku komputerowego i jest podzielona na 6 rozdziałów takich, jak Wstęp, Założenia i cel pracy, Część doświadczalna, Wyniki, Dyskusja i Wnioski. Praca zawiera streszczenie w języku polskim i języku angielskim, spis tabel i rycin, 5 załączników i wykaz 170 pozycji piśmiennictwa. W rozprawie znajduje się 26 tabel i 32 ryciny.

Pracę doktorską rozpoczyna obszerny – 33 stronicowy Wstęp, w którym mgr M. Klimczak, w oparciu o dostępne piśmiennictwo, omówił źródła obecności w środowisku trwałych zanieczyszczeń organicznych i stwarzane przez nie zagrożenia dla zdrowia populacji generalnej oraz przedstawił regulacje prawne mające na celu ochronę człowieka przed narażeniem na te substancje. Szczególną uwagę Autor zwrócił na polichlorowane naftaleny. W kolejnych podrozdziałach omówił właściwości fizykochemiczne i zastosowanie w przeszłości tych związków, przedstawił ich stężenia w środowisku, produktach spożywczych i organizmie człowieka oraz dokonał charakterystyki toksykologicznej omawianych związków uwzględniając ich losy w organizmie. Wstęp stanowi interesujące wprowadzenie do problematyki podjętej w pracy i daje dobrą podstawę do uzasadnienia celowości prowadzonych badań. Bardzo istotne są podrozdziały 2.6.2 i 2.6.3 dotyczące toksyczności polichlorowanych naftalenów u ludzi i zwierząt doświadczalnych, w tym Tabele 1.8 i 1.9, w których Pan Magister podsumował dostępne dane literaturowe w zakresie toksyczności krótkoterminowej i długoterminowej tych związków ocenianej w modelach doświadczalnych *in vivo*. Z dokonanego przeglądu

wynika, iż dane toksykologiczne dotyczące wpływu ekspozycji długoterminowej na polichlorowane naftaleny są nieliczne i fragmentaryczne oraz pochodzą sprzed wielu lat. Ponadto praktycznie wszystkie dane dotyczą toksyczności mieszanin różnych kongenerów, w tym preparatów technicznych, które mogły być zanieczyszczone innymi związkami, w tym dioksynami, co mogło mieć wpływ na wyniki badań. Dotychczas brak jest kompleksowych badań nad możliwymi skutkami powtarzanego narażenia na polichlorowane naftaleny oraz działaniami odległymi tych związków. Powyższe dobrze uzasadnia celowość badań podjętych przez mgr M. Klimczaka.

Autor przedstawił założenia pracy doktorskiej i bardzo jasno sformułował jej cel w 2-stronicowym rozdziale dysertacji pt. „Założenia i cel pracy”. Za cel pracy przyjęto ocenę toksyczności podprzewlekłej heksachloronaftalenu w modelu doświadczalnym na samicach szczura, która obejmowała:

- podstawowe parametry toksyczności ogólnoustrojowej (ogólny stan zdrowia zwierząt, parametry hematologiczne, enzymy wskaźnikowe uszkodzenia wątroby, biomarkery funkcji nerek, wybrane parametry stresu oksydacyjnego, stężenie cytochromu P-450 i aktywność CYP1A i CYP2B)
- obraz morfologiczny narządów wewnętrznych (wątroba, nerki, płuca, śledziona, grasica, serce, tarczyca, nadnercza, jajniki, macica, mózgowie, nerw kulszowy)
- potencjalne działanie porfirogenne (w oparciu o wybrane parametry szlaku biosyntezy hemu)
- wstępną ocenę genotoksyczności w badaniu *in vivo* (test mikrojądrowy w szpiku kostnym).

W rozdziale III dysertacji pt. „Cześć doświadczalna” mgr M. Klimczak szczegółowo opisał model doświadczalny i metodykę badań, co pozwala stwierdzić, iż badania zostały zaplanowane prawidłowo do realizacji postawionego celu i właściwie przeprowadzone na wszystkich ich etapach, począwszy od wyboru materiału badanego. Do badań, jako przedstawiciela polichlorowanych naftalenów słusznie wybrany został heksachloronaftalen ponieważ w świetle dostępnych danych literaturowych za najbardziej toksyczne kongenery polichloronaftalenów uważa się izomery heksachloronaftalenu, które są także dominującymi kongenerami polichloronaftalenów stwierdzanymi w wątrobie oraz tkance tłuszczowej człowieka. Ze względu na brak dostępności komercyjnej, heksachloronaftalen został zsyntetyzowany na zamówienie w Zakładzie Chemii Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej. Z wykorzystaniem metod analitycznych potwierdzono tożsamość materiału badanego oraz oceniono jego potencjalne zanieczyszczenie innymi związkami chloroorganicznymi, takimi jak dioksyny i

furany. Uzyskany materiał (o czystości powyżej 95%) stanowiła mieszanina 1,2,3,5,6,7-heksachloronaftalenu (81,17%) oraz izomerów heksachloronaftalenu (13,97%), a 4,86% składu tej mieszaniny stanowił 1,2,3,4,5,6,7-heptachloronaftalen. Przeprowadzona analiza zanieczyszczeń wykazała, że związki z grupy polichlorowanych dibenzo-*p*-dioksyn i dibenzofuranów występowały w badanej mieszaninie heksachloronaftalenu w śladowym stężeniu (poniżej 1 pg/mg), w związku z czym nie miały wpływu na wyniki oceny toksykologicznej heksachloronaftalenu.

Należy podkreślić, iż badania obejmujące ocenę toksykologiczną heksachloronaftalenu przeprowadzono w oparciu o wytyczne Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD) uwzględniające „zasadą 3R”. W baniach wykorzystano łącznie 50 samic szczura stada Wistar, a na ich przeprowadzenie uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach (Uchwała nr 13/ŁB703/2014). Celem właściwego wyboru dawek heksachloronaftalenu do oceny toksyczności podprzewlekłej (90-dniowej) drogą pokarmową, prowadzonej zgodnie z wytyczną OECD 408 i procedurą B.26 wg Rozporządzenia WE Nr 440/2008 z późn. zm., badanie poprzedzono eksperymentem pilotażowym polegającym na ocenie toksyczności krótkoterminowej (28-dniowej) tego związku. W oparciu o wyniki badania toksyczności 28-dniowej i uwzględniając wytyczne procedury OECD 408 do dalszych badań właściwie wybrano 3 dawki heksachloronaftalenu (0,03; 0,1 i 0,3 mg/kg m.c.), tak, aby najwyższa z badanych dawek (1/2 dawki zastosowanej w badaniu toksyczności 28-dniowej) prowadziła do wyraźnych efektów toksycznych, natomiast najniższa nie powodowała wystąpienia istotnych działań szkodliwych.

W badaniu toksyczności podprzewlekłej heksachloronaftalenu prowadzono codzienne obserwacje kliniczne zwierząt, kontrolę spożycia paszy i wody oraz kontrolę przyrostu masy ciała, a po zakończonej ekspozycji, po uprzedniej 24-godzinnej zbiórce moczu, do badań pobrano krew (na antykoagulant i na skrzep), narządy wewnętrzne (wątroba, nerki, płuca, śledziona, grasica, serce, tarczyca, nadnercza, jajniki, macica, mózgowie, wycinek nerwu kulszowego) oraz obie kości udowe (celem uzyskania szpiku kostnego). W krwi oznaczono podstawowe parametry hematologiczne (liczba krwinek białych i czerwonych, średnia objętość krwinki czerwonej, rozpiętość rozkładu objętości krwinek czerwonych, wskaźnik rozkładu objętości krwinek czerwonych, stężenie hemoglobiny, średnia zawartość hemoglobiny w krwince czerwonej, hematokryt, liczba płytek krwi i średnia objętość płytki). Narządy wewnętrzne przeznaczono do badań histopatologicznych, a wycinki wątroby i nerek również do badań biochemicznych (stężenie zredukowanego glutationu, dialdehydu malonowego i białka, aktywność

CYP1A i CYP2B, a w wątrobie również stężenie cytochromu P450). W surowicy oznaczono aktywność aminotransferazy alaninowej i aminotransferazy asparaginianowej oraz całkowity status antyoksydacyjny. Działanie porfirogenne oceniono w oparciu o aktywność syntazy kwasu delta-aminolewulinowego, dehydratazy kwasu delta-aminolewulinowego i dekarboksylazy uroporfirynogenu w homogenatach wątroby, stężenie porfiryn w moczu i homogenatach wątroby oraz stężenie kwasu delta-aminolewulinowego w moczu. Określono również klirens kreatyniny i szybkość wydalania kreatyniny i białka z moczem. Szpik kostny wykorzystano do przeprowadzenia testu mikrojądrowego pozwalającego na dokonanie wstępnej oceny genotoksyczności heksachloronaftalenu.

Metodyka przeprowadzonych oznaczeń została szczegółowo opisana z podaniem źródeł literaturowych stosowanych metod. Szeroki zakres badań i różnorodność stosowanych technik analitycznych (oznaczenia z wykorzystaniem analizatora hematologicznego, metody spektrofotometryczne i spektrofluorymetryczne, ultrasprawa chromatografia cieczowa – UPLC z detekcją fluorescencyjną, badania histopatologiczne i test mikrojądrowy oparty na ocenie pęknięć chromosomów i uszkodzenia wrzeciona podziałowego) świadczą o doskonałym przygotowaniu mgr M. Klimczaka do pracy naukowo - badawczej i Jego wysokich umiejętnościach analitycznych. Dla oznaczeń porfiryn i kwasu delta-aminolewulinowego metodą UPLC Autor przedstawił w pracy (Załączniki 1 - 4) podstawowe parametry walidacyjne metody oraz przykładowe chromatogramy. W pracy zabrakło natomiast informacji potwierdzających wiarygodność oznaczeń parametrów badanych innymi metodami (np. odzysk, precyzja). Ze względu na przeprowadzenie oceny mikroskopowej narządów w oparciu o barwienie hematoksyliną i eozyną stwierdzone w wątrobie zmiany stłuszczeniowe należało potwierdzić specyficznym barwieniem metodą Oil Red, co Autor uczynił, nie zawarł jednak tej informacji w pracy doktorskiej, podał ją natomiast w publikacji prezentującej wyniki badań.

Wyniki badań będących przedmiotem rozprawy doktorskiej mgr M. Klimczak szczegółowo opisał w liczącym 35 stron rozdziale IV pt. „Wyniki” oraz przedstawił w formie 16 tabel i na 23 rycinach. Tabele i ryciny prezentujące wyniki badań, podobnie jak pozostałe zawarte w pracy, są przygotowane z dużą starannością, dzięki czemu rozprawa jest bardzo estetyczna w odbiorze. Wyniki badań są właściwie opisane i zinterpretowane. Wnioski z przeprowadzonych badań zostały prawidłowo wyciągnięte i jasno sformułowane w ostatnim rozdziale rozprawy i znajdują pełne odzwierciedlenie w wynikach badań.

Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły stwierdzić, iż narządem krytycznym dla heksachloronaftalenu jest wątroba, a działanie hepatotoksyczne tego związku przejawia się hepatomegalią, nasileniem peroksydacji lipidów i stłuszczeniem hepatocytów. Ważnym osiągnięciem badań jest wykazanie, iż heksachloronaftalen wykazuje potencjał porfirogenny. Działanie to jest charakterystyczne dla wielu chlorowanych węglowodorów aromatycznych, jednak dopiero Zespół kierowany przez Panią Profesor Annę Kilanowicz-Sapota podjął badania w tym kierunku w odniesieniu do heksachloronaftalenu. Istotnym, z punktu widzenia szacowania ryzyka zdrowotnego u ludzi wynikającego z narażenia chronicznego na heksachloronaftalen, jest wyznaczenie wartości LOAEL dla tego związku (0,03 mg/kg m.c.), czyli najniższej dawki powodującej efekty szkodliwe (*ang. Lowest Observed Adverse Effect Level*). Ponadto wyniki badań pozwalają wstępnie uznać heksachloronaftalen za czynnik niegenotoksyczny.

Mgr M. Klimczak w pełni zrealizował założone cele pracy. Przeprowadzone przez Niego badania, będące pierwszymi w zakresie oceny toksyczności 90-dniowej heksachloronaftalenu, wnoszą nowe, istotne dane do toksykologii tego związku. Oprócz wartości naukowej i poznawczej wyniki badań mają również bardzo istotny aspekt praktyczny, bowiem wyznaczona wartość LOAEL dla heksachloronaftalenu może zostać wykorzystana do szacowania ryzyka zdrowotnego u ludzi narażonych przewlekle na ten związek.

Wyniki badań własnych Autor przedyskutował na tle dostępnych danych literaturowych w 22-stronicowym rozdziale pt. „Dyskusja”. Sposób prowadzenia dyskusji świadczy o w pełni ugruntowanej wiedzy w zakresie przedmiotu rozprawy doktorskiej.

Należy podkreślić, iż wyniki oceny toksyczności 90-dniowej heksachloronaftalenu zostały opublikowane w formie artykułu oryginalnego w jednym z wiodących czasopism międzynarodowych z dziedziny toksykologii – *Environmental Toxicology* (Klimczak M., Daragó A., Bruchajzer E., Domeradzka-Gajda K., Stępnik M., Kużajska K., Kilanowicz A.: „The effects of hexachloronaphthalene on selected parameters of haem biosynthesis and systemic toxicity in female Wistar rats after 90-day oral exposure”, 2018, doi: 10.1002/tox.22558) o współczynniku oddziaływania *Impact Factor* = 2,937 i punktacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego równej 30, w związku z czym zostały już poddane wnikliwej recenzji przez ekspertów międzynarodowych. Pan mgr M. Klimczak jest pierwszym autorem tej pracy. Ponadto Kandydat do stopnia doktora nauk prezentował i dyskutował wyniki badań wchodzących w zakres pracy doktorskiej na 4 konferencjach naukowych.

Rozprawa doktorska mgr M. Klimczaka została przygotowana z wielką starannością zarówno o wysoki poziom merytoryczny, jak również stronę edytorską. Z obowiązku recenzenta muszę jednak zwrócić uwagę, iż Autor nie uniknął pewnych drobnych niedociągnięć natury technicznej, w tym błędów litrowych (np. brak słowa „się” w drugim zdaniu na str. 15; cytowanie Falandycz i wsp. 1996, zamiast Falandycz i wsp. 1996a lub Falandycz i wsp. 1996b – str. 21, linia 7 i str. 22, linia 6; brak w wykazie piśmiennictwa pozycji Lin i wsp. (2013), na którą Autor powołał się na str. 26; cytowanie na str. 38 Galoch i wsp. 2005 zamiast Galoch i wsp. 2006; na str. 31 w pierwszym zdaniu podrozdziału 6 czytamy polichromowanych dibenzo-*p*-dioksyn zamiast polichlorowanych dibenzo-*p*-dioksyn, a w Załączniku 4 – 5-ALA zamiast  $\delta$ -ALA), które z żaden sposób nie wpływają na wartość merytoryczną pracy i jej całościową ocenę.

**Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej mgr farm. Michała Klimczaka pragnę podkreślić, iż praca prezentuje bardzo interesujący i celowy, dobrze zaplanowany i prawidłowo zrealizowany nowatorski projekt badawczy, którego wyniki mają istotną wartość naukową i poznawczą oraz aspekt praktyczny. Badania wniosły nowe dane dotyczące toksyczności powtarzanej heksachloronaftalenu zaliczonego do grupy najniebezpieczniejszych trwałych zanieczyszczeń organicznych, na które człowiek jest narażony przez całe życie i pozwoliły wyznaczyć wartość LOAEL dla tego związku, co może zostać wykorzystane do szacowania ryzyka zdrowotnego u ludzi. Dysertacja została przygotowana z bardzo dużą starannością, zarówno pod względem merytorycznym, jak również stylistycznym i edytorskim. Przeprowadzenie zaplanowanych badań, ich opracowanie statystyczne i interpretacja wyników, jak również przygotowanie dokumentacji z badań w postaci przedłożonej do oceny pracy wymagało nie tylko wielu umiejętności, ale było również praco- i czasochłonne i świadczy o bardzo dużym zaangażowaniu nie tylko Kandydata do stopnia doktora nauk, ale również Promotora. Duże doświadczenie Pani Profesor Anny Kilanowicz-Sapota w zakresie badań nad toksycznością związków chloroorganicznych było gwarantem właściwego zaplanowania i przeprowadzenia oraz zinterpretowania i udokumentowania badań. Drobne uwagi przedstawione w recenzji w żaden sposób nie umniejszają wysokiej wartości merytorycznej pracy.**

**Z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż w mojej opinii rozprawa doktorska mgr farm. Michała Klimczaka spełnia wymogi określone w *art. 13 ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. z 2018 r., poz. 1789)* i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału**

Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W oparciu o Regulamin wyróżniania prac doktorskich na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (Uchwała Rady Wydziału Farmaceutycznego z dnia 15 listopada 2016 r.) wnoszę również do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr farm. Michała Klimczaka. Wniosek swój argumentuję wysoką oceną rozprawy przedstawioną w recenzji oraz opublikowaniem znaczącej części wyników badań wchodzących w zakres dysertacji w formie pracy oryginalnej, której Kandydat jest pierwszym autorem, w czasopiśmie z *Listy Filadelfijskiej* (Environmental Toxicology) o współczynniku *Impact Factor* równym 2,937.

KIEROWNIK

Zakładu Toksykologii



prof. dr hab. Małgorzata M. Brzóska