



dr hab. n. farm. Bartosz Wielgomas

Gdańsk, 2018-04-19

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. farm. Michała Klimczaka

Tytuł **Wpływ heksachloronaftalenu (HxCN) na wybrane wskaźniki toksyczności podprzewlekłej u samic szczura**

Promotor **dr hab. n. med. Anna Kilanowicz-Sapota, prof. nadzw. UMED**

Promotor pomocniczy **dr n. farm. Adam Daragó**

Niezwykle dynamiczny rozwój technologiczny jaki miał miejsce w XX-tym wieku objął wszystkie dziedziny ludzkiej aktywności. Wydłużyła się znacząco średnia długość życia człowieka oraz poprawiła jego jakość. Dzięki osiągnięciom w obszarze nauk medycznych i farmaceutycznych praktycznie wyeliminowano niektóre choroby dotychczas odpowiedzialne za wysoką umieralność. Olbrzymią rolę zaczęła także odgrywać profilaktyka. Niestety postęp technologii chemicznej miał też swoje drugie, mniej przyjazne oblicze. Spośród tysięcy nowych substancji, które zaczęto wytwarzać na skalę przemysłową i które znalazły zastosowanie w różnych gałęziach gospodarki, wiele okazało się prawdziwym „koniem trojańskim”. Po początkowym zachwycie nad szczególnymi właściwościami, których dotychczas nie posiadały żadne znane substancje, po pewnym okresie stosowania zaczęto dostrzegać niekorzystne efekty zdrowotne wynikające z przewlekłego narażenia populacji generalnej. Taką historię posiadają insektycydy chloroorganiczne, polichlorowane bifenyle czy polibromowane difenyloetery, które wycofano lub ograniczono ich stosowanie dopiero po wielu latach produkcji i dystrybucji. Wynikało to po części z braku albo niedoskonałości regulacji prawnych umożliwiających wytwarzanie i obrót substancjami o nieznanym albo znanym tylko w części profilu toksykologicznym. Wśród obciążonych złą sławą, wyżej wymienionych związków halogenoorganicznych są też polichlorowane naftaleny - grupa najmniej poznana pod kątem właściwości biologicznych. Mimo zaprzestania ich celowej produkcji i wprowadzania do środowiska, narażenie na te substancje ma w dalszym ciągu miejsce jako konsekwencja ich dużej trwałości w środowisku. Bieżącym źródłem polichlorowanych naftalenów są



procesy spalania śmieci (emisja wtórna) i paleniska domowe. W literaturze znaleźć można bardzo niewiele informacji toksykologicznych dotyczących polichlorowanych naftalenów, dlatego podjęcie tematu w ramach pracy doktorskiej jest w pełni uzasadnione.

Ocena rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska mgr. farm. Michała Klimczaka ma układ tradycyjnej dysertacji w formie oprawionego wydruku komputerowego zawierającego 6 głównych rozdziałów obejmujących: Wstęp, Założenia i cel pracy, Część doświadczalną, Wyniki, Dyskusję oraz Wnioski. W pracy zamieszczono również streszczenie w języku polskim i angielskim, spisy tabel i rycin, załączniki zawierające dokumentację analityczną oraz piśmiennictwo. Wydruk liczy łącznie 153 strony, zawiera 26 tabel, 32 ryciny oraz wykaz 170 pozycji literaturowych.

Wstęp do rozprawy to bardzo interesujące kompendium wiedzy z obszaru trwałych zanieczyszczeń organicznych (TZO). Doktorant przedstawił ogólną charakterystykę tej grupy ksenobiotyków omawiając właściwości fizykochemiczne oraz los w ustroju i środowisku. Uwagę poświęcił także na prezentację wprowadzonych regulacji prawnych mających na celu ograniczenie emisji tych związków do środowiska naturalnego a w efekcie zmniejszenia ekspozycji człowieka. Kluczowym elementem tego systemu jest „Konwencja Sztokholmska w sprawie trwałych zanieczyszczeń organicznych” z 2001 roku. Do listy substancji objętych Konwencją, liczącej w pierwotnej wersji 12 pozycji, dołączyły w następnych latach kolejne, tworząc w 2017 roku grupę 29 indywidualnych związków chemicznych oraz mieszanin izomerów lub soli. Warto w tym miejscu podkreślić, że włączenie do tej listy polichlorowanych naftalenów jest w dużej mierze zasługą badań prowadzonych we wcześniejszych latach przez Promotora recenzowanej rozprawy doktorskiej - dr hab. Annę Kilanowicz-Sapota, prof. nadzw. UMED.

Tematyka badawcza podjęta przez Doktoranta jest zatem powiązana z naukowymi zainteresowaniami Promotora dzięki czemu mógł On liczyć na fachową pomoc na każdym etapie realizacji tej pracy doktorskiej.

Kolejny fragment rozprawy poświęcony jest właściwościom fizykochemicznym polichlorowanych naftalenów, obszarom ich zastosowania w przeszłości i obecnym źródłom ekspozycji dla populacji generalnej. Przedstawione są także wyniki monitoringu biologicznego dokumentujące jakościowo i ilościowo narażenie w populacjach w różnych krajach świata.



Skąpa literatura tematu powoduje, że rozdział poświęcony toksyczności jest stosunkowo krótki, gdyby porównać ilość danych z tymi dostępnymi chociażby dla polichlorowanych bifenyli a cytowane pozycje literaturowe datowane są na lata 50-70 ubiegłego wieku. Brak podstawowych danych toksykologicznych przy ekspozycji na wielokrotne dawki uzasadnia podjęcie tematu, gdyż narażenie na polichlorowane naftaleny podobnie jak na inne wycofane z produkcji i obrotu związki halogenoorganiczne może mieć istotne znaczenie dla zdrowia publicznego przez kolejne dziesiątki lat a brak rzetelnych danych uniemożliwia przeprowadzenie oceny ryzyka zdrowotnego.

Jednym z zasadniczych problemów metodologicznych w badaniach toksyczności substancji występujących komercyjnie jako mieszaniny kongenerów jest właśnie złożoność tych mieszanin oraz występowanie zanieczyszczeń, które niejednokrotnie mogą charakteryzować się innym profilem toksykologicznym niż główna substancja. Dotyczy to także polichlorowanych naftalenów, które mogą być zanieczyszczone strukturalnie podobnymi dioksynami. Niekontrolowana obecność zanieczyszczeń tego rodzaju lub nieuwzględnienie ich prawdopodobnej obecności na etapie interpretacji wyników nakazuje podchodzić z dużą rezerwą do doniesień pochodzących sprzed kilkudziesięciu lat, kiedy niedostępne były metody analityczne umożliwiające wiarygodną analizę. To zagadnienie zostało bardzo poważnie potraktowane przez Doktoranta, gdyż jednym z pierwszych etapów przygotowań do eksperymentów było przeprowadzanie analitycznej charakterystyki badanego związku. Heksachloronaftalen ze względu na brak możliwości zakupu z komercyjnego źródła, zsyntezowano na zamówienie w Zakładzie Chemii Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej uzyskując satysfakcjonujące parametry jakościowe: czystość powyżej 95% i około 5% zawartości 1,2,3,4,5,6,7-heptachloronaftalenu. Tożsamość potwierdzono technikami NMR, IR oraz GC-MS a zawartość dioksyn oznaczono metodą rozcieńczeń izotopowych z użyciem HRGC/HRMS, zgodnie z metodą EPA 1613. Produkt syntezy wykorzystany w badaniach zawierał dibenzo-*p*-dioksyny i dibenzofurany w stężeniu niższym niż 1 pg/mg. Brakuje w tym miejscu informacji o wartości granicy oznaczalności zastosowanej metody, gdyż z tego zapisu nie wynika czy wynosi ona właśnie 1 pg/mg.

Wybór związku modelowego – heksachloronaftalenu został przez autora dysertacji szczegółowo uzasadniony. To właśnie heksachloropochodne są najbardziej toksyczne wg dostępnej wiedzy i dominują ilościowo w tkankach pochodzących od człowieka. Planowane doświadczenia miały dostarczyć wyników wypełniających istotną lukę w danych toksykologicznych dotyczących toksyczności podprzewlekłej.



Plan doświadczenia był ambitny i obejmował:

- Podstawowe wskaźniki toksyczności ogólnoustrojowej; parametry stresu oksydacyjnego; ocenę indukcji wybranych cytochromów
- Badania histopatologiczne pobranych narządów
- Potencjalne działanie porfirogenne
- Wstępną ocenę genotoksyczności.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach a eksperymenty przeprowadzone zostały w zgodzie z wymogami ustawy o doświadczeniach na zwierzętach (Dz.U. 2005, nr 33, poz. 289, z późn. zm.) oraz Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych.

Doktorant przeprowadził dwa doświadczenia na zwierzętach. Pierwsze z nich o charakterze pilotażowym (ekspozycja 28-dniowa) przeprowadzono na 10 samicach, szczurach stada Wistar stosując ekspozycję dożołądkową. Wyniki tego doświadczenia miały posłużyć do wyznaczenia dawek do eksperymentu głównego – 90-dniowego z zastosowaniem tej samej drogi ekspozycji. Dobór 3 dawek przeprowadzono prawidłowo, tak aby najwyższa powodowała wyraźne efekty toksyczne natomiast przy najniższym poziomie ekspozycji nie spodziewano się istotnych efektów toksycznych.

Po zakończeniu ekspozycji zwierzęta skrwawiano w narkozie (CO₂) i pobierano materiał do badań: krew i narządy, z których przygotowywano homogenaty do oznaczeń biochemicznych oraz preparaty do badań histopatologicznych. Z kości udowych pobierano szpik kostny do wykonania testu mikrojądrowego. Szczegółowe opisy metodyk badawczych dowodzą, że realizacja założeń pracy wymagała od Doktoranta opanowania warsztatu analitycznego obejmującego techniki spektrofotometryczne oraz chromatograficzne. O ile w dysertacji można znaleźć parametry walidacyjne metody oznaczania porfiryn w moczu i homogenatach wątroby metodą UPLC-FLR to nie podano ich dla metod oznaczania MDA, białka, GSH i in. Warto byłoby umieścić w pracy wartości precyzji tych metod.

Wyniki badań pozwoliły na wskazanie wątroby jako narządu krytycznego, gdyż heksachloronaftalen powodował znaczącą indukcję enzymów mikrosomalnych, szczególnie izoformy CYP1A cytochromu P-450. Ponadto obserwowano hepatomegalię wraz z nasiloną peroksydacją lipidów oraz stłuszczenie wątroby. Badany związek hamował aktywność dehydratazy kwasu delta-



aminolewulinowego oraz dekarboksylazy uroporfirynogenu, enzymów szlaku syntezy hemu o znaczeniu diagnostycznym w porfirii. W efekcie inhibicji w wątrobie następowała kumulacja uroporfiryn.

Wyniki testu mikrojądrowego świadczą z kolei o braku właściwości genotoksycznych heksachloronaftalenu.

Najniższa z badanych dawek w badaniu toksyczności podprzewlekłej okazała się wystarczająca do wywołania efektów toksycznych i została uznana poprawnie jako LOAEL (ang. *lowest observed adverse effect level*), czyli najniższa dawka wywołująca efekty szkodliwe. Co istotne, wartość ta ze względu na długość ekspozycji (90 dni) może zostać wykorzystana w ocenie ryzyka zdrowotnego.

Na uwagę zasługuje fakt, że każdy etap pracy został starannie zaplanowany a jego podjęcie w pełni uzasadnione, co jest szczególnie ważne w projektach naukowych z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych. Przeprowadzone procedury doświadczalne nie budzą zastrzeżeń. Model zwierzęcy wykorzystany w tej pracy wymagał od Doktoranta ogromu pracy, opanowania trudnych umiejętności manualnych (codzienna opieka nad zwierzętami, wykonywanie procedur).

Doktorant w pełni zrealizował założone cele pracy a uzyskane wyniki mają dużą wartość poznawczą i stanowią cenny wkład w ogólną wiedzę o właściwościach biologicznych polichlorowanych naftalenów.

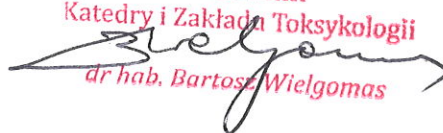
Na koniec chciałbym wyrazić uznanie za wyjątkowo staranne przygotowanie edytorskie rozprawy. Ta pozornie mało istotna kwestia jest przeze mnie doceniana i promowana, gdyż świadczy o dojrzałości autora i jego szacunku wobec odbiorców. W trakcie lektury pracy natknąłem się na zaledwie kilka niefortunnych zwrotów i błędów literowych, które pozwolę sobie pominąć w tej opinii i przekażę je osobiście Doktorantowi, gdyż te uwagi nie mają znaczenia dla ogólnej, merytorycznej oceny rozprawy.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr. farm. Michała Klimczaka bezsprzecznie wnosi elementy nowości naukowej, została zaplanowana, przeprowadzona i udokumentowana w sposób rzetelny. W mojej opinii praca spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora i wnoszę, za pośrednictwem Komisji Doktorskiej, do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o jej przyjęcie i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej
Katedra i Zakład Toksykologii

Ponadto, w oparciu o zapisy regulaminu wyróżniania prac doktorskich na Wydziale Farmaceutycznym ustanowionego Uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego w Łodzi z dnia 15 listopada 2016 roku, wnoszę do Wysokiej rady Wydziału Farmaceutycznego w Łodzi o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr. farm. Michała Klimczaka. Podstawą do wyróżnienia jest opublikowanie wyników dużej części rozprawy doktorskiej w czasopiśmie *Environmental Toxicology* (IF=2,937).

Kierownik
Katedry i Zakładu Toksykologii

dr hab. Bartosz Wielgomas