

dr hab. inż. Małgorzata Dżugan, prof UR

Zakład Chemii i Toksykologii Żywności
Instytut Technologii Żywności i Żywienia
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Rzeszowski
e-mail: mdzugan@ur.edu.pl, tel. 178721619

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Kingi Kowalik pt. *Oddziaływanie polichlorowanych bifenyli i ich hydroksylowanych metabolitów na syntezę i metabolizm jodotyronin w tarczycy i wątrobie kury (*Gallus domesticus*)*

wykonanej w Katedrze Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt
Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. H. Kołłątaja w Krakowie
pod kierunkiem Promotora *prof. dra hab. inż. Andrzeja Sechmana*

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie z dn. 25.03.2022r., powołujące się na uchwałę Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Wydziału z dn. 23.03.2022r.

Przedłożona do recenzji praca doktorska koncentruje się na porównaniu skutków i molekularnych mechanizmów toksycznego oddziaływania wybranych polichlorowanych bifenyli oraz ich hydroksylowanych metabolitów na funkcję endokrynną gruczołu tarczycowego i metabolizm jodotyronin w wątrobie w oparciu o eksperyment *in vitro* z wykorzystaniem tkanek kury domowej.

Ocena aktualności problematyki badawczej

Polichlorowane bifenyly (PCB) to grupa zanieczyszczeń środowiskowych pochodzenia antropogenicznego, obejmująca 209 kongenerów różniących się głównie miejscem podstawienia i ilością atomów chloru, warunkujących ich hydrofobowość i trwałość. Odporność na degradację chemiczną i biologiczną jest przyczyną występowania i biomagnifikacji PCB w środowisku, mimo ich wycofania z komercyjnej masowej produkcji oraz rygorystycznej utylizacji odpadów. PCB są znanymi czynnikami zaburzającymi gospodarkę hormonalną, należą do tzw. Endocrine Disruptor Chemicals, które mogą atakować różne układy hormonalne, w tym również gruczoł tarczycowy. Ich detoksykacja prowadzi do

powstawania hydroksylowanych metabolitów (OH-PCB), które ze względu na większą rozpuszczalność i trwałość mogą wykazywać zwiększoną toksyczność w porównaniu do związków macierzystych. Część PCB wykazuje aktywność hormonalną podobną do dioksyn (tzw. dl-PCB), przy czym wykazano, że ich hydroksylowane metabolity również mogą oddziaływać z receptorami estrogenów. Badanie toksyczności metabolitów jest szczególnie istotne w świetle danych potwierdzających narażenie na OH-PCB w żywności (nawet do 30% ogólnej zawartości PCB). Dostępne dane eksperymentalne, głównie dla gryzoni laboratoryjnych, dotyczą wpływu macierzystych PCB (rzadko ich metabolitów) na układ homeostatyczny tarczycy i sugerują ich toksyczność na różnych etapach metabolizmu w sposób zależny od budowy chemicznej kongenerów.

Z punktu widzenia zdrowia publicznego, powszechne narażenie na PCB wskazuje na potrzebę dogłębnego poznania potencjalnych negatywnych skutków związanych z macierzystymi kongenerami PCB i ich metabolitami. W tym aspekcie badania podjęte w recenzowanej pracy doktorskiej wpisują się w aktualny światowy trend zmierzający do wyjaśnienia mechanizmów toksyczności PCB.

Ocena formalna i merytoryczna pracy doktorskiej

Oceniana rozprawa doktorska składa się z 106-stronnicowego opracowania przygotowanego wg zasad właściwych pracom naukowym. Tytuł rozprawy dobrze oddaje treść pracy. Na początkowych stronach pracy zamieszczono informację o finansowaniu badań w ramach projektu Preludium 14, którym kierowała Doktorantka oraz o publikowaniu części prezentowanych badań w czasopiśmie *Gen. Comp. Endocrinol.* (2022, 318, 113989). Po spisie treści umieszczono 2-stronnicowe streszczenie w języku polskim i równoważne - w języku angielskim oraz bardzo obszerny wykaz skrótów (91) użytych w tekście. Zasadnicza część pracy obejmuje opracowane w odpowiednich proporcjach rozdziały: Wstęp (12 str), Hipotezy, cele i zadania badawcze (1 str), Materiał i metody (12 str), Wyniki (31 str), Dyskusja (9 str), Podsumowanie (2str), syntetyczne Wnioski (1 str). Należy podkreślić profesjonalne zawężenie zakresu rozważań teoretycznych, gdyż ponad 70% zasadniczej części pracy (po odliczeniu bibliografii i wykazów) stanowi jej część empiryczna.

Spis bibliografii wykorzystanej w opracowaniu obejmuje 121 publikacji (119 anglojęzycznych), starannie opracowanych, w tym 60% prac z ostatnich 10 lat. Spis tabel i rycin obejmuje 23 ryciny i 6 tabel, które stanowią odpowiednią dokumentację uzyskanych wyników. Praca napisana jest poprawnym językiem, z wykorzystaniem naukowej terminologii, w sposób przejrzysty i logicznie spójny, zwraca uwagę staranna forma graficzna.

W części teoretycznej (rozdz. 1) Autorka wprowadza czytającego w problematykę dotyczącą poruszanej tematyki, przedstawia uwarunkowania prowadzonych badań, co pozwala na zasygnalizowanie luki badawczej, której uzupełnienie stanowi główną przesłankę podjęcia badań. Wstęp jest podzielony na dwie części: pierwsza prezentuje zagadnienia związane z syntezą i metabolizmem hormonów tarczycowych, druga dotyczy przeglądu aktualnego stanu wiedzy dotyczącej toksyczności PCB i ich metabolitów. Na szczególne uznanie zasługują prezentowane w tej części pracy opracowania graficzne (fotografie i schematy), samodzielnie wykonane przez Autorkę.

W kolejnym rozdziale postawiono do weryfikacji 3 hipotezy badawcze dotyczące wpływu badanych ksenobiotyków na: 1) sekrecję jodotyronin z gruczołu tarczycowego i wątroby kury, 2) metabolizm jodotyronin w obu narządach oraz 3) ekspresję mRNA białek i enzymów uczestniczących w syntezie i metabolizmie hormonów tarczycy, białek transbłonowych transportujących hormony tarczycy w komórkach oraz receptorów hormonów w wątrobie. W celu weryfikacji postawionych hipotez badawczych określono 5 szczegółowych celów badawczych, a do ich realizacji wyznaczono 9 szczegółowych zadań badawczych.

Część metodyczna pracy przedstawiona w Rozdziale 3 zawiera opis zwierząt doświadczalnych oraz wykaz stosowanych odczynników. Układ 3 eksperymentów *in vitro* z wykorzystaniem eksplantów narządów kurzych (tarczycy, wątroba) eksponowanych na 4 badane ksenobiotyki opisano szczegółowo (rozdz. 3.3), a kombinację czynników i dawek narażenia zilustrowano na przejrzystych schematach (ryc. 6 i 7). Przyjęty model postępowania badawczego pozwolił na weryfikację postawionych hipotez merytorycznych. W Rozdziale 3.4 opisano szczegółowo stosowane metody analizy: stężenia jodotyronin T₃ i T₄ (RIA), stężenia dejodynaz DIO1,2,3 (ELISA) oraz genów (Real-Time qPCR). Warsztat badawczy zaprezentowany przez Autorkę jest imponujący, obejmuje wiele zaawansowanych metod molekularnych, a podane szczegóły odnośnie walidacji i kalibracji metod wskazują na doświadczenie i biegłość laboratoryjną. Na zakończenie tej części pracy określono metody analizy statystycznej wyników (ANOVA z testem post-hoc Tukey'a).

Najobszerniejszą część pracy stanowi rozdział „Wyniki”, podzielony na 2 części dotyczące badań nad wpływem badanych ksenobiotyków na gruczoł tarczycowy i wątrobę. W pierwszej części (rozdz. 4.1) przedstawiono wyniki dotyczące oceny wpływu polichlorowanych bifenyli (PCB118 i PCB153) i ich hydroksylowanych metabolitów (4-OH-PCB107 i 3-OH-PCB153) na wydzielanie hormonów T₄ i T₃ oraz stężenie 3 dejodynaz jodotyroninowych w zależności od dawki (w zakresie od 10⁻⁹ do 10⁻⁵ M) i czasu ekspozycji na toksyny (6 i 24 godz). Oceniono także ekspresję mRNA genów biorących udział w syntezie

hormonów tarczycowych, ich metabolizmie i transporcie. W Rozdziale 4.2 przedstawiono wyniki eksperymentu *in vitro* dla wątroby kur, obejmujące sekrecję T3, konwersję T4 do T3, stężenie dejodynaz oraz ekspresję mRNA głównych genów kodujących białka enzymów, transporterów transbłonowych, hormonów i receptorów zaangażowanych w ekspresję genów. W badaniach uwzględniono wpływ stymulacji TSH na aktywność eksplantów tarczycy oraz inhibicji dejodynaz (DEX) w wątrobie.

Wyniki eksperymentów *in vitro* wykazały, że wszystkie zastosowane PCB i ich metabolity OH-PCB wpływały na procesy syntezy i dejodynacji hormonów w gruczole tarczycy. Ekspozycja na badane ksenobiotyki wpływała na ekspresję mRNA zarówno białek uczestniczących w syntezie hormonów w gruczole tarczycowym (NIS, TPO i TG, DIO), jak i dejodynaz w wątrobie. Badane ksenobiotyki wywoływały zmiany ekspresji transporterów błonowych jodotyronin przez błonę tyreocytów i hepatocytów, co może skutkować zmianami w ich uwalnianiu do krwiobiegu. Wyniki potwierdziły, że nie tylko macierzyste PCB, ale także ich hydroksylowane metabolity są niebezpieczne dla tarczycy i mogą zaburzać jej funkcję endokrynną.

W końcowej części pracy (*Podsumowanie*) Doktorantka w sposób syntetyczny podsumowała rezultaty osiągniętych badań. Z trudnego zadania, wymagającego interpretacji olbrzymiego zbioru danych, wywiązała się znakomicie formułując 5 skondensowanych wniosków, wpływających z przeprowadzonych badań i będących równocześnie odpowiedzią na postawione do realizacji tezy. Wnioskowanie końcowe wskazuje, że założony do realizacji cel badawczy został osiągnięty w pełni.

W trakcie oceny pracy nasunęły mi się spostrzeżenia, do których mam nadzieję Doktorantka ustosunkuje się podczas obrony:

1. Czy obserwowany brak dawkozależności efektu toksycznego (tab. 5 i 6) może być konsekwencją słabej rozpuszczalności PCB (lepszego OH-PCB) w medium hodowlanym?
2. Czy uzyskane wyniki potwierdzają większą toksyczność i odmienny mechanizm oddziaływania kongenerów dl-PCB i ich hydroksylowanych metabolitów?
3. Jakie są podobieństwa w gospodarce hormonalnej tarczycy ptaków i człowieka? Czy uzyskane wyniki mogą wskazywać na prawdopodobny mechanizm toksyczności PCB i ich metabolitów u ludzi? Jak można ograniczyć narażenie ludzi na te ksenobiotyki?

Z obowiązku recenzenta należy wymienić nieliczne błędy i niedociągnięcia, które pojawiają się w pracy, jak. np.:

- niepoprawny wzór 3-OH-PCB153 (str 27, ryc. 5),
- ilość kur użytych w doświadczeniu (podano 40, użyto 38?) (str 31),
- brak określenia sposobu przygotowania eksplantów (ich wielkości, masy) (str 31),
- brak określenia sposobu wprowadzania dioksyn do podłoża Eagle'a (str 32),
- sformułowanie „białka oznaczano metodą Bradforda z BSA jako standardem” lepiej brzmi „białka oznaczano metodą Bradforda, stosując BSA do kalibracji metody” (str 37)
- wyniki raczej „wyrażono” niż „przedstawiono” na pg lub ng białka (str 38)
- niepełny zapis poz. 58 Bibliografii.

W związku z olbrzymią liczbą wyników eksperymentalnych i obliczeń, ich przedstawienie stanowiło spore wyzwanie edytorskie, stąd uwagi te nie mają znaczenia dla oceny merytorycznej rozprawy.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Problematyka badawcza poruszana w przedstawionej do oceny pracy dotyczy toksycznego oddziaływania dwóch modelowych kongenerów PCB oraz ich hydroksylowanych metabolitów na funkcję endokrynną gruczołu tarczycowego, transport i metabolizm jodotyronin w wątrobie. Zastosowany model badawczy i analiza porównawcza efektów toksyczności związków macierzystych i ich metabolitów sprawiają, że prezentowane wyniki są unikatowe i stanowią doskonałe uzupełnienie luki badawczej w nauce światowej. Ponadto, wyniki zostały omówione i przeanalizowane z dostępną literaturą na dobrym poziomie naukowym, co świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. Obszerny zakres przygotowanej rozprawy wskazuje na Jej biegłość laboratoryjną, zdolności organizacyjne i pracowitość. Na uznanie zasługuje fakt, że na finansowanie badań pozyskała grant NCN Preludium.

Podsumowując stwierdzam, że dysertacja mgr Kingi Kowalik spełnia wszystkie wymagania ustawowe stawiane pracom na stopień doktora (art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14.03.2003r. Dz.U.nr 65, poz.595, z późn. zm. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki) i wnoszę do Rady Dyscypliny *Nauki Biologiczne* Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Kingi Kowalik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoki poziom naukowy recenzowanej rozprawy, wieloaspektowość przeprowadzonych badań oraz wartość publikacyjną uzyskanych wyników przedkładam Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie powyższej pracy.

Rzeszów, dnia 7 maja 2022


dr hab. inż. Małgorzata Dżugan, prof. UR