WARSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY

ZAKŁAD TOKSYKOLOGII I BROMATOLOGII

Warszawa, 23 maja 2024 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Jakuba Maculewicza

Zatytułowanej: „Biokoncentracja związków chemicznych obdarzonych ładunkiem – analityka, ocena metodami *in vitro* oraz *in vivo*".

Wykonanej pod kierunkiem dr hab. inż. Anny Białk-Bielińskiej, prof. UG, w Katedrze Analizy Środowiska, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Gdańskiego.

Recenzja została przygotowana na zlecenie Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Gdańskiego w oparciu o art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z poźn. zm.), dotyczący wymagań stawianych rozprawom doktorskim.

Podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora jest spójny tematycznie cykl 7 wieloautorskich prac: 3 przeglądowych oraz 4 oryginalnych opublikowanych w latach 2020-2024. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach o bardzo wysokiej pozycji naukowej: Journal of Hazardous Materials (Q1, IF=13,6, 200 pkt. MEiN), Science of the Total Environment (Q1, IF=9,8, 200 pkt. MEiN), Talanta (Q1, IF=6,6, 100 pkt. MEiN) oraz Biochimica et Biophysica Acta-Biomembrans (Q2, IF=3,4, 100 pkt. MEiN). Sumaryczny współczynnik oddziaływania dla tych prac wynosi 62 i odpowiada 1200 pkt. MEiN, co jest wynikiem imponującym jak na rozprawę doktorską. W 6 pracach Pan mgr Jakub Maculewicz jest pierwszym autorem, a w siódmej pracy – autorem korespondencyjnym, co wskazuje na znaczny wkład Doktoranta nie tylko w wykonanie badań, ale także przygotowanie publikacji. Prace składające się na rozprawę doktorską były cytowane 90 razy (Web of Science; stan na 22.05.2024), co świadczy o bardzo wysokiej randze czasopism, ale także o tym, że rozprawa doktorska porusza aktualną tematykę naukową.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy poprzedzone są 50-stronicowym opracowaniem, w którym Doktorant w syntetyczny sposób przedstawił najważniejsze zagadnienia ze swojej rozprawy doktorskiej, zarówno z części teoretycznej (publikacji

ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
www.toksykologia.wum.edu.pl

przeglądowych), jak i doświadczalnej (publikacji oryginalnych). Na końcu umieścił oświadczenia wszystkich współautorów publikacji.

Badania ekotoksykologiczne związków chemicznych stanowiących zanieczyszczenie środowiska przyrodniczego obejmują szereg analiz, od wykrywania ich w różnych przedziałach środowiskowych (woda, ścieki, osad denny, gleba) po analizy toksyczności dla podstawowych grup organizmów. Procesy biokoncentracji, bioakumulacji oraz biomagnifikacji odgrywają bardzo istotną rolę w ekosystemach, a ich analiza jest niezbędna w ocenie długotrwałego oddziaływania substancji chemicznych na organizmy żywe. Europejska Agencja Leków zaleca, aby wszystkie substancje czynne leków o wysokim potencjale do bioakumulacji podlegały ocenie zarówno toksyczności chronicznej, jak i trwałości w środowisku. Jednocześnie, jako kryterium zaliczenia do tej grupy substancji, wskazuje jedynie na współczynnik podziału oktanol/woda. Mgr Jakub Maculewicz w pracy przeglądowej **P1** stanowiącej wstęp do rozprawy doktorskiej (J.Maculewicz et al. Sci Total Environ 2020, 739:140261) wskazał na konieczność rewizji tego kryterium. Z jednej strony, ksenobiotyki mogą gromadzić się nie tylko w tkankach o wysokiej zawartości niepolarnych lipidów w skutek oddziaływań hydrofobowych, ale także wiązać się z białkami i fosfolipidami. W tych przypadkach ważną rolę mogą odgrywać inne rodzaje oddziaływań międzycząsteczkowych. Po drugie, wśród ksenobiotyków wykrywanych w środowisku przyrodniczym dużą grupę stanowią związki chemiczne obdarzone ładunkiem i w ich przypadku, w procesie biokoncentracji dużo ważniejszą rolę mogą odgrywać inne rodzaje oddziaływań. Z uwagi na bardzo dużą liczbę ksenobiotyków, a także problemy etyczne i ekonomiczne związane ze stosowaniem testów na rybach zalecanych przez OECD (OECD 305), coraz częściej w badaniach biokoncentracji wykorzystywane są analizy *in vitro* wykorzystujące odpowiedne fazy sorpcyjne. Doktorant dokonał systematycznego przeglądu tych testów, ukazując ich wady i zalety.

W kolejnych dwóch publikacjach przeglądowych (publikacja **P2:** Maculewicz et al. J Hazard Mater 2022, 437:129353 oraz **P3:** Maculewicz et al. Sci Total Environ 2022, 802:149916) Doktorant zaprezentował dwie grupy ksenobiotyków: ciecze jonowe i produkty przemian leków, będące przedmiotem badań eksperymentalnych prowadzonych w części doświadczalnej doktoratu. Ciecze jonowe są solami mającymi w strukturze złożone kationy organiczne oraz nieorganiczne lub organiczne aniony. Ich szerokie zastosowanie w różnych obszarach działalności człowieka wiąże się nie tylko z unikalnymi właściwościami fizykochemicznymi, ale także przekonaniem o ich znikomej szkodliwości dla środowiska. Zainteresowanie badaczy substancjami czynnymi leków wywołane ich bardzo silnym działaniem toksycznym na organizmy wodne, a także lawinowo rosnącym spożyciem na wszystkich kontynentach, skupione jest od ponad 40 lat, przede wszystkim, na związkach macierzystych. Natomiast produkty przemian abiotycznych i biotycznych leków są badane dopiero od niedawna. Wybór tych grup był nieprzypadkowy. Do obu należą związki obdarzone ładunkiem. Są coraz częściej wykrywane w środowisku, a ich biokoncentracja w organizmach żywych, podobnie jak toksyczność, są słabo zbadane i trudne do przewidzenia. **Uważam taki wybór przedmiotu badań za słuszny i w pełni uzasadniony**. Aktualność wyboru tych dwóch grup ksenobiotyków potwierdza wysoka

cytowalność prac przeglądowych, wynosząca wg bazy Web of Science 27 (P2) oraz 51 (P3) cytowań (22.05.2024).

W części doświadczalnej Pan mgr Jakub Maculewicz wykonał szereg badań wybranych 27 cieczy jonowych oraz 7 produktów transformacji leków. Dobór cieczy jonowych nie budzi wątpliwości. Różna długość łańcucha alifatycznego w kationach, różne aniony w połączeniu z tymi samymi kationami i *vice versa* dają możliwość wyciągnięcia bardziej ogólnych wniosków dotyczących zależności badanego parametru (toksyczności, biokoncentracji itp.) od struktury związku. Natomiast wybór produktów transformacji leków wydaje się przypadkowy. Dlaczego, spośród tysięcy metabolitów i produktów przemian leków wybrano te właśnie 7 związków?

W pierwszym etapie badań Doktorant opracował i zwalidował metody oznaczania chromatograficznego z detekcją spektrofotometryczną wszystkich kationów cieczy jonowych wybranych w pracy (**publikacja P4**: Maculewicz et al. BBA-Biomembranes 2024, 1866:184320). W badaniach powinowactwa cieczy jonowych oraz produktów transformacji leków do błon komórkowych zastosował gotowe testy mikropłytkowe wykorzystujące lipidy osadzone na stałym nośniku (SSLM), czyli metodę, którą wcześniej opisał w pracy P1 jako szybką metodę przesiewową, przydatną w celu otrzymania danych dla modeli matematycznych. Zgodnie z przeznaczeniem tych testów zespół badawczy porównał wyniki doświadczalne z wynikami uzyskanymi w modelu COSMOmic przeznaczonym do przewidywania oddziaływania związków chemicznych z błonami biologicznymi. Współpraca w międzyośrodkowym zespole badawczym umożliwiła Doktorantowi szersze spojrzenie na analizowany problem naukowy.

Poszerzone w stosunku do publikacji P4 badania przeprowadzono dla produktów transformacji leków. Oprócz analizy powinowactwa do błon biologicznych (fosfolipidów), zbadano wiązanie analitów z modelowymi białkami albuminą oraz kwaśną glikoproteiną (**publikacja P5**: Kowalska et al. Sci Total Environ 2021, 783:146987). Umożliwiło to kompleksowe zbadanie bioakumulacji tych ksenobiotyków w modelu *in vitro*, nie tylko wskutek oddziaływań hydrofobowych, ale także elektrostatycznych. Jest to podejście nowatorskie, rzadko stosowane w analizach ekotoksykologicznych dotyczących biokoncentracji/bioakumulacji, w których badacze skupiają się jedynie na oddziaływaniach niepolarnych, z lipidami. Każda substancja czynna leków posiada dane farmakologiczne i farmakokinetyczne dotyczące wiązania z białkami (np. baza drugbank.com). W publikacji P5 zabrakło odniesienia się autorów do tych danych. Interesujące wydaje się także porównanie uzyskanych danych eksperymentalnych dotyczących produktów transformacji leków z danymi dla substancji macierzystych. Czy potencjał do biokoncentracji poprzez wiązanie z białkami także się zmniejsza, podobnie jak lipofilność produktów metabolizmu leków? Dodatkowo pojawia się pytanie, dlaczego w Tabeli 2 publikacji P5 zamieszczono wartości log Kow, a nie wartości współczynnika podziału skorygowanego pH? Jego wartość wskazałaby na lipofilność ocenianych związków w stosowanym w pracy medium PBS o pH=7,4.

Analiza zastosowanych metod badawczych w publikacjach 4 oraz 5 rodzi dwie grupy pytań. Po pierwsze, czy wyniki uzyskane dla analitów rozpuszczonych w PBS (buforowanym

roztworze 0,9% NaCl) mogą być przeniesione do warunków występujących w środowisku wodnym i organizmów w nim bytujących? Po drugie, wszystkie analizy prowadzono w pH=7,4. Natomiast w środowisku, zwłaszcza eutroficznym oraz lekko zasolonym pH jest zwykle wyższe i czasem nawet przekracza wartość 8,0. Czy takie zmiany pH mogą wpływać na uzyskane wyniki? Czy ten parametr powinien być uwzględniony w modelach matematycznych?

Większość badaczy zajmujących się analizą losów ksenobiotyków w środowisku skupia się na pracy laboratoryjnej na modelach *in vitro* albo analizach *in vivo*. Pan mgr Jakub Maculewicz w ostatnich dwóch pracach należących do cyklu (**publikacja P6**: Maculewicz et al. Talanta 2023, 12:3790 oraz **publikacja P7**: Maculewicz et al. Sci Total Environ 2023, 858:159388) podjął się trudnego zadania oceny biokoncentracji wybranych kationów imidazoliowych w tkankach małży pobranych z Zatoki Gdańskiej. Oznaczanie tych analitów w matrycy biologicznej wymagało opracowania właściwej metody ekstrakcji do fazy stałej, a następnie metody oznaczania techniką UHPLC z detekcją MS/MS. Doktorant rozwiązał wszystkie problemy analityczne związane zarówno z różnorodnością analitów (długość łańcucha alifatycznego od 10 do 18 atomów węgla), jak i efektem matrycowym utrudniającym analizy na poziomie śladów. Metoda została prawidłowo zwalidowana. Uzyskane wyniki wskazują na możliwą biokoncentrację niektórych kationów z cieczy jonowych, zależną, w różnym stopniu dla różnych związków, od poziomu zasolenia badanych roztworów.

Podsumowując merytoryczną ocenę rozprawy uważam, **że zaplanowany zakres badań został w pełni zrealizowany. Za najważniejsze osiągnięcia, a jednocześnie elementy mające duży wpływ na rozwój dziedziny naukowej, uważam**:

1. Opracowanie i walidację nowych metod analitycznych dotyczących oceny ilościowej kationów cieczy jonowych w różnych matrycach, w tym w matrycy biologicznej, na poziomach ng/g;
2. Ocenę powinowactwa cieczy jonowych do fosfolipidów i wykazanie, że kluczowym parametrem jest długość łańcucha węglowodorowego;
3. Poruszenie tematu i wykonanie wstępnej oceny powinowactwa produktów przemian substancji czynnych leków do białek;
4. Wykazanie w eksperymencie *in vivo* możliwości biokoncentracji kationów imidiazolowych w tkankach małży.

Podkreślić należy właściwy układ prac w cyklu rozprawy doktorskiej. Zawarte w pracach teoretycznych tezy stanowiły przesłanki do realizacji eksperymentów badawczych. Prace doświadczalne realizowane były w logicznym ciągu od przygotowania warsztatu badawczego, przez eksperymenty *in vitro*, po eksperymenty *in vivo*.

Część teoretyczna pracy **wskazuje na dobrą znajomość przez Doktoranta aktualnych problemów badawczych w obszarze ekotoksykologii, wyzwań stojących przed naukowcami i praktykami wobec rosnącej świadomości etycznej prowadzącej do ograniczenia w badaniach liczby kręgowców, w tym ryb.**

Natomiast część doświadczalna pracy wskazuje na umiejętność posługiwania się nowoczesnymi technikami chemii analitycznej, a także, co jest bardzo istotne w pracy badawczej, umiejętność pracy w zespole i korzystania z wiedzy i doświadczenia innych zespołów naukowych.

Wniosek końcowy

Podjęty przez Doktoranta temat stanowi bardzo aktualne zagadnienie z punktu widzenia ekotoksykologii i chemii środowiskowej i wpisuje się w trend poszukiwania metod alternatywnych w stosunku do stosowanych obecnie badań na kręgowcach. Przedstawione uwagi krytyczne nie umniejszają mojej bardzo wysokiej i pozytywnej oceny całości pracy. Oceniana rozprawa doktorska stanowi oryginalny i indywidualny wkład Doktoranta w rozwój nauk chemicznych i środowiskowych i spełnia wszystkie wymagania zawarte w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (z poźn. zm.). Mając na uwadze wszystkie powyższe fakty, z pełnym przekonaniem składam wniosek do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych Uniwersytetu Gdańskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej mgr. Jakuba Maculewicza i dopuszczenie go do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki dorobek naukowy Doktoranta wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauk Chemicznych UG o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

prof. dr hab. Grzegorz Nałęcz-Jawecki