



UNIWERSYTET
O P O L S K I

WYDZIAŁ CHEMII

ul. Oleska 48, 45-052, Opole
tel. 077 452 71 00
fax 077 452 71 01
chemia@uni.opole.pl
www.chemia.uni.opole.pl

Prof. zw. dr hab. inż. Piotr P. Wieczorek
e-mail: Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl

Opole, 2019-08-16

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Karoliny Czarny

z tytułu

„Wpływ hormonów na fitoplankton oraz metody ich oznaczania w środowisku wodnym”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Karoliny Czarny została wykonana w Pracowni Zagrożeń Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Sławomiry Skrzypek, prof. UŁ, dr hab. Renaty Gadzały-Kopciuch, prof. UMK z Uniwersytetu im. Mikołaja Kopernika w Toruniu jako kopromotora i dra Dominika Szczukockiego z Uniwersytetu Łódzkiego jako promotora pomocniczego. Przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej są zagadnienia związane z określeniem wpływu hormonów na organizmy wodne oraz metod ich oznaczania w próbkach środowiskowych.

We wszystkich elementach środowiska (w wodach, glebie, powietrzu, tkankach organizmów żywych) wykrywana jest cała gama różnorodnych związków chemicznych, będących ksenobiotykami. Związane jest to przede wszystkim z coraz większym postępowaniem gospodarczym, rozwojem przemysłu i rolnictwa. Obecność tych substancji może negatywnie wpływać na rozwój i funkcjonowanie organizmów oraz przyczynić się do rozwoju wielu chorób. W ciągu ostatnich lat coraz częściej zwraca się uwagę na możliwość oddziaływania niektórych substancji na układ hormonalny i rozrodczy, a także ich wpływ na płodność oraz nieprawidłowości w budowie i działaniu narządów płciowych. Związki takie, zakłócające funkcjonowanie układu dokrewnego, określa się mianem związków endokrynologicznie czynnych (*Endocrine Disrupting Compounds*, EDCs). Stanowią one dużą grupę substancji,

które ze względu na podobieństwo strukturalne do endogennych hormonów steroidowych, wykazują zdolność wiązania się z odpowiednimi receptorami i zakłócają funkcjonowanie układu dokrewnego. Są one wszechobecne w środowisku, zdolne do bioakumulacji i wykazują aktywność biologiczną już w niewielkim stężeniu. Na szczególną uwagę wśród tych związków zasługują naturalne i syntetyczne hormony stosowane jako leki i środki antykoncepcyjne oraz w leczeniu i do poprawy produktywności zwierząt. Ich negatywny wpływ na organizmy żywe jest bezsporny dlatego też niezbędne są badania dotyczące skutków ekspozycji organizmów wodnych na działanie hormonów oraz opracowywanie skutecznych metod ich oznaczania i stałego monitorowania w środowisku.

By w efektywny sposób monitorować obecność hormonów, należy uwzględnić fakt, iż próbki rzeczywiste (takie jak wody powierzchniowe), w których związki te są obecne, odznaczają się złożonym składem matrycy, w której często poziom innych substancji przewyższa stężenie analitów. Ponieważ stosowane do tej pory metody przygotowania próbek wciąż posiadają pewne wady i ograniczenia, poszukuje się nowych, lepszych lub modyfikuje metody już istniejące.

Dlatego też zrozumiałym jest fakt, że celem rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Czarny, było określenie wpływu naturalnych i syntetycznych hormonów steroidowych na wzrost sinic i zielenic, jako modelowych przedstawicieli fitoplanktonu, a w drugiej części opracowanie efektywnej procedury oznaczania tych związków w próbkach środowiskowych. Do tego celu zastosowała selektywne polimery z odciskiem molekularnym do ekstrakcji i wzbogacania oznaczanych analitów z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Oceniana rozprawa nie została napisana w klasycznym układzie pracy doktorskiej i zgodnie z przepisami opublikowanymi w Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz. 455, art. 13, ust. 2 stanowi spójny tematycznie zbiór 5 artykułów, w tym jednego artykułu przeglądowego i jednego po recenzjach w redakcji czasopisma, opublikowanych w prestiżowych międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (IF), poprzedzony spisem rysunków i tabel, wykazem skrótów i akronimów, autoreferatem, podsumowaniem, streszczeniem, wykazem cytowanej literatury, przedstawieniem sylwetki ze spisem dorobku naukowego Autorki rozprawy i oświadczeniami współautorów. Przedstawiony w dokumentacji dorobek naukowy zawiera również publikacje, które nie wchodzi w skład rozprawy doktorskiej (5 prac). Łącznie jest to **aż osiem** publikacji w

czasopismach z listy Filadelfijskiej i 1 publikacja spoza tej listy, 3 rozdziały w monografiach, 1 zgłoszenie patentowe oraz aż 84 doniesienia konferencyjne, w tym 10 komunikatów ustnych, ale aż 67 w sesjach, konferencjach i sympozjach doktorantów. Taka „aktywność konferencyjna” budzi moje wątpliwości, ponieważ wymaga to jednak jakiegoś nakładu pracy i czasu. Moim zdaniem jest to, w pewnym sensie, podejście podobne do zbierania znaczków. Co nie znaczy, że nie doceniam szerokiego spektrum zainteresowań Doktorantki. Pomimo tego uważam, że osiągnięcia te są imponujące, a sumaryczny IF tych publikacji wynosi 25,085, przy czym sumaryczny IF 5 prac wchodzących w skład rozprawy to 20,577. Recenzent jest pod wrażeniem tak wartościowego dorobku Doktorantki osiągniętego w krótkim przecież czasie czterech lat studiów doktoranckich.

Autoreferat rozpoczyna „Wstęp” będący krótkim przedstawieniem literatury przedmiotu zawierający omówienie naturalnych i syntetycznych hormonów, ich zastosowania, występowania w środowisku, negatywnym wpływie na organizmy wodne oraz sposobów ich oznaczania, co zostało szczegółowo opisane w pracy przeglądowej wchodzącej w zakres rozprawy. Zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim ta część pracy świadczy o trafnym doborze treści i nie budzi zastrzeżeń. Część literaturowa poparta jest dobrze dobranymi cytacjami z literatury. Zwieńczeniem tego krótkiego wstępu jest przedstawienie celu pracy. Cel ten dzieli się na dwie części. Pierwsza z nich dotyczy określenia wpływu naturalnych i syntetycznych hormonów na wzrost wybranych sinic (*Anabena variabilis*, *Microcystis aeruginosa*) i zielenic (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus armatus*). Natomiast celem części drugiej jest opracowanie i walidacja procedury analitycznej oznaczania hormonów z wykorzystaniem polimerów z odciskiem molekularnym do ich wydzielenia.

W części pracy zatytułowanej „Materiały i metody badawcze” mgr K. Czarny przedstawia procedury badania wpływu hormonów na wzrost fitoplanktonu, hodowlę sinic i zielenic, sposoby wykonywania testów toksykologicznych i statystycznej analizy wyników. Następnie opisuje sposób opracowania procedury analitycznej użytecznej w analizie hormonów rozpoczynając od optymalizacji metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej, po czym ekstrakcję z wykorzystaniem polimerów z odciskiem molekularnym oraz walidację procedury wydzielenia i oznaczania hormonów w próbkach wodnych.

Kolejna część pracy zawiera otrzymane wyniki wraz z ich dyskusją. W pierwszym kolejności omawia i dyskutuje wyniki badań wpływu pojedynczych hormonów na wzrost

wymienionych wcześniej organizmów, a następnie trzech mieszanin wybranych hormonów. Uzyskane wyniki potwierdziły toksyczne działanie w stosunku do badanych organizmów, zarówno pojedynczych hormonów jak i, co oczywiste, ich mieszanin. Najsilniejszy efekt toksyczny wykazały 17 α -etynyloestradiol (EE2) i progesteron o średnich wartościach EC₅₀ w zakresie 79-104 mg/l. Natomiast badania toksyczności mieszanin wykazały, że zależy ona od składu mieszaniny i jest najwyższa dla mieszanin najbardziej toksycznych hormonów, a ponadto wykazały synergistyczne działanie tych związków. Dla mieszaniny składającej się z najbardziej toksycznego estrogenu EE2, progesteronu i androgeny średnie wartości EC₅₀ wynosiły bowiem 37-74 mg/l. Uzyskane wyniki potwierdzają zatem to, iż pomimo braku układu hormonalnego w badanych organizmach, związki te mogą ograniczać wzrost fitoplanktonu. Uzyskane wyniki wpływu hormonów na fitoplankton przedstawiła w trzech pracach, z których dwie już się ukazały, a trzecia jest po recenzjach.

Ponieważ toksyczność hormonów wobec organizmów wodnych zależy od ich stężenia niezbędne są efektywne procedury ich wydzielenia i oznaczania w wodach powierzchniowych. Dlatego też mgr Karolina Czarny w drugiej części swojej dysertacji zajęła się opracowaniem efektywnej procedury oznaczania badanych hormonów w próbkach wodnych. Ze względu na występowanie tych związków w wodach powierzchniowych o złożonym składzie i w niskich stężeniach, poniżej poziomu detekcji urządzeń analitycznych, procedura taka musi zawierać metodę wydzielenia, oczyszczania i wzbogacania analitów w próbce. Do tego celu Autorka zastosowała, charakteryzujące się wysoką selektywnością, polimery z odciskiem cząsteczkowym naniesione na porowate żele krzemionkowe. Do tego celu zastosowała sześć różnych sorbentów różniących się wielkością porów krzemionki użytej do naniesienia warstwy polimeru z odciskiem molekularnym (MIP) i zastosowaniem 17 β -estradiolu jako wzorca. Wszystkie testowane sorbenty charakteryzowały się wysoką precyzją, w zakresie 4-6 % i dobrymi odzyskami wynoszącymi od 79% do 101% i były porównywalne lub wyższe od danych literaturowych. Zbadła również efekt matrycowy i udowodniła, że w procedurze z zastosowaniem HPLC-DAD do oznaczania tych związków, nie ma on istotnego wpływu ponieważ uzyskane sygnały analityczne różnią się mniej niż 20%. Następnie przeprowadziła walidację testowanej metody dla sześciu hormonów steroidowych określając zakres liniowości, LOD i LOQ. Wykazała zatem użyteczność opracowanej metody do oznaczania hormonów w próbkach wody środowiskowej. Wyniki te opublikowała w kolejnej pracy będącej podstawą Jej rozprawy.

Otrzymane wyniki i wynikające z nich wnioski Pani mgr Karolina Czarny krótko omawia i komentuje w części zatytułowanej „Podsumowanie”.

Nie mam większych zastrzeżeń i uwag dotyczących zarówno samej rozprawy, jak i merytorycznej strony publikacji przedstawionych do oceny jako rozprawa doktorska. Prace te zostały bowiem gruntownie ocenione przed opublikowaniem przez odpowiednich recenzentów, tym bardziej że zostały opublikowane w czasopismach o wysokiej renomie. W tym miejscu chciałbym jednak wyrazić uznanie Autorce rozprawy za podjęcie się realizacji trudnej, interdyscyplinarnej tematyki. Na uwagę zasługuje również Jej umiejętność współpracy z wieloma osobami i w różnym zakresie tematycznym.

Niemniej jednak ma jedną uwagę:

- Dlaczego Autorka wyraźnie nie określa, czy MIPy syntezowała osobiście, czy też otrzymała je od Pani Prof. Gadzały-Kopciuch. Takiej informacji nie można znaleźć w autoreferacie, jak i w pracy opublikowanej w *Journal of Separation Science* dotyczącej tego zakresu badań. Z przedstawionych oświadczeń współautorów wynika bowiem, że udział wszystkich współautorów polegał na konsultacjach naukowych, udziale w interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptów.

Na podstawie lektury publikacji wchodzących w skład rozprawy mogę stwierdzić, że Doktorantka sprawnie posługuje się językiem angielskim. Na uwagę zasługuje również fakt, iż autoreferat jest dobrze napisany i zawiera tylko nieliczne drobne błędy. Te, które znalazłem wymieniam poniżej:

- str. 26; „za pomocą”, a nie „przy pomocy”

- str. 34; powinno być: „...związki zakłócające...”

Str. 38; powinno być: „Podsumowując tę część...”

Podsumowując chciałbym stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska reprezentuje wysoki poziom badań i zawiera wiele elementów nowości naukowej. Zakres badań, zawarte w niej wyniki doświadczalne, sposób interpretacji oraz wnioskowania wskazują, że mgr Karolina Czarny wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia interesujących badań naukowych i wniosła istotny wkład w rozwój badań środowiskowych z

zakresu chemii i toksykologii, a szczególnie nad określeniem toksyczności związków organicznych występujących w środowisku wodnym oraz procedur analitycznych użytecznych w ich oznaczaniu. Po zapoznaniu się z rozprawą mgr Karoliny Czarny **stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszelkie wymagania stawiane w Ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych rozprawom doktorskim i wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie, mając na względzie wysoki poziom merytoryczny rozprawy, czego dowodem jest opublikowanie wyników w prestiżowych międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (IF), wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy. Wniosek ten dodatkowo wzmacnia znaczący dorobek naukowy i organizacyjny mgr Karoliny Czarny,

T. Winiogorel