

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Klaudii Świackiej „Los środowiskowy i ocena toksyczności wybranych farmaceutyków i ich metabolitów z wykorzystaniem *Mytilus trossulus* jako gatunku modelowego”

Pani mgr Klaudia Świacka przygotowała rozprawę doktorską w Zakładzie Funkcjonowania Ekosystemów Morskich pod kierunkiem promotora – dr hab. Katarzyny Smolarz prof. UG.

Rozprawę doktorską stanowi cykl siedmiu publikacji. Chciałabym na początku zaznaczyć, że w materiale otrzymanym do recenzji znajdowało się 6 publikacji: przez pomyłkę Doktorantka zamieściła dwukrotnie publikację 2 zamiast publikacji 3, co nie wpłynie na poniższą recenzję. Poniżej zestawiono publikacje zgodnie z kolejnością w rozprawie, a w nawiasach podano liczbę ich cytowań (na dzień 19.07.2023).

1. Mytilidae as model organisms in the marine ecotoxicology of pharmaceuticals - A review. Environ Pollut. 2019;254:113082. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113082.

(30)

2. Effects of environmentally relevant concentrations of diclofenac in *Mytilus trossulus*. Sci Total Environ. 2020;737:139797. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139797.

(18)

3. Toxic effects of NSAIDs in non-target species: A review from the perspective of the aquatic environment. Environ Pollut. 2020;273:115891. doi: 10.1016/j.envpol.2020.115891.

(44)

4. Exposure of *Mytilus trossulus* to diclofenac and 4'-hydroxydiclofenac: Uptake, bioconcentration and mass balance for the evaluation of their environmental fate. Sci Total Environ. 2021;791:148172. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.148172.

(4)

5. Presence of pharmaceuticals and their metabolites in wild-living aquatic organisms - Current state of knowledge. J Hazard Mater. 2022;424:127350. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.127350.

(29)

6. A multi-biomarker approach to assess toxicity of diclofenac and 4-OH diclofenac in *Mytilus trossulus* mussels - First evidence of diclofenac metabolite impact on molluscs. Environ Pollut. 2022;315:120384. doi: 10.1016/j.envpol.2022.120384.

(0)

7. Long-term stability of diclofenac and 4-hydroxydiclofenac in the seawater and sediment microenvironments: Evaluation of biotic and abiotic factors. Environ Pollut. 2022 Jul 1;304:119243. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119243.

(2)

Doktorantka poprzedziła zebrane publikacje wprowadzeniem, na które składa się Streszczenie, Cele pracy, Materiał i metody, Wyniki i Dyskusja, Wnioski i Literatura. Do rozprawy dołączono informację o dorobku naukowym oraz oświadczenia współautorów o udziale w przedstawionych publikacjach.

Tematyka, którą podjęła Doktorantka jest istotna i aktualna, o czym świadczyć mogą liczne cytowania prac wchodzących w skład rozprawy (podane w nawiasach przy publikacjach, łącznie 127). Celem pracy jest ocena wpływu diklofenaku, głównego przedstawiciela grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ), który jak i jego pochodne, tu: 4-OH diklofenak, trafia do środowiska w formie zanieczyszczeń. Związki te mogą zagrażać jakości środowiska morskiego i tym samym żyjącym w nim organizmom. Gatunkiem modelowym w niniejszych badaniach jest omulek *Mytilus trossulus*.

W przypadku tej rozprawy doktorskiej mamy do czynienia z materiałem naukowym, który przeszedł już pozytywne recenzje wydawnicze, został opublikowany w bardzo

znaczących czasopismach naukowych o wysokich IF (6,8-14,2), co oczywiście podkreśla jego wartość, ale nie zwalnia recenzenta ze szczegółowego odniesienia się do poszczególnych prac.

We **Wstępie** Doktorantka odniosła się do zagrożeń powodowanych przez farmaceutyki, które docierają nieprzerwanie do środowiska morskiego i stanowią tzw. „nowo pojawiające się zanieczyszczenia”. Problem przedstawiono szczegółowo w pracach przeglądowych:

- Toxic effects of NSAIDs in non-target species: A review from the perspective of the aquatic environment (nr 3 w wykazie)
- Presence of pharmaceuticals and their metabolites in wild-living aquatic organisms - Current state of knowledge (nr 5 w wykazie)

Doktorantka zwraca uwagę, że wiadomo, że największa zawartość diklofenaku jest w wodach powierzchniowych i dla potwierdzenia tego faktu dysponujemy sporym materiałem faktograficznym, ale nadal nie znamy losu tego związku w strefie przydennej w morzu. Poza badaniami diklofenaku istotne wydaje się rozpoznanie produktów jego transformacji, wśród których główną rolę zdaje się odgrywać 4-hydroksy (4-OH) diklofenak, co podkreśla Doktorantka we **Wstępie**.

W **publikacji 3** Doktorantka na podstawie zebranych danych literaturowych wskazała, że leki z grupy NLPZ mają prawdopodobnie największy udział wśród farmaceutyków wykrywanych w środowisku wodnym. Następnie szczegółowo omówiła efekty toksyczne tych związków i wskazała na luki w wiedzy, które czekają na uzupełnienie. Doktorantka zebrała efekty działania NLPZ u ryb, małży, skorupiaków i wieloszczetów, analizując ich działanie zarówno na poziomie komórkowym, jak całego organizmu oraz omówiła wpływ związków na zachowania zwierząt. Jest to interesujące i staranne omówienie zagadnienia.

W **publikacji 5** Doktorantka zestawiała dostępne dane dotyczące występowania rozmaitych farmaceutyków w organizmach wodnych pochodzących z różnych środowisk, krajów/kontynentów, z uwzględnieniem ich stężeń w poszczególnych narządach. Praca ta jest efektem tytanicznej wręcz analizy źródeł i stanowi niezwykle cenny zestaw danych.

Obydwie publikacje 3 i 5 są bardzo wartościowym zbiorem informacji, których zestawienie w postaci przeglądówek nie było łatwe i wymagało solidnych i czasochłonnych studiów literaturowych oraz zdolności w porządkowaniu faktów. Teraz stanowią nieocenione kompendium wiedzy na ten temat i są chętnie cytowane – łącznie 73 razy (!).

Jednym z istotnych elementów pracy było wyznaczenie odpowiedniego gatunku modelowego. Gatunkiem tym został omulek *Mytilus trossulus*. W **publikacji 1** Doktorantka szczegółowo omówiła przyczyny, dla których małże z rodziny Mytilidae są chętnie stosowane w badaniach ekotoksykologicznych, w tym z udziałem farmaceutyków. Wśród nich wymienił należy powszechność występowania małży w strefie przybrzeżnej w dużych skupiskach, osiadły tryb życia, dobrze poznana biologia, odżywianie przez filtrację i słabą aktywność detoksykacyjną i tym samym istotną bioakumulację farmaceutyków. W pracy 1 przedstawiono szereg istotnych zagadnień, które związane są z zastosowaniem Mytilidae w badaniach biomonitoringowych i laboratoryjnych z uwzględnieniem różnych rodzajów farmaceutyków. Praca stanowi cenny zbiór informacji i dobrze uzasadnia wybór gatunku modelowego.

W **publikacji 2** Doktorantka przedstawiła eksperyment laboratoryjny polegający na poddaniu *M. trossulus* działaniu diklofenaku przez 12 dni. Stosowane były dwa stężenia związku przekraczające stężenia mierzone w wodach morskich (szczególnie stężenie 40 µg/l; patrz: publikacja 3). Badania nie wykazały wpływu związku na kondycję badanych osobników, ale odnotowano u nich zmiany histopatologiczne. W publikacji przy Fig 5. nie podano ile osobników było branych pod uwagę; jest tylko ogólna informacja w tekście ile osobników pobierano do analiz na każdym etapie eksperymentu, a to nie wystarcza, bo nie

wszystkie osobniki mogły zostać ostatecznie przeanalizowane pod kątem histologicznym. Brak tych informacji na wykresie znacznie utrudnia odczytanie i interpretację danych, co ma szczególne znaczenie w przypadku podawania częstotliwości występowania zmian histopatologicznych. Doktorantka w konkluzjach podaje, że diklofenak powoduje atrezję gonad, na co nie ma potwierdzenia w wynikach (wykres częstotliwości). Badanie częstotliwości występowania zjawiska/cechy ma sens tylko wtedy, gdy jest odpowiednio wysoka liczba przebadanych przypadków. Czy tak jest w tym przypadku?

Proszę Doktorantkę o odniesienie się do tej sprawy w trakcie obrony.

W publikacji 4 Doktorantka przedstawiła dane na temat bioakumulacji diklofenaku i jego metabolitów hydroksylowych w tkankach omułka z uwzględnieniem płci osobników (nie stwierdziła zależności od płci, u samic stwierdziła obecność 5-OH na poziomie wykrywalności.). Eksperyment polegający na poddaniu omułków działaniu diklofenaku i jego pochodnej 4-OH (odpowiednio: 68 i 21 $\mu\text{g/l}$) trwał 7 dni, stężenia substancji w wodzie nie były utrzymywane na stałym poziomie; zastosowane w badaniach stężenia znacznie przekraczały stężenia spotykane w środowisku morskim oraz te zastosowane w eksperymentach przedstawionych w publikacji 2. Po raz pierwszy zbadano pochodną 4-OH pod kątem bioakumulacji w tkankach. Przeanalizowano też rozkład diklofenaku do pochodnych hydroksylowych w wodzie, biofilmie i badanych organizmach. W publikacji 4 na wykresach stężeń związków nie zaznaczono odchyień standardowych (Fig.1). Brak liczebności prób przy tabelach utrudnia interpretację wyników. Brakuje także oznaczeń istotności różnic między stężeniami na wykresie 2 (Fig.2).

Czym Doktorantka tłumaczy tak duże (choć statystycznie nieistotne) różnice między zbiornikami, w przypadku 4-OH diklofenaku? Co oznacza „matrix effect” w podpisie pod rysunkiem (Fig.1) (i brak danych)? Proszę też o wyjaśnienie, czy stężenia badanych związków w wodzie różniły się istotnie statystycznie w czasie trwania eksperymentu (Fig.2. nie zaznaczono istotności)? Proszę o odniesienie się do kwestii toksyczności pochodnej 4-OH diklofenaku wobec jego niskiej stabilności wynikającej z szybkiej biodegradacji – o czym Doktorantka wspomina w pracy.

W publikacji 6, w której zastosowano model eksperymentu z publikacji 4, Doktorantka powróciła do badań markerów histologicznych zapoczątkowanych wcześniej i opisanych w publikacji 2; tym razem zastosowała wyższe niż w pracy 2 stężenia diklofenaku oraz uwzględniła w doświadczeniach pochodną 4-OH diklofenak. Są to pierwsze badania tej pochodnej u małży w tym kontekście, co podkreśliła Doktorantka w pracy i we wstępie do rozprawy. W pracy obok markerów histologicznych przeprowadzono również badania biomarkerów enzymatycznych, które nie odpowiedziały zmianami na zastosowanie testowanych związków (z wyjątkiem GR – reduktazy glutationowej). Zaobserwowano jednak zmiany w poziomie białka w oskrzelach, co może stanowić wskaźnik toksyczności – jak wskazano w publikacji. Doktorantka skupiła się w niniejszej pracy na analizie zmian histologicznych omułka. Obserwowane zmiany miały charakter regresyjny i dotyczyły układu pokarmowego, oddechowego i rozrodczego, co zostało opisane w pracy i zasygnalizowane we wstępie do rozprawy. Uwaga : W podpisie do Fig. 2 brakuje informacji, czy pokazane zmiany histologiczne dotyczą działania diklofenaku, czy jego pochodnej. Na rysunku 3 i 4 zebrano obserwowane zmiany u badanych osobników. Wiele zmian histopatologicznych obserwowane było również w grupie kontrolnej, a przedstawione proporcje nie różniły się zasadniczo, choć w kilku przypadkach wykazano istotność statystyczną. Taki sposób przedstawienia wyników przy małej liczebności próby (n=10) utrudnia interpretację wyników i może prowadzić do pochopnych wniosków. Na wykresach i w podpisach nie podano różnic statystycznych ani stosowanego testu statystycznego. Informacji tych trzeba szukać w tekście. Podobnie jak w poprzednich pracach brak liczebności analizowanych osobników w podpisach pod rysunkami utrudnia interpretację danych.

Proszę Doktorantkę o skomentowanie i interpretację otrzymanych wyników analiz histologicznych i odnieść się do sposobu ich przedstawienia na wykresach. Czy można oczekiwać podobnych (zauważalnych) efektów w środowisku morskim przy znacznie mniejszym stężeniu badanych związków? Jaki należy interpretować efekt działania pochodnej diklofenaku?

W publikacji 7 Doktorantka odnosi się do problemu stabilności diklofenaku i jego pochodnej w wodzie morskiej i osadach morskich.

Proszę Doktorantkę o szczegółowe odniesienie się i interpretację stwierdzonego faktu, że stężenie pochodnej 4-OH diklofenaku zmniejsza się znacznie szybciej w obecności osadu sterylizowanego i niesterylizowanego. Jakie inne pochodne diklofenaku mogą występować w wodzie i osadzie poza 4-OH i 5-OH? Jak wygląda przemiana metaboliczna diklofenaku w organizmie małży?

Prosiłabym również Doktorantkę o przedstawienie zbiorczego schematu/rysunku opisującego los diklofenaku (i jego przemiany) w środowisku morskim i zasiedlających je małżach. Zabrakło mi takiego podsumowania w rozprawie. Wnioski przedstawione przez Doktorantkę są właściwie zbiorem obserwacji i podsumowaniem wyników otrzymanych przy okazji przygotowania kolejnych prac, a nie wnioskami zbiorczymi wynikającymi z całej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując:

Doktorantka wykazała się dużą wiedzą w tematyce prowadzonych badań, o czym świadczą trzy solidne artykuły przeglądowe, stanowiące bardzo dobre i przydatne dla innych badaczy źródło wiedzy. W czterech oryginalnych artykułach przedstawiła wyniki badań eksperymentalnych: oceniła toksyczność diklofenaku i jego pochodnej hydroksylowej oraz biokoncentrację tych związków u małży *M. trossulus* oraz określiła stabilność diklofenaku i jego pochodnej w środowisku. Uważam, że porządek przedstawianych i omawianych prac/wyników powinien być inny, na czym skorzystałaby przejrzystość rozprawy, a także ułatwiłoby to wyciągnięcie ogólnych wniosków. W mojej opinii wprowadzenie powinno rozpoczynać się od omówienia trzech prac przeglądowych, kolejno prace 5, 3 i 1 zgodnie z zasadą „od ogółu do szczegółu”. Następnie powinno nastąpić omówienie stabilności diklofenaku i jego pochodnej w środowisku (praca 7). Na tle tych informacji powinny zostać omówione wyniki prac eksperymentalnych z małżami (prace 4, 2 i 6). Niewątpliwie wartościową częścią rozprawy są badania pochodnej hydroksylowej diklofenaku, oraz analizy histologiczne ze wskazaniem nowego podejścia badawczego w ekotoksykologii. Na szczególną uwagę zasługuje dorobek Doktorantki – publikacje w bardzo wysoko punktowanych czasopismach; jest w nich najczęściej pierwszą autorką.

Niniejszym stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pt. „Los środowiskowy i ocena toksyczności wybranych farmaceutyków i ich metabolitów z wykorzystaniem *Mytilus trossulus* jako gatunku modelowego” uzasadnia nadanie Doktorantce stopnia doktora nauk o Ziemi i środowisku i wnoszę o dopuszczenie Pani mgr Klaudii Świackiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Prof. dr hab. Ewa Kulczykowska

Sopot, dnia 27.07.2023