

Prof. dr hab. inż. Ewa Liwarska-Bizukojć
Politechnika Łódzka
Wydział Budownictwa, Architektury i Inżynierii Środowiska
Instytut Inżynierii Środowiska i Instalacji Budowlanych

Łódź, 17.06.2021

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Marceliny Jureczko
pt. „Badania ekotoksyczności wybranych leków cytostatycznych i możliwości
wykorzystania grzybów do ich usuwania”**

Promotor: dr hab. inż. Wioletta Przysaś, prof. Pol. Śl.

Podstawą opracowania recenzji jest pismo Pana prof. dr hab. inż. Andrzeja Rusina, przewodniczącego Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Politechniki Śląskiej z dnia 17.05.2021 (RIE-BD/4/299/2020/2021) z prośbą o przygotowanie oceny wspomnianej wyżej pracy doktorskiej zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Politechniki Śląskiej z dnia 29.04.2021.

Podstawowe informacje o ocenianej rozprawie doktorskiej

Mgr inż. Marcelina Jureczko przedstawiła pracę doktorską zatytułowaną „Badania ekotoksyczności wybranych leków cytostatycznych i możliwości wykorzystania grzybów do ich usuwania” w formie cyklu pięciu artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, posiadających tzw. współczynnik wpływu (*Impact Factor*) od 1,775 do 9,038. Są to następujące artykuły naukowe:

Publikacja 1. Jureczko M., Kalka J. Cytostatic pharmaceuticals as water contaminants. Eur. J. Pharmacol. 2020: 866: 172816, DOI:10.1016/j.ejphar.2019.172816, (*IF*: 3,263, MNiSW: 100 pkt.);

Publikacja 2. Jureczko M., Przysaś W. Ecotoxicity risk of presence of two cytostatic drugs: bleomycin and vincristine and their binary mixture in aquatic environment. Ecotoxicol. Environ. Saf. 2019: 172: 210-215, DOI:10.1016/j.ecoenv.2019.01.074, (*IF*: 4,872, MNiSW: 100 pkt.);

Publikacja 3. Jureczko M., Przysaś W., Urbaniak M., Banach-Wiśniewska A., Stępień Ł. Tolerance to cytostatic drugs bleomycin and vincristine by white rot fungi. Arch. Environ. Prot. 2020: 46 (3): 99-104, DOI:10.24425/aep.2020.134540, (*IF*: 1,775, MNiSW: 100 pkt.);

Publikacja 4. Jureczko M., Przysaś W. Removal of two cytostatic drugs: bleomycin and vincristine by white-rot fungi – a sorption study. *J. Environ. Health Sci. Eng.* 2021, DOI: 10.1007/s40201-021-00635-8, (IF: 2,179, MNiSW: 100 pkt.);

Publikacja 5. Jureczko M., Przysaś W., Krawczyk T., Gonciarz W., Rudnicka K. White-rot fungi-mediated biodegradation of cytostatic drugs - bleomycin and vincristine. *J. Hazard. Mater.* 2021: 407: 124632, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124632, (IF: 9,038, MNiSW: 200 pkt.).

Wymienione wyżej artykuły zostały uzupełnione o wprowadzenie do tematu rozprawy doktorskiej, sformułowanie tezy badawczej, celu i zakresu pracy, zwięzłe omówienie metodyki i planu badań, podsumowanie, wnioski, kierunki dalszych badań i spis literatury. Doktorantka przedstawiła także oświadczenia współautorów artykułów naukowych zaliczonych do cyklu oraz źródła finansowania badań. Udział procentowy mgr inż. Marceliny Jureczko w przygotowaniu poszczególnych publikacji wynosił od 60% do 70%. Doktorantka jest autorem do korespondencji we wszystkich pięciu publikacjach wchodzących w skład cyklu. Rozprawa doktorska jest w mojej ocenie kompletna, a jej układ oceniam jako prawidłowy.

Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

W pierwszej kolejności odniosę się do celowości podjętego przez mgr inż. Marcelinę Jureczko tematu pracy doktorskiej. Farmaceutyki stanowią istotną grupę mikrozanieczyszczeń obecnych w środowisku przyrodniczym. Ze względu na swoją specyfikę oprócz pożądaných zmian w organizmie człowieka mogą wywołać inne, potencjalnie niekorzystne zmiany, w organizmach spoza grupy docelowej. Dlatego ocena ich wpływu na biotyczną część ekosystemów oraz poszukiwanie metod ich usunięcia ze środowiska przyrodniczego to według mnie jedne z priorytetowych kierunków badań prowadzonych w obszarze inżynierii i biotechnologii środowiska. Stosowane w chemioterapii leki cytostatyczne należą do farmaceutyków rzadziej niż inne (np. niesteroidowe leki przeciwzapalne) badanych pod kątem ich usuwania z wód i ścieków, choć nie są skutecznie eliminowane w konwencjonalnych mechaniczno-biologicznych oczyszczalniach ścieków. Stąd w mojej ocenie wybór zarówno tematu badań, jak i obiektu badań jest niezwykle trafny. Podjęcie tego tematu pozwala zapełnić lukę w danych ekotoksykologicznych, a także zweryfikować przydatność grzybów do usuwania cytostatyków ze środowiska przyrodniczego.

Mgr inż. Marcelina Jureczko postawiła sobie dwa główne cele badawcze, a mianowicie (1) uzyskanie danych na temat ekotoksyczności wybranych dwóch leków

cytostaticznych i co bardzo ważne ich mieszanin, a także (2) ocenę przydatności pięciu szczepów grzybów białej zgnilizny drewna do usuwania tej grupy farmaceutyków ze środowiska. Obiekt badań, czyli dwa cytostatyki, zostały starannie wytypowane na podstawie szczegółowej analizy literaturowej wspomaganą obliczeniami w programie komputerowym E_TX 2.1 pozwalającym obliczyć wartości stężeń niebezpiecznych dla ekosystemów. W ten sposób Doktorantka wybrała bleomycynę i winkrystynę do swoich badań. Analizę aktualnego stanu wiedzy na temat źródeł pochodzenia, metod wykrywania i degradacji cytostatyków, a także ich wpływu na ludzi i środowisko przyrodnicze przedstawiła Pani mgr inż. Marcelina Jureczko w artykule naukowym opublikowanym wspólnie z Panią dr hab. inż. Joanną Kalką w *European Journal of Pharmacology* w 2020. Jest to pierwszy artykuł wchodzący w skład cyklu pięciu publikacji ocenianej pracy doktorskiej (Publikacja 1).

Ocena ekotoksyczności bleomycyny i winkrystyny została przeprowadzona wobec przedstawicieli trzech poziomów troficznych organizmów wodnych, to jest rośliny *Lemna minor*, skorupiaków *Daphnia magna* oraz bakterii *Pseudomonas putida* (Publikacja 2). Okazało się, że bleomycyna wykazuje silniejszy, negatywny wpływ na wybrane organizmy testowe niż winkrystyna i można ją zakwalifikować jako substancję bardzo toksyczną. Natomiast winkrystyna według tej samej klasyfikacji (Dyrektywa UE 93/67/EEC) to substancja toksyczna. Doktorantka zbadala również toksyczność mieszaniny tych dwóch leków cytostaticznych z zastosowaniem trzech modeli i wyliczeniem indeksu CI (*Combination Index*), który pozwala ocenić, czy efekt mieszaniny jest synergistyczny, antagonistyczny, czy addytywny. Przeprowadzone badania i obliczenia, w tym obliczenia statystyczne (test t-Studenta), wykazały działanie antagonistyczne (Publikacja 2).

Do usuwania wybranych farmaceutyków ze środowiska wodnego mgr inż. Marcelina Jureczko postanowiła zastosować grzyby białej zgnilizny drewna. Wybór tych organizmów nie budzi zastrzeżeń, gdyż wykorzystywane były już wcześniej z powodzeniem do rozkładu innych ksenobiotyków o budowie aromatycznej. Do identyfikacji wytypowanych pięciu szczepów grzybów Doktorantka użyła metod biologii molekularnej (Publikacja 3). Przed eksperymentami ukierunkowanymi na usuwanie badanych cytostatyków Doktorantka słusznie postanowiła ocenić możliwości wzrostu wybranych szczepów grzybów w obecności bleomycyny i winkrystyny (Publikacja 3). W tym celu przeprowadziła odpowiednie eksperymenty, a ich wyniki poddała dokładnej analizie statystycznej. Dokonała m.in. analizy statystycznej istotności różnic między poszczególnymi intensywnościami wzrostu grzybów w obecności leków na różnych podłożach (MEA i MSB) za pomocą testów Kruskala-Wallisa oraz testu post-hoc Dunna (Publikacja 3). Logiczne zaplanowanie eksperymentów oraz

wykorzystanie do potwierdzenia ich wyników odpowiednio dobranych, zaawansowanych metod statystycznych wskazują na dużą dojrzałość naukową Pani mgr inż. Marceliny Jureczko.

W kolejnym etapie pracy Doktorantka zbadała możliwości usuwania bleomycyny i winkrystyny ze środowiska wodnego na drodze sorpcji i biologicznego rozkładu. Testy sorpcji obydwu badanych cytostatyków zostały przeprowadzone na martwej i żywej grzybni każdego z pięciu wyizolowanych szczepów grzybów białej zgnilizny drewna (Publikacja 4). Podczas tych testów określone zostały optymalne warunki prowadzenia sorpcji, takie jak temperatura, pH i początkowe stężenie leku. Do tego celu Doktorantka wykorzystwała plan centralny kompozycyjny (*Central Composite Design, CCD*) uwzględniający interakcje pomiędzy poszczególnymi czynnikami wpływającymi na przebieg procesu sorpcji. Niezbędne obliczenia Doktorantka przeprowadziła z pomocą programu Statistica 12.0 (StatSoft). Mgr inż. Marcelina Jureczko opisała także kinetykę i wyznaczyła izotermy sorpcji dla badanego układu cytostatyk - biomasa grzybni, co uważam za bardzo cenne uzupełnienie przeprowadzonych badań. Proces sorpcji został opisany za pomocą izotermy Redlicha-Petersona dla bleomycyny, a w przypadku winkrystyny izotermą Langmuira. Natomiast kinetykę sorpcji Doktorantka opisała równaniem pseudo-drugiego rzędu, dla którego uzyskała najwyższe wartości współczynnika dopasowania R^2 od 0.795 do 0.998 (Publikacja 4).

Biologiczny rozkład dwóch badanych cytostatyków przy udziale grzybów białej zgnilizny drewna okazał się bardziej skuteczną metodą ich usuwania w porównaniu do sorpcji, zwłaszcza w odniesieniu do cytostatyku o mniejszej masie cząsteczkowej, czyli winkrystyny (Publikacja 5). Doktorantka wykazała, że winkrystyna była usuwana w ponad 94% przez trzy spośród pięciu wytypowanych szczepów grzybów (*Fomes fomentarius* (CB13), *Hypholoma fasciculare* (CB15), *Trametes versicolor* (CB8)). Natomiast stopień usunięcia bleomycyny na drodze biologicznego rozkładu był niższy niż winkrystyny i osiągnął 36% w przypadku *Trametes versicolor* (CB8). Bleomycyna była skuteczniej od winkrystyny usuwana metodą sorpcji, to jest do 59% przy założeniu optymalnych warunków prowadzenia procesu (Publikacja 4). Doktorantka badała aktywność trzech enzymów ligninolitycznych i wykazała, że usuwanie leków cytostatycznych (bleomycyny i winkrystyny) powiązane jest ze wzrostem aktywności jednego z nich, a mianowicie lakazy. Dzięki zastosowaniu ultrasprawniej chromatografii cieczowej sprzężonej z detekcją mas udało się Doktorantce zidentyfikować trzy produkty rozkładu winkrystyny (Publikacja 5). Co ważne produkty powstałe po procesach biologicznego rozkładu cytostatyków zostały poddane badaniom ekotoksykologicznym. Okazało się, że szczepy grzybów wykazujące największą

skuteczność w usuwaniu badanych cytostatyków przyczyniły się także do największego spadku toksyczności.

Za najważniejsze osiągnięcie recenzowanej rozprawy doktorskiej uważam uzyskanie cennych danych ekotoksykologicznych dla dwóch stosunkowo rzadko badanych pod tym kątem farmaceutyków, bleomycyny i winkrystyny, i ich mieszanin, a także wykazanie możliwości usuwania tych dwóch cytostatyków ze środowiska wodnego na drodze sorpcji i biologicznego rozkładu przy udziale grzybów zgnilizny białej drewna wraz z podaniem skuteczności obydwu metod oraz czynników, które mają na nie wpływ. Uwagę zwraca kompleksowość i interdyscyplinarność tej pracy doktorskiej. Pani mgr inż. Marcelinie Jureczko udało połączyć się wiedzę z nauk biologicznych, chemicznych i matematycznych do rozwiązywania problemów badawczych, które sformułowała na początku doktoratu. Bardzo wysoko oceniam zastosowanie zaawansowanych metod statystycznych do opracowania uzyskanych wyników, co było widoczne we wszystkich publikacjach o charakterze eksperymentalnym, czyli w czterech spośród pięciu publikacji wchodzących w skład przedstawionego do recenzji cyklu artykułów naukowych.

Ocena formalna pracy

Praca jest bardzo dobrze przygotowana pod względem formalnym. Język zarówno w cyklu publikacji, jak i w opisie będącym wprowadzeniem do tego cyklu, charakteryzuje się zwięzłością i wysokim poziomem naukowym. Prowadzony przez Doktorantkę wywód jest logiczny i poparty faktami, konkretnymi danymi. Doktorantka skorzystała z około 92 źródeł literaturowych, z czego większość (około 57%) stanowiły artykuły naukowe o zasięgu międzynarodowym opublikowane w ciągu ostatnich 10 lat. Dobór źródeł literaturowych jest według mnie trafny, wystarczający i odpowiada aktualnemu stanowi wiedzy na temat ekotoksyczności i usuwania z wody/ścieków cytostatyków.

Nie mam zastrzeżeń do przygotowanych przez Doktorantkę tabel i wykresów. Co do zastosowanej nomenklatury, to wydaje mi się, że lepiej byłoby używać terminu „środowisko przyrodnicze” zamiast „środowisko naturalne”, a na rysunku 1, strona 14 lepiej byłoby napisać „składowiska” lub ewentualnie „dzikie wysypiska” zamiast „wysypiska”.

Uwagi do rozprawy doktorskiej

Jak już wspominałam, rozprawę doktorską mgr inż. Marceliny Jureczko oceniam bardzo wysoko. Chciałabym jednak przedstawić kilka uwag o charakterze dyskusyjnym.

W pracach nad sorpcją (Publikacja 4) początkowe stężenie każdego z badanych cytostatyków wynosiło 5, 10 lub 15 mg/l, a w testach biodegradacyjnych 10 mg/l (Publikacja 5). Dlaczego wybrano takie stężenia początkowe badanych cytostatyków? Z jakich względów nie przeprowadzono badań nad usuwaniem cytostatyków przy stężeniach poniżej 1 mg/l?

W badaniach nad sorpcją cytostatyków do ich oznaczania wykorzystano spektrofotometr UV-VIS (pomiar absorbancji przy 210 nm dla bleomycyny i 219 nm dla winkrystyny), a w badaniach nad biologicznym rozkładem tych leków zastosowano do ich oznaczania ultrasprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (UPLC MS). Czy i jaki miało to potencjalny wpływ na ocenę skuteczności sorpcji i biologicznego rozkładu w usuwaniu badanych cytostatyków?

Którą metodę usuwania cytostatyków ze środowiska wodnego rekomendowałaby ostatecznie Doktorantka? Czy byłaby to ta sama metoda lub metody dla obydwu badanych cytostatyków?

Prosiłabym, żeby Doktorantka odniosła się na publicznej obronie do tych trzech uwag dyskusyjnych.

Podsumowanie i wnioski

Podsumowując recenzję chciałabym podkreślić, że wymienione powyżej uwagi o charakterze dyskusyjnym nie mają wpływu na moją bardzo wysoką ocenę niniejszej rozprawy doktorskiej. Według mnie całokształt dorobku: liczba publikacji, udział procentowy Doktorantki w przygotowaniu poszczególnych publikacji, wysoki poziom czasopism naukowych, w których Doktorantka publikuje, nie tylko spełnia, ale przekracza wymagania stawiane zwyczajowo pracom doktorskim.

Stwierdzam jednoznacznie, że w mojej ocenie rozprawa doktorska Pani mgr inż. Marceliny Jureczko spełnia wymogi określone w stosownych przepisach Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Inżynieria Środowiska, Górnictwo i Energetyka Politechniki Śląskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Marceliny Jureczko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę bardzo wysoką jakość przeprowadzonych badań, ich interdyscyplinarny charakter, sposób statystycznego opracowania i przedstawienia wyników badań, a także formę przedstawionej rozprawy doktorskiej (5 publikacji w bardzo dobrych czasopismach z *Impact Factor*) z pełnym przekonaniem składam wniosek o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.