



Adres: ul. H. Sucharskiego 2, 35-225 Rzeszów

Kancelaria Ogólna: tel. 17 866 11 11; fax 17 866 12 22

e-mail: wsiz@wsiz.edu.pl

Internet: wsiz.edu.pl

Biuro Rektora: tel. 17 866 11 12

NIP: 813-11-23-670

REGON: 690389644

prof. dr hab. Konrad Szychowski
Kierownik Katedry Biotechnologii
i Biologii Komórki
Kolegium Medyczne
Wyższa Szkoła Informatyki i Zarządzania
z siedzibą w Rzeszowie
36-020 Tyczyn, Kielnarowa 386a, KA110/1
tel. (17) 866 12 96
e-mail: kszychowski@wsiz.edu.pl

Rzeszów, 4.12.2025

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Leili Khani Khouzani
pt. „Funkcjonalne konsekwencje działania opóźniaczy palenia
w komórkach układu odpornościowego”
wykonanej pod opieką dr hab. Łukasza Pułaskiego, prof. IBM PAN**

I. Tematyka rozprawy

Temat przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej dotyczy konsekwencji działania opóźniaczy palenia lub inaczej uniepalniaczy (FR, ang. *flame retardants*) w komórkach układu odpornościowego. Obecnie wiadomo, że opóźniacze palenia w znaczący sposób wpływają na organizmy zwierząt i ludzi jednak ich działanie w stosunku do komórek układu odpornościowego jest szerzej nieznane. Tak więc rozprawa będąca zbiorem publikacji stara się uzupełnić istniejącą lukę badawczą.

Doktorantka w dwóch artykułach (jeden przeglądowy IF²⁰²³=8.2, pkt. MEiN=200 oraz jeden badawczy IF²⁰²⁵=8.0, pkt. MEiN=200) oraz dwóch manuskryptach (oba badawcze IF²⁰²⁵=9.7, pkt. MEiN=140 i IF²⁰²⁵=6.9, pkt. MEiN=140) stara się przedstawić immunotoksyczne działania tetrabromobisfenolu-A (TBBPA), bisfenolu-A (BPA), eteru oktabromodifenylowego (DecaBDE), tris(2-butoksyetylo)fosforanu (TBEP) i fosforanu tricylosowego (TCP). Całość rozprawy jest spójna tematycznie i pasuje do zaproponowanego tytułu rozprawy.

Pierwszy z artykułów (Leila Khani, Leonardo Martin, Łukasz Pułaski, Cellular and physiological mechanisms of halogenated and organophosphorus flame retardant toxicity. Science of the Total Environment 2023, 897:165272. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2023.165272) to kompleksowy przegląd toksyczności FR, zarówno halogenowanych jak i fosforowych, na



Adres: ul. H. Sucharskiego 2, 35-225 Rzeszów

Kancelaria Ogólna: tel. 17 866 11 11; fax 17 866 12 22

e-mail: wsiz@wsiz.edu.pl

Internet: wsiz.edu.pl

Biuro Rektora: tel. 17 866 11 12

NIP: 813-11-23-670

REGON: 690389644

organizmy zwierzęce i komórki ludzkie. Autorka podkreśla, że FR które były niegdyś uważane za stosunkowo nietoksyczne, obecnie posiadają opisany negatywny wpływ na wiele procesów biologicznych. Doktoranta we właściwy sposób akcentuje mechanizmy działania FR na poziomie komórkowym które bardzo często wynikają z ich silnej lipofilności. Praca opisuje jak FR zaburzają strukturę błon komórkowych i kluczowych elementów szlaków sygnałowych. Autorka następnie opisuje, jak takie zaburzenia przekładają się na poziom organizmu wpływając na dysfunkcje hormonalne, zaburzenia metabolizmu oraz negatywne efekty w funkcjonowaniu układu rozrodczego i odpornościowego. Podsumowując, publikacja stanowi obszerną syntezę dotychczasowych badań nad toksycznością FR, przedstawiając wspólne mechanizmy działania różnych związków. Publikacje wyróżnia kompleksowość, rzadko spotyka się przegląd łączący oba typy FR i opisujący ich efekt na wielu poziomach organizacyjnych. Autorka słusznie zwraca uwagę, że pomimo chemicznego zróżnicowania różne FR oddziałują na podobne cele biologiczne. Ta holistyczna prezentacja istniejącego stanu wiedzy oraz wskazanie luk poznawczych sprawia, że praca wnosi istotny, oryginalny wkład do literatury przedmiotu i stanowi bardzo dobre wprowadzenie do dalszych badań doktorantki.

Drugi z artykułów (Leila Khani, Maciej Studzian, Leonardo Martins, Michał Gorzkiewicz, Łukasz Pułaski, Tetrabromobisphenol A, but not bisphenol A, disrupts plasma membrane homeostasis in myeloid cell models – A novel threat from an established persistent organic pollutant, Science of the Total Environment 2025, 961:178284. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.178284) jest pracą badawczą porównującą wpływ TBBPA i BPA na fizykochemiczne właściwości błon komórkowych układu odpornościowego linii takich jak HL-60, THP-1, Mono Mac 6. Głównym odkryciem jest to, że ekspozycja na TBBPA a nie na BPA, prowadzi do zaburzenia stanu błon komórkowych. TBBPA znacząco zwiększa rotacyjny i boczny ruch lipidów w błonach plazmatycznych podnosząc ich płynność i obniżając ogólną polaryzację oraz uporządkowanie lipidów. Co interesujące, w błonach wewnętrznych tych samych komórek obserwowano odwrotną tendencję. W przeciwieństwie do tego co powodowało TBBPA, BPA przy podobnym stężeniu nie wykazywał żadnego istotnego wpływu na własności błon. Autorka wnioskuje, że błona komórkowa makrofagów i innych komórek odpornościowych może być nowym celem toksycznego działania TBBPA.



Adres: ul. H. Sucharskiego 2, 35-225 Rzeszów

Kancelaria Ogólna: tel. 17 866 11 11; fax 17 866 12 22

e-mail: wsiz@wsiz.edu.pl

Internet: wsiz.edu.pl

Biuro Rektora: tel. 17 866 11 12

NIP: 813-11-23-670

REGON: 690389644

Odkrycie doktorantki jest istotne, ponieważ wskazuje na wcześniej niewystarczająco poznany mechanizm toksyczności środowiskowej TBBPA bazujący na zaburzeniach fizycznych właściwości błon komórkowych układu odpornościowego. W literaturze znaleźć można doniesienia sugerujące wpływ TBBPA na działanie błony komórkowej jednak, żadna z wcześniejszych publikacji nie dokonuje porównania TBPPA i BPA oraz nie omawia mechanizmu głębiej.

Trzecia przedstawiona do recenzji praca stanowiąca manuskrypt (Leila Khani, Maciej Studzian, Leonardo Martin, Lukasz Pulaski, The brominated flame retardant DecaBDE inhibits low-density lipoprotein macropinocytosis in human M2 macrophages, Archives of Toxicology – manuskrypt w ocenie) opisuje działanie powszechnie stosowanych bromowanych opóźniaczy palności (BFRs, ang. *brominated flame retardants*) takich jak DecaBDE, TBBPA i heksabromocyklododekan (HBCD) na metabolizm lipidów ludzkich pierwotnych makrofagów. Autorka wykazała, że w stężeniu 5 μ M DecaBDE i HBCD silnie hamują pochłanianie lipoproteiny LDL przez makrofagi populacji M2. Doktoranta sugeruje że, efekt ten nie był spowodowany bezpośrednim blokowaniem kanałów endocytozy LDL, lecz wynikał z zaburzenia ekspresji genów kodujących elementy szlaku makropinocytozy i wpływem na kinaz PI3K γ , Akt3, WNK1 i SGK1. Eksperymenty wykazał, że DecaBDE hamuje pobieranie dużych cząstek typowych dla makropinocytozy, podczas gdy nie wpływa na endocytozę zależną od receptorów ani na fagocytozę bakterii. W porównaniu do innych BFRs zauważono słabszy efekt dla HBCD oraz brak działania dla TBBPA. Podsumowując Autorka wykazała, że DecaBDE może zakłócać homeostazę lipidową organizmu poprzez zahamowanie alternatywnej ścieżki pobierania cholesterolu przez makrofagi. Odkrycie to jest istotne w kontekście miażdżycy i chorób cywilizacyjnych związanych z akumulacją lipidów. W literaturze znaleźć możemy doniesienia, że DecaBDE sprzyja formowaniu się komórek piankowych poprzez wzrost ekspresji TLR4 i pobieranie LDL, jednak badania Doktorantki uzupełniają ten obraz pokazując, że jednocześnie DecaBDE hamuje alternatywną drogę makropinocytozy LDL. Tym samym praca przedstawia oryginalny mechanizm immunotoksycznego działania BDE-209, komplementarny do dotychczas znanych efektów. Nowatorskie jest zwłaszcza badanie wpływu DecaBDE na makropinocytozę w komórkach odpornościowych, co nie było wcześniej opisywane.



Adres: ul. H. Sucharskiego 2, 35-225 Rzeszów

Kancelaria Ogólna: tel. 17 866 11 11; fax 17 866 12 22

e-mail: wsiz@wsiz.edu.pl

Internet: wsiz.edu.pl

Biuro Rektora: tel. 17 866 11 12

NIP: 813-11-23-670

REGON: 690389644

Czwarta przedstawiona do recenzji praca stanowiąca manuskrypt (Leila Khani, Maciej Studzian, Leonardo Martin, Lukasz Pulaski, TBEP and TCP impair metabolic and immune functions in human macrophages: a novel redox-related activity with potential immunotoxic consequences, Environment International – manuskrypt w ocenie) bada wpływ dwóch fosforowych FR takich jak TBEP i TCP na funkcje metaboliczne i odpornościowe ludzkich makrofagów. Wbrew powszechnemu pogładowi, że FR wywołują efekty prooksydacyjne, autorka wykazuje, że TBEP i TCP powodują obniżenie produkcji reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) w ludzkich pierwotnych makrofagach. Efekt ten zachodzi szybko i nie wynika ani z bezpośredniego wychwytu ROS, ani ze zwiększenia ekspresji enzymów antyoksydacyjnych. Badania doktorantki wykazały, że TBEP i TCP nie hamują aktywności NADPH-oksydaz, ale indukują hiperpolaryzację błony mitochondrialnej przy niezmiennym poziomie nadtlenu superoxydu w macierzy mitochondrium. Skutkiem tych zaburzeń było wyraźne osłabienie kluczowych funkcji makrofagów. TCP zmniejszył dwukrotnie stężenie ATP w cytoplazmie i praktycznie zahamował uwalnianie nadtlenu wodoru do środowiska zewnątrzkomórkowego. Mimo że fagocytoza bakterii pozostała niezmienną, TCP drastycznie ograniczył zdolność makrofagów do zabijania pochłoniętych bakterii *Staphylococcus aureus*. Efekty te zaobserwowano przy stężeniach rzędu kilku mikromoli, istotnych z punktu widzenia realnego narażenia. Wyniki podkreślają nowy mechanizm immunotoksyczny działania TBEP i TCP i zaburzenie homeostazy redoks oraz funkcji antybakteryjnych makrofagów. W literaturze brakuje wcześniejszych doniesień o takim działaniu TBEP lub TCP na komórki układu immunologicznego. Stwierdzenie, że te związki wykazują działanie przeciwoksydacyjne w makrofagach, stanowi zatem oryginalny wkład. Autorka słusznie zauważa że mechanizm ten nie był wcześniej opisany dla badanych FR.

II. Ocena wiedzy teoretycznej doktorantki

Rozprawa pani mgr Leili Khani Khouzani przedstawia obszerny przegląd literatury dotyczącej opóźniaczy palenia (publikacja nr 1). Autorka dokładnie opisuje charakterystykę FR, ich podział chemiczny oraz cel stosowania, a także skalę ich produkcji i zanieczyszczeń środowiskowych. Doktorantka przedstawia rodzaje FR (bromowane, fosforanowe itp.) oraz



przykłady (np. DBDE, HBCD, TBBPA, TCP), co świadczy o aktualności i rzetelności wiedzy teoretycznej. W rozdziale dotyczącym układu odpornościowego autorka wyjaśnia jego funkcje oraz podkreśla znaczenie równowagi między nimi dla zdrowia człowieka (publikacja nr 1). W pracy zauważono, że wpływ FR na układ odpornościowy jest dotychczas słabo poznany, co uzasadnia postawienie pytań badawczych w tym zakresie. Szerokie sięgnięcie do najnowszych źródeł oraz jasne osadzenie tematu w kontekście immunotoksyczności świadczą o gruntownej wiedzy teoretycznej doktorantki.

III. Ocena umiejętności prowadzenia samodzielnej pracy naukowej

Doktorantka przedstawiła jasno sformułowany problem badawczy i cel pracy którym było zbadanie skutków działania różnych FR na komórki układu odpornościowego. W mojej ocenie dobór modeli eksperymentalnych był uzasadniony. Doktorantka powadziła badania zarówno na liniach komórkowych układu odpornościowego (HL-60, THP-1, Mono Mac 6), jak i na makrofagach izolowanych od pacjentów. Przyjęte stężenia związków są dość wysokie ale jednak wystarczająco bliskie poziomom stwierdzanym w środowisku. Zastosowanie odpowiednich kontroli (rozpuszczalnik DMSO) czy związków odniesienia (porównanie TBBPA z BPA) wskazuje na rzetelne podejście eksperymentalne. Autorka wykorzystwała zaawansowane techniki pomiarowe i mogą jednoznacznie stwierdzić, że doktorantka zna bogaty zasób technik badawczych. W publikacji 2 mgr Leili Khani Khouzani wykorzystwała bogaty zasób metod fluorescencyjnych. W przedłożonym do oceny manuskrypcie 1 przeprowadzono pomiary endocytozy, natomiast w manuskrypcie 2 doktorantka wykonywała pomiary ROS, polaryzacji mitochondrialnej, poziomu ATP oraz zdolności makrofagów do zabijania bakterii. Uważam, że wyniki analizowano przy użyciu odpowiednich technik statystycznych, zwracając uwagę na spójność z hipotezami. Przykładowo, hamowanie pochłaniania LDL przez DecaBDE wykazano za pomocą różnych metod oraz doktorantka wykorzystywała szeroką gamę inhibitorów makropinocytozy. Sposób prowadzenia badań, kompleksowa analiza danych i wiarygodne wnioskowanie potwierdzają zdolność doktorantki do samodzielnej pracy naukowej.

IV. Ocena oryginalności wkładu naukowego



Adres: ul. H. Sucharskiego 2, 35-225 Rzeszów

Kancelaria Ogólna: tel. 17 866 11 11; fax 17 866 12 22

e-mail: wsiz@wsiz.edu.pl

Internet: wsiz.edu.pl

Biuro Rektora: tel. 17 866 11 12

NIP: 813-11-23-670

REGON: 690389644

Przedstawiona rozprawa zawiera liczne oryginalne ustalenia. W punkcie I niniejszej recenzji starałem się podkreślić najważniejsze z nich. Nowatorskie jest m.in. zastosowanie w immunotoksykologii zaawansowanych metod biofizycznych do badania wpływu FR na struktury komórkowe. Badania doktorantki, wykazały że TBBPA specyficznie zwiększa mobilność lipidów w błonie plazmatycznej monocytów, obniżając polaryzację błony czego nie obserwowano dla podobnego chemicznie BPA. W manuskrypcie 1 (trzecia z przedstawionych do oceny prac) po raz pierwszy opisano zjawisko, wpływu DecaBDE oraz HBCD na hamowanie makropinocytozy lipoproteiny LDL w makrofagach M2. Uzyskane wyniki mają istotne zaniecanie z medycznego punktu widzenia. Ważną innowacją ocenianej rozprawy jest także wykazanie, że niektóre fosforanowe FR (TBEP, TCP) działają nietypowo a w szczególności zmniejszają produkcję ROS w makrofagach przez mechanizm związany z hiperpolaryzacją mitochondriów. W szczególności TCP znacząco obniża wewnątrzkomórkowy poziom ATP i produkcję nadtlenu wodoru, równocześnie hamując bakteriobójcze zdolności makrofagów. Te wyniki otwierają nowe perspektywy badawcze dotyczące czynników immunotoksycznych FR. Bazując na wiedzy recenzenckiej oraz przedstawionych do oceny publikacji i manuskryptów uważam że wyniki doktorantki są oryginalne i wnoszą istotną wiedzę w poznanie mechanizmu działania FR.

V. Uwagi, pytania i sugestie

Uwagą ogólną do całości zbioru prac pani mgr Leili Khani Khouzani jest to że wszystkie przedstawione publikacje i manuskrypt są bardzo estetyczne a przygotowane schematy w znaczącym stopniu ułatwiają zrozumienie przedstawionych treści. Ogólną sugestią do wszystkich badań dotyczących FR jest to aby w przyszłości doktorantka rozważyła używanie pożywek hodowlanych bez czerwieni fenolowej oraz surowicy pozbawionej hormonów steroidowych (CH-FBS, ang. *charcoal stripped fetal bovine serum*). Czerwień fenolowa jest znanym estrogenem. Ponadto, standardowa surowica jest bogata w różne hormony steroidowe a w przypadku FR które są znanymi związkami zaburzającymi hormonalną równowagę organizmu (EDCs, ang. *endocrine-disrupting chemicals*) może to wpływać na wyniki badań. Jest to szczególnie istotne w przypadku szlaków molekularnych z którymi estrogeny lub androgeny mogą interferować takimi jak np. PPARs, AhR, WNT itp.



Adres: ul. H. Sułkowskiego 2, 35-225 Rzeszów

Kancelaria Ogólna: tel. 17 866 11 11; fax 17 866 12 22

e-mail: wsiz@wsiz.edu.pl

Internet: wsiz.edu.pl

Biuro Rektora: tel. 17 866 11 12

NIP: 813-11-23-670

REGON: 690389644

Na badane w niniejszej rozprawie mechanizmy nie ma to istotnego wpływu ponieważ są to procesy niezależne od steroidów. Dodatkowo, komórki układu immunologicznego mają bardzo niską ekspresję receptorów estrogenowych i androgenowego. Chciałbym to jednak zaznaczyć gdyby doktorantka planowała kontynuować badania nad głębszymi szlakami molekularnymi lub na innych typach komórek. Poniżej zamieszczam szczegółowe uwagi i sugestie do poszczególnych publikacji i manuskryptów.

Publikacja 1

W przypadku publikacji 1 będącej przeglądem badań dotyczących FR nie mam istotnych uwag. Uważam, że wybór publikacji do przeglądu jest właściwy. W kontekście całości rozprawy oczywisty jest przegląd publikacji dotyczących układu immunologicznego natomiast ciekawi mnie dlaczego drugim z omawianych układów jest układ rozrodczy. Czy mógłbym prosić o uzasadnienie tego wyboru?

Publikacja 2

- W publikacji nr 2 doktorantka prowadziła swoje badania tylko na liniach białaczkowych (HL-60, THP-1, MM6), czy rozważane były lub będą prowadzone podobne badania na komórkach prawidłowych?
- Doktorantka badała wpływ TBBPA używając sond fluorescencyjnych. Ja w swoich badaniach z 2016 roku (Szychowski KA, Rybczyńska-Tkaczyk K, Leja ML, Wójtowicz AK, Gmiński J. Tetrabromobisphenol A (TBBPA)-stimulated reactive oxygen species (ROS) production in cell-free model using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) assay-limitations of method. Environ Sci Pollut Res Int. 2016, 23(12):12246-52. doi: 10.1007/s11356-016-6450-6) wykazałem, że sonda fluorescencyjna jaką jest H₂DCFDA spontanicznie reaguje z TBBPA wywołując fluorescencje bez obecności komórek. Czy doktorantka sprawdzała interakcje między TBBPA a używanymi w badaniach sondami?
- Użyte stężenie 25 μ M jest dość wysokie, ale uzasadnione w kontekście figur 2, 3 i 4. Natomiast czy doktorantka może się odnieść do stężeń spotykanych w organizmie człowieka? Jaki jest to zakres stężeń i zawartości?



Adres: ul. H. Sucharskiego 2, 35-225 Rzeszów

Kancelaria Ogólna: tel. 17 866 11 11; fax 17 866 12 22

e-mail: wsiz@wsiz.edu.pl

Internet: wsiz.edu.pl

Biuro Rektora: tel. 17 866 11 12

NIP: 813-11-23-670

REGON: 690389644

- W przyszłość doktorantka mogłaby zbadać wpływ TBBPA na syntezę cholesterolu i jego metabolizm, może to wpływać na organizację mikrostruktur lipidowych, co pomogłoby wyjaśnić mechanizm zwiększonej płynności błony.

Manuskrypt 1

- Uważam że w manuskrypcie można by odwołać się do wcześniejszych badań dotyczących nasilenia pobierania lipoprotein przez DecaBDE które było zależne od receptora TLR4. Czy doktorantka mogłaby się odnieść do badań Zhi i współpracowników? (Hui Zhi, Jiang-Ping Wu, Lin-Ming Lu, Yan Li, Xiao-Yun Chen, Jun Tao, Bi-Xian Mai. Decabromodiphenyl ether (BDE-209) enhances foam cell formation in human macrophages via augmenting Toll-like receptor 4-dependent lipid uptake. Food Chem Toxicol. 2018 Nov;121:367-373. doi: 10.1016/j.fct.2018.09.024.)
- W manuskrypcie wykorzystywano stężenie 5 μ M nie wydaje się ono wysokie jednak czy sprawdzano ewentualną toksyczność tego stężenia dla komórek? Czy były wykonywane badania optymalizacyjne, lub bazowano na wcześniejszych badaniach własnych?
- W pracy wykonano jedynie badania ekspresji mRNA genów. Na tej podstawie silne wnioskowanie jest kontrowersyjne ponieważ mRNA nie ma pełnego przełożenia na powstające białka. Czy doktorantka planuje wykonać w przyszłości badania ekspresji białek?

Manuskrypt 2

- Podobnie jak w przypadku publikacji 2 czy doktorantka sprawdziła czy badane związki wchodzi w interakcję z sondami fluorescencyjnymi?
- Aby lepiej wyjaśnić mechanizm działania TBEP i TCP należałoby wykonać głębsze zbadanie szlaków molekularnych. Czy doktorantka może zaproponować białka lub szlaki molekularne które należałoby zbadać w przyszłości?



Adres: ul. H. Sucharskiego 2, 35-225 Rzeszów

Kancelaria Ogólna: tel. 17 866 11 11; fax 17 866 12 22

e-mail: wsiz@wsiz.edu.pl

Internet: wsiz.edu.pl

Biuro Rektora: tel. 17 866 11 12

NIP: 813-11-23-670

REGON: 690389644

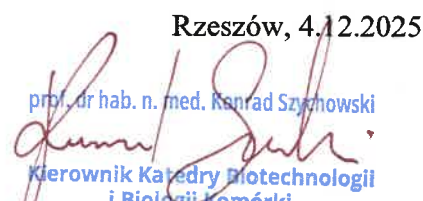
VI. Wniosek końcowy

Na podstawie dokonanej oceny stwierdzam, że rozprawa spełnia wymogi naukowe i formalne. Praca jest merytorycznie dobrze udokumentowana, a przeprowadzone badania posiadają znaczącą wartość poznawczą. Zgodnie z art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce wnioskuję do Rady Naukowej o dopuszczenie pani mgr Leili Khani Khouzani do dalszych etapów postępowania ws. nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

VII. Wyróżnienie

Uważam, że rozprawa charakteryzuje się wysoką wartością naukową i oryginalnym wkładem w badania immunotoksyczności opóźniaczy palenia, co uzasadnia przyznanie jej wyróżnienia. W świetle powyższego wnioskuję do Rady Naukowej o przyznanie wyróżnienia rozprawie doktorskiej pani mgr Leili Khani Khouzani.

Rzeszów, 4.12.2025


prof. dr hab. n. med. Konrad Szychowski
Kierownik Katedry Biotechnologii
i Biologii Komórki
prof. dr hab. Konrad Szychowski

