



UNIWERSYTET GDAŃSKI



Prof. dr hab.
PIOTR STEPNOWSKI

Gdańsk, dnia 16 sierpnia 2016 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Radosława Czernycha pod tytułem „Możliwości wykorzystania biotestów w procedurze szacowania ryzyka zdrowotnego w warunkach narażenia chemicznego na emisję związków chemicznych”

Ocena ryzyka zdrowotnego wobec narażenia na działanie różnorodnych zanieczyszczeń chemicznych zarówno w żywności jak i w środowisku naturalnym jest dziś dynamicznie rozwijającym się interdyscyplinarnym obszarem badawczym na pograniczu toksykologii, epidemiologii, analityki biomedycznej oraz monitoringu chemicznego środowiska i żywności. Ocena ta obejmuje zwykle identyfikację i charakterystykę ryzyka oraz określenie prawdopodobieństwa wystąpienia negatywnych skutków zdrowotnych u określonej populacji narażonej na dany czynnik lub grupę czynników. Wiarygodność oceny ryzyka zdrowotnego w związku z narażeniem na zanieczyszczenia chemiczne uzależniona jest od bardzo wielu czynników, spośród których najważniejsze to rzetelne dane monitoringowe żywności i/lub środowiska (poziom narażenia), statystycznie istotna próbka populacji, na której prowadzi się badania (dane epidemiologiczne) w końcu właściwy dobór testów oceny działania toksycznego *in silico*, *in vitro* czy *in vivo* (dane toksykologiczne).

Spośród wielu grup niebezpiecznych zanieczyszczeń chemicznych na szczególną uwagę zasługują te substancje, na ekspozycję których populacja narażona jest w sposób ciągły. Jedną z nich są mono- i diestry kwasu ftalowego (popularnie nazywane „ftalanami”), których obecność w wodzie, żywności, powietrzu wewnętrznym, a także wielu komponentach środowiska naturalnego została wielokrotnie potwierdzona przez grupy badawcze na całym świecie. Estry kwasu ftalowego stosowane są na szeroką skalę jako dodatki zmiękczające (plastyfikatory) do polimerów i produktów z nich wytwarzanych. Najpowszechniej stosuje się je do produkcji płytek, pianek i wykładzin z polichloru winylu, folii i opakowań z termoplastycznych polimerów, rozpuszczalników w farbach i lakierach, dodatków w produktach kosmetycznych, środków smarujących i zapobiegających pienieniu się czy powłok leków odpornych na działanie soku żołądkowego. Główne drogi przedostawania się tych substancji do ustroju człowieka to konsumpcja żywności przechowywanej w opakowaniach z tworzyw sztucznych, wdychanie powietrza wewnętrznego w pomieszczeniach zawierających wykładziny PCV oraz bezpośredni kontakt z niektórymi kosmetykami.

Informacje te stały się inspiracją dla przeprowadzonych przez doktoranta badań, mających na celu zastosowanie baterii testów toksykologicznych *in vitro* w metodyce szacowania ryzyka zdrowotnego matek i dzieci narażonych na mono- i diestry kwasu ftalowego. Cele szczegółowe dysertacji obejmowały oznaczanie zawartości 11 ftalanów (związków macierzystych i ich metabolitów) z wykorzystaniem techniki GC-MS w wodzie butelkowanej, krwi i mleku kobiecym oraz w mleku modyfikowanym, ocenę toksyczności ostrej każdego z badanych związków oraz ich mieszanin z użyciem bakterii *Vibrio fischeri*, ocenę potencjału genotoksycznego ftalanów za pomocą testu UmuC Easy, ocenę aktywności endokrynnej badanych substancji za pomocą testu Xenometrics YES/YAS, w

Dziedzinat Wydziału Nauk o Zdrowiu

2016 08. 22

Wpl. dnia.....

WYDZIAŁ CHEMII Katedra Analizy Środowiska

ul. Wita Stwosza 63, 80-308 Gdańsk

Nr-DNZ/.....
tel. +48 523 52 05, email: piotr.stepnowski@ug.edu.pl

końcu przeprowadzenie oceny ryzyka zdrowotnego związanego z prenatalnym oraz postnatalnym narażeniem dziecka na obecność estrów kwasu ftalowego w pożywieniu w oparciu o uzyskane eksperymentalnie wyniki badań.

Wybrana przez kandydata tematyka pracy doktorskiej jest nie tylko bardzo interesująca z naukowego punktu widzenia ale i ma niewątpliwy wymiar praktyczny, jako że może stać się podstawą konstruowania ogólnych modeli oceny ryzyka zdrowotnego dla innych zanieczyszczeń chemicznych na ekspozycję których populacja narażona jest w sposób ciągły.

Praca ma układ typowy. Całość rozprawy obejmuje 190 stron maszynopisu. Rozprawa podzielona jest na 10 rozdziałów, spis piśmiennictwa obejmuje 251 pozycji. W pracy umieszczono 30 tabel i 35 rysunków.

Część teoretyczna dysertacji koncentruje się przede wszystkim na omówieniu konstrukcji modeli oceny ryzyka zdrowotnego. Co prawda duża część zawartych tu informacji ma charakter podręcznikowy, to jednak zaproponowany układ tekstu umożliwia powiązanie ze sobą formalnych aspektów oceny ryzyka z jej praktyczną częścią w zakresie prowadzonych testów czy stosowanych modeli. Szczegółowo omówiono tu zagadnienie oceny ryzyka dla związków chemicznych o działaniu genotoksycznym oraz substancji aktywnych endokrynnie, niezbyt fortunnie nazywanych przez autora „zaburzaczami endokrynnymi”. Spora miejsca poświęcono tu również toksyczności mieszanin, działania łącznego związków, ich współoddziaływania itd.

W mojej opinii w części teoretycznej rozprawy zdecydowanie zabrakło omówienia grupy badanych związków, tj. mono- i diestrów kwasu ftalowego. O tym iż substancje te staną się przedmiotem badań autora dowiadujemy się dopiero na 66 stronie (Cel pracy), gdyż ani tytuł, ani wstęp, ani jakkolwiek wzmianka w części teoretycznej o tym nie informuje. Byłoby to tym bardziej wskazane, iż wiele z wysnuwanych później wniosków odnosi się np. do budowy chemicznej tej grupy substancji i wynikających z niej właściwości fizykochemicznych, np. lipofilowość, symetria i in. Wskazaniem byłoby także szczegółowe omówienie źródeł pochodzenia, uwalniania, przemieszczania się estrów kwasu ftalowego w środowisku i żywności i ich dalszego metabolizmu w ustroju. Co prawda niektóre z tych informacji są rozproszone w dalszej części rozprawy to jednak ich brak we wstępie jest zdecydowanie odczuwalny.

Spora część pracy eksperymentalnej doktoranta koncentrowała się na analitycznym oznaczaniu badanych związków w próbkach płynnych. Mimo tego w części wstępnej nie ma ani słowa o stosowanych metodykach, ich wadach i zaletach w końcu problemach i wyzwaniach jakie stoją przed naukowcami w tym zakresie, a jest ich nie mało. Ponieważ ftalany ze względu na swą „wszechobecność” stały się nieodzownym elementem tła analitycznego większości laboratoriów analitycznych należałoby chociaż pokrótce omówić w jaki sposób można temu zaradzić chcąc uzyskiwać wiarygodne i miarodajne wyniki pomiarów tej grupy związków.

Po części teoretycznej przedstawiono cel pracy, a w dalszej kolejności rozważania na temat konstrukcji modelu oceny ryzyka zdrowotnego oraz metodologię prowadzonych badań. Najobszerniejszą część pracy stanowią uzyskane wyniki oraz ich dyskusja. Większość z uzyskanych przez kandydata wyników oceniam bardzo wysoko. Za najważniejsze osiągnięcia doktoranta uważam:

- Potwierdzenie obecności 4 z badanych związków (DEP, DBP, BBzP oraz DEHP) w badanych próbkach wody butelkowanej oraz wykazanie dużej zmienności ich występowania w zależności od rodzaju opakowania (PET, szkło) oraz innych prawdopodobnych czynników wpływających na stężenie końcowe (temperatura, czas przechowywania i in.). Związkiem dominującym był DEHP.

- Potwierdzenie obecności 5 z badanych metabolitów ftalanów (MMP, MEP, MiBP, MBzP, MEHP) w mleku kobiecym oraz określenie na ich podstawie najbardziej prawdopodobnych dróg przedostawania się związków natywnych do ustroju kobiet (dieta, kosmetyki, powietrze wewnętrzne i in.), a także wykazanie spadku stężenia metabolitów w mleku wraz z upływem czasu karmienia z hipotetycznym wyjaśnieniem tego zjawiska.
- Zidentyfikowanie 6 diestrów kwasu ftalowego (DMP, DEP, DBP, DEHP, BBP, DiNP) oraz dwóch metabolitów (MMP, MEP) w mleku modyfikowanym i przedstawienie na ich podstawie prawdopodobnych źródeł skażenia (mleko krowie, opakowania, proces produkcyjny i in.).
- Zidentyfikowanie 5 metabolitów ftalanów (MMP, MEP, MBP, MBzP, MEHP) w surowicy krwi kobiet oraz pozytywne skorelowanie zmienności ich stężeń z wynikami badań ankietowych.
- Wykazanie większej toksyczności ostrej metabolitów ftalanów w odniesieniu do związków natywnych z użyciem testu Microtox oraz wykazanie efektów łącznych dla niektórych par ftalanów w tym teście. Wskazuje to na złożoność interpretacji wyników badań toksykologicznych, a co więcej, wysoką niepewność wniosków budowanych w oparciu o wyniki jakichkolwiek testów biologicznych uzyskiwanych dla pojedynczych substancji.
- Wykazanie relatywnie niskiego potencjału genotoksycznego dla badanych diestrów kwasu ftalowego (test UmuC Easy CS), a także stwierdzenie iż ich zmetabolizowane formy są bardziej aktywne i mogą być uznane za genotoksyczne.
- Wykazanie dla niektórych z badanych związków (DEHP i DiNP) silnego działania hamującego aktywność hormonalną w teście YES-YAS.
- Zastosowanie uzyskanych wyników badań (i ich krytyczna weryfikacja) do przeprowadzenia oceny ryzyka prenatalnego i postnatalnego narażenia na ftalany.

Z kolei poniżej wymieniam zagadnienia budzące moje wątpliwości oraz pytania jakie pojawiły się w trakcie lektury dysertacji:

- Interpretując wyniki badań dla wody butelkowanej autor stwierdza, że w każdej z próbek znajduje się ftalan diizononylowy, który najprawdopodobniej jest zanieczyszczeniem dostającym się do próbek w trakcie wykonywania procedury analitycznej. Jaka jest więc pewność, iż pozostałe z analizowanych związków w mniejszej lub większej części również nie są wynikiem zanieczyszczenia próbek?
- Z literatury przedmiotu wiadomo, iż jednym ze źródeł ftalanów w organizmie człowieka mogą być kosmetyki i środki ochrony osobistej. Mimo to w ankiecie zastosowanej przez doktoranta zabrakło pytań związanych ze stosowaniem tych preparatów, a koncentruje się ona wyłącznie na nawykach żywieniowych. Czy wnioski wyciągane tylko na podstawie nawyków żywieniowych są w pełni uprawnione?
- W dyskusji nad interpretacją uzyskanych wyników oznaczeń metabolitów ftalanów w surowicy i mleku kobiet autor odnosi się często do lipofilowości zamiennie z masą cząsteczkową badanych związków w kontekście ich wewnętrznej dystrybucji, przedostawania się przez bariery biologiczne itp. Czy synonimowe traktowanie tych dwóch wielkości jest uprawnione?
- Tak jak wspominałem powyżej, za bardzo wartościowe uważam wyniki działania toksycznego mieszanin dwuskładnikowych przeprowadzonych z użyciem testu Microtox. Nasuwa się

jednak pytanie w jakim stopniu można odnosić się do tych obserwacji (zachowanie bakterii) przeprowadzając ocenę ryzyka dla populacji ludzi narażonych na obecność ftalanów w pożywieniu?

- W dysertacji autor kilkakrotnie wskazuje na metody teoretycznego przewidywania toksyczności na podstawie struktury chemicznej (QSAR) jako coraz częstsza alternatywę w badaniach toksykologicznych. Czy na podstawie uzyskanych badań można pokusić się o wprowadzenie ogólnych zależności tego typu dla grupy badanych związków chemicznych?
- Niektóre ze stosowanych nazw badanych związków chemicznych są niepoprawne (np. ftalan di(2-etyluheksylu) – powinno być ftalan di(2-etyloheksylu), ftalan butylubenzylu – powinno być ftalan beznylo-n-butylowy). Ponadto, dla wartości LOD czy LOQ niepoprawnym jest stosowanie terminu „poziom”, gdyż są to odpowiednio „granice” wykrywalności i oznaczalności.
- W pracy znajduje się sporo potknięć i błędów językowych, niektóre z nich zawarłem w poniższej tabeli:

strona	Jest	Powinno być
8	Banezylu	Benzylu lub benzylowy
10	Methyl tert butyl	Methyl tert butyl ether
26	Sagrożenia	zagrożenia
32	wpływu	Wpływu
33	Istny	istotny
34	lub wytworzone	lub być wytworzone
38	Dietylstilbestrol	dietylostilbestrol
46	osiadających	osiągających
48	etanolu, acetaminofenu	etanol, acetaminofen
54	neftotokyczne	Nefrotoksyczne
71	dla jeden jonu	dla jednego jonu
73	Kolumienki amino propylowe	Kolumienki z wypełnieniem amino propylowym
79	staki	skali
109	Ocena genotoksycznych właściwości ftalanów – jako fragment tekstu	Ocena genotoksycznych właściwości ftalanów – jako tytuł podrozdziału
111	wastrości	wartości
116	ementem	elementem
117	indukacji	indukcji
119	monobezylu	monobenzylu
120	zakrożenia, swie, pisujące	zagrożenia, dwie, opisujące
125	0,99 mM	0,99 nM
128	zmówić, różniąc	zwrócić, różnic
130	urydino-5'-difosfo-glukoronylotranferazy	urydino-5'-difosfo-glukoronylotranferazy
131	di-n-dutylu, dietylheksylu, etylu, etylo, carboksy, octyl	di-n-butylu, dietyloheksylu, etylu, etylo, karboksy, oktyle
133	ubutku, pisanym	użytku, opisanym
137	mogę	Mogą
139	biodostępność	biodostępności
144	genotoksycznych	genotoksyczny
156	bark	brak

Przytoczone wątpliwości nie mają istotnego charakteru i nie podważają w żadnej mierze wartości rozprawy i mojej bardzo pozytywnej jej oceny. Reasumując, uważam, że cel pracy został zrealizowany,

a postawione przez autora tezy znalazły potwierdzenie. Rozprawa mgr inż. Radosława Czernycha zawiera bogaty, solidny i wartościowy materiał badawczy, a Kandydat wykazał się ponadto doskonałą znajomością technik laboratoryjnych w zakresie analityki chemicznej materiału biologicznego oraz testów toksykologicznych.

Kandydat jest autorem i współautorem 6 publikacji naukowych opublikowanych w czasopismach recenzowanych, 1 rozdziału w książce oraz 39 doniesień konferencyjnych. W czasie przewodu doktorskiego doktorant dwukrotnie pełnił rolę kierownika w projektach badawczych finansowanych przez MNISW i NCN.

Biorąc pod uwagę powyższe fakty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa spełnia ustawowe i zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr inż. Radosława Czernycha do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

