

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Andrzeja Berga pt.:  
„Narażenie kobiet w wieku rozrodczym na substancje o działaniu grzybobójczym będące skutkiem ekspozycji żywieniowej”

Promotor rozprawy doktorskiej: prof. dr hab. Tomasz Bączek

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Zakładzie Toksykologii Środowiska Wydziału Nauk o Zdrowiu z Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Tematyka rozprawy doktorskiej odnosi się do bardzo aktualnego problemu związanego z oceną narażenia człowieka na różnego rodzaju ksenobiotyki, a dokładnie pestycydy z grupy fungicydów, które to powszechnie stosowane są w ochronie upraw rolniczych, sadowniczych, warzywnych czy nawet ogrodniczych, przede wszystkim jako środki grzybobójcze, ale także na etapie transportu i przechowywania warzyw i owoców w celu wydłużenia czasu ich przydatności do spożycia. Mając na uwadze fakt, iż część związków należących do tej grupy pestycydów zaliczana jest także do tak zwanych związków endokrynnie czynnych (z ang. *Endocrine Disrupting Chemicals*, *EDCs*) za niezmiernie istotne uznaje się prowadzenie badań, mających na celu ocenę stopnia narażenia jak i skutków wynikających z ekspozycji człowieka na te związki, co stało się zasadniczą przesłanką do podjęcia się przez Pana mgr Andrzeja Berga zaplanowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej prac badawczych. Za cel nadrzędny swojej rozprawy doktorskiej Pan mgr Andrzej Berg postawił sobie bowiem opracowanie jednej selektywnej i czulej metodyki analitycznej oznaczania 17 wybranych fungicydów oraz dwóch produktów ich przemian w surowicy krwi i wykorzystanie jej do analizy próbek surowicy pobranych od 236 kobiet w wieku rozrodczym, a następnie skorelowanie uzyskanych wyników badań ze spożyciem warzyw i owoców oraz występowaniem zaburzeń hormonalnych i metabolicznych charakterystycznych dla zespołu policystycznych jajników (PCOS) wśród kobiet.

Podjęcie tej tematyki badawczej przez Doktoranta jest zgodne z trendami rozwojowymi badań z zakresu oceny ryzyka zdrowotnego i analityki chemicznej.

Rozprawa doktorska Pana mgr Andrzeja Berga napisana jest w języku polskim. Stanowi ona bardzo zwarte opracowanie, czego potwierdzeniem jest fakt, iż całość dysertacji obejmuje 68 stron. Układ dość typowy dla prac doktorskich, obejmujący: spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wstęp (zawierający zagadnienia teoretyczne), cel badań, materiał i metody badawcze, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim oraz w języku angielskim, aneks, spis rysunków i tabel zamieszczonych w pracy oraz literaturę. Należy jednak podkreślić, iż w tym układzie zabrakło typowego krótkiego wprowadzenia do tematyki podjętej pracy doktorskiej, czyli standardowego wstępu, a dopiero w dalszej kolejności przedstawienia bardziej szczegółowych aspektów teoretycznych w części, która często tytułowana jest jako „Przegląd literaturowy”, „Część literaturowa” itp. Ponadto, część dotycząca przeglądu literatury, a zatem i prezentująca bieżący stan wiedzy na temat poruszany w ramach niniejszej pracy doktorskiej obejmuje zaledwie 8 stron. Ta część, mimo iż została napisana w sposób poprawny, to jednak bardzo lakoniczny jak na rozprawę doktorską i moim zdaniem w niewystarczającym stopniu wprowadza czytelnika w cel podjętych przez Doktoranta badań. Przedstawione w tym rozdziale dane często odnoszą się tylko do stanu wiedzy w Polsce (np. rozdziały pt. „*Fungicydy w Polsce*” czy „*Warzywa i owoce będące głównym źródłem ekspozycji człowieka na fungicydy*”), a przecież problematyka, której podjął się Doktorant nie ma lokalnego charakteru. Chciałabym także podkreślić jeden ważny aspekt, który również powinien być wzięty pod uwagę w kontekście oceny narażenia człowieka czy innych organizmów na jakiegokolwiek związki chemiczne, a mianowicie ich trwałość, czego Doktorant nie omówił w swojej rozprawie doktorskiej. Ponadto, Doktorant nie wskazał także w tej części żadnych danych na temat stanu wiedzy dotyczącego obecności fungicydów w owocach i warzywach, wskazując przykładowo jakie związki z wytypowanej grupy fungicydów zostały już wykryte i na jakich poziomach stężeń? Jakie są przyczyny i przesłanki do podjętego tematu? Czy dostępne są już jakiegokolwiek badania, które wskazywałyby, że fungicydy mogą przyczyniać się do PCOS? Mam nadzieję, że te kwestie zostaną w jasny sposób przedstawione podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

W dalszej części rozprawy doktorskiej Doktorant przedstawia w sposób jasny i precyzyjny cel oraz hipotezę zaplanowywanych badań, przechodząc następnie do opisu materiałów

i metod badawczych wykorzystanych w pracy doktorskiej. Badania zostały zaplanowane prawidłowo, a opis ich przebiegu przedstawiono w sposób czytelny i syntetyczny. Należy podkreślić, iż realizacja pierwszego zadania badawczego, tj. opracowania metodyki oznaczania 17 fungicydów i 2 produktów przemian metabolicznych w próbkach surowicy krwi ludzkiej z wykorzystaniem techniki GC-MS/MS w trybie MRM została przeprowadzona w poprawny sposób. Obejmowała ona w pierwszej kolejności dobranie odpowiednich warunków metody oznaczeń końcowych (tj. pracy zestawu GC-MS/MS), następnie dobrania techniki (spośród trzech testowanych tj. LLE, SPE, QuEChERS) i warunków ekstrakcji wytypowanych do badań analitów z próbek surowicy krwi ludzkiej, a w kolejnym etapie pełnej walidacji opracowanej procedury analitycznej i finalnie jej zastosowania do analizy 236 próbek surowicy kobiet w wieku od 18 do 42 lat, będących pod opieką Poradni Zaburzeń Hormonalnych, Nadciśnienia Tętniczego oraz Chorób Przemian Materii w Gdyni i prowadzonych przez specjalistę chorób wewnętrznych i endokrynologii (prof. dr hab. med. Dominika Rachonia). Badania te zrealizowano w ramach grantu NCN OPUS 8 (2014/15/B/NZ7/00999), którego kierownikiem był prof. dr hab. med. Dominik Rachoń. Chciałabym jednak poprosić Doktoranta o doprecyzowanie następujących kwestii:

- Jak dokładnie przeprowadził optymalizację parametrów analizy chromatograficznej oraz parametrów pracy spektrometru mas?
- Dlaczego przejścia MRM w Tabeli 3 podane są z dokładnością do części setnych?
- Dlaczego wśród wymienionych kryteriów wyboru odpowiedniej procedury ekstrakcji wymieniono tylko precyzję, powtarzalność i szybkość przygotowania próbki, a nie odwołano się do dokładności uzyskiwanych wyników? Jak wyznaczana była powtarzalność tych procedur w odróżnieniu od precyzji?
- Jakie było kryterium wyboru różnych sorbentów wykorzystanych w technice SPE (tj. Strata-X Polymeric RP i Oasis HLB)?
- Dlaczego opisując proces dobierania warunków ekstrakcji 19 wytypowanych analitów Doktorant w opisie podaje jedynie informację, iż „do próbek surowicy krwi ludzkiej dodawano 10  $\mu$ l roztworu wzorca wewnętrznego” – tylko wzorca wewnętrznego?
- Dlaczego dane na wykresach (Rysunek 8-10) nie zawierają słupków błędów, mimo że analiza próbek wykonywana była w trzech równoległych powtórzeniach oraz mimo tego, że na stronie 28 Doktorant pisze o tym, że „ze względu na brak powtarzalności wyników...”.

Ten wniosek nie odnajduje swego poparcia w zaprezentowanych wynikach badań na tychże rysunkach.

- Co dokładnie oznaczają próbki ślepe, próbki wzorcowe i próbki rzeczywiste wykorzystane w toku walidacji całej procedury analitycznej?
- Jakże było ostateczne kryterium wyboru analitów do opracowanej metodyki – w rozprawie można odnaleźć dwie informacje, że „wybrano najczęściej stosowane fungicydy do ochrony wyżej wymienionych produktów roślinnych” – czyli tych, wykazanych w badaniach ankietowych; zaś w Rozdziale 5 napisane jest „oznaczenie 17 najczęściej stosowanych w rolnictwie fungicydów”.

Należy podkreślić, iż badania pod kątem oceny stopnia zawartości 17 wytypowanych fungicydów i 2 produktów przemian metabolicznych w pobranych próbkach surowicy krwi, uzupełniono o bardzo istotne: (i) badania ankietowe, mające na celu pozyskanie informacji na temat stylu życia, ilości spożywania owoców i warzyw, współistniejących chorób czy przyjmowanych leków; (ii) oznaczenia poziomów surowiczych stężeń hormonów jak i wskaźników zaburzeń metabolicznych w grupie badanych kobiet; (iii) jak i analizę statystyczną uzyskanych wyników badań.

Rozprawa doktorska napisana jest prostym i zrozumiałym językiem, aczkolwiek w kilku fragmentach trudno nie dostrzec drobnych niedociągnięć językowych i edycyjnych (jak np. „biomonitoring” zamiast biomonitoring; „surowicy ludzkiej” (strona 23); braku akapitów w całej pracy; niewłaściwego w niektórych fragmentach zastosowania terminu metoda vs. technika (str. 18), a czasami nawet metoda vs. metodyka (str. 48) – mimo zdecydowanie widocznej staranności Doktoranta w stosowaniu prawidłowej terminologii) czy stosowania skrótów myślowych jak i żargonu laboratoryjnego (jak np. „optymalizację metody wykonano od 5-45 V, co 3 V”; „Chromatogram 17 fungicydów i 2 produktów przemian metabolicznych”; „Chromatogram GC-MS/MS dla propiokonazolu (1) oraz chromatogram MRM dla propiokonazolu (2)”).

Zwieńczeniem dysertacji są rozdziały pt. Wnioski oraz Streszczenie pracy w j. polskim i j. angielskim, a także rozdział Literatura. Tutaj muszę zwrócić uwagę na fakt, iż nie wszystkie informacje zawarte w rozdziale pt. Wnioski są spójne z informacjami podanymi w streszczeniach pracy. W streszczeniu pracy napisano bowiem, że „Co więcej, stężenia niektórych z nich korelowały dodatnio z surowiczymi stężeniami anandrenów (TST, 4-A-dione), TSH, oraz

ujemnie z E2. Nie znaleziono natomiast żadnych korelacji pomiędzy stężeniami badanych związków a wskaźnikami zaburzeń metabolicznych w tej grupie.” – co mogłoby sugerować, że takie korelacje pomiędzy uzyskanymi wynikami a obserwowanymi zaburzeniami hormonalnymi zanotowano, podczas, gdy w rozdziale dotyczącym dyskusji uzyskanych wyników jak i we wnioskach pracy – pojawia się jasne stwierdzenie, iż takich korelacji nie zaobserwowano. Równocześnie w streszczeniach niemal trzykrotnie powielano tę samą informację dotyczącą celu podjętych badań. Natomiast wykaz cytowanej literatury obejmuje 46 pozycji, co moim zdaniem budzi niedosyt, choć należy podkreślić, iż większość z cytowanych pozycji (ok. 80%) została opublikowana w ciągu ostatniej dekady, a zatem odnosi się do najbardziej aktualnych danych.

Niemniej jednak postawiony przez Pana mgr Andrzeja Berga cel pracy został zrealizowany, a za najważniejsze osiągnięcie Doktoranta uważam:

- opracowanie nowej, czulej i selektywnej metodyki analitycznej do oznaczania 17 różnych fungicydów i 2 produktów ich przemian z wykorzystaniem techniki GC-MS/MS w trybie monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (MRM) w próbkach surowicy krwi ludzkiej, która to ze względu na bardzo dobre wartości podstawowych parametrów metrologicznych jak i swoją prostotę oraz stosunkowo krótki czas potrzebny do przygotowania próbek do analizy posiada duży potencjał aplikacyjny i może z łatwością być stosowana w rutynowych i przesiewowych badaniach, mających na celu ocenę narażenia człowieka na tego typu związki.
- podjęcie po raz pierwszy próby skorelowania obecności wytypowanych fungicydów w próbkach surowicy krwi z najczęstszym źródłem ich ekspozycji tj. spożywaniem warzyw i owoców, a także z występowaniem zaburzeń hormonalnych czy metabolicznych u kobiet w wieku rozrodczym z rozpoznanym zespołem PCOS.

W toku przeprowadzonych badań Doktorant wykazał, że podwyższone stężenia 7 analitów spośród 19 wytypowanych do badań związków były na znacznie wyższym poziomie w grupie kobiet cierpiących na PCOS w porównaniu z grupą kontrolną. Stwierdził jednak, że nie mają one związku z obserwowanymi wśród nich zaburzeniami hormonalnymi i metabolicznymi, a są jedynie wynikiem zwiększonego spożycia warzyw i owoców w grupie kobiet z PCOS. Tym samym postawiona hipoteza badawcza została zweryfikowana i tylko częściowo potwierdzona.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska stanowi zatem oryginalne studium badawcze, zawierające elementy nowości naukowej, a uzyskane wyniki badań stanowią wkład w stan wiedzy z zakresu nauk o zdrowiu, ryzyka zdrowotnego jak i analityki śladowej. Z tego też względu żywię ogromną nadzieję, że zostaną one w niedalekiej przyszłości opublikowane.

Na podstawie dołączonego dorobku naukowego można stwierdzić, że Pan mgr Andrzej Berg jest współautorem 9 publikacji o zasięgu międzynarodowym opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej (indeks H = 4). W jednej z nich pełni rolę pierwszego autora, choć nie jest to publikacja tematycznie powiązana z przedstawioną rozprawą doktorską. Na tej podstawie wnioskuję jednocześnie, iż zaprezentowane w niniejszej pracy doktorskiej badania nie zostały jeszcze opublikowane. Niemniej jednak jego dorobek publikacyjny świadczy o aktywnym uczestnictwie Pana mgr Andrzeja Berga w badaniach naukowych, prowadzonych przez różnorodne zespoły badawcze, obejmujące różne zagadnienia badawcze, powiązane jednak tematycznie w znaczącym stopniu z problemem zdrowotnym, jakim jest zespół PCOS wśród kobiet. Potwierdzeniem jest tego także fakt, iż był wykonawcą w dwóch projektach naukowych (OPUS 8 2014/15/B/NZ7/00999 oraz SONATA 10 2015/19/D/NZ7/03283) i jest współautorem zgłoszenia patentowego (P.427323). Ponadto, brał także czynny udział w konferencjach krajowych, będąc autorem 3 komunikatów.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana mgr Andrzeja Berga spełnia określone w Ustawie o Stopniach i Tytule Naukowym warunki stawiane rozprawom doktorskim. Wnioskuję zatem do Rady Nauk o Zdrowiu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie ocenianej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pana mgr Andrzeja Berga do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK  
Katedra Analizy Środowiska  
*Anna Białk-Bielińska*  
dr hab. inż. Anna Białk-Bielińska  
profesor Uniwersytetu Gdańskiego

dr hab. inż. Anna Białk-Bielińska, prof. UG