



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań

tel.: 61 641 83 38
akluczynska@ump.edu.pl

Dr hab. Agnieszka Kluczyńska-Gabryszak

Poznań, 09.02.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Andrzeja Berga

pt. „Narażenie kobiet w wieku rozrodczym na substancje o działaniu grzybobójczym będące skutkiem ekspozycji żywieniowej”

Przedstawiona do oceny praca doktorska koncentruje się na ekspozycji człowieka na pozostałości środków ochrony roślin, w szczególności fungicydy. Narażenie człowieka na pestycydy może powodować wiele negatywnych skutków zdrowotnych, zaburzając gospodarkę hormonalną, upośledzając pracę narządów, wpływając na działanie enzymów, a także wykazując działanie mutagenne i teratogenne. Zaproponowaną tematykę badawczą uważam zatem za uzasadnioną i ważną. Obiektem zainteresowania naukowego Doktoranta stała grupa środków ochrony roślin o działaniu grzybobójczym, wśród których znajdują się związki endokrynnie czynne (ang. *endocrine disrupting chemicals*, EDCs).

Układ rozprawy jest prawidłowy. Przedstawiona rozprawa liczy 68 stron i rozpoczyna się od spisu treści oraz przejrzystego wykazu stosowanych skrótów i symboli. Praca zawiera wstęp teoretyczny, cel badań zawierający postawioną przez Doktoranta hipotezę badawczą, jasno opisaną część doświadczalną, omówienie wyników oraz dyskusję. Końcowymi elementami pracy są wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, aneks, spis rycin i tabel oraz bibliografia składająca się z 46 pozycji. Pod względem formalnym praca została przygotowana bardzo starannie i napisana poprawnym językiem naukowym. Wyniki badań zostały przedstawione w postaci czytelnych tabel i rycin, co ułatwia ich interpretację.

We wstępie Doktorant zawarł wprowadzenie do poruszanej tematyki badawczej oraz uzasadnił celowość przeprowadzonych badań. Pan mgr Berg scharakteryzował grzybobójcze środki ochrony roślin, omówił stosowanie fungicydów w Polsce, akcentując ciągły wzrost sprzedaży tych środków na przestrzeni ostatnich 20 lat oraz opisał wpływ fungicydów na zdrowie człowieka. W mojej opinii nie wszystkie zagadnienia ze wstępu teoretycznego, zwłaszcza podrozdział 1.5.1, zostały omówione w sposób wyczerpujący, do czego przejdę w dalszej części recenzji.

Celem badań przeprowadzonych przez Doktoranta była ocena zależności między stężeniami fungicydów w surowicy krwi a występowaniem zaburzeń hormonalnych, a także zależności między wyznaczonymi stężeniami fungicydów a spożywaniem warzyw i owoców. W badaniach zastosowano nową metodę analityczną umożliwiającą jednoczesne oznaczenie 17 wybranych grzybobójczych środków ochrony roślin i 2 produktów ich przemian, wykorzystującą ekstrakcję ciecz-ciecz oraz chromatografię gazową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas. Autor dysertacji sformułował hipotezę, że spożycie warzyw i owoców może stanowić źródło ekspozycji na związki o działaniu grzybobójczym, co prowadzić może do występowania zaburzeń hormonalnych i metabolicznych u kobiet w wieku rozrodczym.

Cele pracy zostały jasno zdefiniowane i konsekwentnie zrealizowane podczas kolejnych etapów prac, obejmujących opracowanie nowej metody GC-MS/MS oznaczania wybranych fungicydów i produktów ich przemian, opracowanie procedury ekstrakcji fungicydów z próbek surowicy krwi ludzkiej, walidację nowo opracowanej metodyki. Uzupełnieniem danych zebranych podczas oznaczeń fungicydów w próbkach surowicy krwi zebranych od kobiet w wieku rozrodczym były oznaczenia surowicznych stężeń hormonów i wskaźników zaburzeń metabolicznych oraz przeprowadzenie wywiadu kwestionariuszowego wśród kobiet włączonych do badania służącego pozyskaniu informacji o stylu życia, współistniejących chorobach, a przede wszystkim spożywaniu warzyw i owoców. Kończącym etapem prac była analiza statystyczna uzyskanych wyników służąca weryfikacji postawionej przez Doktoranta hipotezy badawczej.

Kluczowym etapem procedury analitycznej, zwłaszcza przy oznaczaniu związków występujących w badanych próbkach w małym zakresie stężeń, jest przygotowanie próbki do analizy. Pan mgr Berg w ramach opracowania optymalnej i wiarygodnej procedury ekstrakcji fungicydów z próbek surowicy krwi ludzkiej przetestował trzy różne sposoby przygotowania próbek, tj. ekstrakcję ciecz-ciecz, ekstrakcję do fazy stałej oraz metodę QuEChERS. Co więcej, Doktorant przetestował 6 różnych rozpuszczalników lub mieszanin rozpuszczalników w celu wybrania odpowiedniej mieszaniny ekstrakcyjnej do ekstrakcji ciecz-ciecz, 3 różne kolumny ekstrakcyjne oraz 2 eluenty w celu wybrania odpowiednich warunków do ekstrakcji do fazy stałej oraz 2 rozpuszczalniki i 2 metody dSPE (dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej) w celu wybrania najbardziej optymalnych w metodzie QuEChERS. Na podstawie przeprowadzonych badań wstępnych i uzyskanych danych Doktorant wybrał ekstrakcję ciecz-ciecz z wykorzystaniem mieszaniny dichlorometan:heksan:aceton (50:30:20, v/v/v) jako technikę przygotowania próbek, która została wykorzystana do izolacji analitów w zebranych próbkach surowicy krwi od kobiet w wieku rozrodczym.

Kolejnym istotnym z analitycznego punktu widzenia etapem prac badawczych podjętych przez Doktoranta była walidacja nowo opracowanej metodyki oznaczania fungicydów w surowicy krwi. Autor dysertacji wyznaczył następujące parametry walidacyjne: zakres, liniowość, granica oznaczalności, granica wykrywalności, powtarzalność, odzysk uzyskując satysfakcjonujące wartości wymienionych parametrów walidacyjnych. Na uwagę zasługują niskie wartości granicy oznaczalności oraz wykrywalności wynoszące poniżej 1 ng/ml dla 18 spośród 19 oznaczanych analitów, nierzadko przyjmujące wartości pojedynczych pikogramów na mililitr (cyprodinil, tebukonazol, fludioksonil).

Opracowana i zwalidowana metodyka pomiaru stężeń 17 wybranych fungicydów oraz 2 produktów ich przemian została wykorzystana do analizy aż 236 próbek surowicy pobranych od kobiet w wieku od 18 do 42 lat, w tym 168 próbek pobranych od kobiet z zespołem policystycznych jajników (PCOS) oraz 68 próbek pobranych od kobiet stanowiących grupę kontrolną. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdzono istotnie wyższe stężenia siedmiu spośród 19 analizowanych fungicydów w grupie kobiet z zespołem policystycznych jajników w porównaniu do grupy kontrolnej. Interesującym dopełnieniem powyższych wyników badań było wykonanie w następnym etapie analizy korelacji stężeń badanych fungicydów z parametrami klinicznymi, wynikami badań hormonalnych oraz wskaźnikami zaburzeń metabolicznych wśród kobiet z zespołem policystycznych jajników. Uzyskane wyniki zostały następnie omówione w postaci sześciostronicowej dyskusji, świadczącej o dobrej znajomości literatury przedmiotu oraz umiejętności krytycznej oceny uzyskanych danych przez Doktoranta.

W końcowej części rozprawy Doktorant zawarł 3 wnioski oraz podjął się weryfikacji postawionej hipotezy, stwierdzając przyjęcie jedynie pierwszej jej części mówiącej o tym, że spożycie warzyw i owoców może stanowić źródło ekspozycji na grzybobójcze środki ochrony roślin.

Wywiązując się z obowiązku recenzenta, chciałabym przedstawić kilka uwag, pytań oraz zagadnień do dyskusji i proszę o ustosunkowanie się do nich w trakcie publicznej obrony:

- 1) Doktorant we wstępie teoretycznym zawarł podrozdział „Metody oznaczeń stężeń fungicydów w próbkach biologicznych”, w którym cytowane są jedynie 3 pozycje literaturowe dotyczące metod oznaczania fungicydów w próbkach biologicznych. Wartościowym uzupełnieniem tego podrozdziału byłoby porównanie większej liczby dotychczas opracowanych metod oznaczania fungicydów (najlepiej w formie tabelarycznej) m.in., pod względem liczby analitów, czasu trwania analizy, metody

- przygotowania próbki, metody detekcji, wartości granicy wykrywalności oraz granicy oznaczalności.
- 2) Rycina 1 nie posiada podanego źródła. Proszę o uzupełnienie tej informacji.
 - 3) W literaturze polskiej funkcjonują różne tłumaczenia trybu pracy „*multiple reaction monitoring*” w skrócie oznaczanego jako MRM będącego złotym standardem w analizie ilościowej w technice spektrometrii mas: monitorowanie wielokrotnych reakcji fragmentacji, monitorowanie wielu reakcji, monitorowanie reakcji fragmentacji. Doktorant w wykazie skrótów podał „tryb monitorowania reakcji fragmentacji”, co jest tłumaczeniem właściwym, po czym w części metodycznej użył mniej właściwego określenia „monitorowanie wybranych reakcji tworzenia jonów pseudo(molekularnych)”.
 - 4) W ocenianej dysertacji zawarto niejasny opis przygotowania roztworów do krzywej kalibracyjnej. Doktorant stwierdził, że przygotowanie krzywych kalibracyjnych z wykorzystaniem wzorców w surowicy ludzkiej pozwoliło wyeliminować efekt matrycy, jednak brak jest opisu sposobu wykonania próbek kalibracyjnych. W opisie wyznaczenia parametrów walidacyjnych metody podany jest tylko przedział stężeń (0,01 ng/ml – 100 ng/ml). Autor dysertacji napisał, że sporządzono roztwory kalibracyjne z odwzorowaniem matrycy, co sugerowałoby użycie matrycy zastępczej. Proszę o wyjaśnienie tych niejasności.
 - 5) Na uznanie zasługuje przetestowanie różnych mieszanin ekstrakcyjnych czy kolumniek ekstrakcyjnych w celu znalezienia najbardziej odpowiedniej do procedury ekstrakcji wybranych fungicydów. Proszę o informację, na ilu próbkach surowicy krwi przeprowadzono wyżej wymienione testy doboru parametrów procedur ekstrakcyjnych. Proszę również o podanie powodu, dlaczego na Rycinie 5 nie przedstawiono wartości pól powierzchni analitów w przypadku zastosowania kolumniek Strata C18 (6 ml/200 mg). Doktorant stwierdził, że najbardziej odpowiednim sposobem ekstrakcji fungicydów z surowicy krwi jest ekstrakcja cieczy z wykorzystaniem mieszaniny dichlorometan:heksan:aceton (50:30:20, v/v/v), ze względu na powtarzalność wyników i jedną z wyższych odpowiedzi detektora. Drugi argument obrazują wykresy słupkowe umieszczone na Rycinach 8, 9, 10. Autor dysertacji nie umieścił jednak żadnych danych liczbowych ilustrujących lepszą powtarzalność wyżej wymienionej techniki ekstrakcji nad pozostałymi testowanymi technikami izolacji analitów z próbek surowicy krwi.

- 6) Autor dysertacji podał, że wartości odzysku oznaczanych substancji dla poziomu wzbogacenia 10 ng/ml i 100 ng/ml mieściły się w zakresie 70 - 120%. Jednak z danych umieszczonych w Tabeli 5 wynika, że zakres uzyskany na podstawie przeprowadzonych eksperymentów walidacyjnych był znacznie lepszy i wynosił 88,1 - 104,7 %. Jeśli podany w dysertacji zakres 70 - 120% wynikał z przyjętych wytycznych walidacyjnych, należałoby przywołać wytyczne walidacyjne przedstawiające takie kryteria akceptacji.
- 7) Czy opracowana i zwalidowana metodyka oznaczania fungicydów mogłaby zostać zastosowana do analizy próbek moczu? Mocz stanowi również wartościową próbkę biologiczną, której analiza dostarcza informacji o ekspozycji na kenobiotyki, w tym środki ochrony roślin.

Pragnę zaznaczyć, że moje powyższe komentarze i zapytania nie obniżają wartości merytorycznej ocenianej rozprawy.

Podsumowując, przedłożona przez pana mgr Andrzeja Berga praca doktorska stanowi rzetelny i wartościowy opis badań podjętych w celu oceny zależności pomiędzy stężeniami fungicydów w surowicy krwi kobiet a występowaniem zaburzeń hormonalnych, metabolicznych oraz spożywaniem przez nie warzyw i owoców. Praca została dobrze zaprojektowana i wykonana. Doktorat wykorzystał w badaniach nowoczesną technikę łączoną GC-MS/MS i opracował czułą metodykę oznaczania wybranych fungicydów w surowicy krwi. Uzyskane wyniki stanowią cenne źródło informacji dotyczących ekspozycji na grzybobójcze środki ochrony roślin wśród kobiet w wieku rozrodczym. Opracowana metodyka oznaczania fungicydów może zostać zastosowana do analizy pozostałości fungicydów w innych populacjach i próby skorelowania wyznaczonych stężeń z innymi jednostkami chorobowymi.

Biorąc pod uwagę powyższe, przedłożoną dysertację doktorską oceniam pozytywnie i stwierdzam, że spełnia ustawowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Nauk o Zdrowiu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie pana mgr Andrzeja Berga do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agnieszka Kluczyńska-Gabryńska