

Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Nauk o Zdrowiu z Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Andrzej Berg

**Narażenie kobiet w wieku rozrodczym na substancje
o działaniu grzybobójczym będące skutkiem ekspozycji żywieniowej**

Promotor pracy:

prof. dr hab. Tomasz Bączek
Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny

Praca wykonana w:

Zakładzie Toksykologii Środowiska
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2023

Składam serdeczne podziękowania:

Panu prof. dr. hab. n. med. Dominikowi Rachoniowi za inspirację, nieocenioną pomoc i wsparcie na każdym etapie powstawania niniejsze pracy.

Panu prof. dr. hab. Tomaszowi Bączkowi za szansę napisania rozprawy doktorskiej, opiekę merytoryczną, krytykę i wsparcie, wszechstronną pomoc podczas redagowania pracy doktorskiej.

Mojemu partnerowi Grzegorzowi Stryjasowi za cierpliwość, a także za mobilizację do pracy.

Najbliższym za wsparcie, dobre słowo i wiarę we mnie.

Pracownikom Polpharma Biologics za stworzenie przyjaznej i motywującej atmosfery w pracy.

Wszystkim pracownikom Zakładu Toksykologii Środowiska Wydziału Nauk o Zdrowiu z Instytutem Medycyny Morskiej i Tropikalnej, ze szczególnym uwzględnieniem Pani prof. dr hab. Lidii Wolskiej i Pana dr. inż. Macieja Tankiewicza, za możliwość przeprowadzenia badań naukowych.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	7
1.1. Fungicydy, czyli środki grzybobójcze	7
1.2. Fungicydy w Polsce	7
1.3. Warzywa i owoce będące głównym źródłem ekspozycji człowieka na fungicydy	8
1.4. Wpływ fungicydów na zdrowie człowieka	9
1.4.1 Zespół wielotorbielowatych jajników.....	10
1.5. Biomonitoring	10
1.5.1 Metody oznaczeń stężeń fungicydów w próbkach biologicznych.....	14
2. CEL BADAŃ	15
3. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE	16
3.1. Odczynniki i wzorce	16
3.2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny	17
3.3. Opracowanie metodyki oznaczania 17 fungicydów i 2 produktów przemian metabolicznych w próbkach surowicy krwi ludzkiej z wykorzystaniem techniki GC-MS/MS	18
3.3.1 Warunki analizy chromatograficznej.....	18
3.3.2 Dobór optymalnych warunków pracy tandemowego spektrometru mas MS/MS...19	
3.3.3 Przygotowanie roztworów wzorcowych oraz roztworów kalibracyjnych.....	22
3.3.4 Opracowanie procedury ekstrakcji fungicydów z próbek surowicy krwi ludzkiej..23	
3.3.5 Ekstrakcja za pomocą techniki ciecz-ciecz (ang. <i>liquid-liquid extraction</i>).....	25
3.3.6 Ekstrakcja za pomocą techniki SPE (ang. <i>solid-phase extraction</i>)	25
3.3.7 Ekstrakcja za pomocą techniki QuEChERS	26
3.3.8 Porównanie opracowanych metodyk izolacji fungicydów z próbek surowicy krwi	27
3.4. Wyznaczenie podstawowych parametrów walidacyjnych opracowanej procedury oznaczania fungicydów w próbkach surowicy krwi	29
3.5. Materiał badawczy	32
3.6. Wywiad kwestionariuszowy	33
3.7. Oznaczenia surowicznych stężeń hormonów i wskaźników zaburzeń metabolicznych	33
3.8. Analiza statystyczna wyników	34
4. WYNIKI	36

4.1.	Charakterystyka badanych grup.....	36
4.2.	Porównanie wyników badań hormonalnych oraz laboratoryjnych wskaźników metabolicznych w badanych grupach	36
4.3.	Ilościowa ocena spożycia warzyw i owoców w badanych grupach.....	38
4.4.	Wyniki oznaczeń surowiczych stężeń fungicydów w badanych grupach .	40
4.5.	Korelacje stężeń badanych fungicydów z wynikami badań hormonalnych oraz wskaźnikami zaburzeń metabolicznych wśród kobiet z zespołem policystycznych jajników (ang. <i>polycystic ovary syndrome, PCOS</i>).....	42
4.6.	Ocena związku pomiędzy podwyższonymi stężeniami badanych fungicydów w surowicy a rozpoznaniem zespołu policystycznych jajników (PCOS)	45
5.	<i>DYSKUSJA</i>	47
6.	<i>WNIOSKI</i>	53
7.	<i>STRESZCZENIE</i>	54
8.	<i>SUMMARY</i>	55
9.	<i>ANEKS</i>	56
10.	<i>SPIS RYSUNKÓW I TABEL ZAMIESZCZONYCH W PRACY</i>	61
10.1.	Spis rysunków.....	61
10.2.	Spis tabel	61
11.	<i>LITERATURA</i>	63

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW I SYMBOLI

Skrót/symbol	Termin anglojęzyczny	Termin polskojęzyczny
4A-dione	<i>androstendione</i>	androstendion
4-OH PYR	<i>4-OH pyrimethanil</i>	4-OH-pirymetanil
A średnia	<i>arithmetic mean</i>	średnia arytmetyczna
ACN	<i>acetonitrile</i>	acetonitryl
AR	<i>androgen receptor</i>	receptory androgenowe
AZOXYstrob	<i>azoxystrobin</i>	azoksystrobina
BMI	<i>body mass index</i>	wskaźnik masy ciała
BOSlid	<i>boscalid</i>	boskalid
CEC18	<i>modified silica gel with octadecyl groups</i>	modyfikowany żel krzemionkowy z grupami oktadecylowymi
CHLOnil	<i>chlorthalonil</i>	chlorotalonil
ChNS	-	choroby niedokrwiennej serca
CV	<i>coefficient of variation</i>	współczynnik zmienności
CYPR	<i>cyprodinil</i>	cyprodinil
DBP	<i>diastolic blood pressure</i>	rozkurczowe ciśnienie tętnicze
DCM	<i>dichloromethane</i>	dichlorometan
DHEA-s	<i>dehydroepiandrosterone sulfate</i>	siarczan dehydroepiandrosteronu
DIFEzol	<i>difenoconazol</i>	difenokonazol
dSPE	<i>dispersive-solid phase extraction</i>	dyspersyjna ekstrakcja do fazy stałej
E2	<i>17β-estradiol</i>	17-β-estradiol
EDCs	<i>endocrine-disrupting chemicals</i>	związki endokrynnie czynne
EtAc	<i>ethyl acetate</i>	octan etylu
EPOzol	<i>epoxiconazole</i>	epoksykonazol
ERα	<i>estrogen receptor alpha</i>	receptory estrogenowe alfa
FAI	<i>free androgen index</i>	wskaźnik wolnych androgenów
FLUnil	<i>fludioxonil</i>	fludioksonil
FLUzol	<i>flusilazole</i>	flusilazol
FSH	<i>follicle stimulating hormone</i>	hormon folikulotropowy
ft4	<i>free thyroxine</i>	wolna tyroksyna
GC	<i>gas chromatography</i>	chromatografia gazowa
GC-MS/MS	<i>gas chromatography-tandem mass spectrometry</i>	chromatografia gazowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
GM	<i>geometric mean</i>	średnia geometryczna
HMB	<i>human biomonitoring</i>	biomonitoring człowieka
HOMA -IR	<i>homeostasis assesment of insulin resistance</i>	wskaźnik oporności na insulinę
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>	wysokosprawna chromatografia cieczowa
HepG2	<i>liver cancer cell</i>	komórki nowotworu wątroby
IMAZ	<i>imazalil</i>	imazalil
KAP	<i>captan</i>	kaptan
LLE	<i>liquid-liquid extraction</i>	ekstrakcja ciecz-ciecz
LH	<i>luteinizing hormone</i>	hormon luteinizujący
LOD	<i>limit of detection</i>	granica wykrywalności
LOQ	<i>limit of quantification</i>	granica oznaczalności
METSyl	<i>metalaxyl</i>	metalaksyl
MgSO ₄	<i>magnesium sulphate</i>	siarczan magnezu

MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>	tryb monitorowania reakcji fragmentacji
MS/MS	<i>tandem mas spectrometry</i>	tandemowa spektrometria mas
NaCl	<i>sodium chloride</i>	chlorek sodu
OH-TEBzol	<i>oh-tebuconazole</i>	OH-tebukonazol
OR	odds ratio	iloraz szans
PCOS	<i>polycystic ovary syndrome</i>	zespół wielotorbielowatych jajników
PSA	<i>primary secondary amine</i>	pierwszo-, drugorzędowa amina
PRL	prolactin	prolaktyna
PROaz	<i>prochloraz</i>	prochloraz
PROzol	<i>propiconazole</i>	propikonazol
PYR	<i>pyrimethanil</i>	pirymetanił
R2	<i>coefficient of determination</i>	współczynnik determinacji
RSD	<i>relative standard deviation</i>	względne odchylenie standardowe
SBP	<i>systolic blood pressure</i>	skurczowe ciśnienie tętnicze
SD	<i>standard deviation</i>	odchylenie standardowe
SHBG	<i>sex hormone binding globulin</i>	globuliny wiążącej hormony płciowe
SPE	<i>solid phase extraction</i>	ekstrakcja do fazy stałej
T2DM	<i>type 2 diabetes mellitus</i>	cukrzyca typ 2
T3	<i>triiodothyronine</i>	trójjodotyronina
T4	<i>thyroxine</i>	tyroksyna
TEBzol	<i>tebuconazole</i>	tebukonazol
TETRAzol	<i>tetraconazole</i>	tetrakonazol
THPI	<i>tetrahydrophthalimide</i>	tetrahydroftalimid
TRIstrob	<i>trifloxystrobin</i>	trifloksystrobina
TSH	<i>thyroid stimulating hormone</i>	hormon tyreotropowy
TST	<i>testosterone</i>	testosteron
v:v	-	stosunek objętościowy
QuEChERS	<i>quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>	szybka, prosta, tania, skuteczna, wytrzymała oraz bezpieczna

1. WSTĘP

1.1. Fungicydy, czyli środki grzybobójcze

Fungicydy (łac. *fungus* – grzyb, *caedo* – zabijam), to grzybobójcze środki ochrony roślin o szerokim zastosowaniu w ochronie upraw rolniczych, sadowniczych oraz warzywnych. Ich głównym zadaniem jest ograniczanie chorób, które wywoływane są przez grzyby. Wykorzystywane są również do zaprawiania nasion, aby podnieść ich odporność i zapewnić im odpowiednie warunki wegetacji [1,2]. Oprócz uprawy, swoje zastosowanie mają także przy transporcie oraz przechowywaniu owoców i warzyw, żeby ich przydatność do spożycia była jak najdłuższa [3].

Większość fungicydów posiada ukierunkowane działanie, co daje wysoką skuteczność przeciwko określonym rodzajom patogenów. Mechanizm działania związków grzybobójczych polega na uszkodzeniu błon komórkowych grzybów, dezaktywując tym samym krytyczne enzymy biorące udział w takich procesach jak: wytwarzanie energii lub oddychanie [4,5].

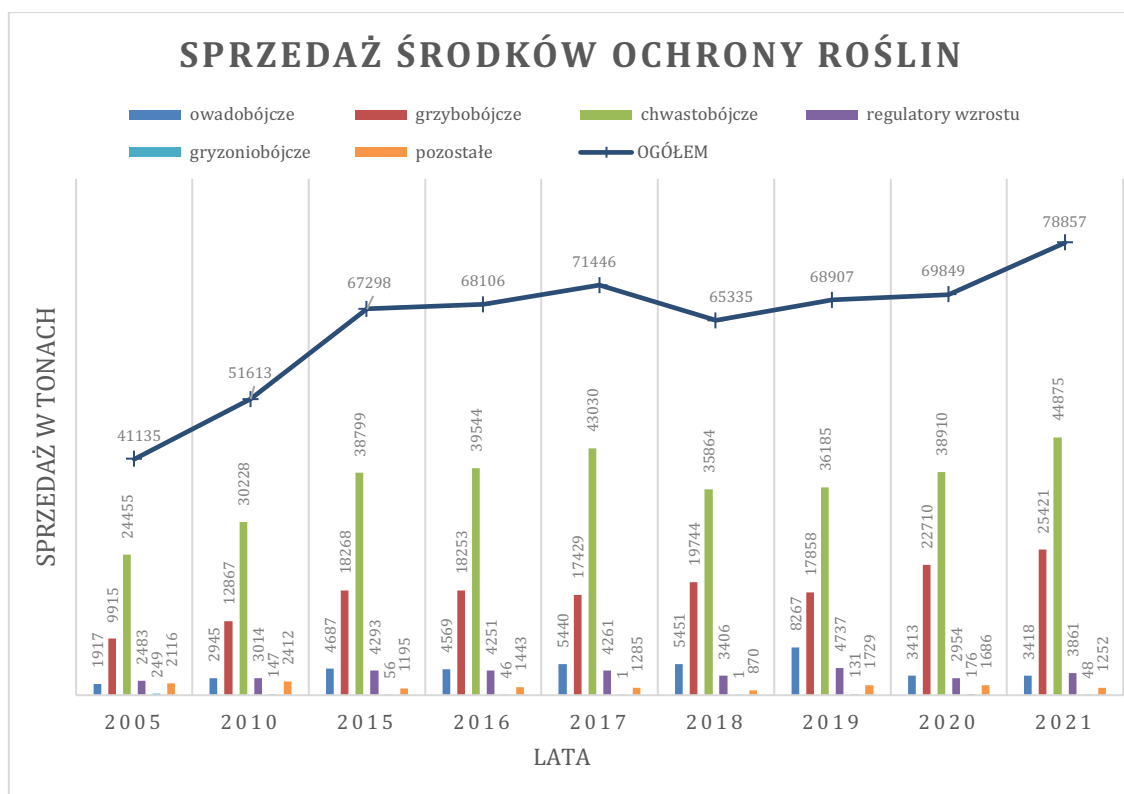
Fungicydy dzieli się między innymi na [6,7]:

- kontaktowe (powierzchniowe) – działają na powierzchni rośliny wykazując toksyczość tylko i wyłącznie w miejscu bezpośredniego zetknięcia się z czynnikiem chorobotwórczym;
- wgłębne – przedostają się do wnętrza tkanek rośliny;
- układowe – przenikają do wnętrza roślin i zatrzymują chorobowe procesy wywołwane przez grzyby.

1.2. Fungicydy w Polsce

Rolnictwo stanowi ważny sektor w polskiej gospodarce, a także jest jednym z podstawowych źródeł utrzymania sporej części społeczeństwa. Obecnie, według rejestru środków ochrony roślin prowadzonego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, dopuszczonych do obrotu oraz stosowania jest ponad 2,5 tysięcy preparatów, w tym: herbicydów - 1051 preparatów, fungicydów - 917 preparatów, insektycydów - 309 preparatów, regulatorów wzrostu - 166 preparatów, pozostałych - 75, a informacje dotyczące ich sprzedaży wskazują na systematyczny wzrost [Rysunek 1].

Sprzedaż środków ochrony roślin na potrzeby rolnictwa w roku 2021 wzrosła o 12,9% i wynosiła 78,9 tysięcy ton w porównaniu do roku 2020. W skali roku dynamika zmian sprzedaży środków ochrony roślin była zróżnicowana w zależności od ich rodzaju. Zgodnie z danymi Głównego Urzędu Statystycznego wzrosła sprzedaż regulatorów wzrostu o 30,7% (o 0,9 tysięcy ton), herbicydów o 15,3% (o 6,0 tysięcy ton) oraz fungicydów o 11,9% (o 2,6 tysięcy ton). Powyższe dane wskazują, że nieustannie wzrasta zużycie tych substancji oraz obszar ich zastosowań. Informacje branżowe o środkach grzybobójczych dotyczą jedynie ich sprzedaży. Nie wiadomo w jakich ilościach stosowane są do upraw, hodowli i konserwowania żywności [8,9].



Rysunek 1. Wykres przedstawiający sprzedaż środków ochrony roślin w Polsce.

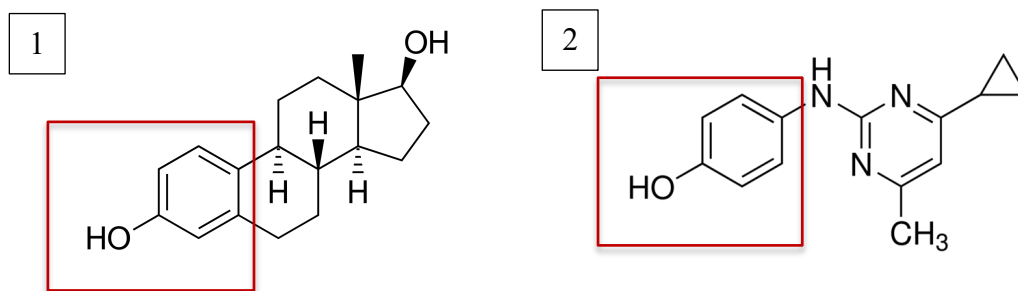
1.3. Warzywa i owoce będące głównym źródłem ekspozycji człowieka na fungicydy

Wyniki przedstawione przez Główny Urząd Statystyczny (GUS) w najnowszym badaniu dotyczącym „Budżetu gospodarstw domowych w 2021 r.” opublikowanym 31 sierpnia 2022 roku wskazują, że statystyczny Polak w roku 2021 spożył około 100 kg warzyw i ponad 50 kg owoców (9). Jednak w 2021 r. nastąpił spadek spożycia większości podstawowych artykułów żywnościowych w tym warzyw o 3,8%. Wzrost spożycia odnotowano natomiast w przypadku owoców (o 2,3%). Zauważono także, że w roku 2021

mieszkańcy miast w porównaniu z mieszkańcami wsi spożywali przeciętnie miesięcznie w przeliczeniu na 1 osobę więcej owoców, odpowiednio 4,34 kg i 3,35 kg. Natomiast mieszkańcy miast i mieszkańcami wsi spożywali zbliżoną ilość warzyw odpowiednio 7,42 kg i 7,45 kg. Z badań wynika, że najczęściej spożywanymi artykułami spożywczymi są warzywa i owoce [10].

1.4. Wpływ fungicydów na zdrowie człowieka

Środki ochrony roślin są wszechobecne w otoczeniu człowieka. Pozostałości związków grzybobójczych można odnaleźć w glebie, wodach, a przede wszystkim w roślinach [11]. Ludzie szczególnie narażeni są na kontakt z fungicydami poprzez spożywaną żywność, głównie owoce i warzywa, które zabezpieczane są fungicydami w trakcie przechowywania czy podczas transportu [12] lub poprzez kontakt bezpośredni np. podczas przeprowadzania zabiegów agrochemicznych (oprysków), czego konsekwencją jest narażenie na nie człowieka [13]. Istnieje wiele spekulacji na temat, jaki wpływ wywierają one na zdrowie człowieka. Wyniki ostatnich badań wskazują, iż fungicydy należą do antropogenicznych czynników mogących w sposób negatywny wpływać na układ wydzielania wewnętrznego (endokryny) organizmu ludzkiego [14]. Ze względu na swoją strukturę aromatyczną mogą zarówno wchodzić w interakcje z receptorami dla hormonów steroidowych, jak i blokować ich syntezę oraz metabolizm [15]. Rysunek 2 przedstawia podobieństwo strukturalne budowy 17 β -estradiolu do cyprodinilu. Wspólną cechą tych związków jest to, że zawierają m. in. co najmniej jedno ugrupowanie aromatyczne w swojej strukturze. Z tego względu niektóre z fungicydów zalicza się do tak zwanych związków endokrynnie czynnych (ang. *Endocrine Disrupting Chemicals*, EDCs) [14].



Rysunek 2. Porównanie struktury chemicznej żeńskiego hormonu płciowego 17 β -estradiolu (1) do cyprodinilu (2).

1.4.1 Zespół wielotorbielowatych jajników

W rozprawie doktorskiej szczególną uwagę poświęcono zespołowi wielotorbielowatych jajników (ang. *polycystic ovary syndrome*, PCOS), który jest najczęściej występującym zaburzeniem hormonalnym wśród kobiet [16,17]. Występuje u około 15-20% kobiet w wieku rozrodczym [18]. U podstaw zaburzeń hormonalnych w PCOS leży hiperandrogenizm pochodzenia jajnikowego oraz oporność tkanek na insulinę [19]. Nadmierna produkcja androgenów i ich prekursorów przez komórki tekalne zrębu jajnika prowadzi do zaburzeń owulacji. Klinicznie objawia się to nie tylko zaburzeniami miesiączkowania oraz płodności, ale przede wszystkim pojawieniem się takich objawów, jak występowanie owłosienia w miejscach typowych dla mężczyzn (hirsutyzm), łysienie androgenowe oraz przetłuszczanie się skóry a co za tym idzie trądzik. Konsekwencją oporności tkanek na insulinę w PCOS jest rozwój otyłości centralnej i jej niekorzystnych następstw metabolicznych takich jak nadciśnienie tętnicze, dyslipidemia aterogenna oraz cukrzyca typu 2 (ang. *type 2 diabetes mellitus*, T2DM) [20,21], co w konsekwencji prowadzi, także do miażdżycy tętnic i rozwoju choroby niedokrwiennej serca (ChNS), wciąż stanowiącej główną przyczynę zgonów wśród kobiet po menopauzie [22].

1.5. Biomonitoring

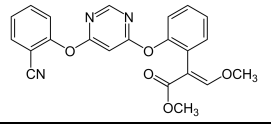
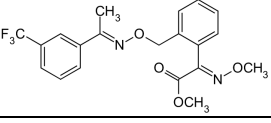
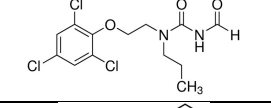
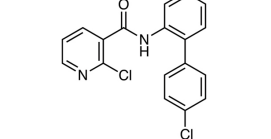
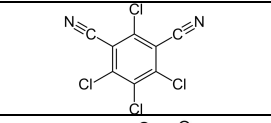
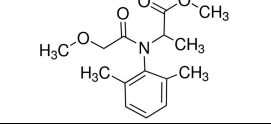
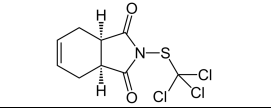
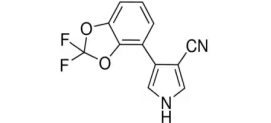
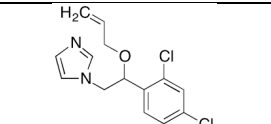
Biomonitoring człowieka (ang. *Human Biomonitoring*, HMB) jest skutecznym narzędziem wykorzystywanym do badania narażenia ludzi na zanieczyszczenia środowiska oraz badania potencjalnego wpływu tych zanieczyszczeń na stan zdrowia. HMB polega na bezpośrednim pomiarze związków chemicznych i ich produktów przemian w płynach ustrojowych, takich jak krew, mocz, ślina, włosy czy pot. Biomonitoring odzwierciedla główną ekspozycję na ksenobiotyki i zapewnia ocenę toksykologiczną dawek, biologicznych skutków i ocenę narażenia na różne grupy społeczne [23,24].

W 2007 r. uruchomiono bazę danych właściwości pestycydów (ang. *pesticide properties database*, PPDB) [25] jako ogólnodostępną stronę internetową. Obecnie PPDB zawiera dane dla prawie 2300 pestycydowych substancji czynnych i ponad 700 metabolitów. Dla każdej substancji przechowywanych jest około 300 parametrów, obejmujących oceny ryzyka dla zdrowia ludzkiego, jakości środowiska i różnorodności

biologicznej. Baza została opracowana przez Jednostkę ds. Badań nad Rolnictwem i Środowiskiem na Uniwersytecie w Hertfordshire. Poniżej w tabeli zostały zestawione oznaczane fungicydy wraz z ich podziałem na grupę, do jakiej należą oraz ich potencjalny wpływ na zdrowie człowieka (Tabela 1).

Tabela 1. Fungicydy i ich potencjalny wpływ na zdrowie człowieka.

Fungicyd	Wzór strukturalny	Grupa substancji	Wpływ na zdrowie
Cyprodinil (CYPR)		anilinopirymidyny	brak informacji
Pirymetanil (PYR)			możliwe działanie toksyczne na nadnercza, pęcherz, nerki wątrobę i tarczycę; prawdopodobny czynnik rakotwórczy
Difenokonazol (DIFEzol)		triazole	działanie toksycznie na wątrobę, tarczycę, nerki i serce; prawdopodobny czynnik rakotwórczy
Epoksykonazol (EPOzol)			możliwe działanie toksyczne na wątrobę; hamuje aktywność aromatazy; zmniejsza produkcję estrogeny; prawdopodobny czynnik rakotwórczy
Flusilazol (FLUzol)			hamuje aktywność aromatazy; wpływa na spadek produkcji estrogenów
Propikonazol (PROzol)			możliwe działanie toksyczne na wątrobę; słabe hamowanie aktywności estrogeny i aromatazy; prawdopodobny czynnik rakotwórczy
Tebukonazol (TEBzol)			działanie toksycznie na wątrobę; prawdopodobny czynnik rakotwórczy
Tetrakonazol (TETRAzol)			działanie toksycznie na wątrobę; prawdopodobny czynnik rakotwórczy w dużych dawkach

Azoksystrobina (AZOXYstrob)		strobiluriny	nieznaczny wpływ na rozrodczość; działanie toksycznie na wątrobę
Trifloksystrobina (TRIstrob)			prawdopodobnie toksyczny dla wątroby i jąder
Prochloraz (PROaz)		amidy	możliwe działanie toksyczne na wątrobę; prawdopodobny czynnik rakotwórczy; powoduje aktywację receptora komórkowego X pregnanu
Boskalid (BOSlid)		karboksamidy	działa toksycznie na tarczycę i wątrobę; prawdopodobny czynnik rakotwórczy
Chlorotalonil (CHLOnil)		chloronitryle/nitryle	może wywoływać kontaktowe zapalenie skóry; aktywuje proliferację komórek wrażliwych na androgeny; prawdopodobny czynnik rakotwórczy
Metalaksyl (METsyl)		fenyloamidy	umiarkowanie toksyczny; toksyczny dla wątroby; słaby indykator cytochromu P450
Kaptan (KAP)		ftalimidy	może wywoływać kontaktowe zapalenie skóry; powoduje hamowanie działania estrogenów; rakotwórczy
Fludioksonil (FLUnil)		fenylopirole	działa toksycznie na wątrobę i nerki
Imazalil (IMAZ)		imidazole	możliwe działanie toksyczne na wątrobę i nerki; prawdopodobny czynnik rakotwórczy

1.5.1 Metody oznaczeń stężeń fungicydów w próbkach biologicznych

Ciągły rozwój technik analitycznych umożliwia oznaczanie fungicydów w śladowych ilościach w próbkach biologicznych, takich jak surowica, mocz i inne płyny ustrojowe, które charakteryzują się skomplikowaną matrycą [26]. Przygotowanie próbek biologicznych do analizy pozostałości fungicydów jest procedurą złożoną i zależy między innymi od rodzaju próbki oraz badanych fungicydów [12]. Najczęściej stosowanymi technikami przygotowywania analitów do analizy fungicydów są metody QuEChERS (ang. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, szybka, łatwa, tania, sprawna, wiarygodna i bezpieczna) [27], LLE (ang. *liquid-liquid extraction*, ekstrakcja ciecz-ciecz) [26] i SPE (ang. *solid phase extraction*, ekstrakcja do ciała stałego) [28]. Próbki takie analizowane są zazwyczaj techniką chromatografii gazowej (GC) lub wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) najczęściej w połączeniu ze spektrometrią masową (MS).

W badaniu przeprowadzonym przez Luzardo *et al.* [26] została opracowana metoda jednoczesnej identyfikacji i oznaczania 109 pestycydów (w tym fungicydów) w surowicy krwi ludzkiej za pomocą ekstrakcji LLE przy użyciu chromatografii gazowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS). Podobne badanie zostało przeprowadzone w Chinach przez Chang, Chen *et al.* [28], gdzie w surowicy krwi ludzkiej oznaczonych zostało 88 różnych pestycydów, w tym związków grzybobójczych z pomocą SPE i GC-MS/MS. Natomiast badanie, gdzie zastosowana została technika QuEChERS przedstawia wyniki oznaczeń 31 pestycydów w surowicy krwi ludzkiej przy pomocy GC-MS/MS [27].

Dotychczas nie powstały badania komercyjne polegające na oznaczaniu jednocześnie kilkunastu fungicydów w próbkach biologicznych takich jak surowica krwi czy mocz. Większość badań obejmuje analizę najwyżej kilku fungicydów jednocześnie.

2. CEL BADAŃ

Głównym celem pracy doktorskiej była ocena zależności pomiędzy oszacowanymi stężeniami fungicydów w surowicy krwi a występowaniem zaburzeń hormonalnych (uwagę poświęcono głównie zespołowi wielotrobiełowatych jajników – PCOS) i metabolicznych u kobiet w wieku rozrodczym.

Kolejnym celem badań było zbadanie zależności pomiędzy oszacowanymi stężeniami fungicydów w surowicy krwi badanych kobiet a ich najczęstszego źródła ekspozycji, jakim jest spożywanie warzyw i owoców.

Jednym z celów było opracowanie metody analitycznej do oznaczania siedemnastu wybranych fungicydów i dwóch produktów ich przemian (4-OH pirymetanilu i OH-tebukonazolu) w próbkach surowicy krwi kobiet w wieku rozrodczym.

Hipoteza badawcza:

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.

3. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

3.1. Odczynniki i wzorce

Podczas realizacji części doświadczalnej zastosowano następujące odczynniki i substancje wzorcowe:

- surowica ludzka – firma *Sigma-Aldrich*, Niemcy,
- tebukonazol (tert-butyl-d₉) o czystości 98% – firma *Sigma-Aldrich*, Niemcy,
- pirymetanil o czystości 100,0% – firma *AccuStandard*, USA,
- chlortalonil o czystości 98,9% – firma *AccuStandard*, USA,
- metalaksyl o czystości 98,0% – firma *AccuStandard*, USA,
- tetrakonazol o czystości 98,9% – firma *AccuStandard*, USA,
- cyprodynil o czystości 100,0% – firma *AccuStandard*, USA,
- imazalil o czystości 99,9% – firma *AccuStandard*, USA,
- kaptan o czystości 100,0% – firma *AccuStandard*, USA,
- fludioksonil o czystości 100,0% – firma *AccuStandard*, USA,
- flusilazol o czystości 98,5% – firma *AccuStandard*, USA,
- propikonazol o czystości 97,2% – firma *AccuStandard*, USA,
- trifloksystrobina o czystości 100,0% – firma *AccuStandard*, USA,
- tebukonazol o czystości 100,0% – firma *AccuStandard*, USA,
- epoksykonazol o czystości 98,8% – firma *AccuStandard*, USA,
- prochloraz o czystości 99,4% – firma *AccuStandard*, USA,
- boskalid o czystości 95,5% – firma *AccuStandard*, USA,
- difenokonazol o czystości 100,0% – firma *AccuStandard*, USA,
- azoksystrobina o czystości 100,0% – firma *AccuStandard*, USA,
- OH-tebukonazol o czystości 98% – firma *Merck*, Niemcy,
- 4-OH pirymetanil o czystości 98% – firma *LGC Standards*, Polska,
- tetrahydroftalimid o czystości 98% – firma *LGC Standards*, Polska,
- metanol do LC-MS o czystości $\geq 99,9\%$ – firma *Merck*, Niemcy,
- octan etylu do HPLC, GC o czystości 99,9% – firma *Merck*, Niemcy,
- acetonitryl do GC o czystości 99,9% – firma *Merck*, Niemcy,
- dichlorometan o czystości 99,9% – firma *Merck*, Niemcy,
- heksan o czystości 99,9% – firma *Merck*, Niemcy,

- aceton o czystości 99,9% – firma *Merck*, Niemcy,
- kity QuEChERS: 400 mg MgSO₄, 100 mg NaCl, etap dSPE (150 mg MgSO₄, 25 mg PSA) lub dSPE (150 mg MgSO₄, 50 mg PSA, 50 mg CEC18) – firma *United Chemical Technologies*, USA.

Jako gaz nośny do analiz chromatograficznych użyto helu o czystości 99,999995% i argonu o czystości 99,998% – firma *Air Products*, Polska).

3.2. Aparatura i sprzęt laboratoryjny

Do przeprowadzenia badań naukowych wykorzystano niżej wymienione urządzenia i sprzęt laboratoryjny:

- chromatograf gazowy (GC-2010 PLUS, *Shimadzu Corp.*, Japonia) w połączeniu z automatycznym podajnikiem próbek (Auto Injector AOC-20ia, *Shimadzu Corp.*, Japonia) i tandemowym spektrometrem mas (MS-TQ8040, *Shimadzu Corp.*, Japonia),
- system do zatężania próbek EVA-EC1-L na 24 próbki z podnośnikiem (*VLM GmbH*, Niemcy),
- generator azotu Genius NM32LA (*Peak Scientific Instruments Ltd*, Wielka Brytania),
- wirówka model 5804 (*Eppendorf*, Niemcy),
- wytrząsarka typu Vortex WIZARD IR na podczerwień (*Velp Scientifica*, Włochy),
- komora do wykonywania ekstrakcji za pomocą techniki SPE (*Grace*, USA),
- kolumna kapilarna GC Zebron ZB-MultiResidue, 30 m (długość): 0,25 mm (średnica wewnętrzna): 0,25 um (grubość fazy) (*Phenomenex*, USA),
- kolumnienki do SPE – Strata-X33 μm Polymeric RP 3 ml/100 mg (*Phenomenex*, Niemcy),
- kolumnienki do SPE – HLB 6 ml/150 mg (*Chromabond*, Niemcy),
- kolumnienki do SPE – C18 6 ml/200 mg (*Phenomenex*, Niemcy).

3.3. Opracowanie metodyki oznaczania 17 fungicydów i 2 produktów przemian metabolicznych w próbkach surowicy krwi ludzkiej z wykorzystaniem techniki GC-MS/MS

3.3.1 Warunki analizy chromatograficznej

W badaniach wykorzystano chromatografię gazową (ang. *gas chromatography*, GC). Chromatografia gazowa jest jedną z najbardziej popularnych nowoczesnych technik rozdzielania mieszanin lotnych substancji chemicznych. W GC fazę ruchomą stanowi gas, określany jako gaz nośny, a fazą stacjonarną jest wypełnienie kolumny. W badaniach wykorzystano hel o czystości 99,999995 %. Parametry analizy metodą chromatografii gazowej dobierane są do konkretnego analitu i konkretnej matrycy. Do oznaczania opisanych w rozprawie doktorskiej śladowych ilości 17 fungicydów i 2 produktów przemian metabolicznych wykorzystano kolumnę Zebron ZB-MultiResidue [30 m (długość), 0,25 mm (średnica wewnętrzna), 0,25 μm (grubość fazy)], która dedykowana jest do oznaczania pestycydów. Parametry układu chromatograficznego w przypadku zastosowania kolumny przedstawiono poniżej (Tabela 2). Optymalizacja parametrów analizy chromatograficznej została przeprowadzona podczas badań pozostałości pestycydów w owocach i warzywach, której rezultaty zostały przedstawione w publikacji „Improvement of the QuEChERS method coupled with GC-MS/MS for the determination of pesticide residues in fresh fruit and vegetables” poświęconej oznaczeniu pozostałości pestycydów w owocach i warzywach [12], która powstała w ramach grantu NCN SONATA 10 pt.: „Ocena porównawcza stopnia barierowości skórek owoców i warzyw dla współcześnie stosowanych pestycydów – przewidywane narażenie na spożycie”, nr 2015/19/D/NZ7/03283 (kierownik: dr inż. Maciej Tankiewicz).

Tabela 2. Parametry pracy układu chromatograficznego.

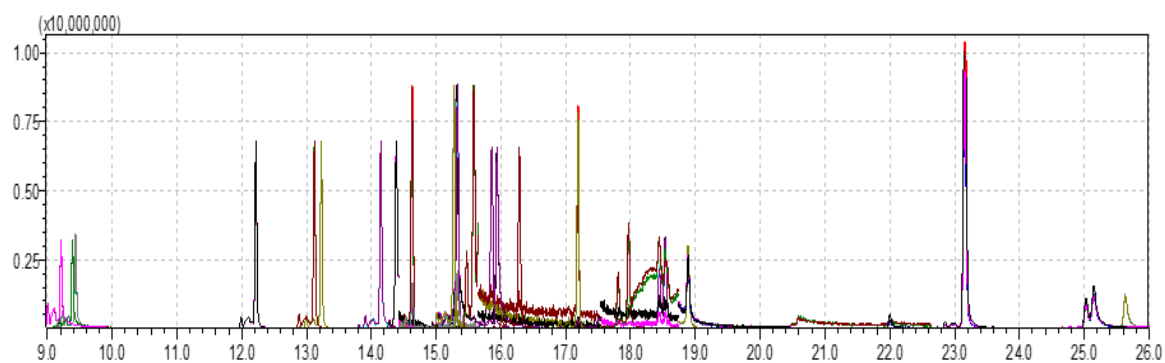
program temperaturowy pieca	70°C (15 °C/min) → 200°C (10 °C/min) → 260°C (5 °C/min) → 280°C (10 °C/min) → 320 °C (5 min)
czas trwania analizy	27,67 min
system dozowania	Splitless
temperatura dozownika	250 °C
prędkość przepływu gazu nośnego	1,01 ml/min
objętość dozowanej próbki	3 µl

3.3.2 Dobór optymalnych warunków pracy tandemowego spektrometru mas MS/MS

Technika spektrometrii mas posiada szerokie zastosowanie w analizach chemicznych. Charakteryzuje ją wysoka czułość i selektywność, dzięki czemu możliwe jest oznaczanie badanych związków na niskich poziomach stężeń. Identyfikację i oznaczanie ilościowe badanych analitów prowadzono w systemie monitorowania wybranych reakcji tworzenia jonów (pseudo)molekularnych (MRM). Dzięki monitorowaniu odpowiedniego przejścia jonu (pseudo)molekularnego do fragmentacyjnego możliwa była identyfikacja związków oraz przeprowadzenie oznaczenia ilościowego. Konsekwencją selektywności uzyskiwanej w tandemowym spektrometrze mas (w trybie MRM) jest czułość, tak bardzo konieczna w przypadku analizy próbek biologicznych.

Podczas optymalizacji parametrów pracy tandemowego spektrometru mas dla cząsteczek fungicydów i wzorca wewnętrznego zaobserwowano przejścia MRM, a optymalizację metody wykonano od 5-45 V, co 3 V (Tabela 3) w Zakładzie Toksykologii Środowiska Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z IMMiT pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Lidii Wolskiej.

Otrzymany chromatogram wszystkich oznaczanych związków przedstawiono na Rysunku 3.

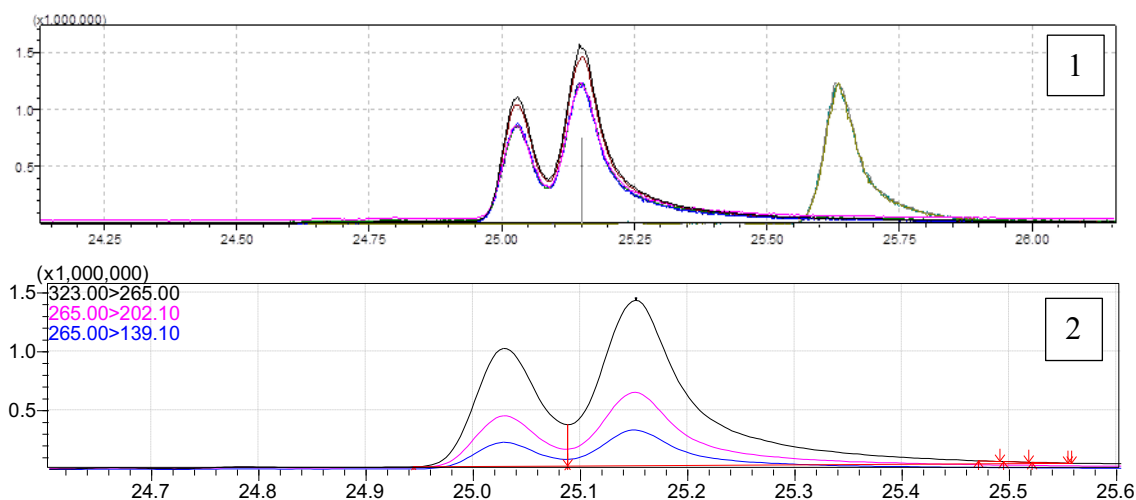


Rysunek 3. Chromatogram 17 fungicydów i 2 produktów przemian metabolicznych.

Tabela 3. Informacje o parametrach pracy tandemowego spektrometru mas pracującego w trybie MRM.

Związek	tr	Jon 1				Jon 2				Jon 3			
	[min]	Type	m/z	CE [V]	Ratio	Type	m/z	CE [V]	Ratio	Type	m/z	CE [V]	Ratio
THPI	9,499	T	79,00>77,00	15	100,00	Ref.1	151,00>80,10	9	40,58	Ref.2	79,00>51,00	24	30,46
pirymetanił	12,258	T	198,00>118,10	24	100,00	Ref.1	198,00>183,10	18	92,79	Ref.2	198,00>158,10	18	64,21
chlorotalonił	13,134	T	264,00>168,00	21	100,00	Ref.1	266,00>168,00	21	66,91	Ref.2	266,00>170,00	21	65,18
metalaksyl	13,274	T	160,00>145,10	9	100,00	Ref.1	160,00>130,10	18	97,64	Ref.2	206,00>132,10	15	94,19
tetrakonazol	14,165	T	336,00>204,10	27	100,00	Ref.1	336,00>164,10	24	78,78	Ref.2	336,00>156,10	24	77,86
cyprodynil	14,683	T	224,00>208,10	18	100,00	Ref.1	224,00>222,10	24	44,64	Ref.2	225,00>210,10	15	32,59
kaptan	15,353	T	79,00>77,10	15	100,00	Ref.1	79,00>51,00	24	24,33	Ref.2	149,00>79,10	15	18,95
4-OH pirymetanił	15,357	T	214,00>107,10	18	100,00	Ref.1	214,00>186,10	12	86,57	Ref.2	214,00>199,10	12	75,22
fludioksonil	15,934	T	248,00>127,10	30	100,00	Ref.1	248,00>154,10	18	62,76	Ref.2	248,00>182,10	15	47,89
Imazalil	15,986	T	215,00>173,00	6	100,00	Ref.1	173,00>145,00	15	74,15	Ref.2	173,00>109,00	30	44,81
flusilazol	16,318	T	233,00>165,10	15	100,00	Ref.1	233,00>152,10	15	72,93	Ref.2	233,00>91,10	24	53,09
trifloksystrobina	17,235	T	116,00>89,10	15	100,00	Ref.1	116,00>63,10	24	30,21	Ref.2	131,00>89,10	24	26,11
propikonazol_1	17,843	T	173,00>144,90	18	100,00	Ref.1	173,00>109,00	24	78,52	Ref.2	173,00>74,10	33	28,86
propikonazol_2	18,029	T	173,00>145,00	15	100,00	Ref.1	173,00>109,00	24	63,72	Ref.2	173,00>74,10	33	23,18
d-tebukonazol	18,450	T	125,00>89,10	12	100,00	Ref.1	125,00>99,00	24	54,52	Ref.2	125,00>63,10	24	34,37
tebukonazol	18,573	T	125,00>89,10	15	100,00	Ref.1	125,00>99,00	21	61,04	Ref.2	125,00>63,10	24	33,05
epoksykonazol	18,910	T	192,00>138,00	15	100,00	Ref.1	192,00>111,00	21	40,20	Ref.2	165,00>138,00	12	26,82
prochloraz	22,022	T	180,00>138,10	15	100,00	Ref.1	180,00>69,10	15	46,93	Ref.2	180,00>95,10	18	25,32
OH-tebukonazol	22,074	T	125,00>89,00	12	100,00	Ref.1	125,00>99,00	18	82,24	Ref.2	125,00>97,00	6	47,81
boskalid	23,199	T	140,00>112,00	12	100,00	Ref.1	140,00>76,00	24	66,72	Ref.2	342,00>140,00	15	33,92
difenokonazol_1	25,064	T	323,00>265,00	15	100,00	Ref.1	265,00>202,00	21	72,14	Ref.2	323,00>202,10	33	63,10
difenokonazol_2	25,104	T	323,00>265,00	21	100,00	Ref.1	265,00>202,10	18	78,52	Ref.2	265,00>139,10	30	75,63
azoksystrobina	25,660	T	344,00>172,10	30	100,00	Ref.1	344,00>156,10	33	95,55	Ref.2	344,00>183,00	30	54,48

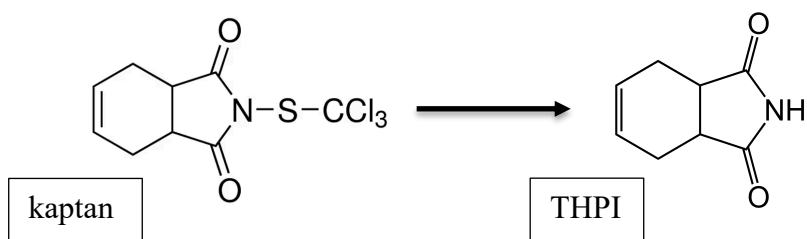
Przykładowy chromatogram dla propiokonazolu wraz z chromatogramem MRM przedstawiono na Rysunku 4.



Rysunek 4. Chromatogram GC-MS/MS dla propiokonazolu (1) oraz chromatogram MRM dla propiokonazolu (2).

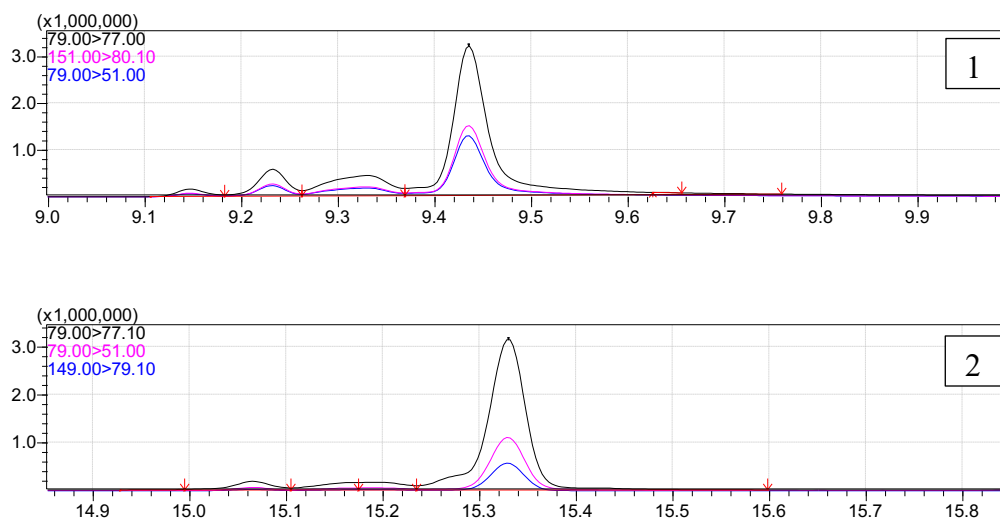
Optymalizacja parametrów detektora MS/MS została przeprowadzona podczas badań pozostałości pestycydów w owocach i warzywach, której rezultaty zostały przedstawione w publikacji „Improvement of the QuEChERS method coupled with GC-MS/MS for the determination of pesticide residues in fresh fruit and vegetables” poświęconej oznaczonej pozostałości pestycydów w owocach i warzywach [12], która powstała w ramach grantu NCN SONATA 10 pt.: „Ocena porównawcza stopnia barierowości skórek owoców i warzyw dla współcześnie stosowanych pestycydów – przewidywane narażenie na spożycie”, nr 2015/19/D/NZ7/03283 (kierownik: dr inż. Maciej Tankiewicz).

Kaptan, który był oznaczany łatwo rozkłada się do tetrahydroftalimidu (THPI) pod wpływem określonych warunków fizykochemicznych, np. wysokiej temperatury lub zmiany pH matrycy (Rysunek 5). Dlatego należy monitorować obie substancje jednocześnie, a do obliczeń stężenia końcowego należy uwzględnić sumę związków [29].



Rysunek 5. Schemat rozpadu kaptanu do THPI.

Chromatogramy w systemie monitorowania wybranych reakcji tworzenia jonów (pseudo)molekularnych (MRM) dla THPI i kaptanu przedstawiono na Rysunku 6.



Rysunek 6. Chromatogram MRM dla THPI (1) oraz KAP (2).

3.3.3 Przygotowanie roztworów wzorcowych oraz roztworów kalibracyjnych

Roztwory podstawowe fungicydów zakupiono w postaci stałej o masie 10 mg każdy oraz tebukonazol (tert-butyl-d₉) o masie 5 mg. Przygotowano roztwory kalibracyjne fungicydów o stężeniu 5 mg/ml oraz 100 µl/ml i roztwór d-tebukonazol o stężeniu 100 ng/ml poprzez rozcieńczenie w ACN. Wszystkie roztwory podstawowe, robocze i kalibracyjne przechowywane były w szklanych w temperaturze ok. -20 °C. Następnie przygotowano roztwory wzorcowe zawierające 17 fungicydów, 2 produkty przemian metabolicznych (4-OH PYR i OH-TEBzol) i tebukonazolu-(tert-butyl-d₉) do krzywej kalibracyjnej w przedziale stężeń 0,01 ng/ml – 100 ng/ml. Próbkę tak przygotowanych roztworów wzorcowych dozowano na układ GC-MS/MS (trzykrotny pomiar odpowiedzi detektora). Przygotowanie krzywych kalibracyjnych z wykorzystaniem wzorców w surowicy ludzkiej pozwoliło wyeliminować efekt matrycy.

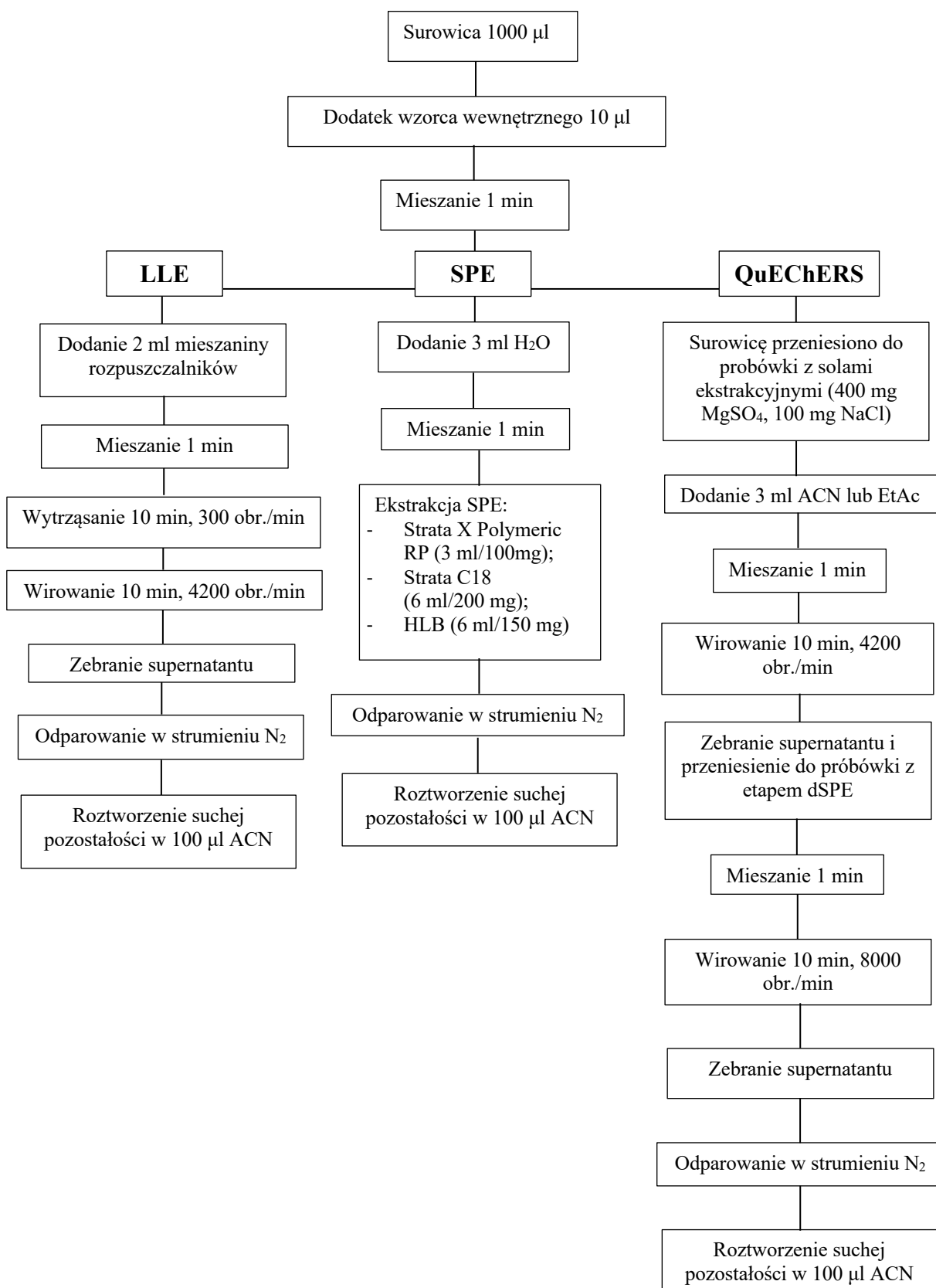
3.3.4 Opracowanie procedury ekstrakcji fungicydów z próbek surowicy krwi ludzkiej

Jednym z niezwykle istotnych etapów procedury analitycznej jest etap przygotowania próbek do analizy. Dla próbek o złożonym składzie matrycy jakim jest surowica krwi, która zawiera wiele substancji przeszkadzających oraz stosunkowo niskie stężenia substancji oznaczanych, etap przygotowania próbek jest niezbędny. Analiza dostępnych danych literaturowych [26,28,30] pozwala stwierdzić, że najczęściej wybieraną techniką przygotowania próbek surowicy ludzkiej do oznaczania śladowych ilości środków grzybobójczych jest ekstrakcja ciec-z-ciecz, technika SPE oraz metoda QuEChERS. Opracowanie procedury ekstrakcji możliwe było dzięki zapleczu laboratoryjnemu i potencjałowi badawczemu Zakładu Toksykologii Środowiska pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Lidii Wolskiej.

Ostatecznie wybrano metodę przygotowania próbek surowicy krwi ludzkiej, która spełniła następujące kryteria:

- precyzja wykonania oznaczeń,
- powtarzalność wyników,
- szybkość przygotowania próbki,

Podczas realizacji tego zadania zaproponowano trzy sposoby przygotowania próbek surowicy do analizy, które w sposób schematyczny zostały zaprezentowane poniżej (Rysunek 7).



Rysunek 7. Schematyczne przedstawienie etapów przygotowania próbek surowicy ludzkiej do analizy chromatograficznej.

3.3.5 Ekstrakcja za pomocą techniki ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid extraction*)

LLE należy do jednych z najstarszych technik ekstrakcyjnych polegającą na przeniesieniu analitu z wodnej matrycy do rozpuszczalnika ekstrakcyjnego. Na schemacie (Rysunek 7) przedstawiono ogólną procedurę przygotowania próbek z zastosowaniem techniki LLE. W przeprowadzonym doświadczeniu do próbek surowicy krwi ludzkiej dodawano 10 µl roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu 100 ng/ml, a następnie próbki wymieszano. W celu znalezienia odpowiedniej mieszaniny ekstrakcyjnej, do próbek dodawano:

- dichlorometan,
- octan etylu,
- octan etylu:heksan (20:80, v:v),
- aceton:heksan (20:80, v:v),
- dichlorometan:octan etylu:aceton (50:30:20, v:v:v),
- dichlorometan:heksan:aceton (50:30:20, v:v:v)

Uzyskaną próbkę mieszano za pomocą wytrząsarki i odwirowano. Ekstrakcję prowadzono 2-krotnie. Supernatant odparowano do sucha pod strumieniem azotu, a suchą pozostałość rozpuszczano w acetonitrylu. Próbkę przygotowano w trzech niezależnych powtórzeniach.

3.3.6 Ekstrakcja za pomocą techniki SPE (ang. *solid-phase extraction*)

W kolejnym etapie badań oceniono efektywność ekstrakcji do fazy stałej. SPE polega na przepuszczeniu ciekłej próbki przez złożę sorbentu i selektywnej adsorpcji oznaczanych związków na tym złożu. Do próbek surowicy dodawano 10 µl roztworu tebukonazolu-(tert-butyl-d₉) o stężeniu 100 ng/ml, a próbki wymieszano. Następnie taką próbkę mieszano i do każdej z nich dodawano 3 ml wody i mieszano. Tak przygotowana próbka była gotowa do naniesienia na kolumnkę do SPE. Do tego celu użyto kolumnki:

- Strata-X Polymeric RP (3 mL/200 mg);
- Strata C18 (6 ml/200 mg);
- HLB (żywica hydrofilowo-lipofilowa) (6 ml/150 mg)

Aktywacji złoża dokonywano przepuszczając przez nie 3 ml metanolu, a następnie 3 ml wody. Kolejnym etapem było naniesienie próbki na kolumnkę. Zanieczyszczenia

były wymywane z kolumny za pomocą wody i złoża suszono pod próżnią przez 10 min. Do elucji fungicydów ze złoża kolumnienki ekstrakcyjnej stosowano 2 ml czystego metanolu lub 2 ml mieszaniny dichlorometan:acetonitryl:metanol (2:1:1, v:v:v). Po wyeluowaniu związków ze złoża sorbentu za pomocą rozpuszlanika, otrzymana próbka była klarowna i bezbarwna. Następny krok stanowiło odparowanie rozpuszczalnika do sucha za pomocą strumienia azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano w acetonitrylu. Tak przygotowaną próbkę dozowano do układu chromatograficznego GC-MS/MS. Próbkę przygotowywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

3.3.7 Ekstrakcja za pomocą techniki QuEChERS

QuEChERS, czyli metoda szybka (ang. Quick), prosta (ang. Easy), tania (ang. Cheap), efektywna (ang. Effective), elastyczna (ang. Rugged) oraz bezpieczna (ang. Safe) to metoda wielopozostałościowa oznaczania pestycydów w owocach i warzywach. Metoda ta w I etapie polega na ekstrakcji i podziale w układzie ciecz-ciecz składników próbki z użyciem rozpuszczalnika, a w II etapie na oczyszczeniu ekstraktu z wykorzystaniem metody dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (dSPE).

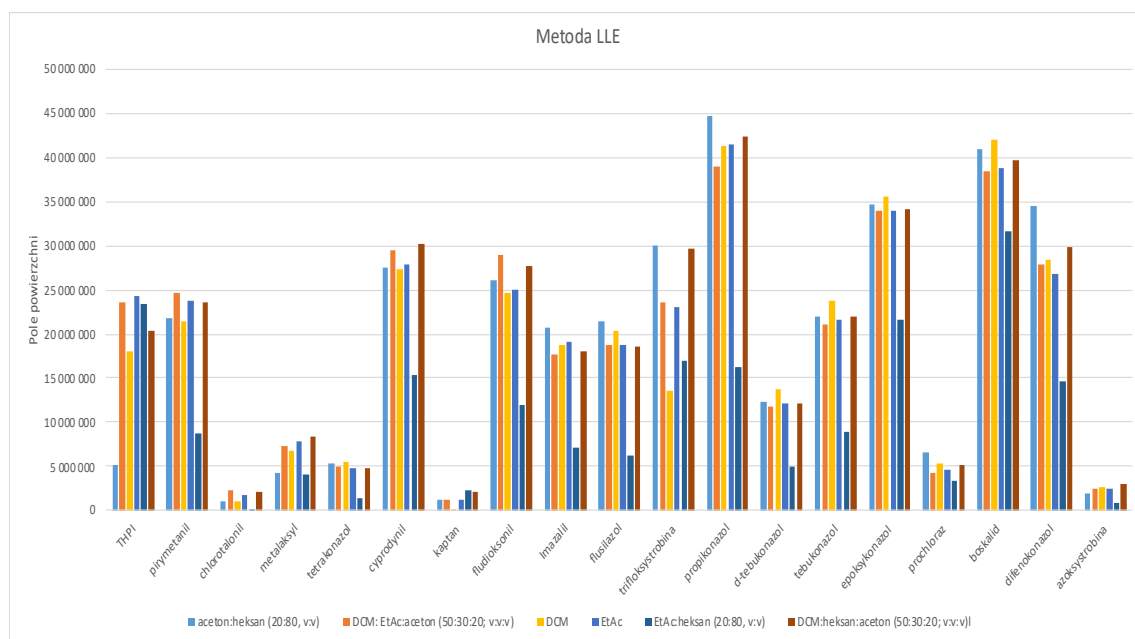
W kolejnym etapie doświadczenia do próbek surowicy krwi ludzkiej dodawano 10 µl roztworu wzorca wewnętrznego o stężeniu 100 ng/ml, a następnie próbki wymieszano. Do próbki stożkowej (15 ml) zawierającej sole (400 mg MgSO₄, 100 mg NaCl) dodano 3 ml EtAc lub ACN oraz 1 ml surowicy. Probówkę wytrząsano i mieszano przez około 1 min, a następnie wirowano przez 10 min przy 4200 obrotów/min. Supernatant przeniesiono do probówek dSPE (150 mg MgSO₄, 25 mg PSA) lub dSPE (150 mg MgSO₄, 50 mg PSA, 50 mg CEC18), próbki wymieszano, a następnie wirowano przez 10 min przy 8000 obrotów/min. Supernatant odparowano do sucha pod strumieniem azotu, a suchą pozostałość rozpuszczano w acetonitrylu. Próbkę przygotowywano w trzech niezależnych powtórzeniach.

3.3.8 Porównanie opracowanych metodyk izolacji fungicydów z próbek surowicy krwi

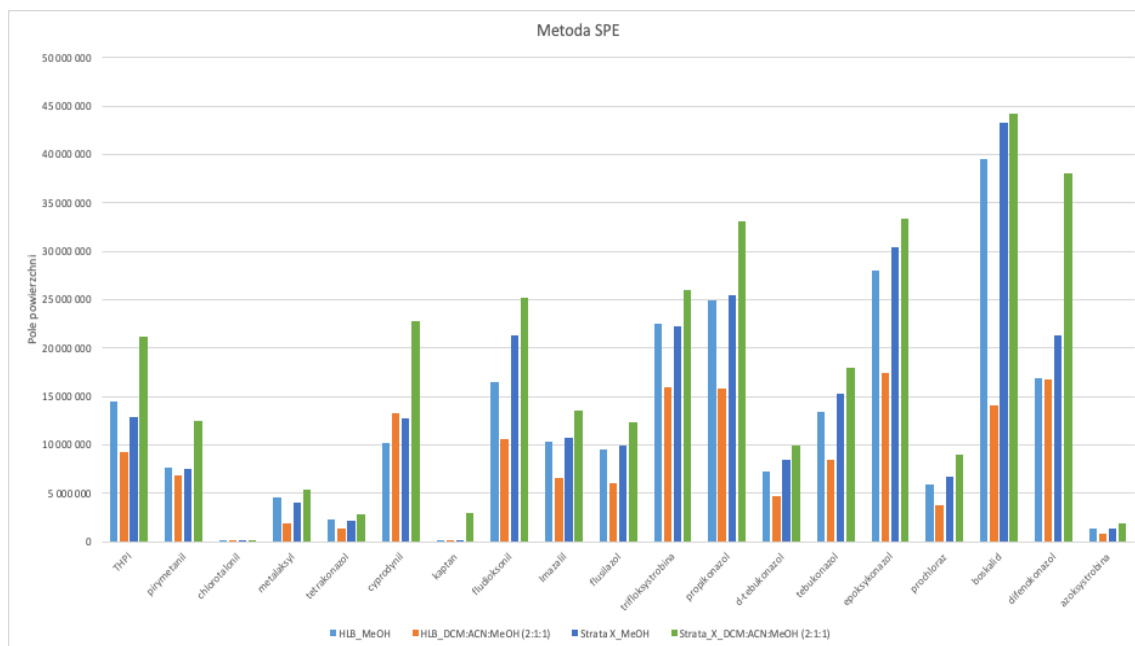
W celu oceny zaproponowanych sposobów przygotowania próbek do analizy, przeprowadzono doświadczenia, w którym porównywano intensywność sygnału pochodzącego od fungicydów oraz wzorca wewnętrznego w próbkach przygotowanych z zastosowaniem:

- ekstrakcji LLE (6 rozpuszczalników lub mieszanin),
- ekstrakcji SPE (3 kolumnienki SPE x 2 eluenty),
- metody QuEChERS (2 rozpuszczalniki x 2 rodzaje dSPE).

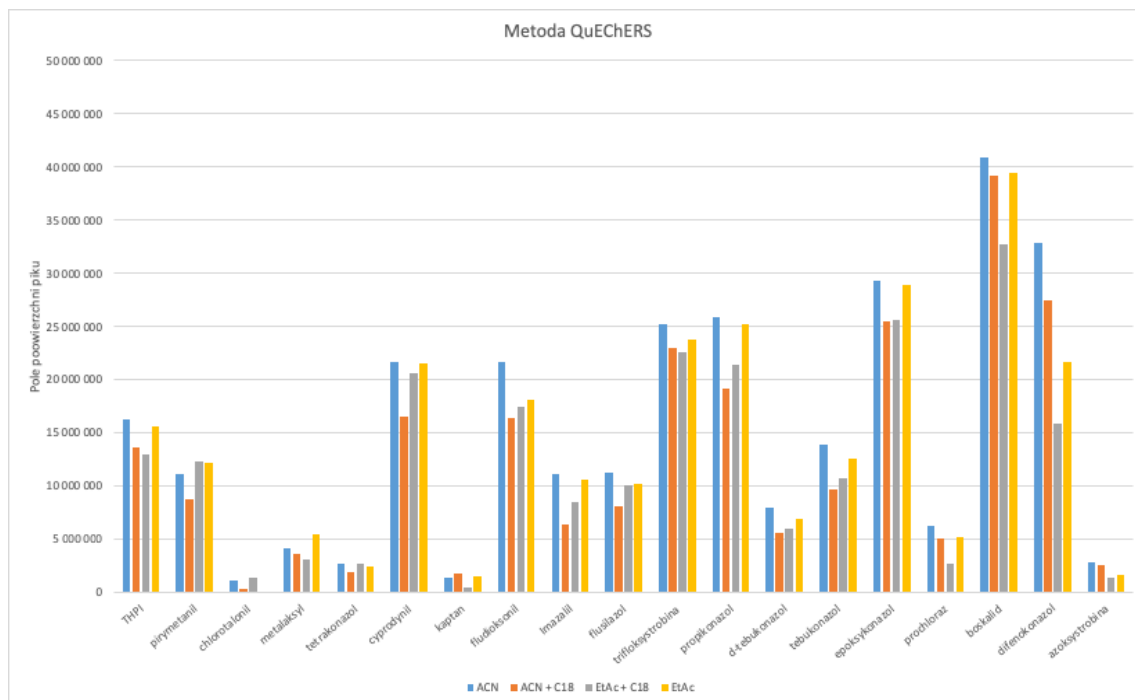
W przypadku próbek przygotowanych z użyciem techniki SPE i QuEChERS pomimo uzyskania zadowalających parametrów, metodyki te zostały odrzucone na korzyść techniki ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE) ze względu na brak powtarzalności wyników oraz niższą intensywność sygnału pochodzącego od fungicydów. Odpowiedzi sygnału detektora dla poszczególnych fungicydów przedstawiono poniżej, odpowiednio dla ekstrakcji LLE (Rysunek 8), ekstrakcji SPE (Rysunek 9) i metody QuEChERS (Rysunek 10).



Rysunek 8. Odpowiedź sygnału detektora dla fungicydów ekstrahowanych za pomocą LLE.



Rysunek 9. Odpowiedź sygnału detektora dla fungicydów ekstrahowanych za pomocą SPE.



Rysunek 10. Odpowiedź sygnału detektora dla fungicydów ekstrahowanych za pomocą metody QuEChERS.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że najbardziej efektywnym sposobem ekstrakcji fungicydów z surowicy krwi jest ekstrakcja LLE, a rozpuszczalnikiem jest mieszanina DCM:heksan:aceton (50:30:20, v:v:v), ze względu na powtarzalność wyników i jedną z wyższych intensywności pików odpowiedzi detektora.

3.4. Wyznaczenie podstawowych parametrów walidacyjnych opracowanej procedury oznaczania fungicydów w próbkach surowicy krwi

Do walidacji metody zastosowano ślepe próby, próbki wzorcowe i próbki rzeczywiste. Kalibracja procedury analitycznej powinna odwzorowywać zależność pomiędzy stężeniem analitu w próbce rzeczywistej, a uzyskanym sygnałem analitycznym. Ze względu na możliwy wpływ składników próbki surowicy krwi na wielkość sygnału analitycznego dla fungicydów, sporządzono roztwory kalibracyjne z odwzorowaniem matrycy. Na podstawie uzyskanych chromatogramów wykreślono krzywe kalibracyjne zależności powierzchni pola pików analitu w funkcji stężenia analitu. Krzywe kalibracyjne badanych związków charakteryzuje współczynnik korelacji powyżej 0,99 i szeroki zakres liniowości. Ważnym elementem w walidacji metody jest wyznaczenie takich parametrów jak granica oznaczalności (LOQ) i granica wykrywalności (LOD). LOD obliczono na podstawie odchylenia standardowego (SD) dla najniższego stężenia oraz kąta nachylenia krzywej kalibracyjnej według wzoru:

Równanie 1:

$$LOD = \frac{(3,3 \cdot SD)}{b}$$

gdzie:

SD - odchylenie standardowe między trzema powtórzeniami odpowiedzi detektora przy najniższym stężeniu analitu,

b – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej.

Natomiast przy obliczaniu LOQ wykorzystano zależność:

Równanie 2:

$$LOQ = 3 \cdot LOD$$

Poniżej przedstawiono parametry walidacyjne metody (Tabela 4).

Tabela 4. Parametry charakteryzujące metodę oznaczania 17 fungicydów i 2 produktów przemian metabolicznych (4OH-PYR i OH-TRBzol).

Związek	Równanie regresji liniowej	Współczynnik determinacji R ²	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	Zakres liniowości [ng/ml]
CYPR	$y = 2,9453x - 0,1622$	0,9998	0,0070	0,021	0,021-100
PYR	$y = 4,3128x - 5,1688$	0,9980	0,0041	0,012	0,012-100
4OH-PYR	$Y = 0,7749x - 0,6898$	0,9989	0,0028	0,008	0,008-100
DIFeZol	$y = 4,8948x - 4,5175$	0,9986	0,0488	0,146	0,146-100
EPOzol	$y = 3,4317x - 1,5065$	0,9989	0,0536	0,161	0,161-100
FLUzol	$y = 2,1828x - 1,0985$	0,9996	0,0200	0,060	0,060-100
PROzol	$y = 4,7927x - 2,4261$	0,9996	0,0082	0,025	0,025-100
TEBzol	$y = 2,2498x - 1,2525$	0,9996	0,0080	0,024	0,024-100
OH-TEBzol	$y = 0,0067x - 0,0147$	0,9990	0,1302	0,390	0,390-100
TETRAzol	$y = 0,5414x - 0,7093$	0,9989	0,0634	0,190	0,190-100
AZOXYstrob	$y = 0,3377x - 0,3230$	0,9988	0,0038	0,011	0,011-100
TRIstrob	$y = 2,7283x - 2,0387$	0,9992	0,0354	0,106	0,106-100
PROaz	$y = 0,5708x - 0,72$	0,9988	0,0278	0,083	0,083-100
BOSlid	$y = 3,6658x + 4,0779$	0,9980	0,0048	0,014	0,014-100
CHLOnil	$y = 0,1907x - 0,3793$	0,9974	0,0071	0,021	0,021-100
METsyl	$y = 1,5128x - 0,6608$	0,9983	0,0201	0,060	0,060-100
KAP+THPI	$y = 2,9388x + 13,604$	0,9948	2,7399	8,220	8,220-100
FLUnil	$y = 3,8923x - 3,0334$	0,9992	0,0066	0,020	0,020-100
IMAZ	$y = 1,6294x - 2,0124$	0,9991	0,0335	0,101	0,101-100

W ramach niniejszej pracy określono także powtarzalność metody na podstawie odchylenia standardowego (ang. *standard deviation*, SD) uzyskanych wartości stężeń dla tej samej próby oraz poprawność opracowanej metody na podstawie odzysku. Wykonano 6 niezależnych oznaczeń analitów w próbach. Powtarzalność metody analitycznej przedstawiono jako wartość współczynnika zmienności (CV) obliczonego na podstawie wyników dla próbek w matrycy.

Wykorzystano następujące wzory:

Równanie 3:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{\text{sr}})^2}{n - 1}}$$

Równanie 4:

$$RSD = \frac{SD}{x_{\text{sr}}}$$

Równanie 5:

$$CV = RSD \cdot 100\%$$

gdzie:

SD – odchylenie standardowe serii pomiarów,

x_i – wartość pojedynczego oznaczenia,

x_{sr} – średnia arytmetyczna wszystkich wyników,

n – liczba pomiarów,

RSD – względne odchylenie standardowe.

Następnie sprawdzono poprawność metody, przeprowadzając analizy prób kontrolnych z dodatkiem mieszaniny roztworu wzorcowego oznaczanych związków. Poziomy wzbogacenia próbek wyniosły odpowiednio 10 ng/ml i 100 ng/ml. Odzyski obliczono jako średnia arytmetyczna z 3 powtórzeń. Wyniki dla parametru współczynnika zmienności (ang. *coefficient of variation*, CV) oraz odzysku ekstraktów w analizach zostały przedstawione poniżej (Tabela 5).

Tabela 5. Parametry dla CV i odzysku dla zaproponowanej metody analitycznej.

Związek	CV [%]	Odzysk [%]	
		10 ng/ml	100 ng/ml
CYPR	8,1	94,4	102,0
PYR	5,1	93,4	99,0
4OH-PYR	7,8	91,1	102,4
DIFEzol	4,1	96,3	104,3
EPOzol	4,4	96,4	102,6
FLUzol	8,9	96,7	102,4
PROzol	4,3	91,2	102,3
TEBzol	10,2	97,4	101,9
OH-TEBzol	5,2	97,0	104,6
TETRAzol	9,8	96,5	102,4
AZOXYstrob	4,8	91,6	97,7
TRIsrob	10,5	96,2	102,3
PROaz	7,1	92,1	101,6
BOSlid	5,5	95,9	104,6
CHLOnil	9,5	91,1	102,1
METSyl	6,5	88,1	101,5
KAP	11,9	88,1	103,0
FLUnil	6,9	93,9	104,7
IMAZ	11,4	90,0	103,8

Odzyski oznaczanych substancji dla poziomu wzbogacenia 10 ng/ml i 100 ng/ml mieściły się w zakresie 70 - 120%. Wyznaczone wartości CV analitów wynosiły poniżej 15%, co wskazuje na powtarzalność oznaczanych fungicydów w próbach.

3.5. Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły próbki surowicy krwi pobrane od 236 kobiet w wieku od 18 do 42 lat. Wszystkie kobiety były pod opieką Poradni Zaburzeń Hormonalnych, Nadciśnienia Tętniczego oraz Chorób Przemiany Materii mieszczącej się przy

ul. Hryniewickiego 6C w Gdyni i prowadzone przez specjalistę chorób wewnętrznych i endokrynologii (prof. dr. hab. med. Dominika Rachonia) w ramach Grantu NCN OPUS 8 pt.: „Ocena wpływu wybranych zanieczyszczeń środowiska (*endocrine disruptors*) na częstość występowania i obraz kliniczny zespołu wielotorbielowatych jajników (PCOS)”, nr 2014/15/B/NZ7/00999 (kierownik: prof. dr hab. Dominik Rachoń). Po przeprowadzeniu badania podmiotowego i przedmiotowego kobiety informowane były o możliwości wzięcia udziału w badaniu. Po zapoznaniu się z jego celami i metodyką badań wszystkie kobiety wyraziły pisemną i świadomą zgodę na uczestniczenie w badaniu. W trakcie badania podmiotowego pacjentki pytano o ewentualne dolegliwości, regularność krwawień miesięczkowych, przyjmowane leki oraz choroby współistniejące. Następnie przeprowadzono badanie przedmiotowe, w trakcie, którego dokonywano pomiarów wzrostu, masy ciała, obwodu tali oraz pomiaru ciśnienia tętniczego i tętna. Kobiety chorujące na choroby przewlekłe (np. cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, astma, nowotwory) lub przyjmujące leki mogące zaburzać wyniki badań hormonalnych (np. doustne leki antykoncepcyjne, glikokortykosteroidy, spironolakton) zostały wykluczone z udziału w badaniu. Dodatkowo wszystkie z uczestniczek otrzymały do wypełnienia autorską ankietę dotyczącą ilości oraz rodzaju spożywanych warzyw i owoców. Na 303 kobiety, które chciały wziąć udział w badaniu, wykluczonych zostało 67 kobiet ze względu na: przyjmowanie hormonalnej terapii zastępczej (n = 23), rozpoznanie menopauzy (n = 1), rozpoznanie raka tarczycy (n = 1), wrodzonego przerostu nadnerczy (n=4) oraz innych chorób współistniejących (n = 38).

3.6. Wywiad kwestionariuszowy

Informacje dotyczące stylu życia, spożywania warzyw i owoców, współistniejących chorób przewlekłych czy przyjmowanych leków pozyskano od badanych kobiet na podstawie kwestionariusza, który załączony zostanie w Aneksie niniejszej pracy.

3.7. Oznaczenia surowiczych stężeń hormonów i wskaźników zaburzeń metabolicznych

Zrekrutowane kobiety kierowano do Laboratorium Medycznego Bruss grupy ALAB sp. z o.o. mieszczącym się przy ul. Grunwaldzkiej 60 w Gdańsku celem wykonania

oznaczeń stężenia hormonów (TSH, LH, FSH, E2, PRL, TST, DHEA-S, A4-dione), globuliny wiążącej hormony płciowe (ang. *sex hormone binding globulin*, SHBG) oraz wskaźników zaburzeń metabolicznych (stężenie glukozy, insuliny oraz lipidów na czczo). Krew pobierano między 6 a 10 dniem cyklu miesięczkowego. Ponadto, pobierano dodatkową próbkę krwi „na skrzep” celem uzyskania surowicy, w której dokonywano oznaczeń stężeń 17 fungicydów i 2 produktów ich przemian (Tabela 4). Dodatkowo wyliczano wskaźnik wolnych androgenów (ang. *free androgen index*, FAI) oraz wskaźnik oporności na insulinę (ang. *homeostasis assesment of insulin resistance*, HOMA-IR) według wzoru:

Równanie 6:

$$HOMA - IR = \frac{\text{stężenie glukozy na czczo} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right] \times \text{stężenie insuliny na czczo} \left[\frac{\mu\text{UI}}{\text{mL}} \right]}{22,5}$$

Badanie uzyskało zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN/374/2017), której kopia załączona zostanie w Aneksie niniejszej pracy.

3.8. Analiza statystyczna wyników

Wszystkie analizy statystyczne dokonano przy użyciu programu GraphPad Prism wersja 9.5.1 dla systemu iOS (*Apple Inc.*, USA). Rozkład zmiennych badano przy użyciu testu D’Agostino-Pearsona. Większość badanych zmiennych nie spełniała założenia rozkładu normalnego, wobec czego za miarę tendencji centralnej przyjęto średnią geometryczną (ang. *gemetric mean*, GM) a za miarę rozproszenia 95 % przedział ufności GM. Zmienne spełniające założenie rozkładu normalnego przedstawiono w postaci średniej arytmetycznej oraz odchylenia standardowego (SD). Różnice pomiędzy dwoma grupami porównywano testem t-studenta, który jest testem parametrycznym lub jego nieparametrycznym odpowiednikiem – testem U Manna-Whitney’a. Współczynniki korelacji pomiędzy zmiennymi wyliczano przy użyciu nieparametrycznego testu Spearmana. Celem zbadania potencjalnego związku pomiędzy ekspozycją na badane fungicydy a występowaniem zaburzeń hormonalnych i metabolicznych w badanej grupie kobiet przeprowadzono analizę regresji logistycznej. W modelu wyliczano iloraz szans (OR) wystąpienia zaburzeń hormonalnych charakterystycznych dla PCOS w przypadku

ekspozycji na fungicydy, których stężenia były znamienne wyższe w porównaniu do grupy kobiet bez zaburzeń hormonalnych (kontrolnej). Za podwyższone stężenia badanych fungicydów przyjęto wartości powyżej mediany ich surowicznych stężeń wśród wszystkich badanych kobiet. Wiek, BMI oraz spożycie warzyw i owoców należały do zmiennych „zakłócających”. Dlatego w ostatecznym modelu regresji logistycznej wyliczone OR zostały skorygowane o te zmienne. We wszystkich analizach statystycznych za różnice istotnie statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$.

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka badanych grup

Kobiety z grupy PCOS były znacząco młodsze oraz miały wyższy wskaźnik BMI i większy obwód talii w porównaniu do kobiet z grupy kontrolnej. Nie różniły się one istotnie statystycznie natomiast pod względem wartości skurczowego i rozkurczowego ciśnienia tętniczego (Tabela 6).

Tabela 6. Charakterystyka kliniczna badanych grup.

	Grupa PCOS (n = 168)		Grupa Kontrolna (n = 68)		wartość p
	GM	95% CI	GM	95% CI	
Wiek (lata)	24,7	(24,0; 25,5)	31,6	(29,8; 33,5)	<0,001
BMI	26,2	(25,3; 27,0)	24,4	(23,2; 25,5)	0,016
Obwód talii (cm)	88,1	(85,8; 90,4)	83,6	(80,4; 86,9)	0,029
SBP (mmHg)	128	(127; 130)	129	(126; 131)	0,834
DBP (mmHg)	75	(74; 77)	77	(75; 79)	0,376

Grupy porównywano testem U Manna-Whitney'a
Za różnicę istotnie statystyczną przyjęto wartość $p < 0,05$

4.2. Porównanie wyników badań hormonalnych oraz laboratoryjnych wskaźników metabolicznych w badanych grupach

Analiza wyników badań hormonalnych wykazała istotnie statystycznie wyższe stężenia TSH, LH, PRL, DHEA-S, TST, FAI oraz A4-dione w grupie kobiet z PCOS w porównaniu do grupy kontrolnej. Surowicze stężenia E2 oraz SHGB były w tej grupie natomiast znacząco niższe (Tabela 7).

Tabela 7. Porównanie wyników badań hormonalnych w badanych grupach.

	Grupa PCOS (n = 168)		Grupa Kontrolna (n = 68)		wartość p
TSH (mIU/l)	2,27	(2,05; 2,51)	1,84	(1,59; 2,14)	0,026
LH (IU/ml)	7,8	(7,22; 8,42)	6,19	(5,44; 7,05)	<0,001
FSH (IU/ml)	6,25	(5,89; 6,62)	6,03	(5,67; 6,42)	0,205
E2 (pmol/l)	199	(184; 215)	260	(214; 316)	0,010
PRL (IU/l)	464	(431; 500)	360	(322; 403)	<0,001
DHEA-S (µg/dl)	314	(295; 334)	206	(185; 229)	<0,001
TST (nmol/l)	1,85	(1,75; 1,95)	1,05	(0,97; 1,15)	<0,001
SHBG (nmol/l)	55,6	(50,5; 61,3)	65	(58; 72,9)	0,020
FAI	3,3	(2,93; 3,71)	1,62	(1,41; 1,86)	<0,001
A4-dione (ng/ml)	2,98	(2,81; 3,16)	1,8	(1,67; 1,94)	<0,001
Grupy porównywano testem U Manna-Whitney'a Za różnicę istotnie statystyczną przyjęto wartość p <0,05					

Analiza wyników laboratoryjnych wskaźników zaburzeń metabolicznych wykazała jedynie wyższe stężenia insuliny oraz wskaźnika HOMA-IR wśród kobiet z PCOS w porównaniu do grupy kontrolnej (Tabela 8).

Tabela 8. Porównanie wyników laboratoryjnych wskaźników zaburzeń metabolicznych w badanych grupach.

	Grupa PCOS (n = 168)		Grupa Kontrolna (n = 68)		wartość p
Glukoza (mg/dl)	88,4	(87,5; 89,4)	88,3	(86,0; 90,6)	0,455
HDL (mg/dl)	62,0	(59,7; 64,5)	64,0	(60,2; 68,0)	0,472
TG (mg/dl)	89,1	(83,3; 95,2)	83,6	(75,8; 92,3)	0,248
TCh (mg/dl)	181	(175; 187)	189	(180; 198)	0,195
LDL (mg/dl)	97,1	(92,5; 102)	102	(94,6; 111)	0,465
Insulina (µIU/ml)	10,0	(9,23; 10,8)	7,54	(6,64; 8,57)	<0,001
HOMA-IR	2,20	(2,01; 2,39)	1,65	(1,43; 1,91)	<0,001
Grupy porównywano testem U Manna-Whitney'a Za różnicę istotnie statystyczną przyjęto wartość p <0,05					

4.3. Ilościowa ocena spożycia warzyw i owoców w badanych grupach

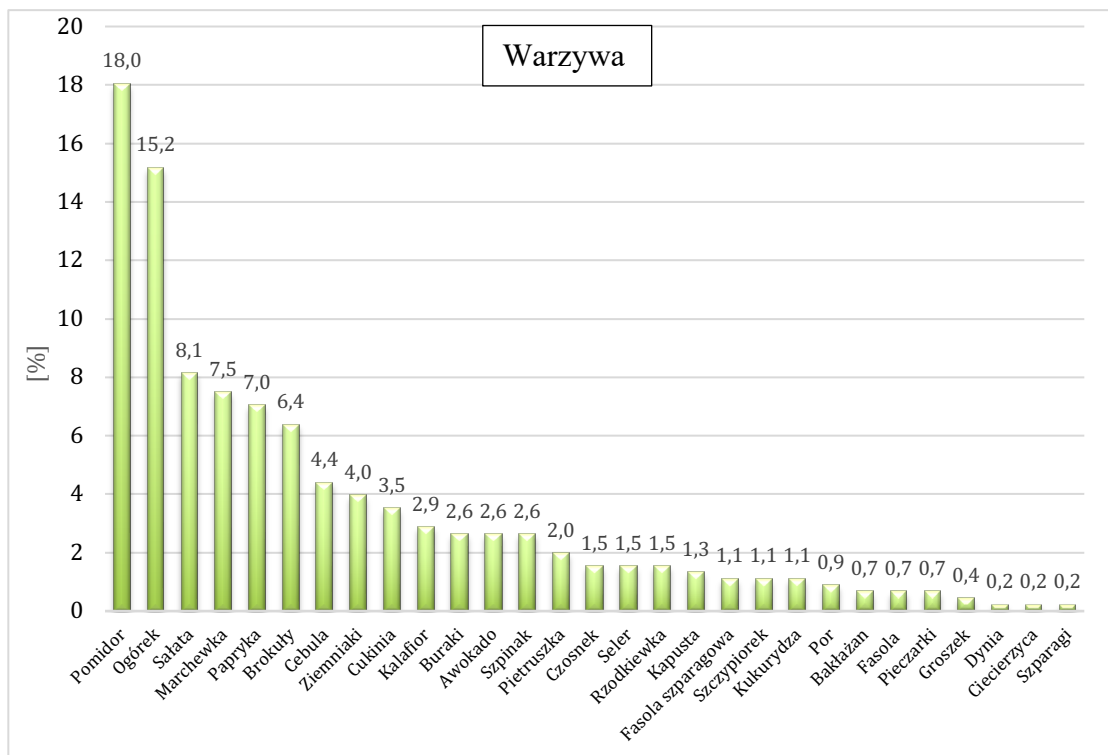
Tabela 9 przedstawia ilość spożywanego owoców i warzyw w badanych grupach. Analiza ankiet wykazała, że kobiety z PCOS spożywały znacznie większą ilość zarówno warzyw i owoców w porównaniu do grupy kontrolnej.

Tabela 9. Wyniki oceny spożycia warzyw i owoców w badanych grupach.

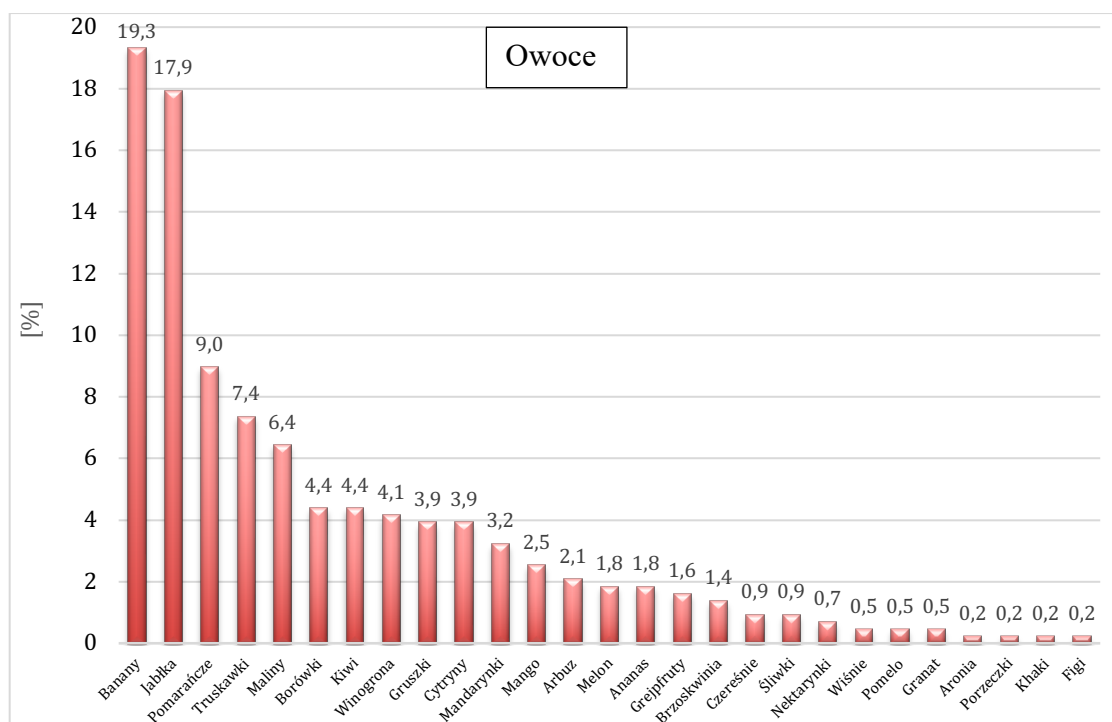
	Grupa PCOS (n=168)		Grupa Kontrolna (n=68)		wartość p
	A średnia	SD	A średnia	SD	
świeże owoce/dziennie [g]	220	104,2	171,4	77,2	0,004
świeże warzywa/dziennie [g]	238	113,5	166,8	73,2	<0,001
suma warzyw i owoców [g]	456	208,0	338,2	148,7	<0,001

Grupy porównywano testem U Manna-Whitney'a
Za różnicę istotnie statystyczną przyjęto wartość $p < 0,05$

Wśród najczęściej spożywanego warzyw znalazły się pomidory (18,0 %) oraz ogórki (15,2 %) (Rysunek 11). Wśród najczęściej spożywanego owoców wśród wszystkich pacjentek badanych znalazły się banany (19,3 %) oraz jabłka (17,9 %) (Rysunek 12). Wykresy opracowano na podstawie pracy magisterskiej Pani Pauliny Fierki pt.: „Ocena narażenia kobiet stosujących dietę owocowo-warzywną na pozostałości pestycydów – badania ankietowe”, której opiekunem był autor niniejszej rozprawy doktorskiej, a promotorem Pan dr inż. Maciej Tankiewicz, przy czym dane pozyskano na podstawie kwestionariuszy wypełnionych przez kobiety zrekrutowane do badań w podczas prac nad tą pracą.



Rysunek 11. Procentowe spożycie warzyw w badanych grupach.



Rysunek 12. Procentowe spożycie owoców w badanych grupach.

Na podstawie powyższych danych dotyczących spożycia rodzaju owoców i warzyw, wybrano najczęściej stosowane fungicydy do ochrony wyżej wymienionych produktów roślinnych, które zostały oznaczone w surowicy krwi kobiet.

4.4. Wyniki oznaczeń surowiczych stężeń fungicydów w badanych grupach

Wykrywalność fungicydów w surowicy wszystkich badanych kobiet (n = 236) mieściła się w zakresie od 3 % dla IMAZ do 56 % dla TEBzol. CYPR, BOSlid, EPOzol wykrywane były > 50 % badanych, odpowiednio w: 54 %, 53 %, 50 % próbek surowicy. Statystyki opisowe surowiczych stężeń badanych fungicydów przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Statystyki opisowe surowiczych stężeń badanych fungicydów wśród wszystkich badanych kobiet (n = 236).

ng/ml	LOD	n (%) >LOD	min	max	GM	95% CI GM
CYPR	0,0070	127 (54)	<LOD	17,600	0,048	0,035; 0,064
PYR	0,0041	116 (49)	<LOD	35,600	0,061	0,041; 0,091
4OH-PYR	0,0028	26 (11)	<LOD	11,600	0,032	0,027; 0,037
DIFeZol	0,0488	61 (26)	<LOD	1,330	0,082	0,068; 0,098
EPOzol	0,0536	117 (50)	<LOD	1,270	0,137	0,116; 0,162
FLUzol	0,0200	59 (25)	<LOD	4,520	0,040	0,032; 0,051
PROzol	0,0082	74 (31)	<LOD	4,210	0,028	0,021; 0,039
TEBzol	0,0080	131 (56)	<LOD	14,100	0,092	0,067; 0,128
OH-TEBzol	0,1302	14 (6)	<LOD	28,000	0,111	0,098; 0,126
TETRAzol	0,0634	50 (21)	<LOD	1,530	0,091	0,076; 0,108
AZOXYstrob	0,0038	89 (38)	<LOD	1,780	0,025	0,017; 0,036
TRIstrob	0,0354	92 (39)	<LOD	53,300	0,128	0,097; 0,169
PROaz	0,0278	37 (16)	<LOD	3,090	0,039	0,032; 0,047
BOSlid	0,0048	126 (53)	<LOD	1,250	0,023	0,018; 0,030
CHLOnil	0,0071	100 (42)	<LOD	2,480	0,060	0,041; 0,087
METsyl	0,0201	75 (32)	<LOD	12,200	0,053	0,041; 0,068
KAP	2,7399	64 (27)	<LOD	34,900	2,790	2,540; 3,070
FLUnil	0,0066	144 (61)	<LOD	2,440	0,106	0,077; 0,146
IMAZ	0,0335	8 (3)	<LOD	2,530	0,028	0,025; 0,031

CYPR – cyprodynil, PYR – pirymetanił, 4OH-PYR – 4-hydroksypirymetanił, DIFeZol – difenokonazol, EPOzol – epoksykonazol, FLUzol – flusilazol, PROzol – propikonazol, TEBzol – tebukonazol, OH-TEBzol – hydroksytebukonazol, TETRAzol – tetrakonazol, AZOXYstrob – azoksystrobina, TRIstrob – trifloksystrobina, PROaz – prochloraz, BOSlid – boskalid, CHLOnil – chlorotalonil, METsyl – metalaksyl, KAP – kaptan, FLUnil – fludioksonil, IMAZ – imazalil

Analiza surowiczych stężeń badanych fungicydów wykazała znamienne wyższe stężenia 4OH-PYR, triazoli (EPOzol, FLUzol, TETRAzol), CHLOnil, METsyl, KAP w grupie kobiet z PCOS w porównaniu do grupy kontrolnej (Tabela 11). Stężenie OH-TEBzol także było wyższe wśród kobiet z PCOS, ale różnica ta była na granicy znamienności statystycznej ($p = 0,052$).

Tabela 11. Wyniki oznaczeń surowiczych stężeń fungicydów w badanych grupach.

ng/ml	Grupa PCOS (n = 168)			Grupa Kontrolna (n = 68)			Wartość p
	N (%) >LOD	GM	95% CI GM	N (%) >LOD	GM	95% CI GM	
CYPR	89 (53)	0,0452	0,0318; 0,0644	38 (56)	0,054	0,0309; 0,0944	0,425
PYR	87 (52)	0,0711	0,0441; 0,115	29 (43)	0,0413	0,0195; 0,0875	0,093
4OH-PYR	23 (14)	0,0351	0,0281; 0,0438	3 (4)	0,0240	0,0193; 0,0298	0,046
Σ PYR	91 (54)	0,216	0,153; 0,305	30 (44)	0,137	0,0806; 0,232	0,057
DIFEzol	44 (26)	0,0827	0,0661; 0,104	17 (25)	0,0788	0,0557; 0,111	0,471
EPOzol	93 (55)	0,162	0,132; 0,198	24 (35)	0,0912	0,0684; 0,122	<0,001
FLUzol	54 (32)	0,0548	0,0403; 0,0745	5 (7)	0,0185	0,0147; 0,0232	<0,001
PROzol	51 (30)	0,0290	0,0199; 0,0423	23 (34)	0,0269	0,0160; 0,0455	0,521
TEBzol	90 (54)	0,0838	0,0568; 0,124	41 (60)	0,118	0,0636; 0,218	0,378
OH-TEBzol	9 (5)	0,120	0,101; 0,143	5 (7)	0,0919	0,0912; 0,0919	0,052
Σ TEBzol	90 (54)	0,392	0,314; 0,490	41 (60)	0,394	0,292; 0,531	0,641
TETRAzol	44 (26)	0,107	0,0854; 0,134	6 (9)	0,0601	0,0475; 0,0760	0,002
AZOXYstrob	63 (38)	0,0247	0,0159; 0,0382	26 (38)	0,0255	0,0127; 0,0512	0,815
TRIsstrob	63 (38)	0,130	0,0926; 0,184	29 (43)	0,123	0,0779; 0,195	0,883
PROaz	27 (16)	0,0399	0,0312; 0,051	10 (15)	0,0351	0,025; 0,0493	0,606
BOSlid	85 (51)	0,0233	0,0172; 0,0316	41 (60)	0,0230	0,0156; 0,0339	0,641
CHLOnil	80 (48)	0,0819	0,0522; 0,128	20 (29)	0,0281	0,0146; 0,0539	0,006
METsyl	67 (40)	0,0743	0,0543; 0,102	8 (12)	0,0229	0,0166; 0,0315	<0,001
KAP	59 (35)	3,23	2,85; 3,66	5 (7)	1,95	1,80; 2,12	<0,001
FLUnil	99 (59)	0,0957	0,0651; 0,141	45 (66)	0,137	0,0758; 0,246	0,468
IMAZ	6 (4)	0,0279	0,0248; 0,0314	2 (3)	0,0272	0,0229; 0,0322	0,804

Grupy porównywano testem U Manna-Whitney'a.

Za różnicę istotnie statystyczną przyjęto wartość $p < 0,05$

CYPR – cyprodynil, PYR – pirymetanił, 4OH-PYR – 4-hydroksypirymetanił, DIFEzol – difenokonazol, EPOzol – epoksykonazol, FLUzol – flusilazol, PROzol – propikonazol, TEBzol – tebukonazol, OH-TEBzol – hydroksytebukonazol, TETRAzol – tetrakonazol, AZOXYstrob – azoksystrobina, TRIsstrob – trifloksystrobina, PROaz – prochloraz, BOSlid – boskalid, CHLOnil – chlorotalonił, METsyl – metalaksyl, KAP – kaptan, FLUnil – fludioksonił, IMAZ - imazalił

4.5. Korelacje stężeń badanych fungicydów z wynikami badań hormonalnych oraz wskaźnikami zaburzeń metabolicznych wśród kobiet z zespołem policystycznych jajników (ang. *polycystic ovary syndrome, PCOS*)

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie czy podwyższone, w stosunku do grupy kontrolnej, stężenia fungicydów w grupie kobiet z PCOS korelują z danymi klinicznymi (wiek, BMI, obwód talii, RR), ilością spożywanych przez nich warzyw i owoców oraz obserwowanymi u nich zaburzeniami hormonalnymi oraz metabolicznymi. W tym celu wyliczono wskaźniki korelacji Spearmana pomiędzy stężeniami 4OH-PYR, EPOzol, FLUzol, OH-TEBzol, TETRAzol, CHLOnil, METsyl i KAP a wiekiem, BMI, obwodem talii, RR, ilością spożywanych warzyw i owoców, badanymi stężeniami hormonów oraz wskaźnikami zaburzeń metabolicznych.

Analiza danych wykazała obecność ujemnej korelacji pomiędzy surowiczymi stężeniami dwóch fungicydów z grupy triazoli Σ TEBzol ($R = -0,202$; $p = 0,010$), TEBzol ($R = -0,199$; $p = 0,045$), i EPOzol ($R = -0,161$; $p = 0,042$) z SBP oraz dodatniej korelacji pomiędzy surowiczymi stężeniami Σ PYR ($R = 0,171$; $p = 0,059$), TEBzol ($R = 0,179$; $p = 0,048$) i Σ TEBzol ($R = 0,184$; $p = 0,042$) a spożyciem warzyw. Korelacja Σ PYR była na granicy znamienności statystycznej ($R = 0,171$, $p = 0,059$) (Tabela 12).

Tabela 12 Korelacje podwyższonych stężeń fungicydów z wybranymi parametrami klinicznymi w grupie kobiet z PCOS.

	wiek	BMI	Talia	SBP	DBP	Spożycie owoców	Spożycie warzyw
PYR	-0,129	-0,044	-0,042	-0,066	-0,015	0,038	0,156
4OH-PYR	0,006	-0,072	-0,063	-0,110	-0,153	0,065	0,113
Σ PYR	-0,094	-0,062	-0,050	-0,093	-0,071	0,060	0,171
TEBzol	-0,083	-0,014	0,013	-0,199*	-0,097	0,019	0,179*
OH-TEBzol	0,078	-0,105	-0,094	-0,119	0,021	0,004	0,119
Σ TEBzol	-0,066	-0,032	-0,002	-0,202*	-0,082	0,008	0,184*
TETRAzol	-0,052	-0,059	-0,090	-0,066	-0,022	-0,049	0,118
FLUzol	0,056	0,056	0,090	0,114	0,111	0,097	0,080
EPOzol	-0,098	-0,100	-0,079	-0,161*	-0,074	-0,098	0,078
CHLOnil	0,013	-0,042	-0,045	0,093	0,025	-0,019	0,027
METsyl	-0,047	-0,066	-0,017	-0,004	-0,025	-0,017	-0,035
KAP	-0,046	-0,118	-0,093	-0,024	0,041	-0,107	-0,037

Współczynniki korelacji wyliczono testem Spearmana, *p < 0,05
 PYR – pirymetanił, 4OH-PYR – 4-hydroksypirymetanił, FLUzol – flusilazol, TEBzol – tebukonazol, OH-TEBzol – hydroksytebukonazol, TETRAzol – tetrakonazol, EPOzol – epoksykonazol, CHLOnil – chlorotalonil, METsyl – metalaksyl, KAP – kaptan,

Surowicze stężenia TEBzol ($R = 0,161$; $p = 0,040$) i Σ TEBzol ($R = 0,154$; $p = 0,050$) korelowały także dodatnio z surowiczymi stężeniami TSH. Kolejne analizy wykazały obecność ujemnej korelacji pomiędzy surowiczymi stężeniami METsyl a E2 ($R = -0,184$; $p = 0,020$) oraz dodatniej korelacji pomiędzy CHLOnil a TST ($R = 0,172$; $p = 0,028$) oraz pomiędzy FLUzol a A4-dione ($R = 0,175$; $p = 0,026$) (Tabela 13).

Tabela 13. Korelacje podwyższonych stężeń fungicydów ze stężeniami hormonów w grupie kobiet z PCOS.

	TSH	LH	FSH	E2	PRL	DHEA-s	TST	FAI	A4-dione	SHBG
PYR	-0,052	-0,103	-0,024	0,031	-0,046	0,064	0,120	0,051	0,072	0,011
4OH-PYR	0,039	-0,015	0,054	-0,123	-0,027	0,035	-0,047	-0,001	0,037	-0,023
Σ PYR	-0,033	-0,103	0,005	-0,010	-0,045	0,063	0,086	0,040	0,085	0,004
TEBzol	0,161*	-0,140	-0,124	0,053	-0,075	0,064	0,036	0,010	0,063	0,025
OH-TEBzol	-0,075	-0,051	0,072	0,132	-0,029	-0,017	0,018	-0,050	-0,003	0,109
Σ TEBzol	0,154*	-0,142	-0,099	0,068	-0,071	0,057	0,033	0,002	0,057	0,040
TETRAzol	0,126	-0,029	0,041	-0,083	0,042	0,062	-0,032	0,013	0,005	-0,005
FLUzol	0,069	0,014	-0,042	0,063	-0,035	0,070	0,151	0,086	0,175*	-0,022
EPOzol	-0,026	-0,098	-0,038	0,027	-0,004	0,048	0,032	-0,070	0,076	0,122
CHLOnil	0,076	0,032	0,033	0,024	-0,036	0,070	0,172*	0,109	0,100	-0,047
METsyl	0,027	-0,006	0,098	-0,184*	0,030	0,085	-0,072	-0,048	0,015	0,018
KAP	0,052	-0,057	0,019	-0,049	0,030	0,086	0,003	-0,024	0,083	0,043

Współczynniki korelacji wyliczono testem Spearmana, * $p < 0,05$

PYR – pirymetanił, 4OH-PYR – 4-hydroksypirymetanił, FLUzol – flusilazole, TEBzol – tebukonazol, OH-TEBzol – hydroksytebukonazol, TETRAzol – tetrakonazol, EPOzol – epoksykonazol, CHLOnil – chlorotalonił, METsyl – metalaksyl, KAP – kaptan

Analiza danych nie wykazała żadnych korelacji pomiędzy surowiczymi stężeniami fungicydów a wskaźnikami metabolicznymi w grupie kobiet z PCOS (Tabela 14).

Tabela 14. Korelacje podwyższonych stężeń fungicydów ze wskaźnikami zaburzeń metabolicznych w grupie kobiet z PCOS.

	GLU	HDL	TG	TCh	LDL	insulina	HOMA-IR
PYR	-0,038	0,028	-0,022	0,020	0,010	-0,015	-0,032
4OH-PYR	0,010	0,028	-0,031	0,009	0,009	-0,117	-0,114
Σ PYR	-0,030	0,039	-0,036	0,015	0,004	-0,060	-0,116
TEBzol	-0,031	0,049	-0,062	-0,103	-0,134	-0,052	-0,064
OH-TEBzol	-0,030	0,042	-0,001	-0,048	-0,081	-0,033	-0,033
Σ TEBzol	-0,034	0,054	-0,058	-0,100	-0,136	-0,055	-0,042
TETRAzol	-0,042	0,037	0,002	0,094	0,069	-0,039	-0,045
FLUzol	0,009	-0,016	0,096	0,147	0,135	-0,017	-0,008
EPOzol	-0,090	0,121	-0,060	0,041	-0,012	-0,086	-0,105
CHLOnil	0,026	0,050	0,031	0,029	0,004	-0,027	-0,005
METSyl	-0,011	-0,016	-0,018	0,027	0,036	-0,071	-0,071
KAP	-0,067	0,109	-0,068	0,011	-0,040	0,031	0,015

Współczynniki korelacji wyliczono testem Spearmana, * $p < 0,05$

PYR – pirymetanił, 4OH-PYR – 4-hydroksypirymetanił, FLUzol – flusilazol, TEBzol – tebukonazol, OH-TEBzol – hydroksytebukonazol, TETRAzol – tetrakonazol, EPOzol – epoksykonazol, CHLOnil – chlorotalonił, METsyl – metalaksyl, KAP – kaptan

4.6. Ocena związku pomiędzy podwyższonymi stężeniami badanych fungicydów w surowicy a rozpoznaniem zespołu policystycznych jajników (PCOS)

Analiza regresji logistycznej wykazała istnienie związku pomiędzy rozpoznaniem PCOS a stężeniami trzech z siedmiu fungicydów, których stężenia były znamienne wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej. Szansa rozpoznania PCOS w przypadku podwyższonego stężenia METsyl, KAP i FLUzol w surowicy była prawie trzykrotnie wyższa (odpowiednio $OR = 2,98$; $OR = 2,73$ i $OR = 2,55$) jednak FLUzol był na granicy znamienności statystycznej ($p=0,087$). Niemniej jednak w modelu skorygowanym o BMI i wiek (OR^b) jedynie podwyższone stężenie FLUzol ($OR = 3,85$) oraz METsyl ($OR = 2,48$) zwiększało szansę rozpoznania PCOS. Tym razem METsyl był na granicy znamienności statystycznej ($p = 0,070$). Dołączenie do modelu ostatniej zmiennej „zakłócającej”, którą stanowiło zwiększone spożycie warzyw i owoców (OR^c) w grupie

PCOS spowodowało brak związku pomiędzy podwyższonymi stężeniami badanych fungicydów w surowicy a rozpoznaniem PCOS (Tabela 15).

Tabela 15. Ocena potencjalnego związku pomiędzy podwyższonymi stężeniami badanych fungicydów w surowicy a rozpoznaniem PCOS.

	dane surowe			skorygowane o BMI i wiek			skorygowane o BMI, wiek oraz spożycie owoców i warzyw		
	OR	95% CI	wartość p	OR ^b	95% CI	wartość p	OR ^c	95% CI	wartość p
4OH-PYR	1,08	0,277; 5,34	0,916	1,90	0,388; 12,1	0,458	1,43	0,232; 12,0	0,715
EPOzol	1,52	0,714; 3,31	0,280	1,20	0,502; 2,87	0,687	1,17	0,422; 3,24	0,765
FLUzol	2,55	0,927; 8,26	0,087	3,85	1,24; 14,0	0,027	3,32	0,819; 18,1	0,119
TETRAzol	1,43	0,489; 4,55	0,525	1,30	0,392; 4,78	0,674	1,31	0,326; 5,74	0,706
CHLOnil	0,89	0,407; 1,91	0,760	1,10	0,464; 2,63	0,821	1,32	0,488; 3,61	0,583
METSyl	2,98	1,28; 7,61	0,015	2,48	0,963; 6,97	0,070	1,94	0,678; 5,96	0,228
KAP	2,73	1,18; 6,75	0,023	1,68	0,645; 4,66	0,297	2,30	0,769; 7,50	0,147

4OH-PYR – 4-hydroksypirymetanił, EPOzol – epoksykonazol, FLUzol – flusilazole, TETRAzol – tetrakonazol, CHLOnil – chlorotalonił, METsyl – metalaksyl, KAP – kaptan

5. DYSKUSJA

Ludzie na całym Świecie są narażeni na szereg różnych antropogenicznych substancji toksycznych. Wśród nich wyróżnić można środki ochrony roślin, do których zalicza się także związki o działaniu grzybobójczym, czyli fungicydy [14,24]. Ich głównym zadaniem jest nie tylko ograniczanie chorób roślin, które wywoływane są przez grzyby, ale także związki te mają swoje zastosowanie przy transporcie oraz przechowywaniu warzyw i owoców, celem wydłużenia ich przydatności do spożycia [3]. Wobec czego jednym z głównych źródeł ekspozycji człowieka na fungicydy stanowi spożywanie warzyw i owoców [12,31].

Wyniki ostatnich badań wskazują, że niektóre z fungicydów ze względu na swoją strukturę aromatyczną wykazują podobieństwo do hormonów steroidowych a co za tym idzie mogą stanowić przyczynę występowania zaburzeń hormonalnych [32]. Do najczęstszych z nich należy PCOS, który charakteryzuje hiperandrogenizm pochodzenia jajnikowego [18] oraz oporność tkanek na insulinę [33]. Ilościowe oznaczenie fungicydów na coraz niższych poziomach stężeń, w próbkach o skomplikowanej matrycy, takich jak surowica krwi, wymaga stałego rozwoju zaawansowanych technik analitycznych.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było zatem opracowanie metody analitycznej umożliwiającej oznaczenie siedemnastu najczęściej stosowanych w rolnictwie fungicydów i dwóch produktów ich przemian w próbkach surowicy kobiet w wieku rozrodczym, skorelowanie otrzymanych wyników ze spożyciem warzyw i owoców oraz występowaniem zaburzeń hormonalnych i metabolicznych charakterystycznych dla PCOS.

Opracowana procedura analityczna oparta została na ekstrakcji ciec-z-ciecz za pomocą mieszaniny rozpuszczalników DCM:heksan:aceton w stosunku objętościowym (50:30:20). Ze względu na powtarzalność otrzymanych wyników i jedną z wyższych intensywności pików odpowiedzi detektora wybrano powyższą metodę ekstrakcji. Analizę oznaczania fungicydów wykonano przy pomocy zwalidowanej metody, gdzie wyznaczono między innymi takie parametry jak: LOD, LOQ, R^2 , odzysk (dla poziomu wzbogacenia 10 ng/ml i 100 ng/ml) czy CV. Do oznaczeń końcowych zastosowano technikę GC-MS/MS. Dzięki opracowanej metodzie możliwe jest oznaczenie 17 fungicydów i 2 produktów ich przemian w próbkach surowicy na bardzo niskim

poziomie stężeń od LOQ = 0,0084 ng/ml dla 4OH-pirymetanilu do LOQ = 8,22 ng/ml dla kaptanu. Inne ośrodki badawcze na całym świecie stworzyły podobne metody analityczne oparte na GC-MS/MS. Jakkolwiek dotyczą one oznaczania głównie herbicydów i insektycydów chloroorganicznych [30,34] i tylko nieliczne z nich umożliwiają oznaczenie tylko kilku powszechnie występujących fungicydów takich jak: kaptan [35]. Dodatkowym atutem stworzonej metody jest fakt oznaczenia tych fungicydów, które znalazły swoje zastosowanie przy transporcie oraz przechowywaniu warzyw i owoców w Polsce [36].

Kolejnym etapem badań była ocena zależności pomiędzy oszacowanymi stężeniami fungicydów w surowicy badanych kobiet a ich najczęstszego źródła ekspozycji jakim jest spożywanie warzyw i owoców oraz występowaniem zaburzeń hormonalnych i metabolicznych charakterystycznych dla PCOS. Badane kobiety podzielono zatem na dwie grupy: pierwszą stanowiły kobiety z rozpoznaniem PCOS, w którym obserwuje się szereg zaburzeń hormonalnych wynikających z nadmiernej produkcji androgenów przez jajniki oraz oporności tkanek na insulinę. Grupę kontrolną stanowiły kobiety zdrowe, regularnie miesiączkujące bez obecności jakichkolwiek nieprawidłowości w wynikach badań hormonalnych i wskaźników zaburzeń metabolicznych. Wyniki przeprowadzonych oznaczeń wskazały na znamienne wyższe stężenia siedmiu (4OH-PYR, EPOzol, FLUzol, TETRAzol, CHLOnil, METsyl, KAP) z spośród 19 analizowanych fungicydów w grupie PCOS w porównaniu do grupy kontrolnej. Co więcej, stężenia niektórych z nich korelowały dodatnio z surowiczymi stężeniami androgenów (TST, 4A-dione), TSH oraz ujemnie z E2. Nie znaleziono natomiast żadnych korelacji pomiędzy stężeniami badanych związków a wskaźnikami zaburzeń metabolicznych w tej grupie. Surowicze stężenia TEBzol i produktu jego przemian (OH-TEBzol) korelowały z ilością spożywanych warzyw w grupie kobiet z PCOS. Niemniej jednak, kobiety z grupy PCOS były starsze, miały większy wskaźnik BMI, a co za tym idzie wyższy obwód pasa oraz spożywały znamienne większe ilości warzyw i owoców. Powstało zatem pytanie czy podwyższone surowicze stężenia niektórych z badanych fungicydów mają związek z występowaniem zaburzeń hormonalnych, a co za tym idzie rozpoznaniem PCOS, czy są po prostu efektem zwiększonego spożycia warzyw i owoców w tej grupie. Co prawda wstępna analiza regresji logistycznej wykazała istnienie związku pomiędzy rozpoznaniem PCOS a stężeniami trzech (FLUzol, METsyl, KAP) z siedmiu fungicydów, których stężenia były znamienne wyższe

w porównaniu do grupy kontrolnej, jednakże dołączenie do modelu trzech zmiennych „zakłócających” (to jest: BMI, wiek oraz spożycie warzyw i owoców) wykazało brak takiej zależności. Wyniki te wskazują, iż zaobserwowane zwiększone surowicze stężenia 7 z 19 badanych fungicydów w grupie kobiet z PCOS nie ma związku z obserwowanymi wśród nich zaburzeniami hormonalnymi tylko są efektem zwiększonego spożycia warzyw i owoców w tej grupie.

Wyniki powyższych badań są pierwszą próbą na Świecie oznaczania wielu różnych fungicydów jednocześnie w próbkach surowicy i oceny ich związku z występowaniem zaburzeń hormonalnych u kobiet w wieku rozrodczym. Przesłanką do badania takiej zależności jest fakt, iż niektóre z fungicydów należą do EDC. Badania *in vitro* przeprowadzone przez Wang *et al.* [37] dowiodły, że fungicydy triazolowe wykazują działanie agonistyczne wobec receptorów estrogenowych alfa (z *ang.* ER α) i stymulują produkcję E2 przez komórki HepG2. Podobne wyniki uzyskali Draskau *et al.* [32], którzy wykazali że FLUzol, fungicyd także należący do grupy triazoli, działa antagonistycznie w stosunku do receptorów androgenowych (z *ang.* AR) i zmniejsza produkcję E2 w modelu *in vitro* prawdopodobnie przez hamowanie aktywności aromatazy, enzymu kluczowego w syntezie estrogenów. W badaniach *in vivo* prowadzonych na szczurach, przez tą samą grupę badawczą, dowiodły, że ekspozycja ciężarnych szczurzyk na FLUzol zwiększa stężenie A4-dionu i zmniejsza stężenie estronu w męskich płodach szczurów. Wyniki prowadzonych badań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazały natomiast dodatnią korelację pomiędzy surowiczymi stężeniami FLUzolu a surowiczym stężeniem A4-dionu w grupie kobiet z PCOS. Można zatem podejrzewać, że związek ten, tak jak wykazano to w badaniach na szczurach rzeczywiście ma zdolności do hamowania aktywności aromatazy, uczestniczącej także w przemianie A4-dionu do estronu. Surowicze stężenia CHLOnilu w tej grupie kobiet korelowały natomiast z surowiczymi stężeniami TST. Być może związek ten także wykazuje działanie blokujące aktywność aromatazy, która także przekształca TST do E2. Surowicze stężenia METsyl korelowały ujemnie z stężeniami E2 w surowicy. W dostępnej literaturze brak jest natomiast jakichkolwiek danych, aby METsyl miał zdolność do hamowania syntezy E2. Wyniki badań *in vitro* wykazały natomiast, że METsyl może hamować syntezę progesteronu przez komórki ciała żółtego [38]. Naukowcy z Iowa i Karolinie Północnej zbadali na grupie 3 103 kobiet, zależność między stosowaniem pestycydów, w tym fungicydów, a zaburzeniami miesiączkowania. Wyniki przeprowadzonych badań

wykazały, że kobiety, które były narażone na kontakt z pestycydami miały dłuższe cykle miesiączkowe i większe prawdopodobieństwo wtórnego braku miesiączki (OR = 1,5; 95% CI: 1,2; 1,9) w porównaniu do kobiet, które nie miały kontaktu z pestycydami [39].

Wyniki niniejszej pracy doktorskiej, wykazały także, iż surowicze stężenia TEBzolu w grupie kobiet z PCOS korelowały dodatnio ze stężeniami TSH, hormonu odpowiedzialnego za czynność tarczycy. Badanie Piccoli *et al.* [40] na brazylijskiej populacji, w której udział wzięło 275 kobiet i mężczyzn pracujących na farmie, wykazało, że ekspozycja na pestycydy, w tym fungicydy, wiąże się ze wzrostem TSH, któremu towarzyszy spadek wolnej tyroksyny (fT4) ale tylko wśród mężczyzn. Wśród kobiet nie znaleziono takiej zależności, co może wynikać z faktu, że głównie mężczyźni zaangażowani są w pracę przy opryskach upraw warzyw i owoców. Badanie przeprowadzone przez Yu *et al.* [41] na larwach ryb Danio przegowanego wykazało, że ekspozycja na TEBzol, prowadzi natomiast do zmniejszenia produkcji T4 i trójiodotyroniny (T3). Goldner *et al.* [42] zbadali natomiast związek między ekspozycją na pestycydy w tym fungicydy a ryzykiem rozwoju niedoczynności lub nadczynności tarczycy w grupie 16 529 mężczyzn. Częstość występowania niedoczynność i nadczynność w tej grupie wynosiła odpowiednio 6,9 % i 2,1 %. Ryzyko wystąpienia niedoczynności tarczycy w przypadku ekspozycji na fungicydy w tej grupie rosło o 40 % (OR = 1,4; 95 % CI: 1,1; 1,8).

Wyniki niniejszej pracy nie wykazały natomiast związku pomiędzy surowiczymi stężeniami badanych fungicydów a wskaźnikami zaburzeń metabolicznych, które stanowiły surowicze stężenia lipidów i wskaźnika HOMA. Analiza dostępnych danych literaturowych nie wykazała, aby jakkolwiek grupa badawcza na Świecie prowadziła badania wpływu ekspozycji na fungicydy a dyslipidemię. Istnieje natomiast szereg badań na temat wpływu pestycydów, w tym także fungicydów, na zaburzenia przemian węglowodanów a co za tym idzie ryzyka rozwoju T2DM [43]. Wiele badań *in vitro* i *in vivo* wykazało, że narażenie na pestycydy zaburza homeostazę glukozy i prowadzi do insulinooporności, a także objawów cukrzycy. Potencjalne mechanizmy, za pomocą których pestycydy w tym fungicydy zakłócają homeostazę glukozy, obejmują indukcję lipotoksyczności, stres oksydacyjny, stany zapalne, akumulację acetylocholinę i dysbiozę mikroflory jelitowej [43]. Naukowcy z Tajlandii zbadali na grupie 866 pracowników plantacji ryżu z cukrzycą i 1021 zdrowej kontroli zależność między stosowaniem

pestycydów, w tym fungicydów a występowaniem cukrzycy. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że częstość występowania cukrzycy była dodatnio związana z narażeniem na wszystkie rodzaje pestycydów, w tym insektycydy, herbicydy czy związki grzybobójcze. Związek należący do grupy fungicydów (benomyl) wykazywał statystycznie istotne OR (OR = 2,08; 95%CI 1,03; 4,20) [33].

Analiza wybranych parametrów klinicznych wskazała na istnienie ujemnej korelacji pomiędzy surowiczymi stężeniami dwóch fungicydów z grupy triazoli (TEBzol i EPOzol) z wartościami SBP w grupie kobiet z PCOS. Wyniki poszukiwań nowych leków hipotensyjnych wskazują natomiast, że związki triazolowe wykazują właściwości blokujące produkcję aldosteronu poprzez hamowanie CYP11B2 (syntaza aldosteronu), a co za tym idzie obniżają SBP [44].

Analiza regresji logistycznej dowiodła natomiast, że obserwowane w grupie kobiet z PCOS zaburzenia hormonalne nie są wynikiem ekspozycji na badane fungicydy tylko są efektem zwiększonego spożycia warzyw i owoców w tej grupie.

Naukowcy z Polski przeprowadzili badania w roku 2012 i 2020 na owcach, w tym jabłkach, pomarańczach, grejpfrutach i cytrynach pochodzących z rynku w Lublinie. W 2012 roku w jabłkach wykryto 26 różnych pestycydów w tym 12 fungicydów (BOSlid, CHLOnil, DIFEzol, PYR, FLUzol, TRIstrob, EPOzol, CYPR, KAP, FLUnil, TEBzol). W 2012 r. najczęściej identyfikowaną grupą pestycydów były insektycydy (50 %), następnie grzybobójcze (46 %) i regulatory wzrostu (8 %). W 2020 r. w próbkach całych jabłek wykryto wyłącznie środki grzybobójcze (7 fungicydów) [36]. Według Raportu Ministra Zdrowia [45] w Polsce w 2017 roku we wszystkich 85 analizowanych próbkach jabłek stwierdzono obecność łącznie 29 pozostałości pestycydów. W 71 % próbek wykryto pozostałości co najmniej jednego pestycydu. W 39 % próbki stwierdzono pozostałości co najmniej dwóch pestycydów. Najczęściej identyfikowanymi pestycydami były: kaptan (35 % próbek) i boskalid (22 % próbek). Ponadto wykryto obecność także tebukonazolu w 12 % próbek i fludioksonilu w 9 % próbek. W ramach urzędowej kontroli i monitoringu w 2019 roku badaniom na obecność pestycydów poddano łącznie 2624 próbek żywności. W ponad 1300 próbkach (ok. 49,5%) stwierdzono obecność co najmniej jednego pestycydu. Najczęściej wykrywanymi pestycydami były fungicydy: boskalid, kaptan, azoksystrobina i fludioksonil, Najbardziej zanieczyszczonymi produktami były porzeczki, truskawki, brzoskwinie i nektarynki, maliny oraz cytryny

[46]. Powyższe wyniki są potwierdzeniem moich badań, w których także najczęściej wykrywanymi pestycydami w owocach i warzywach były środki grzybobójcze, ich obecność stwierdzono w 64% analizowanych próbek. Najczęściej oznaczanym ilościowo fungicydem był boskalid, wykryto go w ponad 40 % próbek, potwierdzono także obecność THPI (32% próbek), metabolitu kaptanu. Potwierdza to jego zastosowanie w uprawie roślin. Wykryto także pozostałości tebukonazolu (24 %), fludioksonilu (16 %), cyprodynilu (12 %) i kaptanu (12 %) [12]. Zatem spożywanie owoców i warzyw może być źródłem narażenia na środki grzybobójcze.

Podsumowując, prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania umożliwiły opracowanie metody analitycznej umożliwiającej oznaczenie siedemnastu, najczęściej stosowanych w rolnictwie fungicydów, w próbkach surowicy krwi oraz ocenę potencjalnego wpływu ekspozycji na te związki na występowanie zaburzeń hormonalnych u kobiet w wieku rozrodczym.

6. WNIOSKI

W ramach prowadzonych badań opracowano metodę analityczną pozwalającą na oznaczania siedemnastu wybranych fungicydów i dwóch produktów ich przemian w próbkach o skomplikowanej matrycy, jakim jest surowica krwi.

Podwyższone surowicze stężenia Σ PYR, TEBzol i Σ TEBzol w grupie kobiet z PCOS korelowały ze zwiększonym spożyciem warzyw.

Zaobserwowane zwiększone surowicze stężenia siedmiu fungicydów (4OH-PYR, EPOzol, FLUzol, TETRAzol, CHLOnil, METsyl, KAP) w grupie kobiet z PCOS nie mają związku z obserwowanymi wśród nich zaburzeniami hormonalnymi i metabolicznymi tylko jest efektem zwiększonego spożycia warzyw i owoców w tej grupie.

Na podstawie powyższych wniosków możemy jedynie przyjąć pierwszą część hipotezy badawczej, iż spożycie warzyw i owoców może stanowić źródło ekspozycji na związki o działaniu grzybobójczym, jednakże, nie ma to związku z występowaniem zaburzeń hormonalnych i metabolicznych u kobiet w wieku rozrodczym.

7. STRESZCZENIE

Celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie metody analitycznej umożliwiającej oznaczenie siedemnastu najczęściej stosowanych w rolnictwie fungicydów i dwóch produktów ich przemian w próbkach surowicy kobiet w wieku rozrodczym, skorelowanie otrzymanych wyników ze spożyciem warzyw i owoców oraz występowaniem zaburzeń hormonalnych i metabolicznych charakterystycznych dla PCOS.

Grupę badaną stanowiło 236 kobiet w wieku od 18 do 42 lat. Ilościowe oznaczenie fungicydów na coraz niższych poziomach stężeń, w próbkach o skomplikowanej matrycy, takim jak surowica krwi, wymaga stałego rozwoju zaawansowanych technik analitycznych. Wobec czego, celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie metody analitycznej umożliwiającej oznaczenie siedemnastu wybranych fungicydów i dwóch produktów ich przemian w próbkach surowicy kobiet w wieku rozrodczym oraz skorelowanie otrzymanych wyników ze spożyciem warzyw i owoców oraz występowaniem zaburzeń hormonalnych i metabolicznych wśród kobiet z PCOS.

Wyniki powyższych badań wskazały na znamienne wyższe stężenia siedmiu (4OH-PYR, EPOzol, FLUzol, TETRAzol, CHLOnil, METsyl, KAP) z pośród 19 analizowanych fungicydów w grupie PCOS w porównaniu do grupy kontrolnej. Co więcej, stężenia niektórych z nich korelowały dodatnio z surowiczymi stężeniami androgenów (TST, 4A-dione), TSH oraz ujemnie z E2. Nie znaleziono natomiast żadnych korelacji pomiędzy stężeniami badanych związków a wskaźnikami zaburzeń metabolicznych w tej grupie. Niemniej jednak, kobiety z grupy PCOS były starsze, miały większy wskaźnik BMI, a co za tym idzie wyższy obwód pasa oraz spożywały znamienne większe ilości warzyw i owoców.

Podsumowując, prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania umożliwiły opracowanie metody analitycznej umożliwiającej oznaczenie siedemnastu, najczęściej stosowanych w rolnictwie fungicydów, w próbkach surowicy krwi oraz ocenę potencjalnego wpływu ekspozycji na te związki na występowanie zaburzeń hormonalnych u kobiet w wieku rozrodczym.

8. SUMMARY

The aim of this doctoral thesis was to develop an analytical method enabling the determination of seventeen fungicides most frequently used in agriculture and two of their transformation products in serum samples of women of reproductive age, correlating the obtained results with the consumption of vegetables and fruits and the occurrence of hormonal and metabolic disorders characteristic of PCOS.

The study group consisted of 236 women aged 18 to 42. Quantitative determination of fungicides at increasingly lower concentration levels, in samples with a complex matrix, such as blood serum, requires the constant development of advanced analytical techniques. Therefore, the aim of this doctoral thesis was to develop an analytical method enabling the determination of seventeen selected fungicides and two products of their transformations in serum samples of women of reproductive age and to correlate the obtained results with the consumption of vegetables and fruits and the occurrence of hormonal and metabolic disorders among women with PCOS.

The results of the above tests indicated significantly higher concentrations of seven (4OH-PYR, EPOzol, FLUzol, TETRAzol, CHLOnil, METsyl, KAP) of the 19 analyzed fungicides in the PCOS group compared to the control group. Moreover, the concentrations of some of them correlated positively with serum concentrations of androgens (TST, 4A-dione), TSH and negatively with E2. However, no correlations were found between the concentrations of the tested compounds and the indicators of metabolic disorders in this group. However, women from the PCOS group were older, had a higher BMI and, consequently, a higher waist circumference and consumed significantly larger amounts of vegetables and fruit.

To sum up, the research conducted as part of this doctoral thesis enabled the development of an analytical method enabling the determination of seventeen fungicides most frequently used in agriculture in blood serum samples and the assessment of the potential impact of exposure to these compounds on the occurrence of hormonal disorders in women of reproductive age.

9. ANEKS

Do pracy dołączono następujące dokumenty:

1. Kopię zgody Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN/374/2017):

**NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
PRZY GDAŃSKIM UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
80-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a**

Sekretariat: tel. 58/349-10-11, fax 58/349-11-70, Przewodniczący tel. 58/349-12-60

=====

NKBBN/374/2017

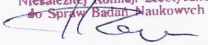
Gdańsk, 2017-10-11

Pani
Prof. dr hab. n. chem. Lidia Wolska
Kierownik Zakładu Toksykologii Środowiska
Wydział Nauk o Zdrowiu
Gdański Uniwersytet Medyczny

W odpowiedzi na zgłoszenie badań z dnia 22.08.2017r. na temat: **„Narażenie człowieka na substancje o działaniu grzybobójczym będące skutkiem ekspozycji żywieniowej”** (praca doktorska mgr Andrzeja Berga) - Niezależna Komisja Bioetyczna do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym na posiedzeniu w dniu 7 września 2017 roku zapoznała się z powyższym projektem pracy i – po uzupełnieniu przez badacza ww. wniosku zgodnie z zaleceniem Komisji w dniu 14.09.2017r. - wyraża zgodę na jej prowadzenie w zakresie przedstawionym we wniosku, gdyż są to badania poznawcze, nie stanowiące istotnego zagrożenia dla zdrowia badanych osób.

Niniejsza zgoda jest ważna do 30 czerwca 2020 roku, zgodnie z planowanym przez badacza terminem zakończenia ww. badań.

NIEZALEŻNA KOMISJA BIOETYCZNA
DO SPRAW BADAŃ NAUKOWYCH
PRZY GDAŃSKIM UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM
80-210 Gdańsk, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a
tel. 58 349 10 11, fax 58 349 11 70

PRZEWODNICZĄCY
Niezależnej Komisji Bioetycznej
do Spraw Badań Naukowych

prof. dr hab. med. Stefan Ruszczyk

2. Kwestionariusz narażenia na związki grzybobójcze:

Data.....

Imię i nazwisko.....

Kwestionariusz narażenia na związki grzybobójcze i inne substancje toksyczne

Dane podane w kwestionariuszu są objęte tajemnicą. Służą wyłącznie do celów badawczych i interpretacji wyników analiz. Wyniki nie zostaną udostępnione inaczej niż w formie naukowego opracowania z zachowaniem anonimowości. Uczestnikom badania przysługuje prawo do wglądu i wprowadzaniu modyfikacji w danych osobowych. Czas potrzebny na uzupełnienie ankiety to około 10 – 12 minut. Prosimy o szczerą odpowiedź.

I. Dane demograficzne

1. Proszę podać nazwę miejscowości zamieszkania: i zaznaczyć stopień jej zaludnienia:

Wieś do 5 tys. Mieszkańców

Małe miasto 5-50 tys.

Średnie miasto 50-200 tys.

Duże miasto 200-500 tys.

Duże miasto powyżej 500 tys.

II. Dane społeczno-ekonomiczne

1. Czy pracuje Pani/Pan obecnie zawodowo?

Tak Nie

2. Jeśli pracowała Pani lub pracuje, proszę o podanie

a. Zawodu.....

b. Stanowiska pracy.....

3. Czy kiedykolwiek pracowała Pani/Pan:

	Tak	Kiedy (zakres lat)	Jak długo (miesiące):
W branży związanej z rolnictwem (np. produkcja pasz)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
W gospodarstwie rolnym/ na farmie	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
W fabryce przy produkcji kosmetyków lub leków	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
W hurtowni/sklepie spożywczym/mięsny	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

4. Czy w pracy miała Pani/ miał Pan kontakt ze środkami dezynfekującymi/przeciwgrzybiczymi?

Tak Nie

III. Styl życia

1. Proszę podać swój:

Wzrost Wagę Wiek

2. Jak często uprawia Pani/Pan sport?

Wcale 1x/tyg. 2x/tyg. 3x/tyg. 4x/tyg. i częściej

3. Proszę wymienić leki, suplementy diety które zażywała Pani/Pan w ciągu ostatniego roku:

.....
.....
.....

4. Proszę wymienić kosmetyki, leki zawierające substancje o działaniu przeciwgrzybiczym, które zażywała Pani/Pan w ciągu ostatniego roku (np. szampony, preparaty do stóp, kremy, tabletki): (np. szampony/odżywki/balsamy przeciwłupieżowe, środki antyalergiczne, środki regulujące pracę łojotoków, środki przeciwzapalne itp.)

.....

VI. Dieta

1. Czym kieruje się Pani/Pan wybierając żywność?

Jakością Świeżością Ceną

2. Czy kupuje Pani gotowe posiłki w plastikowych opakowaniach?

Nie	Tak, jak często (proszę podać częstość)			
	dziennie	tygodniowo	miesięcznie	rzadziej niż 1x/ w miesiącu

3. Ile dziennie płynów Pani/Pan wypija?

1-2 szklanki 3-4 szklanki 5-6 szklanek >6 szklanek

4. W jaki sposób przechowuje Pani/Pan napoje butelkowane po otwarciu?

.....

5. W poniższej rubryce proszę wybrać tę kolumnę, która odpowiada najczęstszemu spożyciu produktu oraz wpisać liczbę - ile porcji każdorazowo Pani/Pan spożywa (jedna porcja to 100g produktu). Jeśli spożywała Pani/Pan dany produkt w ciągu ostatnich 48h przed pobraniem krwi do badania proszę dodatkowo w ostatniej kolumnie wpisać „X”.

Produkty spożywcze	Dziennie	Tygodniowo	Miesięcznie	Nigdy	Spożywałam/em w ciągu ostatnich 48h
Gotowe dania obiadowe w plastikowych opakowaniach					
Gotowe dania w puszkach (np. paszety, mielonki)					
Paczowane wędliny					
Paczowane surowe mięso					
Warzywa np. ogórki, brokuły w plastikowych opakowaniach					
Owoce np. maliny, borówki w plastikowych opakowaniach					
Gotowe sałatki warzywne/owocowe w plastikowych opakowaniach					
Surowe mięso (wołowina, drób, wieprzowina)					
Świeże owoce i warzywa					
Woda w butelkach plastikowych					
Napoje gazowane i niegazowane w butelce plastikowej					

6. Po jakie owoce i warzywa najczęściej Państwo sięgają?

.....
.....

7. Czy myje Pani/Pan świeżą żywność przed konsumpcją? (np. banany, jaja, świeże mięso pakowane itp.)

.....
.....

8. Ile dziennie zjada Pani/Pan świeżych owoców i warzyw?

.....
.....

9. Czy spożywa Pani/Pan surowe mięso. Jakie? (np. tatar)

.....
.....

10. Ile dziennie zjada Pani/Pan mięsa?

.....
.....

11. Proszę podać typy produktów mięsnych najczęściej spożywanych (np. mięso wieprzowe gotowane, drób klatkowy, wędlina wędzona, parzona, mięso wysoko przetworzone itp.)

.....
.....

12. Gdzie Pani/Pan kupuje świeżą żywność? (np. lokalny rynek, sklep osiedlowy, sklep sieciowy, hipermarket itp.)

.....
.....

DZIĘKUJEMY ZA WYPEŁNIENIE ANKIETY

3. Zgoda na udział w badaniu:

ŚWIADOMA ZGODA NA UDZIAŁ W BADANIU NAUKOWYM

Tytuł badania:

„Narażenie człowieka na substancje o działaniu grzybobójczym będące skutkiem ekspozycji żywieniowej”

Jestem doktorantem Zakładu Toksykologii Środowiska Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Prowadzę badania w ramach rozprawy doktorskiej. W związku z powyższym, zwracam się do Państwa z prośbą o wyrażenie zgody na udział w badaniach. Będą one polegały na pobraniu moczu i krwi żyłnej do analiz jakościowych i ilościowych. Po dokonanej analizie wyniki zostaną Państwu przekazane w formie elektronicznej. Oprócz tego, zostaną Państwo również poproszeni o wypełnienie ankiety dotyczącej nawyków żywieniowych. Państwa dane osobowe zostaną wykorzystane jedynie dla potrzeb niniejszych badań. Pragnę zapewnić, iż badanie jest dobrowolne, natomiast wyniki uzyskane w toku badań posłużą jedynie do celów opracowania naukowego.

Dziękuję za wyrażenie zgody na udział w badaniach
mgr Andrzej Berg

Zgodnie z art. 13 ogólnego rozporządzenia o ochronie danych osobowych z dnia 27 kwietnia 2016 r. (Dz. Urz. UE L 119 z 04.05.2016) informuję, iż:

- 1) administratorem Pani/Pana danych osobowych jest Gdański Uniwersytet Medyczny z siedzibą w Gdańsku 80-210, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a,
- 2) Pani/Pana dane osobowe przetwarzane będą w celu niniejszych badań na podstawie art. 6 ust. 1 lit. b,c,f ogólnego rozporządzenia o ochronie danych osobowych z dnia 27 kwietnia 2016 r.,
- 3) Posiada Pani/Pan prawo dostępu do treści swoich danych, prawo do ich sprostowania i prawo do przenoszenia danych,
- 4) posiada Pani/Pan prawo wniesienia skargi do Urzędu Ochrony Danych Osobowych, gdy uzasadnione jest, że Pani/Pana dane osobowe przetwarzane są przez administratora niezgodnie z ogólnym rozporządzeniem o ochronie danych osobowych z dnia 27 kwietnia 2016 r.,

Wyrażam zgodę na przetwarzanie moich danych osobowych przez Gdański Uniwersytet Medyczny z siedzibą w Gdańsku 80-210, ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a, obejmujących imię i nazwisko, PESEL, płeć, wiek, adres zamieszkania, stan zdrowia, numer telefonu, adres e-mail w celu prowadzenia dokumentacji badań na studiach doktoranckich, zgodnie z ogólnym rozporządzeniem o ochronie danych osobowych. Podanie danych i wyrażenie zgody jest dobrowolne. Przyjmuję do wiadomości, że zgoda może być odwołana w każdym momencie poprzez złożenie oświadczenia woli w tym zakresie u mgr Andrzej Berg (wycofanie zgody nie wpływa na zgodność z prawem wykorzystania danych przed cofnięciem takiej zgody).

Pacjent:

.....
Imię i nazwisko

.....
Własnoręczny Podpis

.....
data

10. SPIS RYSUNKÓW I TABEL ZAMIESZCZONYCH W PRACY

10.1. Spis rysunków

Rysunek 1. Wykres przedstawiający sprzedaż środków ochrony roślin w Polsce.....	8
Rysunek 2. Porównanie struktury chemicznej żeńskiego hormonu płciowego 17 β -estradiolu (1) do cyprodinilu (2).	9
Rysunek 3. Chromatogram 17 fungicydów i 2 produktów przemian metabolicznych...	20
Rysunek 4. Chromatogram GC-MS/MS dla propiokonazolu (1) oraz chromatogram MRM dla propiokonazolu (2).	21
Rysunek 5. Schemat rozpadu kaptanu do THPI.	21
Rysunek 6. Chromatogram MRM dla THPI (1) oraz KAP (2).	22
Rysunek 7. Schematyczne przedstawienie etapów przygotowania próbek surowicy ludzkiej do analizy chromatograficznej.....	24
Rysunek 8. Odpowiedź sygnału detektora dla fungicydów ekstrahowanych za pomocą LLE.	27
Rysunek 9. Odpowiedź sygnału detektora dla fungicydów ekstrahowanych za pomocą SPE.	28
Rysunek 10. Odpowiedź sygnału detektora dla fungicydów ekstrahowanych za pomocą metody QuEChERS.	28
Rysunek 11. Procentowe spożycie warzyw w badanych grupach.....	39
Rysunek 12. Procentowe spożycie owoców w badanych grupach.....	39

10.2. Spis tabel

Tabela 1. Fungicydy i ich potencjalny wpływ na zdrowie człowieka.....	12
Tabela 2. Parametry pracy układu chromatograficznego.	19
Tabela 3. Informacje o parametrach pracy tandemowego spektrometru mas pracującego w trybie MRM.	20
Tabela 4. Parametry charakteryzujące metodę oznaczania 17 fungicydów i 2 produktów przemian metabolicznych (4OH-PYR i OH-TRBzol).....	30
Tabela 5. Parametry dla CV i odzysku dla zaproponowanej metody analitycznej.....	32
Tabela 6. Charakterystyka kliniczna badanych grup.....	36
Tabela 7. Porównanie wyników badań hormonalnych w badanych grupach.....	37
Tabela 8. Porównanie wyników laboratoryjnych wskaźników zaburzeń metabolicznych w badanych grupach.	37

Tabela 9. Wyniki oceny spożycia warzyw i owoców w badanych grupach.....	38
Tabela 10. Statystyki opisowe surowicznych stężeń badanych fungicydów wśród wszystkich badanych kobiet (n = 236).	40
Tabela 11. Wyniki oznaczeń surowicznych stężeń fungicydów w badanych grupach.	41
Tabela 12 Korelacje podwyższonych stężeń fungicydów z wybranymi parametrami klinicznymi w grupie kobiet z PCOS.	43
Tabela 13. Korelacje podwyższonych stężeń fungicydów ze stężeniami hormonów w grupie kobiet z PCOS.	44
Tabela 14. Korelacje podwyższonych stężeń fungicydów ze wskaźnikami zaburzeń metabolicznych w grupie kobiet z PCOS.	45
Tabela 15. Ocena potencjalnego związku pomiędzy podwyższonymi stężeniami badanych fungicydów w surowicy a rozpoznaniem PCOS.	46

11. LITERATURA

1. S. Rosa, P. Pesaresi, C. Mizzotti, V. Bulone, B. Mezzetti, E. Baraldi, S. Masiero, Game-changing alternatives to conventional fungicides: small RNAs and short peptides. *Trends in biotechnology* **40**, (2022), 320-337.
2. S. Rondeau, N. Raine, Fungicides and bees: a review of exposure and risk. *Environment international* **165**, (2022), 1-24.
3. X. Zhang, B. Li, Z. Zhang, Y. Chen, S. Tian, Antagonistic Yeasts: A Promising Alternative to Chemical Fungicides for Controlling Postharvest Decay of Fruit. *Journal of fungi* **6**, (2020), 1-15.
4. D. Hammoudi Halat, S. Younes, N. Mourad, M. Rahal, Allylamines, Benzylamines, and Fungal Cell Permeability: A Review of Mechanistic Effects and Usefulness against Fungal Pathogens. *Membranes* **12**, (2022), 1-19.
5. C.-W. Zhang, X.-J. Zhong, Y.-S. Zhao, M.S.R. Rajoka, M.H. Hashmi, P. Zhai, X. Song, Antifungal natural products and their derivatives: A review of their activity and mechanism of actions. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine* **7**, 100262 (2023), 1-37.
6. E.V. Baibakova, E.E.Nefedjeva, M. Suska-Malawska, M. Wilk, G.A. Sevriukova, V.F. Zheltobriukhov, Modern Fungicides: Mechanisms of Action, Fungal Resistance and Phytotoxic Effects. *Annual Research & Review in Biology* **32**, (2019), 1-16.
7. Hahn Matthias, The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. *Journal of Chemical Biology* **7**, 2014, 133-141.
8. GUS, *Rocznik Statystyczny Rolnictwa 2017*, (Warszawa 2017).
9. GUS, *Rocznik Statystyczny Rolnictwa 2022*, (Warszawa, 2022).
10. GUS, *Budżety gospodarstw domowych w 2021 roku*, (Warszawa 2021).
11. M. Tudi, H.D. Ruan, L. Wang, J. Lyu, R. Sadler, D. Connell, C. Chu, D.T. Phung, Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International journal of environmental research and public health* **18**, (2021), 1-23.
12. M. Tankiewicz, A. Berg, Improvement of the QuEChERS method coupled with GC-MS/MS for the determination of pesticide residues in fresh fruit and vegetables. *Microchemical Journal* **181**, (2022), 1-12.

13. G. Tamburini, M.-H. Pereira-Peixoto, J. Borth, S. Lotz, D. Wintermantel, M. Allan, R. Dean, J.M. Schwarz, A. Knauer, M. Albrecht, A.-M. Klein, Fungicide and insecticide exposure adversely impacts bumblebees and pollination services under semi-field conditions. *Environment international* **157**, (2021), 1-9.
14. Y. Combarrous, Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) and agriculture: The case of pesticides. *Comptes rendus biologiques* **340**, (2017), 406-409.
15. K.P. Friedman, S. Papineni, M.S. Marty, K.D. Yi, A.K. Goetz, R.J. Rasoulpour, P. Kwiatkowski, D.C. Wolf, A.M. Blacker, R.C. Peffer, A predictive data-driven framework for endocrine prioritization: a triazole fungicide case study. *Critical reviews in toxicology* **46**, (2016), 785-833.
16. R. Azziz, E. Carmina, Z. Chen, A. Dunaif, J.S.E. Laven, R.S. Legro, D. Lizneva, B. Natterson-Horowitz, H.J. Teede, B.O. Yildiz, Polycystic ovary syndrome. *Nature Reviews Disease Primers* **2**, (2016), 1-18.
17. R. Pasquali, L. Zanotti, F. Fanelli, M. Mezzullo, A. Fazzini, A.M.M. Labate, A. Repaci, D. Ribichini, A. Gambineri, Defining Hyperandrogenism in Women With Polycystic Ovary Syndrome: A Challenging Perspective. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **101**, (2016), 2013-2022.
18. M.C. Eiras, D.P. Pinheiro, K.A.M. Romcy, R.A. Ferriani, R.M.D. Reis, C.L.M. Furtado, Polycystic Ovary Syndrome: the Epigenetics Behind the Disease. *Reproductive sciences* **29**, (2022), 680-694.
19. D. Rachoń, H. Teede, Ovarian function and obesity--interrelationship, impact on women's reproductive lifespan and treatment options. *Molecular and cellular endocrinology* **316**, (2010), 172-179.
20. A. Gambineri, L. Patton, P. Alteri, U. Pagotto, C. Pizzi, L. Manzoli, R. Pasquali, Polycystic Ovary Syndrome Is a Risk Factor for Type 2 Diabetes: Results From a Long-Term Prospective Study. *Diabetes* **61**, (2012), 2369-2374.
21. R. Pasquali, A. Gambineri, Glucose intolerance states in women with the polycystic ovary syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation* **36**, (2013); 648-653.
22. G. Papadakis, E. Kandaraki, O. Papalou, A. Vryonidou, E. Diamanti-Kandarakis, Is cardiovascular risk in women with PCOS a real risk? Current insights. *Minerva endocrinologica* **42**, (2017), 340-355.

23. D. B. Barr, K. Thomas, B. Curwin, D. Landsittel, J. Raymer, C. Lu, K.C Donnelly, J. Acquavella., Biomonitoring of exposure in farmworker studies. *Environmental health perspectives* **114**, (2006), 936-942.
24. S. Faure, N. Noisel, K. Werry, S. Karthikeyan, L.L. Aylward, A. St-Amand, Evaluation of human biomonitoring data in a health risk based context: An updated analysis of population level data from the Canadian Health Measures Survey. *International journal of hygiene and environmental health* **223**, (2020), 267-280.
25. PPDB: Pesticide Properties DataBase, *University of Hertfordshire*, 2023. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>, dostęp w dniach: 10.05.2023 – 20.05.2023.
26. O.P. Luzardo, M. Almeida-Gonzalez, N. Ruiz-Suarez, M. Zumbado, L.A. Henriquez-Hernandez, M.J. Melian, M. Camacho, L.D. Boada, Validated analytical methodology for the simultaneous determination of a wide range of pesticides in human blood using GC-MS/MS and LC-ESI/MS/MS and its application in two poisoning cases. *Science & justice : journal of the Forensic Science Society* **55**, (2015), 307-315.
27. A. Srivastava, S. Rai, A.K. Sonker, K. Karauliya, C.P. Panday, S.P. Singh, Simultaneous determination of multiclass pesticide residues in human plasma using a mini QuEChERS method. *Analytical and bioanalytical chemistry* **409**, (2017), 3757-3765.
28. C. Chang, M. Chen, J. Gao, J. Luo, K. Wu, T. Dong, K. Zhou, X. He, W. Hu, W. Wu, C. Lu, B. Hang, J.D. Mekker, X. Wang, Y. Xia, Current pesticide profiles in blood serum of adults in Jiangsu Province of China and a comparison with other countries. *Environment international* **102**, (2017), 213-222.
29. European Food Safety Authority (EFSA), Modification of the existing maximum residue level for captan in hops. *EFSA Journal* **16**, (2018), 1-25.
30. W. Naksen, T. Prapamontol, A. Mangklabruks, S. Chantara, P. Thavornytikarn, M.G Robson, P.B. Ryan, D.B. Barr, P. Panuwet, A single method for detecting 11 organophosphate pesticides in human plasma and breastmilk using GC-FPD. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **1025**, (2016), 92-104.
31. M. Kang, S. Yook, J. Hwang, Is It What They Eat or How Much They Eat That Matters More in Adults with Food Insecurity in a Wealthy-Country Context? *Nutrients* **13**, (2021), 1-20.

32. M. Draskau, J. Boberg, C. Taxvig, M. Pedersen, H.L. Frandsen, S. Christiansen, T. Svingen, In vitro and in vivo endocrine disrupting effects of the azole fungicides triticonazole and flusilazole. *Environmental pollution* **255**, (2019), 1-11.
33. C. Juntarawijit, Y. Juntarawijit, Association between diabetes and pesticides: a case-control study among Thai farmers. *Environmental health and preventive medicine* **23**, (2018), 1-10.
34. M. Davis, E.L. Wade, P.R. Restrepo, W. Roman-Esteva, R. Bravo, P. Kuklennyik, A.M. Calafat, Semi-automated solid phase extraction method for the mass spectrometric quantification of 12 specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, and select herbicides in human urine. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **929**, (2013), 18-26.
35. R. Heredia-Ortiz, M. Bouchard, Toxicokinetic modeling of captan fungicide and its tetrahydrophthalimide biomarker of exposure in humans. *Toxicology letters* **213**, (2012), 27-34.
36. G. Kowalska, U. Pankiewicz, R. Kowalski, Assessment of Pesticide Content in Apples and Selected Citrus Fruits Subjected to Simple Culinary Processing. *Applied Sciences* **12**, (2022), 1-27.
37. Y. Wang, X. Ning, G. Li, N. Sang, New insights into potential estrogen agonistic activity of triazole fungicides and coupled metabolic disturbance. *Journal of hazardous materials* **424**, (2022).
38. N. Atmaca, S. Arıkan, D. Essis, H. Kalender, O. Simsek, F.S. Bilmen, R. Kabakci, Effects of mancozeb, metalaxyl and tebuconazole on steroid production by bovine luteal cells in vitro. *Environmental toxicology and pharmacology* **59**, (2018), 114-118.
39. S. Farr, G. Cooper, J. Cai, S. DA, D. Sandler, Pesticide use and menstrual cycle characteristics among premenopausal women in the Agricultural Health Study. *American journal of epidemiology* **160**, (2004), 1194-1204.
40. C. Piccoli, C. Cremonese, R. J. Koifman, S. Koifman, C. Freire, Pesticide exposure and thyroid function in an agricultural population in Brazil. *Environmental research* **151**, (2016), 389-398.

41. L. Yu, M. Chen, Y. Liu, W. Gui, G. Zhu, Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole. *Aquatic toxicology* **138-139**, (2013), 35-42.
42. W. Goldner, D. Sandler, F. Yu, J. Hoppin, F. Kamel, T. Levan, Pesticide use and thyroid disease among women in the Agricultural Health Study. *American journal of epidemiology* **171**, (2010), 455-464.
43. Y. Wei, L. Wang, J. Liu, The diabetogenic effects of pesticides: Evidence based on epidemiological and toxicological studies. *Environmental pollution* **331**, (2023).
44. S. Hoyt, W. Petrilli, C. London, G. Liang, J. Tata, Q. Hu *et al.*, Discovery of Triazole CYP11B2 Inhibitors with in Vivo Activity in Rhesus Monkeys. *ACS medicinal chemistry letters* **6**, (2015), 861-865.
45. P. Struciński *et al.*, Analiza potencjalnego zagrożenia zdrowia konsumentów wynikającego z obecności pozostałości pestycydów w żywności dostępnej na polskim rynku w roku 2017, (Ministerstwo Zdrowia: Warszawa, Poland, 2019).
46. P. Struciński *et al.*, Analiza potencjalnego zagrożenia zdrowia konsumentów wynikającego z obecności pozostałości pestycydów w żywności dostępnej na polskim rynku w roku 2019, (Ministerstwo Zdrowia: Warszawa, Poland, 2022).