

OCENA

Rozprawy doktorskiej mgr Anny Justyny Klimowskiej pt.: „Ocena ryzyka zdrowotnego dla wybranych substancji o potencjalnym wpływie na gospodarkę hormonalną, w oparciu o wyniki badań monitoringu biologicznego”

Praca została wykonana w Katedrze i Zakładzie Toksykologii, Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku pod kierunkiem promotora Pana dr hab. n. farm. Bartosza Wielgomasa

Substancje chemiczne zaburzające funkcjonowanie układu hormonalnego/dokrewnego (*ang. endocrine disrupter (ED)*) są od wielu lat traktowane jako zagrożenia priorytetowe w szeroko rozumianej ochronie zdrowia publicznego. Wynika to z wielu powodów, ale kluczowe wydają się dwa: 1) dotyczą niezamierzonego przewlekłego narażenia populacji generalnej, w tym małych dzieci, które stanowią grupę szczególnego ryzyka, 2) w przypadku narażenia zawodowego mają istotny udział także w etiologii innych chorób, np. nowotworowych czy neurodegeneracyjnych (co zostało dobrze udokumentowane). Wyniki badań epidemiologicznych sugerują, że długotrwałe narażenie na związki z grupy ED może prowadzić do obniżenia jakości nasienia mężczyzn, a także (prawdopodobnie) przyczynia się do wzrostu zaburzeń płodności u kobiet. W przypadku kobiet narażonych zawodowo na większość substancji zaburzających układ hormonalny stwierdza się zwykle wzrost częstości poronień spontanicznych, zmniejszenie odsetka noworodków płci męskiej. U mężczyzn notuje się wzrost częstości zaburzeń rozwojowych układu rozrodczego (wnętrostwo, spodziectwo). Wiodącą rolę zaburzeń równowagi hormonalnej powiązanych ze środowiskowym narażeniem na chemikalia z grupy ED upatruje się także w etiologii endometriozy, przedwczesnego dojrzewania płciowego, zaburzeń neurologicznych czy też nowotworów hormono-zależnych, np. piersi, błony śluzowej macicy, gonad męskich, gruczołu krokowego oraz raka tarczycy. Również w przypadku przewlekłego narażenia na bisfenol A, parabeny, triklosan czy (intensywnie badane w ostatnich latach) syntetyczne pyretroidy istnieje potencjalne zagrożenie, iż mogą zakłócać funkcjonowanie układu hormonalnego i są szczególnie niebezpieczne dla małych dzieci. Stąd zainteresowanie wiodących instytucji Unii Europejskiej oraz licznych organizacji międzynarodowych, takich jak m.in. OECD czy WHO w kierunku oceny bezpieczeństwa i ochrony zdrowia, szczególnie w przypadku narażenia na substancje należących do ED. Zaleca się więc powadzenie systematycznych badań służących ocenie ryzyka zdrowotnego, szczególnie populacji generalnej.

Jednym z podstawowych narzędzi szacowania ryzyka zdrowotnego, pozwalającego na ocenę przewlekłego narażenia populacji generalnej na związki chemiczne są badania monitoringu biologicznego. Tak więc badania przeprowadzone przez Panią mgr Annę Klimowską w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej bardzo aktualnie wpisują się w kierunek strategii oceny ryzyka zdrowotnego dla substancji obecnych w środowisku życia człowieka, które uważa się za potencjalnie niebezpieczne dla zdrowia, w tym funkcjonowania układu hormonalnego.

Praca doktorska mgr Anny Klimowskiej została przygotowana w formie maszynopisu liczącego 153 strony. Dysertacja ma typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem

na następujące rozdziały: część teoretyczna, cel pracy, część doświadczalna, obejmująca omówienie wyników, dyskusja oraz wnioski. Praca zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, wykaz publikacji, spis rysunków oraz tabel. Ostatni rozdział stanowi piśmiennictwo, które obejmuje 198 pozycji, w większości oryginalnych, aktualnych publikacji literaturowych, pochodzących w większości z ostatniego 10-lecia. Dodatkowo do pracy zostały załączone 2 załączniki. Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej zostały sfinansowane ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW), przyznanych na podstawie decyzji MNiSW oraz w ramach grantu dla młodych naukowców. Warto także nadmienić, że wyniki rozprawy doktorskiej zostały już częściowo przez Doktorantkę i współautorów opublikowane w dwóch renomowanych czasopismach z listy JCR, tj. *Talanta* (Impact Factor 5-letni: 4,711) oraz *Environment International* (Impact Factor 5-letni: 8,925). W obu publikacjach Doktorantka jest pierwszym Autorem, co potwierdza Jej wiodący udział w ich powstaniu.

Zasadniczym celem ocenianej pracy było przeprowadzenie oceny ryzyka zdrowotnego dla bisfenolu A, oksybenzonu, triklosanu, wybranych syntetycznych pyretroidów oraz parabenów na podstawie pomiarów stężeń biomarkerów ekspozycji oznaczonych w dobowych próbkach moczu zbieranych w ciągu 12 miesięcy od 14 ochotników. Na przeprowadzenie badań z udziałem ludzi Doktorantka uzyskała pozytywną opinię Niezależnej Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (**Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.**). Zrekrutowana do badań grupa ochotników (mieszkańcy Gdańska) chociaż była nieliczna, to pod względem zróżnicowania wieku i płci, była dobrana prawidłowo. Taka niejednorodna grupa dobrze odzwierciedla przekrój badanej populacji. W przypadku oceny narażenia środowiskowego, kiedy nie powinny występować istotne różnice w wielkości narażenia dla poszczególnych przedstawicieli badanej populacji, zawsze pojawia się trudność związana z brakiem grupy odniesienia. Łącznie analizom chemicznym poddano 295 dobowych prób moczu zbieranych od ochotników w cyklu miesięcznym przez okres 12 miesięcy. Tak duża liczba zebranych próbek moczu była konieczna, ponieważ w przypadku związków relatywnie nietrwałych, stężenia ich metabolitów w moczu mogą cechować się dużą zmiennością w czasie, co wynika najczęściej z epizodycznego charakteru narażenia. Wybrane dla każdego związku biomarkery ekspozycji oznaczone w moczu, zostały następnie wykorzystane przez Doktorantkę do oceny ryzyka zdrowotnego.

Podjęcie tematu badawczego w pracy doktorskiej Pani mgr Anny Klimowskiej uważam nie tylko jako ambitne wyzwanie pod względem analitycznym, ale także ważne z punktu widzenia ochrony zdrowia populacji generalnej. Ocena ekspozycji na podstawie wyznaczonych w pracy doktorskiej biomarkerów ekspozycji ma także wartość aplikacyjną, ponieważ może zostać praktycznie wykorzystana do oceny ryzyka zdrowotnego.

Aby zrealizować zasadniczy cel badawczy Doktorantka musiała wykazać się nie tylko biegłą znajomością szlaków biotransformacji oraz toksykokinetyki dla poszczególnych grup związków, ale także musiała opanować i opracować czułe metody analityczne, które mogłyby być użyteczne do oceny narażenia środowiskowego. Z tego zadania, korzystając z wiedzy i doświadczenia swojego promotora - prof. B. Wielgomasa, wywiązała się znakomicie. Przed wykonaniem oznaczeń stężeń badanych związków w moczu Doktorantka musiała wybrać najbardziej optymalną metodę ich izolacji, zateżenia oraz sposobu oczyszczenia próbki z matrycy. W przypadku metabolitów syntetycznych



pyretroidów Doktorantka wybrała technikę mikroekstrakcji do sorbentu upakowanego w strzykawce w sprzężeniu z chromatografem gazowym ze spektrometrem mas, pracującym w trybie dozowania wielkoobjętościowego (MEPS-LVI-GC-MS). Natomiast w przypadku związków o strukturze fenoli zastosowała technikę ekstrakcji typu ciecz-ciecz w połączeniu z chromatografią gazową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (LLE-GC-MS/MS). Zoptymalizowane metody Autorka poddała procesowi walidacji. Parametry walidacyjne opracowanych przez Nią metod potwierdziły ich zadawalającą użyteczność do przeprowadzenia analiz w zakresie bardzo niskich stężeń. O wysokiej jakości opracowanych metod świadczą także wyniki międzylaboratoryjnej kontroli jakości przeprowadzone w ramach udziału w dwóch programach: G-EQUAS oraz *Human Biomonitoring for Europe External Quality Assurance Scheme*.

W części teoretycznej pracy Doktorantka bardzo syntetycznie omówiła zagadnienia dotyczące oceny ryzyka zdrowotnego, w tym problematykę związaną z identyfikacją zagrożenia, oceną ilościową i jakościową zależności dawka-odpowiedź. Do najważniejszych zagadnień części teoretycznej należy uznać rozdział poświęcony biomonitoringowi. Jest w nim wszystko to, co powinno z jednej strony naświetlać rangę tego bardzo trudnego zagadnienia, a z drugiej stanowi satysfakcjonujące uzasadnienie podjętego przez Doktorantkę celu badawczego. Część teoretyczną kończy zwięzła charakterystyka toksykologiczna wszystkich wybranych do badań grup związków z ukierunkowaniem na informacje dotyczące ich szkodliwego wpływu na gospodarkę hormonalną.

W części doświadczalnej rozprawy Autorka bardzo dokładnie i skrupulatnie opisała sposób opracowania i optymalizacji wszystkich zastosowanych w pracy procedur analitycznych, co należy ocenić bardzo wysoko. Na szczególne podkreślenie zasługuje opracowanie metody oznaczania metabolitów syntetycznych pyretroidów w moczu (BIF, *cis/trans*-DCCA, *cis*-DBCA oraz 3PBA), która wpisuje się w założenia tzw. „zielonej chemii”. Zastosowana technika mikroekstrakcji pozwoliła Autorce na istotne zmniejszenie zarówno objętości próbki poddawanej analizie, jak i ilości używanych rozpuszczalników organicznych. Uzyskane z poszczególnych etapów pracy wyniki Autorka poddała wnikliwej analizie statystycznej i przedstawiła w formie graficznej w postaci przejrzystych 44 rysunków oraz 28 tabel. Jednym z głównych problemów w trakcie analizy, a następnie podczas końcowej interpretacji danych, z którym musiała zmierzyć się Autorka był udział prób, w których stężenia analizowanych substancji mieściły się w zakresie wartości poniżej granicy wykrywalności lub oznaczalności metody analitycznej.

Ocenę narażenia dla każdego z 14 uczestników badań Doktorantka przeprowadziła w oparciu o stężenia dziewięciu biomarkerów, które wykryła w co najmniej 50% analizowanych próbek moczu. Aby zrealizować główny cel pracy Doktorantka dla badanych substancji obliczyła dzienne pobranie, które porównywała z wartościami referencyjnymi (akceptowanym dziennym pobraniem (ADI) lub tolerowanym dziennym pobraniem (TDI)). Stężenia oznaczonych w pracy biomarkerów zostały także porównane z wartościami równoważników biomonitoringu (BE), wyznaczonymi w oparciu o wartości NOAEL, a także z wyznaczonymi wartościami ilorazów zagrożenia (HQ). Taki tok postępowania był bardzo racjonalny, gdyż zaletą równoważników biomonitoringu, które obliczono na podstawie wartości bezpiecznych dla zdrowia dawek, jest możliwość bezpośredniego ich odniesienia do zmierzonego stężenia biomarkera. Na uznanie zasługuje także fakt, że Autorka uzyskane wyniki z dużą swobodą potrafiła konfrontować z danymi pochodzącymi z piśmiennictwa światowego

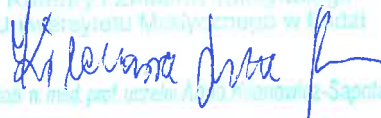


(rozdział „Dyskusja”), nie tracąc przy tym krytycyzmu, co świadczy nie tylko o Jej dojrzałości naukowej, ale także potwierdza przygotowanie do dalszej pracy naukowej. Pracę doktorską kończy rozdział „Wnioski”, w którym Doktorantka zaproponowała 6 wniosków. Za najważniejsze w mojej opinii należy uznać te, w których Autorka postuluje, że parametry walidacyjne opracowanych przez Nią metod potwierdzają ich przydatność do oznaczania metabolitów syntetycznych pyretroidów i związków o strukturze fenoli w moczu nawet w bardzo niskich stężeniach oraz; analiza dobowych próbek moczu, zebranych od ochotników w okresie 12 kolejnych miesięcy, co wskazuje na przewlekłe narażenie środowiskowe na syntetyczne pyretroidy i 6 fenoli. Autorka udokumentowała, że narażenie na paraben propylowy może wiązać się z wystąpieniem szkodliwego działania na zdrowie ludzi, dlatego bezpieczeństwo jego stosowania powinno zostać poddane szczegółowej ocenie (HQ>1). Natomiast z formalnego punktu widzenia trudno uznać za wnioski sformułowania o charakterze bardzo ogólnym, tj. wniosek nr 3: „Kontakt z papierem termicznym może przyczyniać się do zwiększonej ekspozycji na bisfenol A”(jest to znany i opisany w literaturze fakt) oraz wniosek nr 5 „Monitoring biologiczny z powodzeniem może być wykorzystywany do oceny ryzyka zdrowotnego dla substancji chemicznych”.

Powyższe uwagi nie wpływają na moją bardzo pozytywną ocenę pracy doktorskiej. Przeprowadzone przez Autorkę badania w pełni ukazują, jak skomplikowanym procesem jest prawidłowo wykonana ocena ryzyka zdrowotnego. Z pełnym przekonaniem mogę stwierdzić, że Doktorantka w pełni zrealizowała wszystkie zaplanowane przez siebie cele badawcze.

Podsumowując, praca doktorska **mgr Anny Justyny Klimowskiej pt.: „Ocena ryzyka zdrowotnego dla wybranych substancji o potencjalnym wpływie na gospodarkę hormonalną, w oparciu o wyniki badań monitoringu biologicznego”** stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jak również wnosi istotne aspekty nowości w ramach rozwoju reprezentowanej dyscypliny naukowej. Recenzowana praca w pełni spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim wynikające z art. 16 ust. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.), dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych o dopuszczenie mgr Anny Justyny Klimowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie - ze względu na wysoki poziom merytoryczny pracy, szeroki zakres wykonanych badań, których wyniki zostały opublikowane jako dwie prace oryginalne w bardzo dobrych, renomowanych czasopismach z listy JCR o sumarycznym IF 5-letnim równym 13,636 (co oznacza, że przeszły skrupulatny proces recenzji i uzyskały uznanie ekspertów międzynarodowych) - wnoszę do Wysokiej Rady wniosek formalny o wyróżnienie pracy.

KILANOWICZ
Katedra i Zakład Toksykologii
Uniwersytet Medyczny w Łodzi


Pieczątka jednostki organizacyjnej recenzenta

Anna Kilanowicz - Sapota

Imię i nazwisko recenzenta

dr hab. n. med. prof. Uczelni

Tytuł/stopień naukowy/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko doktoranta: **mgr Anna Justyna Klimowska**

Tytuł pracy doktorskiej:

„Ocena ryzyka zdrowotnego dla wybranych substancji o potencjalnym wpływie na gospodarkę hormonalną, w oparciu o wyniki badań monitoringu biologicznego.”

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Niniejszy zwracam się z wnioskiem do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie:

Jednym z podstawowych narzędzi szacowania ryzyka zdrowotnego, pozwalającego na ocenę przewlekłego narażenia populacji generalnej na związki chemiczne są badania monitoringu biologicznego. Badania przeprowadzone przez Panią mgr Annę Klimowską w ramach przedstawionej rozprawy doktorskiej bardzo aktualnie wpisują się w kierunek strategii oceny ryzyka zdrowotnego dla substancji obecnych w środowisku życia człowieka, które uważa się za potencjalnie niebezpieczne dla zdrowia, w tym funkcjonowania układu hormonalnego.

Wyniki rozprawy doktorskiej zostały już częściowo przez Doktorantkę i współautorów opublikowane w dwóch renomowanych czasopismach z listy JCR, tj. *Talanta* (Impact Factor 5-letni: 4,711) oraz *Environment International* (Impact Factor 5-letni: 8,925). W obu publikacjach Doktorantka jest pierwszym Autorem, co potwierdza Jej wiodący udział w ich powstaniu.

Praca doktorska **mgr Anny Justyny Klimowskiej pt.: „Ocena ryzyka zdrowotnego dla wybranych substancji o potencjalnym wpływie na gospodarkę hormonalną, w oparciu o wyniki badań monitoringu biologicznego”** stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jak również wnosi istotne aspekty nowości w ramach rozwoju reprezentowanej dyscypliny naukowej.

Ze względu na wysoki poziom merytoryczny pracy, szeroki zakres wykonanych badań, których wyniki zostały opublikowane jako dwie prace oryginalne w bardzo dobrych, renomowanych czasopismach z listy JCR o sumarycznym IF 5-letnim równym 13,636 (co oznacza, że przeszły skrupulatny proces recenzji i uzyskały uznanie ekspertów międzynarodowych) - wnoszę do Wysokiej Rady wniosek formalny o wyróżnienie pracy.

2

porozumieniem

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Toksykologii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Anna Kilanowicz - Sapota
dr hab. n. med. prof. uczelni