



Prof. dr hab. n. farm. Grzegorz Nałęcz-Jawecki
Zakład Badania Środowiska
Warszawski Uniwersytet Medyczny

OCENA

Pracy 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”**

Substancje o potencjalnym wpływie na gospodarkę hormonalną (endocrine disrupting compounds - EDC) stanowią szeroką grupę zanieczyszczeń środowiska, której intensywne badania naukowe rozpoczęły się pod koniec XX wieku. Światowa Organizacja Zdrowia w 2002, a następnie 2012 roku przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat EDC, wskazując, iż ta grupa substancji stanowi jedno z najważniejszych wyzwań stojących przed ekotoksykologami i toksykologami środowiskowymi (State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals, WHO, 2012). Badania naukowe prowadzone są w dwóch kierunkach: analizie występowania i losów tych substancji w różnych elementach środowiska, w tym w produktach codziennego użytku i w żywności oraz analizie ich oddziaływania na organizmy żywe. Najlepiej przebadanymi podgrupami EDC są związki stanowiące trwałe zanieczyszczenia środowiskowe m.in. pestycydy chloroorganiczne, polichlorowane bifenyle, dibenzo-p-dioksyny, tributyllocyna i uniepalniacze (flame retardants). Określenie narażenia na trwałe zanieczyszczenia jest możliwe poprzez jednorazowy pomiar z uwagi na wysoką trwałość tych związków i ich kumulowanie się w organizmach. Znacznie rzadziej analizowane są substancje o krótkim biologicznym okresie półtrwania, szybko metabolizowane i/lub wydalane z organizmów. **Tę grupę substancji postanowiła przebadać w swojej pracy Pani Magister Anna Klimowska.** Badania wykonała w Katedrze i Zakładzie Toksykologii, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem dr hab. n. farm. Bartosza Wielgomasa.

Przedstawiona do oceny rozprawa stanowi klasycznie napisaną dysertację liczącą 152 strony, podzieloną na część teoretyczną, cel, część doświadczalną, dyskusję oraz wnioski. Na podkreślenie zasługuje obszerna bibliografia obejmująca 198 pozycji, w większości oryginalnych, aktualnych publikacji naukowych.

Celem ocenianej rozprawy doktorskiej była ocena ryzyka zdrowotnego wynikającego z narażenia 14 osób na bisfenol A, oksybenzon, triklosan, syntetyczne pyretroidy oraz parabeny przez okres 12 miesięcy.

Na początku części teoretycznej pracy Doktorantka ukazała zasady oceny ryzyka zdrowotnego. Przedstawiła podstawowe definicje miar stosowanych przy identyfikacji zagrożeń (ADI, TDI, NOAEL, LOAEL oraz UF). Opisując metody oceny ekspozycji szczególny nacisk położyła na monitoring biologiczny, który umożliwia oszacowanie całkowitej ekspozycji, niezależnie od drogi narażenia na substancję czynną. Zwróciła uwagę na właściwy dobór materiału biologicznego oraz biomarkera ekspozycji na podstawie znajomości szlaków biotransformacji i toksykokinetyki badanej substancji. Nieprawidłowo wybrany, na etapie planowania projektu, materiał może doprowadzić do uzyskania błędnych wniosków. Jako przykład Doktorantka wskazała prace, w których stężenia szybko metabolizowanych substancji w moczu różniły się o dwa rzędy wielkości. Stąd Autorka wysnuła wniosek (i zastosowała się do niego w części doświadczalnej), że najlepszym materiałem w biomonitoringu substancji o krótkim okresie półtrwania w organizmie człowieka jest dobowy zbiórka moczu. **Istotnym parametrem, na który zwróciła także uwagę jest właściwy dobór oznaczanego biomarkera** tj. substancji macierzystej vs metabolitów I fazy vs metabolitów II fazy biotransformacji. Podczas oceny grupy substancji istotny jest wybór metabolitu specyficznego dla konkretnego związku lub metabolitu będącego wspólnym produktem przemian całej grupy związków. W swoim projekcie badawczym Pani Anna Klimowska, w biomonitoringu syntetycznych pyretroidów, postanowiła ocenić poziom zarówno metabolitu wspólnego dla 9 pochodnych (kwasu 3-fenoksybenzoesowego), jak i czterech metabolitów specyficznych. Natomiast w przypadku fenoli zdecydowała się na analizę związków macierzystych, wolnych i związanych z kwasem siarkowym i glukuronowym. Świadczy to o jej umiejętności wyciągania prawidłowych wniosków z piśmiennictwa. Celem analiz chemicznych prowadzonych w czasie biomonitoringu jest ocena ekspozycji. Autorka pracy omówiła zasady procesu szacowania dziennego pobrania, a także pojęcie równoważnika biomonitoringu, który umożliwia powiązanie wyników badań monitoringu biologicznego z potencjalnym ryzykiem zdrowotnym badanej populacji.

Doktorantka przedstawiła grupę związków o potencjalnym wpływie na gospodarkę hormonalną, zwracając uwagę na szybki przyrost liczby związków klasyfikowanych jako ED oraz podejrzewanych o taki wpływ. W tym kontekście należy zadać pytanie, dlaczego jako najnowsze dane o liczbie EDC zacytowała dokument UE z 2007 roku (strona 33)? Pani Magister omówiła szczegółowo związki, które następnie badała w części doświadczalnej pracy: bisfenol A, parabeny, syntetyczne pyretroidy, triklosan oraz benzofenon. Wskazała na źródła narażenia, opisała

farmakokinetykę, wpływ na układ hormonalny, a także regulacje międzynarodowe (jeśli istnieją) odnośnie dopuszczalnych zawartości w produktach oraz wartości dopuszczalnego (tolerowanego) dziennego pobrania.

Część doświadczalna pracy została podzielona na dwa główne etapy: opracowanie metod oznaczania substancji w próbkach moczu oraz badanie próbek uzyskanych od grupy 14 osób zakończone analizą ryzyka. Metabolity syntetycznych pyretroidów Doktorantka oznaczała przy użyciu nowej metody, opracowanej i zwalidowanej w czasie realizacji doktoratu. Jako referencyjną zastosowała metodę opartą na ekstrakcji LLE poprzedzoną kwaśną hydrolizą, opracowaną i stosowaną od wielu lat w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. W nowej metodzie Autorka zhydrolizowała metabolity II fazy przy użyciu β -glukuronidazy (z aktywnością sulfatazy). Anality ekstrahowała stosując mikroekstrakcję do upakowanego sorbentu (MEPS). Każdy etap analizy optymalizowała wybierając: odpowiednie pH buforu, rodzaj złoża sorbentu, rozpuszczalnik do przemycia złoża i elucji analitów, szybkość elucji oraz liczbę cykli ekstrakcyjnych. Krótki opis opracowywania metody nie oddaje w pełni ogromu mrowczej pracy, która niewątpliwie została wykonana w celu dopracowania każdego szczegółu procedury. Artykuł, którego pierwszą autorką była Doktorantka, opisujący nową metodę został opublikowany w wysokopunktowanym czasopiśmie (Talanta, IF₂₀₂₀=5,339; 100 pkt MNiSW) w 2018 roku i do końca 2020 roku był cytowany 13 razy (wg bazy Scopus, bez autocytowań). **Zaletą nowej metody ekstrakcji jest niższe zużycie rozpuszczalników organicznych niż w metodzie referencyjnej (\rightarrow zielona chemia), możliwość wielokrotnego używania mikrosorbentów, a także mniejsza ilość próbki badanej niezbędnej do oznaczeń.** Pomimo zmniejszenia skali uzyskano dobre parametry walidacyjne. Opracowaną metodę zweryfikowano poprzez analizę próbek referencyjnych dostarczonych w ramach programu międzylaboratoryjnej kontroli jakości G-EQUAS. Dodatkowo, przebadano 21 próbek rzeczywistych uprzednio analizowanych z wykorzystaniem metody referencyjnej. Analiza uzyskanych wyników wykazała niższe poziomy kwasu p-fenoksybenzoesowego w próbkach, w których zastosowano hydrolizę enzymatyczną, zamiast hydrolizy kwaśnej. Doktorantka zwróciła uwagę na konieczność uwzględnienia tego faktu przy analizie próbek moczu. Niestety, nie zasugerowała rozwiązania możliwego do zastosowania w praktycznym biomonitoringu.

W drugiej metodzie analitycznej Pani Magister postanowiła zbadać grupę substancji obejmującą związki fenolowe: oksybenzon, triklosan oraz estry kwasu p-hydroksybenzoesowego (parabeny). Zastosowała chromatografię gazową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas. W pierwszym etapie zoptymalizowała warunki analizy instrumentalnej stosując anality oraz wzorce wewnętrzne rozpuszczone w wodzie oraz w matrycy (moczu). Następnie zoptymalizowała proces

hydrolizy metabolitów II fazy porównując hydrolizę enzymatyczną z dwoma wariantami hydrolizy kwaśnej. Kolejnym etapem była optymalizacja procesu oczyszczania ekstraktu. Najlepszym wariantem okazała się dyspersyjna ekstrakcja do fazy stałej z wykorzystaniem PSA jako adsorbenta. W ostatnim etapie opracowywania metody zoptymalizowano proces derywatywacji sprawdzając różne warianty temperatury oraz czasu inkubacji. Opracowaną metodę oznaczania fenoli Doktorantka poprawnie zwalidowała otrzymując wartości LOD od 0,2 do 1,0 ng/ml i dobre parametry walidacji dla wszystkich oznaczanych fenoli. Podobnie jak w przypadku oznaczania metabolitów syntetycznych pyretroidów, metodę zweryfikowano poprzez analizę próbek materiału referencyjnego, w ramach międzylaboratoryjnej kontroli jakości G-EQUAS. **Zewnętrzna weryfikacja metod analitycznych stosowanych w badaniach daje gwarancję uzyskania wiarygodnych wyników biomonitoringowych, a jednocześnie dobrze świadczy o rzetelności pracy Doktorantki.**

Ocenę ryzyka zdrowotnego wynikającego z ekspozycji na opisywane wcześniej zanieczyszczenia środowiskowe Doktorantka wykonała na grupie 14 osób. Na prowadzenie badań uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej ds. Badań Naukowych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Grupa badana była bardzo niejednorodna. Z jednej strony umożliwiło to dokonanie przeglądu narażenia wśród osób różniących się wiekiem i statusem zawodowym. Z drugiej strony utrudniło wykonanie wewnątrzgrupowych analiz statystycznych. Materiał do badań stanowiły dobowe zbiórki moczu, uzyskiwane 1-2 razy w miesiącu. Analizę materiału badawczego przeprowadzono w dwóch seriach, wykorzystując dwie, opisane wcześniej metody analityczne. W związku z tym pojawia się pytanie, czy wykonano ocenę trwałości analitów w moczu w czasie wielomiesięcznego przechowywania w temp. -20°C ? Na uwagę zasługuje fakt analizowania 42 próbek dziennie (plus odpowiednie próbki kontrolne), co, w przypadku próbek wymagających derywatywacji jest dobrym wynikiem. Uzyskane wyniki wyrażono w jednostkach stężenia (ng/ml) oraz jako wielkość dobowego wydalania ($\mu\text{g}/24\text{h}$). **Do przeprowadzenia oceny ryzyka zdrowotnego Doktorantka wykorzystwała dwa podejścia: porównała stężenia biomarkerów z wartościami równoważników monitoringu oraz porównała dzienne pobranie z dawkami referencyjnymi.** Wykonanie takich obliczeń sugerowałoby możliwość syntetycznego porównania obu metod, czego niestety w rozprawie zabrakło. W przypadku jednej osoby objętość dobowa moczu była bardzo niska, a w przypadku dwóch osób – znacznie wyższa od średniej (Tabela 12). Czy miało to wpływ na uzyskane wyniki?

Spośród oznaczanych 14 biomarkerów ekspozycji w analizowanych próbkach wykryto od 7 do 9 związków, przy czym 9 biomarkerów wykryto w co najmniej 50% próbek. Dla każdego związku oprócz wyników oznaczeń Doktorantka przeprowadziła ocenę ryzyka zdrowotnego.

W przypadku syntetycznych pyretroidów ocena ta dotyczyła 3 substancji: permetryny, cypermetryny oraz deltametryny. Dla deltametryny obliczenia wykonane zostały na podstawie stężeń specyficznego metabolitu (*cis*-DBCA). Natomiast, z uwagi na zbliżony przebieg biotransformacji permetryny oraz cypermetryny, skutkujący powstawaniem wspólnych metabolitów (3PBA oraz *cis/trans*-DCCA), ryzyko zdrowotne oszacowano wspólnie dla obu pyretroidów. Jednakże, przedstawienie tego ryzyka na oddzielnych dwóch wykresach (Ryc. 35) jest błędem i sugeruje istnienie narażenia na każdy związek osobno. Oksybenzon wykryto i oznaczono we wszystkich analizowanych próbkach. Wynik ten wskazuje na narażenie badanej populacji na tą substancję przez cały rok, a nie, tak jak można się było spodziewać w przypadku substancji promieniochronnych, tylko w okresie letnim. Jakie produkty codziennego użytku stosowane przez tak zróżnicowaną badaną populację mogą być źródłem oksybenzonu? **Istotnym osiągnięciem Doktorantki było wykazanie najwyższego ryzyka zdrowotnego w dla parabenu propylowego.** Jak wspomniano we wstępie, związek ten nie może być już stosowany jako dodatek do żywności, lecz nadal jest wykorzystywany jako środek konserwujący w lekach. Zgodnie z wynikami prezentowanymi w pracy aż w 15 próbkach moczu obliczone jego dzienne pobranie przewyższyło wartość ADI. **Ważną obserwacją, z której powinien rozwinąć się następny projekt badawczy, jest zwiększone narażenie na bisfenol A u osób mających kontakt z papierem termicznym.**

Wyniki zaprezentowane w rozprawie doktorskiej poszerzają naszą wiedzę na temat długotrwałego narażenia ludzi na wykorzystywane w codziennym życiu nietrwałe ksenobiotyki środowiskowe. Rozprawa, jak każda dobra praca naukowa, rodzi nowe pytania badawcze np. czy w przypadku substancji mających podobne działanie na organizmy, np. wpływających na układ hormonalny, powinno się analizować ten wpływ osobno dla każdej substancji (na podstawie biomarkerów narażenia), czy może powinien być analizowany wspólny (jeśli istnieje) biomarker efektu?

Patrząc całościowo na przedstawioną do oceny rozprawę należy uznać, że Doktorantka w logiczny sposób zaplanowała analizy oraz starannie je wykonała. Wyniki omówiła i przedyskutowała korzystając z najnowszego, światowego piśmiennictwa. Wysoki poziom prezentowanych badań potwierdza fakt opublikowania części wyników dotyczących biomonitoringu syntetycznych pyretroidów w artykule w *Environment International* (IF=7,577; 140 pkt. MNiSW), którego Pani Anna Klimowska jest pierwszą autorką. Nie ustrzegła się jednak przed popełnieniem kilku błędów np. zamiast „Rysunek” – powinna stosować słowo „Rycina”, które jest określeniem szerszym, obejmującym zarówno ręcznie narysowane rysunki, jak i komputerowo wygenerowane chromatogramy i wykresy.

Powyższe uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy doktorskiej. Zaproponowane podejście do kompleksowej analizy 14 biomarkerów jest ważnym wkładem do toksykologii środowiskowej.

Podsumowując, wyrażam przekonanie, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr Anny Justyny Klimowskiej pt.: „Ocena ryzyka zdrowotnego dla wybranych substancji o potencjalnym wpływie na gospodarkę hormonalną, w oparciu o wyniki badań monitoringu biologicznego” spełnia wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora zgodnie z artykułem 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku .

Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Anny Klimowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na opublikowanie części wyników rozprawy w bardzo dobrych czasopiśmie naukowych (Talanta oraz Environment International), składam wniosek o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Warszawa, 14.01.2021 r.

KIEROWNIK
Zakład Badania Środowiska
Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. Grzegorz Nareńcz-Jawecki

Pieczętka jednostki organizacyjnej recenzenta

Grzegorz Nałęcz-Jawecki
Imię i nazwisko recenzenta

Profesor, Kierownik Zakładu
Tytuł/stopień naukowy/stanowisko recenzenta

Imię i nazwisko doktoranta: **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:

Wyniki badań, będących przedmiotem rozprawy zostały opublikowane w dwóch, wysoko ocenianych czasopismach naukowych: Talanta (IF₂₀₂₀=5,339; 100 pkt MNiSW) oraz Environment International (IF=7,577; 140 pkt. MNiSW). W obu pracach Doktorantka jest pierwszą autorką, co wskazuje na jej wiodący udział w napisaniu publikacji.

KIEROWNIK
Zakład Badań Środowiska
Wydział Farmaceutyczny

Prof. dr hab. Grzegorz Nałęcz-Jawecki