



MEDICAL
UNIVERSITY
OF WARSAW

DEPARTMENT OF DRUG CHEMISTRY,
PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS

Warszawa, 25.10.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Waclawik

pt:” The use of complementary methods for exposure measurement as a part of the health risk assessment due to anti-ectoparasite veterinary drug application on household pets”

w tłumaczeniu „Wykorzystanie komplementarnych metod szacowania ekspozycji do oceny ryzyka zdrowotnego wynikającego ze stosowania przeciwpasożytniczych leków weterynaryjnych u zwierząt domowych”

Podstawą formalną przygotowania recenzji jest uchwała Nr 74/2023 Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego z 17.10.2023 r w której zostałam powołana jako recenzent w komisji powołanej do przeprowadzenia postępowania o nadanie stopnia doktora mgr Małgorzacie Waclawik, doktorantce Katedry i Zakładu Toksykologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Mgr Waclawik złożyła rozprawę doktorską pt. *The use of complementary methods for exposure measurement as a part of the health risk assessment due to anti-ectoparasite veterinary drug application on household pets*. Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem promotora, dr hab. Bartosza Wielgomasa, profesora Uczelni.

Przedstawiona rozprawa doktorska ma charakter pracy pisemnej. Została przygotowana w oparciu o cykl spójnych tematycznie czterech manuskryptów, trzech oryginalnych i jednej pracy przeglądowej, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Zgodnie z załączonymi oświadczeniami, wkład doktorantki w powstanie niniejszych prac wynosił od 40% do 65%. Tylko jedna z tych prac została opublikowana lub przyjęta do druku. Artykuł przeglądowy opublikowany został w czasopiśmie bez współczynnika wpływu o punktacji 140 MEiN (w momencie złożenia – w 2021 roku – pismo indeksowane było w bazie JRC i posiadało współczynnik wpływu 4,614). Pozostałe prace oryginalne, zgodnie z deklaracją Doktorantki, zostały wysłane do redakcji czasopism z bazy JCR, a do rozprawy załączone zostały ich ostateczne wersje. Dodatkowo Autorka przedstawiła

wykaz doniesień zjazdowych, z którego wynika, że prezentowała wyniki swoich badań na renomowanych konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa jest 181 stronicowym wydrukiem, który składa się z podsumowania osiągnięcia (strony 6 – 25 rozprawy) zawierającego: a) wstęp, b) cele naukowe pracy oraz wybrane elementy zastosowanych metod badawczych c) wyniki d) wnioski. Zawiera także streszczenie w języku angielskim i polskim, listę skrótów oraz spis piśmiennictwa. Wydrukowi towarzyszą kopie manuskryptów, oświadczenia współautorów o udziale i roli Doktorantki w powstawaniu tychże manuskryptów, a także informacje o dokonaniach zawodowych mgr Małgorzaty Waclawik.

Ocena rozprawy

Szkodliwy wpływ pestycydów na zdrowie człowieka został udokumentowany w licznych doniesieniach literaturowych. Oprócz toksyczności ostrej, której skutki są szeroko zbadane, związki te mogą wywoływać niekorzystne efekty związane z narażeniem przewlekłym. Istnieje wiele przesłanek o wpływie pestycydów na gospodarkę hormonalną człowieka, rozwój otyłości i bezpłodności, etiopatogenezę zespołu policystycznych jajników lub powstawanie wad rozwojowych. Udowodniono również ich wpływ na transformację komórek i nowotworzenie, poprzez zmiany metylacji DNA, które występują m.in. w chłoniaku nieziarniczym oraz wpływają na rozwój chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona i choroba Alzheimerera. Pestycydy można podzielić według klas toksyczności oraz ze względu na działanie. Przedmiot niniejszej pracy stanowią insektycydy, a dokładnie syntetyczne pyretroidy.

Pyretroidy są stosowane jako insektycydy i środki biobójcze, ale także w leczeniu, jako środki przeznaczone do zwalczania wszawicy i świerzbu u ludzi oraz ektopasożytów u zwierząt. Używa się ich także do zapobiegania chorobom przenoszonym m.in. przez kleszcze. Dane statystyczne pokazują, że stosowanie tego typu produktów jest coraz powszechniejsze. Obecnie ocenę narażenia na pyretroidy przeprowadza się za pomocą monitoringu biologicznego, poprzez ilościowe oznaczanie stężenia metabolitów pyretroidów w moczu. Niemniej obecność konkretnych metabolitów nie daje odpowiedzi z którymi pyretroidami badana osoba miała kontakt. Utrudnia to znacznie identyfikację źródła narażenia, oraz – jeżeli w przyszłości uzna się to za stosowne – jego eliminację. Dodatkowo badanie moczu nie daje też jednoznacznej informacji o skali narażenia. Stężenia metabolitów w tym materiale biologicznym charakteryzują się bowiem znaczną zmiennością ze względu na szybki metabolizm tych insektycydów. Należałoby zatem zaproponować nową metodę pomiaru ekspozycji do oceny narażenia społeczeństwa na syntetyczne pyretroidy. Podejście takie, w aspekcie długofalowym, pozwoli na ocenę konsekwencji przewlekłej ekspozycji populacji na konkretne związki należące do tej grupy insektycydów. Stanowić też będzie wstęp do badań wyjaśniających mechanizmy patogenezы wykrytych w badanej grupie chorób. W swojej rozprawie doktorskiej mgr Małgorzata Waclawik proponuje, aby do pomiaru ekspozycji na syntetyczne pyretroidy stosować opaski silikonowe, jako nieinwazyjne, pasywne próbники. We wszystkich

przedłożonych publikacjach zgłębia to zagadnienie i wskazuje dalsze kierunki badań. Uważam, że temat podjęty przez Doktorantkę jest niezwykle ważny, w kontekście ochrony zdrowia społeczeństwa, a także odpowiada na jego aktualne potrzeby.

W pierwszej publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej pt. *„Silicone Wristbands in Exposure Assessment: Analytical Considerations and Comparison with Other Approaches”* dokonano przeglądu piśmiennictwa. Doktorantka opisała dotychczasowe badania w których stosowano opaski silikonowe jako pasywne próbki oraz etapy przedanalizacyjne i analityczne niezbędne w ocenie narażenia z ich użyciem. Zestawiła także zastosowanie i cechy silikonowych opasek z monitoringiem biologicznym, użyciem chusteczek do rąk, próbników powietrza i osiadłego pyłu. Przegląd piśmiennictwa zrealizowany został w sposób rzetelny i krytyczny. Warto podkreślić szereg cennych spostrzeżeń i rekomendacji Doktorantki, w badanym temacie. Zwraca także uwagę staranne zredagowanie manuskryptu i dopełnienie go rycinami o wysokiej wartości merytorycznej. W dniu sporządzania recenzji, publikacja miała już 12 cytowań.

Kolejna publikacja załączona do rozprawy (w wersji roboczej) pt. *„Assessment of exposure to synthetic pyrethroids with the use of silicone wristbands and biomonitoring of urinary metabolites – a pilot study preceded by development of cost-effective GC-ECD method”* dotyczyła opracowania, optymalizacji i walidacji nowej metody analitycznej badania zawartości wybranych syntetycznych pyretroidów w silikonowych opaskach. Dodatkowo Doktorantka zawarła w niej wyniki badania pilotażowego na 24 ochotnikach, a wyniki stężeń związków macierzystych w opaskach, zestawiła z wynikami stężeń metabolitów w moczu. Potwierdziła tym samym, że nowa metoda oceny narażenia na syntetyczne pyretroidy może być stosowana w praktyce i dostarcza wartościowych wyników. Warto tutaj podkreślić, że Doktorantka podczas walidacji metody analitycznej, fortyfikowała badanymi analitami opaski silikonowe, co jest prawidłowym podejściem analitycznym. Podejście to nie jest niestety stosowane często, ze względu na trudności metodyczne i mniej atrakcyjne wyniki precyzji i dokładności. Należy zaznaczyć, że niniejsze badanie jest pierwszym badaniem w Europie, które wykorzystuje silikonowe opaski do określenia narażenia populacji na syntetyczne pyretroidy. Korzystając z przywilejów recenzenta, chciałabym z Doktorantką przedyskutować pewne kwestie i niejasności pojawiające się w manuskrypcie: 1) W jaki sposób zapewnić odtwarzalność wyników, skoro często nie podawany jest producent opasek silikonowych? Jakie jest prawdopodobieństwo, iż w opaskach kupionych od dwóch różnych producentów użyty materiał będzie tożsamy? Jakie badania można zrobić celem charakterystyki opasek? 2) Ryc. 2, 3, 5, 6 – co jest przedstawione na rycinach - średnia czy mediana, jakie miary zmienności przedstawione są za pomocą pudełka i wąsa? Ile powtórzeń zostało wykonanych? 3) Ryc. 2. – jak wytłumaczy Pani niższe względne pole powierzchni dla permetryny podczas poekspozycyjnego płukania opaski izopropanolem w porównaniu do płukania dwoma roztworami: wodą i izopropanolem? Skoro najwyższy (choćby nieistotnie statystycznie) odzysk zaobserwowano dla płukania wodą, dlaczego podjęto decyzję o dwukrokovym płukaniu: wodą i izopropanolem? 4) Ryc. 4 – dlaczego dłuższy

czas ekstrakcji wiązał się z większą zmiennością pola powierzchni analitów?

5) Zakres krzywej wzorcowej w procesie walidacji (10 – 400 ng/g) nie odpowiadał w pełni stężeniom wykrytym w badaniu pilotażowym, szczególnie u osób narażonych na syntetyczne pyretroidy (stężenia permetryny do 6673.9 ng/g, średnia arytmetyczna np. u posiadaczy zwierząt – 1984.9 ng/g). W jaki sposób Doktorantka poradziła sobie z tym problemem? Czy do procesu walidacji dodano test rozcieńczenia (ang. *dilution integrity*) czy zdecydowano się na przedłużenie krzywej wzorcowej i dodanie w procesie walidacji próbki kontrolnej w najwyższym zakresie nowej krzywej? Dlaczego niektóre wartości podane w tabelkach są poniżej najniższego stężenia krzywej (np. w tabeli 3)? W przypadku niektórych analitów LOD było także najniższym punktem krzywej. Czy w przypadku tych związków zakres krzywej był zatem inny niż zaprezentowano w pracy?

6) Czy myśli Pani, że otrzymane wyniki (chodzi o korelacje – związek macierzysty – metabolit) mogłyby się zmienić, gdyby zamiast pobrania przypadkowej próbki moczu robiona byłaby dobową zbiórka moczu? Czy uważa Pani, że niedogodności związane z tego typu pobraniem uzasadniają jego ewentualne korzyści?

7) Dokładność nowej metody analitycznej była w zakresie 63.1% – 139.3%. Jakie kryteria akceptacji przyjęła Doktorantka? Jak niniejsze wyniki kształtują się na tle innych opublikowanych badań?

8) W opisie tabeli 3 i 4 zaznaczono, że do oceny istotności różnic pomiędzy grupami stosowano test U-Manna Whitney'a, podczas gdy w kilku przypadkach były trzy grupy. Czy najmniej liczną eliminowano z porównania czy stosowano do ich porównania inny test?

W roboczej wersji trzeciej publikacji pt. „*Evaluation of exposure to synthetic pyrethroids among pet owners in a study with panned veterinary product application*” Doktorantka słusznie zauważyła, że podczas stosowania produktów z syntetycznymi pyretroidami w przestrzeniach zamkniętych, w związku z wysoką stabilnością środowiskową tych związków, istnieje ryzyko ciągłej na nie ekspozycji. Zweryfikowała to stosując biomonitoring, a także próbki pasywne w postaci opasek silikonowych umieszczonych bądź to na nadgarstku osoby z badanego gospodarstwa domowego, bądź w pomieszczeniu zamkniętym, w którym domownicy spędzali najwięcej czasu. Dotychczas nie było jednoznacznych i ilościowych danych, że stosowanie środków przeciwpasożytniczych u zwierząt domowych, ma wpływ na ekspozycję ich właścicieli. Dlatego niniejsza publikacja stanowi niezwykle cenny wkład w naszą wiedzę o źródłach narażenia na syntetyczne pyretroidy. Warto podkreślić, że eksperymenty opisane w manuskrypcie zostały zaplanowane w sposób staranny i przemyślany. Badanie przeprowadzone było w sposób gwarantujący uzyskanie przydatnych dla społeczeństwa, wiarygodnych wyników. Po zapoznaniu się z złączoną publikacją nasuwają mi się następujące uwagi i pytania: 1) W tabeli 3 jest adnotacja, że podanie leku weterynaryjnego/zastosowanie wyrobu medycznego było pierwszym w danym roku kalendarzowym. W którym miesiącu było robione badanie? 2) W niniejszym badaniu i wcześniejszych pracach zespołu badawczego, stężenie metabolitów przeliczane jest na ciężar właściwy moczu. Inną możliwością jest przeliczenie stężenia np. na kreatyninę. Czy mogłabym prosić o uzasadnienie wyboru? 3) Czy sprawdzana była stabilność

badanych związków w opaskach silikonowych? 4) Pod tabelką 5 Doktorantka odnosi się do tabeli 3, która wydaje się zawierać inne dane niż te przywoływane w tekście. Podobnie w dyskusji jest odniesienie do tabeli 2 jako do tej, gdzie powinny znajdować się dawki pyretroidów w preparatach/wyrobach medycznych. 5) Ryc. 4 – przy porównaniu więcej niż dwóch grup, powinno stosować się test ANOVA lub Kruskala Wallis'a (jak Doktorantka słusznie zauważa w publikacji numer 4). Dopiero po uzyskaniu istotności, stosuje się testy *post hoc*. Czy podane na wykresie wyniki tyczą się właśnie testu *post hoc*? 6) Czy dodając stężenia metabolitów jednego związku macierzystego do siebie, nie powinny być dodawane stężenia molowe? 7) Na kilku rycinach oś y opisana jest jako log ze stężenia analitu w opasce. Wprowadza to w błąd czytelnika sugerując, że przedstawione na wykresie wyniki są logarytmem wartości oznaczonej. Tymczasem tylko skala przedstawiona jest w sposób logarytmiczny. 8) W dyskusji Doktorantka odnosi się do ADI permetryny dla dorosłego człowieka i przedstawia obliczenia, które szacują ryzyko wynikające z przyjęcia całej dawki pestycydu znajdującego się w weterynaryjnym preparacie/wyrobie medycznym przez człowieka w ciągu jednego dnia. Co Doktorantka chciała podkreślić przywołując te dane? Czy biorąc pod uwagę uzyskane przez siebie wyniki stężeń badanych związków w opaskach silikonowych i ich metabolitów w moczu, Doktorantka może oszacować realne zagrożenie wynikające z ekspozycji na ten związek?

W czwartym manuskrypcie pt. „*Comprehensive assessment of exposure to synthetic pyrethroids among inhabitants of Northern Poland via urinalysis supplemented by passive sampling with the use of silicone wristbands*” (wersja robocza) Doktorantka szacuje narażenie środowiskowe na syntetyczne pyretroidy 85 osób zamieszkałych na północy Polski. W artykule stosuje łącznie – tradycyjny biomonitoring oraz bierny próbnik w postaci opaski silikonowej. Jako główne źródła narażenia na pyretroidy wskazuje posiadanie zwierząt domowych ($p = 0,0222$) oraz stosowanie leków przeciwpasożytniczych u tych zwierząt ($p = 0,0104$). Wyniki sugerują również, że opaski silikonowe stosowane jako bierne próbki są przydatne do monitorowania narażenia na pyretroidy, które nie wynika z diety. Badanie to stanowi bardzo istotne uzupełnienie poprzednich analiz. Pozwala bowiem na ocenę skali narażenia na syntetyczne pyretroidy w północnych regionach Polski – z zachowaniem informacji, z którym związkiem macierzystym ochotnik miał kontakt. Otrzymane wyniki stanowią zatem istotną wskazówkę dotyczącą kierunku dalszych badań. Na uwagę zasługuje duża liczba danych jakościowych, które uwzględniono w eksperymencie. Czy Doktorantka rozważyła użycie wieloczynnikowej analizy wariancji i/lub metod chemometrycznych celem wykluczenia koincydencji pewnych czynników i uniknięcia nieścisłości w interpretacji wyników? Czy możliwe jest, że osoby stosujące kremy do rąk np. statystycznie rzadziej podawały zwierzętom środki przeciwpasożytnicze, dlatego stężenie pyretroidów w tej grupie było istotnie niższe niż w grupie osób niestosujących kremów? Dlaczego stosowanie kremów uznano za istotny czynnik wpływający na badanie i uwzględniono w kwestionariuszu? Czy wiadomo jaka jest kinetyka wiązania badanych insektycydów w opaskach silikonowych? Drobna uwaga techniczna- na Ryc. 1 oznaczano istotności pomiędzy

grupami, gwiazdkami. Nie wyjaśniono natomiast co znaczy poszczególna liczba gwiazdek.

Reasumując merytoryczną część recenzji, pragnę podkreślić, że zaprezentowane do oceny prace stanowią monotematyczny, oryginalny cykl publikacji i/lub wersji roboczych artykułów, które w sposób kompleksowy przyczyniają się do poszerzenia naszej wiedzy na temat potencjału opasek silikonowych jako biernych próbników pyretroidów w szacowaniu ekspozycji na tę grupę związków. Doktorantka uzasadniła dobitnie, że użycie opasek powinno być elementem, który towarzyszy monitoringowi biologicznemu, gdyż niesie ze sobą cenne, dodatkowe informacje. Tym samym Doktorantka zrealizowała wszystkie postawione sobie cele naukowe, uzyskując wyniki o dużej wartości poznawczej oraz potencjale aplikacyjnym. W pracach badawczych mamy do czynienia z nowatorskim podejściem do zaprezentowanych zagadnień i wysoką jakością prowadzonych badań. Dodatkowo każdej pracy oryginalnej wchodzącej w skład rozprawy, towarzyszy lista ograniczeń, którymi obarczone jest badanie. Świadczy to o dojrzałości Doktorantki i umiejętności krytycznego spojrzenia na własne wyniki, co jest kluczowe w pracy naukowej. Pomimo przedstawionych w recenzji uwag krytycznych, rozprawę doktorską oceniam wysoko.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Waclawik prezentuje oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim w związku z ubieganiem się o stopień doktora nauk farmaceutycznych, określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.). Dlatego, z pełnym przekonaniem, składam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Małgorzaty Waclawik do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

ADIUNKT BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Zakład Chemii Leków, Analizy
Farmaceutycznej i Biomedycznej

Joanna Giebułtowa
dr hab. n. farm. Joanna Giebułtowa