



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

Katedra i Zakład Toksykologii
Laboratorium Badań Środowiskowych
Prof. Dr Hab. Ewa Florek

ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań

tel. +48 61 641 84 83
e-mail: eflorek@ump.edu.pl

Poznań, 10 listopada 2023 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

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”*

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

Pani mgr Małgorzaty Waclawik – Doktorantki w Katedrze i Zakładzie Toksykologii Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Znaczącą rolę w chorobach człowieka odgrywają nie tylko czynniki genetyczne, ale i środowiskowe, w tym styl życia, nawyki żywieniowe czy zanieczyszczenia środowiska. Istotny w ocenie jest biomonitoring człowieka, który pozwala na pomiar narażenia rzeczywistego poprzez ocenę różnych biomarkerów i wskaźników w próbkach biologicznych. Wielokrotnie wyniki badań dostarczają cennych informacji dotyczących narażenia populacji i powiązania tych czynników z jednostką chorobową. Wśród narażeń środowiskowych znaczącą rolę

odgrywają pestycydy, których masowa produkcja i stosowanie w rolnictwie w ciągu ostatnich lat niepokojąco wzrosły.

W grupie pestycydów środkami o najwyższej toksyczności są insektycydy, wśród których wyróżnia się kilka podgrup chemicznych, a jedną z nich są pyretroidy. Znane i stosowane do zwalczania szkodników w rolnictwie, eliminacji wektorów chorób zakaźnych, do zwalczania pasożytów zewnętrznych u zwierząt domowych będących składnikami weterynaryjnych produktów leczniczych syntetyczne pyretroidy są chemicznymi pochodnymi ich naturalnie występujących analogów. Te silne, skuteczne substancje o szerokim zastosowaniu, łatwo dostępne w sprzedaży, w różnych formułach stały się czynnikiem narażenia zawodowego różnych populacji na całym świecie.

Tytuł rozprawy doktorskiej został sformułowany poprawnie i odnosi się do prezentowanych w pracy wyników badań.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest podsumowaniem badań prowadzonych przez mgr Małgorzatę Waclawik – Doktorantkę w Katedrze i Zakładzie Toksykologii, na Wydziale Farmaceutycznym, Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w latach 2019-2023. Prace badawcze dotyczyły implementacji nowej metody pomiaru ekspozycji z wykorzystaniem opasek silikonowych jako nieinwazyjnych, pasywnych próbników do oceny narażenia na syntetyczne pyretroidy. Stąd uważam, że temat podjętej rozprawy doktorskiej – cyklu manuskryptów, jest nowatorski, a pracę należy uznać za oryginalną.

Rozprawa doktorska obejmuje 31 stronicową część opisową zawierającą rozdziały: (1), (2) *Streszczenie w języku polskim i angielskim*; (3) *Listę skrótów*; (4) *Wprowadzenie*; (4.1) *Właściwości chemiczne i budowę pyretroidów*; (4.2) *Wchłanianie, dystrybucję, metabolizm i wydalanie pyretroidów*; (4.3) *Zastosowanie syntetycznych pyretroidów*; (4.4) *Mechanizm działania syntetycznych pyretroidów*; (4.5) *Toksyczność dla człowieka i ryzyko dla zdrowia*; (4.6) *Biomonitoring człowieka*; (5) *Cele badania*; (5.1) *Przegląd stosowanych metod i prac laboratoryjnych*; (6) *Wyniki przeprowadzonych eksperymentów*; (6.1) *Opracowanie i optymalizację metody*; (6.2) *Badanie pilotażowe*; (6.3) *Badanie z planowanym narażeniem na pyretroidy*; (6.4) *Przekrojowe badanie populacji*; (7) *Wnioski*; (8) *Piśmiennictwo* oraz (9) *Dane*

osobowe i osiągnięcia; (10) Wykaz manuskryptów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i manuskrypty wraz z oświadczeniami.

Układ tej części rozprawy jest oryginalny i przejrzysty. Zawiera również wszystkie wymagane elementy stawiane takim opracowaniom. Dysertacja doktorska jest napisana zwięzłym i poprawnym językiem angielskim z zastosowaniem prawidłowej nomenklatury.

Kolejna część dysertacji stanowiąca podstawę obejmuje: jedną publikację przeglądową - *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022 i trzy manuskrypty wysłane do redakcji czasopism: *Exposure and Health*, *Journal of Hazardous Materials* i *International Journal of Hygiene and Environmental Health*.

Wybór tematu został bardzo dobrze uzasadniony we *Wprowadzeniu*. W części opisowej Doktorantka zaprezentowała aktualny stan wiedzy na temat właściwości chemicznych i budowy pyretroidów, ich wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania, zastosowania syntetycznych pyretroidów i ich mechanizmu działania, a uzupełnieniem były podrozdziały dotyczące toksyczności dla człowieka, ryzyka zdrowotnego oraz biomonitoringu człowieka. Jest to bardzo istotna część pracy wprowadzająca czytelnika w tematykę rozprawy. W tym miejscu należy pochwalić Doktorantkę nie tylko za logiczny układ tej części, ale i wyczerpujące udokumentowanie przedstawianych informacji. Wysoko oceniam umiejętność mgr Małgorzaty Waćławik korzystania z aktualnego piśmiennictwa, które cytowane jest zgodnie z wymogami. Zaprezentowane dane stanowią dobrze opracowaną podstawę teoretyczną do sformułowania celu dysertacji i wyboru metod badawczych dla jego realizacji. Świadczy to o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym i metodologicznym mgr Małgorzaty Waćławik.

Do osiągnięcia zamierzonego celu Autorka uznała za niezbędny podział pracy na kilka etapów. Pierwszy obejmował przegląd piśmiennictwa na temat opasek silikonowych, ich aspekty metodologiczne i zakresy wykorzystania co zostało zaprezentowane w pierwszej publikacji (1) pt. „*Silicone Wristbands in Exposure Assessment: Analytical Considerations and Comparison with Other Approaches*” w *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, w której to Doktorantka jest pierwszym autorem. Publikacja jest wykładnikiem bardzo dobrego przygotowania teoretycznego Doktorantki do pracy badawczej. Bogate, aktualne piśmiennictwo pozwala na podkreślenie umiejętności Autorki korzystania z dostępnych baz danych.

Kolejne zadanie dotyczyło opracowania, optymalizacji i walidacji metody oznaczania związków pyretroidowych w silikonowych opaskach na rękę z wykorzystaniem chromatografii gazowej z detektorem wychwytu elektronów (GC-ECD). Opracowana metoda została zweryfikowana w ramach badań pilotażowych na grupie 24 ochotników. Ta część rozprawy jest tematem manuskryptu (2) 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*” wysłanego do czasopisma *Exposure and Health*, w którym mgr Małgorzata Waclawik jest pierwszym autorem.

Dalsza część badawcza stanowiąca podstawę dysertacji dotyczyła zastosowania opracowanej metody wraz z biomonitorem w badaniu ekspozycji na insektycydy zawarte w produkcie weterynaryjnym przeciw pasożytom zewnętrznym. Eksperyment przeprowadzony na grupie 15 właścicieli zwierząt domowych miał na celu ocenę sekwencji stężeń pyretroidów i ich metabolitów w moczu, jak również zbadanie narażenia przez analizę moczu i opasek na rękę, a także korelacji między tymi wynikami. Wyniki badań zostały opracowane w formie manuskryptu (3) zatytułowanego „*Evaluation of exposure to synthetic pyrethroids among pet owners in a study with panned veterinary product application*” i przesłane do czasopisma *Journal of Hazardous Materials*. Mgr Małgorzata Waclawik jest pierwszym autorem.

Ostatnim etapem badań Doktorantki było wyjaśnienie potencjalnych czynników predykcyjnych narażenia na syntetyczne pyretroidów, zbadanie poziomów narażenia na te związki, poprzez łączną ich ocenę i biomonitoring człowieka. Pracę zaprezentowano w kolejnym manuskrypcie (4) „*Comprehensive assessment of exposure to synthetic pyrethroids among inhabitants of Northern Poland via urinalysis supplemented by passive sampling with the use of silicone wristbands*” i wysłano do czasopisma *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. Doktorantka jest głównym autorem.

Podjęcie zaproponowanej tematyki badawczej przez Autorkę wydaje się być uzasadnione nie tylko ze względu na ocenę stężeń syntetycznych pyretroidów, ale i wpływu stosowania leków weterynaryjnych i produktów biobójczych w pomieszczeniach mieszkalnych na ogólne narażenie na te związki w populacji generalnej.

W dalszej części opisowej rozprawy mgr Małgorzata Waclawik przedstawia stosowane metody badawcze i prace laboratoryjne.

Na wstępie Autorka prezentuje opracowanie metody badawczej począwszy od przygotowania próbników – opasek silikonowych kończąc na analizie metodą GC-MS. Nie lada wyzwaniem dla Doktorantki były czyszczenie próbników silikonowych, ekstrakcja, a na koniec analiza instrumentalna, z którymi doskonale poradziła sobie.

Proces czyszczenia opasek silikonowych został zoptymalizowany pod kątem efektywności (GC-MS), a szczególną uwagę Autorka zwracała na odzysk analitu podczas optymalizacji procesu oczyszczania po pobraniu próbki. Proces ekstrakcji Doktorantka przetestowała różnymi technikami w celu osiągnięcia maksymalnego odzysku analitu jednocześnie redukując sygnały szumu tła. Uwagę zwraca fakt, iż wszystkie analizy przeprowadzono przy użyciu GC-ECD, co pozwoliło Autorce na selektywną detekcję syntetycznych pyretroidów i osiągnięcie niskich granic wykrywalności (LOD). Jest to ważne z uwagi na przyszłe zastosowanie metody w ocenie narażenia mogąc oznaczać ilościowo śladowe ilości analitów. Opracowana i zoptymalizowana metoda została poddana walidacji. Należy podkreślić, że jest to jedno z pierwszych badań skupiających się na analizie i metodologicznych aspektach opasek silikonowych oraz wykorzystania ich do oceny na syntetyczne pyretroidy.

Badaną populację stanowiły łącznie 124 osoby, które zostały zaklasyfikowane do odpowiednich etapów badań. Pierwszy z nich to badania pilotażowe (24 osoby) w celu potwierdzenia użyteczności nowatorskiej metody wykorzystania próbników do oceny narażenia na syntetyczne pyretroidy. Dwa kolejne, to przekrojowe badania populacyjne przeprowadzone wśród ochotników (15 osób) służące ocenie narażenia właścicieli zwierząt domowych na badane substancje, którym aplikowano środki weterynaryjne zawierające syntetyczne pyretroidy i wśród 85 uczestników, mieszkańców Polski Północnej w celu oceny narażenia na ww. związki. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż przeprowadzone przekrojowe badania populacyjne z wykorzystaniem opasek silikonowych są pierwszymi wykonanymi w Polsce, a jednymi z pierwszych w Europie w odniesieniu do oceny narażenia na syntetyczne pyretroidy.

W kolejnej części Autorka syntetycznie prezentuje badanie pilotażowe i przekrojowe badanie populacyjne zwracając uwagę na pobieranie, przygotowanie i analizę próbek moczu. Dodatkowo wśród uczestników przeprowadzono badania ankietowe dotyczące cech osobowych, warunków i stylu życia. W moczu wyznaczono stężenia 5 metabolitów pyretroidu – 3-PBA, DBCA, 4F 3PBA, cis i trans DCCA, kwas lambda-cyhalotrowy-BIF, a w ekstrakcie z

opasek silikonowych stężenia 5 macierzystych pyretroidów (cyhalotryna, permetryna, cyflutryna, cypermetryna, deltametryna, flumetryna). Mgr M. Waćławik do analizy moczu wykorzystwała metodę GC-MS od lat stosowaną w Katedrze Toksykologii, która corocznie bierze udział w zewnętrznej kontroli jakości (G-EQUAS). Stężenie związków macierzystych wyznaczono nowo opracowaną metodą GC-ECD. Zaprezentowana część badawcza i dobór technik świadczą o profesjonalnym przygotowaniu Doktorantki do pracy analitycznej.

Przedstawioną metodykę wykorzystano również w odniesieniu do badań z planowaną ekspozycją na pyretroidy, którego celem było uzyskanie odpowiedzi na pytania dotyczące narażenia na syntetyczne pyretroidy bezpośrednio po ich zastosowaniu w pomieszczeniach zamkniętych i do oceny „wyjściowego” narażenia wśród właścicieli zwierząt domowych, którzy regularnie stosują produkty u swoich zwierząt. Wykonane przez Doktorantkę badanie jest pierwszym tego typu badaniem obejmującym planowane narażenie na pyretroidy i wykorzystanie opasek silikonowych w ocenie tego narażenia.

Zaprezentowany projekt badawczy Doktorantki w postaci czterech manuskryptów dał znakomite rezultaty w ocenie narażenia na pyretroidy.

Mgr Małgorzata Waćławik opracowała metodę oznaczania macierzystych pyretroidów w silikonowych opaskach na rękę (manuskrypt 2), w dalszym etapie wykorzystwała ją do oceny wielkości narażenia, a także wskazania potencjalnych źródeł narażenia na te związki w przekrojowym badaniu populacyjnym (manuskrypt 4) i ostatecznie zbadania po raz pierwszy narażenia przewlekłego na pyretroidy, które obejmowało kontrolowaną ekspozycję uczestników – właścicieli zwierząt domowych (manuskrypt 3).

Opracowaną metodę oznaczania pyretroidów w silikonowych opaskach na rękę oceniono za sprawdzoną i nadającą do rutynowych stosowań. Doktorantka podkreśla, iż metoda jest łatwa w zastosowaniu i wymaga jedynie podstawowego sprzętu laboratoryjnego.

Wykonane przez Autorkę badania pilotażowe wykazały przydatność opasek silikonowych jako osobistych próbników w badaniach wielkości narażenia na pyretroidy niemożliwe do oceny wyłącznie na podstawie analizy moczu (manuskrypt 2). Odnotowano silny poziom korelacji pomiędzy wynikami analizy moczu a badaniami opasek silikonowych co wskazuje na komplementarność stosowanych metod do oceny narażenia (manuskrypty 2, 3, 4).

Zaprezentowane przez Doktorantkę próby wyjaśnienia ewentualnych predyktorów narażenia na syntetyczne pyretroidy jednoznacznie wskazują istotne znaczenie posiadania zwierząt domowych i stosowania leków weterynaryjnych przeciw pasożytom zewnętrznym (manuskrypty 2, 4).

Wykazana przez Autorkę silna korelacja pomiędzy stężeniami metabolitów w moczu i poziomami macierzystych pyretroidów w opaskach silikonowych uczestników narażonych na działanie związków i tych nienarażonych (manuskrypt 4) daje naukowy dowód wykorzystania opasek silikonowych do identyfikacji i rozróżnienia narażenia dietetycznego i pozażywnościowego na syntetyczne pyretroidy.

Badania z udziałem właścicieli zwierząt domowych i planowanego narażenia na pyretroidy (manuskrypt 3) pozwoliły na ocenę ekspozycji mierzoną kombinacją pobierania próbek z wykorzystaniem opasek i biomonitoringu w odniesieniu do stosowania leków weterynaryjnych.

Doktorantka podkreśla niepokojący fakt wykrycia znacznych ilości permetryny na opaskach silikonowych noszonych przez uczestników przed zastosowaniem leku co wiąże się z jej trwałością i obecnością w pomieszczeniach zamkniętych i jednocześnie może być miarą określającą przewlekłe narażenie na tę grupę związków (manuskrypt 3).

Opaski silikonowe okazały się bardzo skutecznym narzędziem zarówno do oceny jakościowej związków macierzystych, jak i ilościowej do oceny ekspozycji na syntetyczne pyretroidy.

Treść rozprawy doktorskiej i przedstawionych manuskryptów oceniam jako bardzo dobrą.

W tym miejscu pozwolę sobie wskazać pewną kwestię dyskusyjną, a wynika ona z obowiązków recenzenta. W manuskrypcie 3 i 4 Autorka pisze o pewnych ograniczeniach badań. Czy ten aspekt można w przyszłych badaniach rozwiązać?

Jednocześnie pragnę podkreślić, że badania, które prowadzono wśród ochotników wymagały niezwyklej organizacji pracy, komunikacji i wytrwałości zarówno ze strony uczestników, jak i badacza, ale z tym Doktorantka poradziła sobie doskonale czego dowodem są prace z udziałem aż 124 osób.

Część badawcza zaprezentowana w rozprawie doktorskiej oraz manuskryptach wysłanych do redakcji czasopism *Exposure and Health*, *Journal of Hazardous Materials* i *International Journal of Hygiene and Environmental Health* została zaplanowana w sposób prawidłowy i poprawnie przeprowadzona, co świadczy o dużej wiedzy mgr Małgorzaty Waclawik, a także o opanowaniu warsztatu badawczego przez Doktorantkę. Zakres pracy badawczej stał się okazją do wykazania również umiejętności organizacyjnych. Na podkreślenie zasługuje zastosowane szerokie spektrum metod i modeli do implementacji nowej metody pomiaru ekspozycji z wykorzystaniem opasek silikonowych jako nieinwazyjnych próbników do oceny narażenia na syntetyczne pyretroidy, wskazujące na duży wkład pracy Autorki w realizowanej rozprawie doktorskiej. Opracowane i zoptymalizowane przez Doktorantkę w badaniach metody analityczne dały możliwość oznaczania pyretroidów w opaskach silikonowych, jak i ich metabolitów w moczu. Procedury badawcze zostały szczegółowo opisane w manuskryptach, a prawidłowo przeprowadzona analiza statystyczna była podstawą interpretacji wyników badań Autorki.

Wysoko oceniam umiejętność przejrzystego podsumowania i interpretacji tak dużej liczby danych. Autorka doskonale przedstawiła badania w manuskryptach i umiejętnie podsumowała wyniki w rozprawie doktorskiej. Opis jest wyczerpujący. Wykazanie pewnych luk na obecnym poziomie wiedzy tłumaczy celowość podjętych badań, a tym samym podnosi wartość zaprezentowanych wyników.

Merytoryczną wartość rozprawy doktorskiej i manuskryptów mgr Małgorzaty Waclawik oceniam bardzo wysoko. Niewątpliwym osiągnięciem Autorki są wyniki badań dotyczące wpływu stosowania leków weterynaryjnych i produktów biobójczych w pomieszczeniach mieszkalnych na ogólne narażenie na syntetyczne pyretroidy w populacji generalnej. Tym samym prace mgr Małgorzaty Waclawik uzupełniają wiedzę dotyczącą zagadnień wykorzystania komplementarnych metod szacowania ekspozycji do oceny ryzyka zdrowotnego wynikającego ze stosowania przeciwpasożytniczych leków weterynaryjnych u zwierząt domowych. Są badaniami pionierskimi.

Mgr Małgorzata Waclawik będąc młodym badaczem posiada dorobek naukowy w formie dwóch prezentacji ustnych i jednej prezentacji posterowej na międzynarodowych

konferencjach naukowych (2023, Polska, Portugalia) oraz dwóch ustnych i dwóch posterowych na konferencjach krajowych i Ogólnopolskim Forum Młodych (2021, 2022, 2023). Jest laureatką nagrody I^o za najlepszą prezentację ustną w sesji doktorantów na konferencji międzynarodowej i nagrody II^o za najlepszą pracę w formie posteru na konferencji krajowej. Jest pierwszym autorem publikacji przeglądowej opublikowanej w *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022. Trzy manuskrypty, w których Doktorantka jest pierwszym autorem zostały wysłane do czasopism wyróżnionych na liście JCR o wysokim współczynniku oddziaływania. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż mgr Małgorzata Waclawik była uczestnikiem warsztatów w ramach Foundation for Advanced Education in the Sciences (FAES graduate school at NIH), a w 2020 roku Workshop on Human Biomonitoring, HBM4EU. Doktorantka jest stypendystką projektu POWR.03.02.00-00-I014/17-00 współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej za pośrednictwem Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014–2020.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca i manuskrypty stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazują ogólną wiedzę teoretyczną Autorki w dziedzinie nauk farmaceutycznych. Dysertacja potwierdza umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych oraz spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Wyczerpuje to wymagania określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym stawiam wniosek do Wysockiej Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Małgorzaty Waclawik do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Wobec pozytywnej oceny pracy i manuskryptów oraz dorobku naukowego stawiam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK
Laboratorium Badań Środowiskowych

prof. dr hab. Ewa Florek