

Zakład Biochemii  
Katedra Biochemii i Chemii Medycznej  
Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Szczecinie  
Al. Powstańców Wlkp. 72  
70-111 Szczecin  
Tel./fax: 91 466 1515  
E-mail: irenabosiacka@pum.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Pohoryło pt.:**  
**„Analiza zawartości wybranych ksenobiotyków chloroorganicznych w**  
**mleku kobiecym z uwzględnieniem różnych okresów laktacji – ocena**  
**narażenia zdrowia niemowląt”**

Spośród wielu zagrożeń środowiskowych szczególną uwagę zwraca się obecnie na trwałe zanieczyszczenia organiczne (TZO). Zanieczyszczenia te powstają w wyniku działalności przemysłowej, rozwoju motoryzacji, produkcji energii, stosowania w rolnictwie środków ochrony roślin i nawozów sztucznych. TZO wykazują wysoką toksyczność dla organizmów żywych, trwałość w środowisku oraz zdolność do biokumulacji. Do grupy tych związków należą: polichlorodibenzodiodksyny, polichlorodibenzofurany, polichlorowane bifenyly, pestycydy chloroorganiczne oraz związki bromoorganiczne stosowane jako uniepalniacze lub związki opóźniające zapłon. Związki te cechuje zdolność rozprzestrzeniania się w atmosferze, dobra rozpuszczalność w tłuszczach oraz odporność na degradacyjne procesy chemiczne, biologiczne. Te właściwości sprawiają, że związki te należą do *endocrine disruptors*, substancji zaburzających równowagę hormonalną organizmów żywych, wykazują także właściwości mutagenne. Ryzyko narażenia na TZO wynika głównie z zanieczyszczenia surowców żywnościowych pochodzenia roślinnego i zwierzęcego, w tym szczególnie ryb, przetworów rybnych, mięsa i produktów mlecznych.

Spośród związków trwale zanieczyszczających środowisko szczególną uwagę zwracają polichlorowane bifenyly (PCB). Są to związki, których struktura przestrzenna zbliżona jest do struktury tetrachloro-dibenzo-para-dioksyn, posiadają też zbliżoną do nich toksyczność. Kongenery te określane są jako analogi przestrzenne dioksyny lub dioksynopodobne PCB (dl-PCB) i wykazują działanie zbliżone do dioksyn, w tym kancerogenne, immuno- oraz

neurotoksyczne. Druga grupa obejmuje związki o innych właściwościach toksycznych określane jako niedioksynopodobne PCB (ndl-PCB). Dzięki właściwościom fizykochemicznym m.in. dobrej rozpuszczalności w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych, olejach i tłuszczach, wysokiej temperaturze zapłonu, niskiemu przewodnictwu elektrycznemu, wysokiemu przewodnictwu cieplnemu, dużej oporności na działanie czynników chemicznych, związki te znalazły szerokie zastosowanie w przemyśle, jako płyny dielektryczne w transformatorach i akumulatorach. PCB stosowano także jako płyny hydrauliczne, płynne wymienniki ciepła, zmiękczacze, środki powierzchniowo czynne, środki ognioodporne, składnik olejów smarowych oraz cieczy chłodząco-smarujących, plastyfikatorów do tuszy, atramentów, farb drukarskich, jako uniepalniacze do tworzyw sztucznych, a także jako nośniki dla pestycydów.

PCB w środowisku ulegają bardzo powolnym przemianom kumulując się głównie w środowisku wodnym, organizmach ryb, skorupiaków i innych zwierząt, osiągając wysoki współczynnik biokumulacji. Podstawową przemianą metaboliczną tych związków w ustroju jest hydroksylacja przy udziale monooksygenaz wątrobowych, a jednym z produktów pośrednich detoksykacji są epoksytlenki, które mogą tworzyć toksyczne, kowalencyjnie związane addukty z makrocząsteczkami (jak DNA) o potencjalnym działaniu cytotoksycznym i mutagennym.

Biorąc pod uwagę stopień kumulacji tych związków w tkankach organizmów żywych oraz efekty ich oddziaływania, udowodniono toksyczny wpływ kilkunastu do kilkudziesięciu spośród ponad 200 kongenerów PCB. Obecnie 12 "dioksynopodobnych" kongenerów PCB Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem zaliczyła do grupy 2A, czyli związków o prawdopodobnym działaniu rakotwórczym dla człowieka.

Druga grupa związków trwale zanieczyszczających środowisko to pestycydy chloroorganiczne stosowane m.in. jako środki owadobójcze, środki ochrony roślin oraz jako środki higieniczno-sanitarne. Do tej grupy związków należą m.in. aldryna, dieldryna, DDT i jego metabolity, heksachlorocykloheksan, heksachlorobenzen. Po odkryciu długofalowych skutków toksycznych, stosowanie tych związków zostało zakazane lub ograniczone na początku lat 70. XX wieku w większości krajów rozwiniętych, jednakże w niektórych regionach świata pestycydy te są stosowane nadal w rolnictwie i do kontroli malarii. Związki te charakteryzują się trwałością w środowisku, odpornością na degradację procesów chemicznych i biologicznych, wykazują również powinowactwo do lipidów. Udowodniono dotychczas, że narażenie na ich działanie może być przyczyną nowotworów, chorób neurologicznych, wad wrodzonych oraz zaburzeń gospodarki hormonalnej, jako że

PCB zalicza się do grupy substancji mogących zakłócać prawidłowe funkcjonowanie hormonów dokrewnych (szczególnie hormonów tarczycy). Wykazano także że niektóre PCB wpływają na wzrost stężenia testosteronu, co skutkuje tworzeniem się cyst w jajnikach. Związki te wykazują także zdolność do zaburzenia prawidłowego funkcjonowania przysadki i podwzgórza. Metabolity PCB działają podobnie do estrogenów, co może być przyczyną rozwoju wielu chorób, w tym nowotworu piersi. PCB mogą być przyczyną endometriozy u kobiet, natomiast u mężczyzn postępującego w czasie zmniejszania się liczby i jakości plemników.

Szczególnie istotnym problemem jest możliwość przenikania związków chloroorganicznych przez łożysko do płodu w okresie ciąży, a także do organizmu noworodka z mlekiem matki. Ksenobiotyki chloroorganiczne mogą bowiem wpływać na wzrost płodu oraz dalszy rozwój noworodka. Narażenie na działanie pestycydów może doprowadzić do upośledzenia zdolności kognitywnych i zaburzeń rozwoju dziecka. Estrogenne, antyestrogenne i antyandrogenne działanie tych związków może wpływać także na rozwój cech określających płeć dziecka. U kobiet, które były narażone na działanie tych związków, notuje się także częstsze poronienia oraz przedwczesne porody.

Dlatego badania jakich podjęła się Doktorantka, a mianowicie zbadanie obecności pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli w mleku matek oraz poszukiwanie współzależności między obecnością tych związków a wiekiem matek, masą ciała, liczbą porodów, czasem trwania laktacji, ilością porodów oraz nawykami żywieniowymi jak również określenie ryzyka zdrowotnego niemowląt, związanego z karmieniem naturalnym uważam za bardzo ważne i aktualne.

Chciałabym także podkreślić, że zadanie to było nie było łatwe, ponieważ wykrywanie i oznaczanie tego typu związków w materiale biologicznym ze względu na ich właściwości fizykochemiczne jest bardzo trudne. Trudne jest także przeprowadzenie właściwej i skutecznej ekstrakcji z materiału biologicznego. Kolejny problem to zebranie materiału do badań - mleka matek, co było szczególnie trudne w okresie zaraz po porodzie, kiedy każdy mililitr mleka jest bezcennym pokarmem dla dziecka. Należy podkreślić, że podjęte przez Doktorantkę badania są nowatorskie ponieważ w dostępnej literaturze brak jest danych na temat zawartości badanych związków w mleku matek zamieszkujących zachodnią Polskę. W niniejszej pracy po raz pierwszy podjęto próbę przeprowadzenia tak kompleksowych i obszernych badań.

Przedstawiona do oceny Rozprawa ma typowy układ, na który składają się: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie i wnioski, literatura, aneks,

streszczenie w języku polskim i angielskim. Nietypowo spis tabel i rysunków znajduje się na początku pracy. Praca nie zawiera natomiast spisu skrótów, co utrudnia jej czytanie, jakkolwiek sukcesywnie wyjaśniano skróty stosowane w poszczególnych rozdziałach. Praca została przedstawiona na 238 stronach, zawiera 26 tabel i 62 rysunki. Pomiędzy poszczególnymi częściami pracy zostały zachowane właściwe proporcje.

Bardzo szczegółowy przegląd piśmiennictwa przedstawiony przez Doktorantkę w pierwszej części pracy zawiera charakterystykę ogólną tzw. trwałych zanieczyszczeń organicznych w tym polichlorowanych bifenyli, pestycydów chloroorganicznych, wpływu związków chloroorganicznych na organizm człowieka, źródeł ksenobiotyków chloroorganicznych w mleku zwierzęcym i przetworach, zawiera także charakterystykę ksenobiotyków chloroorganicznych w mleku kobiecym, w produktach przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci oraz przepisy prawne dotyczące pozostałości ksenobiotyków chloroorganicznych. Na uwagę w tej części pracy zasługuje obszerny podrozdział poświęcony zagadnieniom narażenia płodu, niemowląt oraz małych dzieci na ksenobiotyki chloroorganiczne zawarte w mleku, w którym Doktorantka w sposób bardzo szczegółowy, ale i krytyczny przedstawiła dotychczasowe skutki działania na organizm tych związków. Bardzo przydatne w przeglądzie literatury są także sporządzone przez Doktorantkę tabele szczegółowo przedstawiające wzory strukturalne i sumaryczne badanych związków oraz ich właściwości. Ta część pracy świadczy o bardzo dobrej znajomości poruszanych w pracy zagadnień.

Rozdziały „Materiał i metody” zawiera dokładny opis grupy badanej, sposób pobierania i charakterystykę badanego materiału. Dobór grupy badanej i liczebność prób (560) są właściwe i nie budzą wątpliwości. Następnie Doktorantka bardzo szczegółowo przedstawia sposób analizy pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli techniką chromatografii gazowej, sprzężonej ze spektrometrią mas. Metoda badawcza zastosowana przez doktorantkę jest właściwa i nowoczesna. Zastosowane aparaty, materiały, odczynniki oraz parametry optymalizacji i kontroli nie budzą wątpliwości i wskazują na znakomite opanowanie warsztatu badawczego przez Doktorantkę. Ocena ryzyka zdrowotnego dzieci związana z narażeniem na pestycydy chloroorganiczne przeprowadzona poprzez oszacowanie parametrów: LADD (ang. Lifetime Average Daily Dose, Średnia Dzienna Dawka na Dobę) oraz HQ (ang. Hazard Quotient, Współczynnik Zagrożenia) zostały obliczone prawidłowo i nie budzą wątpliwości.

Doktorantka dokonała szczegółowego opisu metody rozdziału badanych związków. Szczegółowo opisała zastosowane parametry rozdziału chromatograficznego oraz charakterystykę aparatu. W dalszej części rozdziału Materiał i metody przedstawiła opis parametrów, które posłużyły do walidacji opracowanej metody, jak granica wykrywalności (DL) i granica oznaczalności (QL). Parametry oceniające metodę zostały dobrane prawidłowo i zostały prawidłowo scharakteryzowane równaniami matematycznymi. Opisy metodyczne wydają się być jasne i wystarczające dla ewentualnego powtórzenia badań przez kolejnych naukowców, chcących je powtórzyć lub kontynuować.

Kolejny rozdział „Wyniki” dowodzi bardzo dobrej znajomości warsztatu badawczego, olbrzymiego wkładu pracy i umiejętności interpretacyjnych niezbędnych do uzyskania założonych celów. Doktorantka opisała prawidłowo rezultaty swoich badań dokumentując je licznymi tabelami oraz wykresami. Do oceny statystycznej otrzymanych wyników Doktorantka zastosowała właściwe testy statystyczne: Anova poprzedzona testem jednorodności Levene’a oraz testem normalności Kołmogorova-Smirnova. W celu określenia współzależności pomiędzy badanymi zmiennymi wyznaczyła współczynniki korelacji i równania regresji. Do oceny istotności różnic zastosowała test Tuckeya.

Dyskusja dowodzi bardzo dobrej znajomości aktualnego piśmiennictwa dotyczącego analizowanego przez Doktorantkę tematu badawczego, zaś przedstawione wnioski stanowią przejrzystą odpowiedź na założone cele. Doktorantka wykryła obecność związków chloroorganicznych, tj. pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli w mleku matek zamieszkujących Szczecin oraz okolice. Przeprowadzona analiza ryzyka pozwoliła jednak cenić badany pokarm jako bezpieczny dla niemowląt. Doktorantka wykazała również, że wraz z wydłużającym się okresem laktacji następuje spadek zawartości zarówno non-orto, mono-orto, ndl-PCB, jak i pestycydów chloroorganicznych w mleku, przy czym największą pulę zgromadzonych w mleku polichlorowanych bifenyli niemowlę otrzymuje w pierwszych dwóch miesiącach życia, zaś DDT i HCH w pierwszym tygodniu. Jest to niezwykle cenna obserwacja, ważna również z klinicznego punktu widzenia. Autorka pracy wskazuje także na potencjalną możliwość obniżenia zawartości związków chloroorganicznych w mleku kobiecym przez stosowanie się kobiet oczekujących dziecka do określonych zaleceń żywieniowych, m. in. unikania nadmiernego spożycia ryb, zwłaszcza nieznanego pochodzenia oraz wyeliminowanie palenia tytoniu.

Piśmiennictwo obejmuje 401 pozycji polsko- i anglojęzycznych prawidłowo dobranych i cytowanych. Praca zawiera bardzo obszerny aneks, w którym Doktorantka umieściła 26 obszernych tabel. Praca została starannie przygotowana pod względem edytorskim i językowym, bardzo nieliczne są błędy edytorskie lub potknięcia stylistyczne.

Na koniec kilka drobnych uwag: 1) Doktorantka wielokrotnie używa sformułowania „pozostałości stężeń ksenobiotyków” np. str. 57 tworząc hipotezy badawcze i dalej cele badawcze („określenie ilościowe pozostałości, pestycydów chloroorganicznych oraz polichlorowanych bifenyli”) - należałoby uściślić czy oznaczane w pracy związki to pozostałości (które można traktować jako metabolity powstające w procesie detoksykacji wątrobowej) czy jak wskazują na to wyniki zaprezentowane w tabelach i rycinach jest to stężenie np. badanych PCB. 2) Doktorantka nie podaje czy uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej na prowadzone badania. 3) Spis tabel i rycin znajduje się na początku pracy, moim zdaniem powinien znajdować się raczej na końcu pracy, brak natomiast wykazu skrótów używanych w pracy, które powinny znaleźć się na jej początku. 4) W spisie tabel i rycin raczej nie podaje się źródeł w tytule (np. Rys.1.4 zawiera w podpisie nazwiska aż 10 autorów, co bardzo wydłuża niepotrzebnie tytuł w spisie i utrudnia czytanie pracy). 5) Brak wyjaśnienia skrótu CCA dotyczącego analizy redundancji str. 122. 5) Podrozdział w dyskusji: „Zawartość polichlorowanych bifenyli w mleku ludzkim a cechy matki i dziecka” str. 134 przedyskutowano jedynie cechy matki tj. wiek matki, masa ciała matki przed ciążą, miejsce zamieszkania itd. nie przedyskutowano cech dziecka. 6) Brak interpretacji danych żywieniowych w dyskusji. 7) Brak interpretacji danych zawartości badanych związków w mleku polskich matek, analiza została oparta na danych z innych krajów, być może z braku danych.

Powyższe uwagi w żadnej mierze nie umniejszają wartości pracy – zarówno pod względem merytorycznym jak i edytorskim. Praca wnosi nowe, cenne dane dotyczące zawartości zanieczyszczeń chloroorganicznych w mleku matek oraz związanego z tym ryzyka zdrowia niemowlęcia i jego rozwoju. Powyższe badania potwierdzają także konieczność prowadzenia ciągłego monitoringu zawartości ksenobiotyków chloroorganicznych w mleku ludzkim.

**Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania 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 z dnia 14.04.2003; ze zmianami Dz. U. Nr 64 z 2005 r.).**

Wnoszę do Wysokiej Rady Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Pohoryło do dalszych etapów przewodu doktorskiego i jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Z poważaniem



Dr hab., prof. PUM Irena Baranowska-Bosiacka

