

Lublin, 28.06.2023 r.

Prof. dr hab. Jose Luis Valverde Piedra
Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Nawrockiej pt. Ocena zawartości arsenu i jego form specjacyjnych w rybach i owocach morza (Assessment of the total arsenic and its species in fish and seafood samples), wykonana pod kierunkiem

Prof. dr hab. Andrzeja Posyniaka oraz Promotora pomocniczego

Dr hab. Anny Gajdy, profesor instytutu w Zakładzie Farmakologii

i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego,

Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) w 1996 r. uznała 19 pierwiastków śladowych za istotne z punktu widzenia zdrowia człowieka i wymienia wśród nich arsen. Przekroczenie stężeń tego pierwiastka w organizmach żywych, w tym i człowieka, może się wiązać z pojawieniem się wysokiej toksyczności. Na podstawie badań epidemiologicznych Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem uznała ten pierwiastek i jego związki za rakotwórcze, klasyfikując je do grupy 1 czynników kancerogennych dla ludzi.

Toksyczność arsenu wynika głównie z jego zdolności do uszkodzania układów enzymatycznych oraz wpływu na metabolizm komórkowy i możliwość wywoływania aberracji chromosomowych, indukowania stresu oksydacyjnego, upośledzenia procesów naprawy i metylacji DNA, zaburzeń czynników wzrostu, proliferacji komórkowej, amplifikacji genów czy supresji genu p53, którego zadaniem jest utrzymanie stabilności genomu.



Długotrwałe narażenie na arsen może zwiększać ryzyko rozwoju różnych rodzajów nowotworów, w tym nowotworów skóry, płuc, pęcherza moczowego i nerki. Arsen może powodować uszkodzenia narządów, takich jak wątroba, nerki, płuca i układ nerwowy. Może prowadzić do rozwoju chorób, takich jak marskość wątroby, nefropatia arsenowa i neuropatia.

Nagle i znaczne narażenie na duże dawki arsenu może prowadzić do ostrego zatrucia arsenem, które objawia się nudnościami, wymiotami, bólami brzucha, biegunką, gorączką, dusznościami oraz uszkodzeniem nerek i wątroby. W przypadkach ciężkiego zatrucia, może dojść do zawału serca, niewydolności oddechowej i śmierci. Narażenie na arsen w czasie ciąży może mieć negatywny wpływ na rozwój płodu, może prowadzić do poronień, wad wrodzonych, opóźnień w rozwoju umysłowym i fizycznym oraz zwiększonego ryzyka zachorowania na nowotwory w dzieciństwie.

Szczególnie ważne jest narażenie na arsen występującego w żywności wynikającego z naturalnej obecności tego pierwiastka w skorupie ziemskiej, w której uprawiane są rośliny, oraz przez zanieczyszczenia środowiska i przemysłowe emisje. Arsen może przenikać do żywności na różne sposoby, głównie poprzez absorpcję przez rośliny uprawne, a następnie przenikanie do łańcucha pokarmowego. W żywności pierwiastek ten może występować zarówno w formie organicznej jak i nieorganicznej. Organiczny arsen występuje w formie związków takich jak metyloarseniany i dimetyloarseniany, które są naturalnie obecne w niektórych morskich organizmach, jak np. ryby i skorupiaki. Nieorganiczny arsen jest bardziej toksyczny i może występować w niektórych wodach pitnych, owocach morza oraz niektórych roślinach, takich jak ryż.

Kraje Unii Europejskiej monitorują poziomy arsenu i podejmują działania mające na celu ograniczenia jego obecności w żywności, lecz brak jest unijnego systemu określenia maksymalnych dopuszczalnych stężeń tego pierwiastka i jego form w żywności pochodzenia zwierzęcego. Dlatego istotnym elementem w weterynaryjnej ochronie zdrowia publicznego jest zrozumienie w jakich formach arsen występuje w produktach żywnościowych, ponieważ nieorganiczne formy arsenu są zazwyczaj bardziej toksyczne od organicznych form. Nieorganiczny arsen, tak jak arsenin III i arsenin V, jest zwykle bardziej szkodliwy dla organizmów żywych i może prowadzić do poważnych problemów zdrowotnych, takich jak uszkodzenie narządów i nowotwory. Z drugiej strony, organiczne formy arsenu, takie jak metyloarseniany (MMA) i dimetyloarseniany (DMA), są uważane za mniej toksyczne.

Specjacja arsenu odnosząca się do procesu identyfikacji i analizy różnych form chemicznych tego pierwiastka obecnych w próbkach, takich jak gleba, woda, żywność czy próbki biologiczne jest istotna, ponieważ różne formy arsenu mogą mieć różne właściwości toksykologiczne. Badania te są istotne w wielu dziedzinach, w tym w kontroli jakości żywności, monitorowaniu środowiska, zdrowiu publicznym i ocenie ryzyka toksykologicznego. Pomagają naukowcom i organom regulacyjnym zrozumieć obecność, rozpowszechnienie i wpływ różnych form arsenu, co umożliwia podejmowanie odpowiednich działań w celu ochrony zdrowia i środowiska.

Wybór wciąż bardzo aktualnego tematu pracy przez Doktorantkę należy ocenić wysoko jako zasadny naukowo i pożądaný ze względu na możliwości wykorzystania uzyskanych wyników do opracowania wytycznych kontroli zawartości arsenu i jego form w żywności pochodzenia zwierzęcego w ramach weterynaryjnej ochrony zdrowia publicznego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **mgr Agnieszki Nawrockiej** została napisana w języku polskim i przedstawiona do recenzji w postaci wydruku komputerowego na 159 stronach formatu A4. Dysertację przedstawiono w układzie zawierającym spis treści, a w nim, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie, cel badań, materiał i metody, przebieg i wyniki badań, dyskusja, podsumowanie i wnioski, streszczenie w języku polskim i w języku angielskim (abstract), piśmiennictwo i załączniki.

Rozprawa zawiera 17 rycin, 24 tabele i 167 pozycji piśmiennictwa w większości w języku angielskim, z czego 70 % pochodzi z ostatnich 10 lat. Szata graficzna dysertacji jest staranna i estetyczna. Praca została napisana poprawnym językiem i zrozumiale.

Wstęp zajmuje 38 stron i zawiera przegląd piśmiennictwa wzbogacony o sześć tabel i jedną rycinę. Rozdział ten zawiera solidne podstawy teoretyczne, w których Doktorantka obszernie omówiła charakterystykę arsenu i jego związków oraz ich właściwości toksyczne, a także znaczenie oceny narażenia na arsen w kontekście żywności. Dokładnie przedstawiła istniejącą legislację dotyczącą As w żywności i wskazała na potrzebę przeprowadzenia analiz specjacyjnych dla dokładniejszej oceny zagrożenia. Ponadto w podrozdziale oceniającym narażenie na As drogą pokarmową stwierdziła, że badania kontrolne wykazały wyższą zawartość tego pierwiastka w mięśniach ryb morskich importowanych niż u ryb słodkowodnych hodowanych w Polsce. W tym rozdziale wprowadza i wyczerpująco przedstawia również zagadnienie analizy specjacyjnej As,



prezentując wybrane metody stosowane w badaniach oraz techniki wykorzystywane w tej analizie. W końcu rozdziału, Doktorantka omówiła znaczenie arsenu i jego form specjacyjnych w rybach i owocach morza, wskazując na ich rolę w łańcuchu pokarmowym.

Jako cel pracy Doktorantka postawiła sobie opracowanie i walidację metody oznaczania całkowitej zawartości As przy użyciu techniki spektrometrii mas z jonizacją w plazmie wzbudzonej indukcyjnie (ICP-MS) oraz metody identyfikacji i oznaczania ilościowego poszczególnych form As w rybach i owocach morza z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z jonizacją w plazmie wzbudzonej indukcyjnie (HPLC-ICP-MS). Autorka skupiła się na wybranych gatunkach ryb i owoców morza, aby przeprowadzić ocenę narażenia konsumentów na As poprzez spożycie tych produktów.

Do osiągnięcia tego celu Doktorantka postanowiła:

- Opracować i optymalizować metody oznaczania arsenu całkowitego w mięśniach ryb i owoców morza przy użyciu ICP-MS przy odpowiednim doborze parametrów detekcji oraz sposobu przygotowania próbek.
- Opracować i optymalizować analizę specjacyjną arsenu poprzez odpowiedni dobór warunków detekcji i rozdzielania chromatograficznego oraz sposobu przygotowania próbek w mięśniach ryb i owoców morza przy zastosowaniu HPLC-ICP-MS.
- Walidować oraz weryfikować wiarygodność wyników uzyskiwanych z zastosowaniem opracowanych procedur badawczych poprzez analizę certyfikowanych materiałów odniesienia oraz udział w krajowych i międzynarodowych badaniach biegłości.
- Ocenąć zawartość całkowitą oraz dokonać analizę specjacyjną arsenu w wybranych gatunkach ryb i owoców morza.
- Ocenąć narażenie konsumentów na toksyczne związki arsenu obecne w mięśniach wybranych gatunków ryb i owoców morza.

W rozdziale Materiały i Metody wynoszącym 9 stron, zawarte są eksperymentalne aspekty przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. W ramach tego rozdziału omówiła użyte wzorce chemiczne, materiały odniesienia, odczynniki i gazy. Opisała także zastosowaną aparaturę pomiarową oraz sprzęt laboratoryjny. W sekcji tej również przedstawiła informacje na temat materiału badawczego, szczegółowo opisała proces



przygotowania próbek do badań, sporządzenia roztworów wzorcowych, roztworów do analizy całkowitej zawartości arsenu, roztworów do analizy specjacyjnej, a także metod oznaczania zawartości As w materiale biologicznym oraz analizę specjacyjną arsenu w rybach i owocach morza, a także walidację procedur badawczych. W rozdziale tym również uwzględniła analizę statystyczną wyników badań. Zastosowała test Shapiro-Wilka do sprawdzenia normalności rozkładu uzyskanych wyników oraz test nieparametryczny Kruskala-Wallisa a następnie Dunna do określenia statystycznie istotnych różnic między stężeniami badanych związków.

Szczegółowe przedstawienie procedur metodycznych, zawartych w tym rozdziale, z łatwością pozwoli osobie biegłej w technikach analitycznych z udziałem HPLC-ICP-MS odtworzyć badania.

Rozdział „Przebieg i wyniki badań” zajmuje 38 stron i zawiera opis procedur oraz wyniki analiz umieszczonych w osiemnastu tabelach i szesnastu rycinach. Doktorantka opisuje przebieg opracowania procedury oznaczania całkowitej zawartości As w rybach i owocach morza z zastosowaniem techniki ICP-MS. W szczególności, dobrała optymalnych warunków analizy przy użyciu ICP-MS oraz procowała sposób postępowania z próbką z wykorzystaniem mineralizacji mikrofalowej w układzie zamkniętym oraz przedstawiła wyniki walidacji procedury oznaczania całkowitej zawartości arsenu w rybach i owocach morza. W dalszej części tego rozdziału Doktorantka opisała przebieg opracowania metody analizy specjacyjnej arsenu w rybach i owocach morza, ich optymalizacji oraz walidacji. Opisała proces walidacji procedury badawczej, zaś wiarygodność uzyskiwanych wyników badań sprawdziła poprzez analizę certyfikowanych materiałów odniesienia oraz udział w krajowych i międzynarodowych badaniach PT/ILC.

Procedury analityczne przeszły kompleksową walidację zgodnie z wymogami przewodnika Eurachem oraz normy PN-EN ISO/IEC 17025. Podczas walidacji Doktorantka przeprowadziła szereg eksperymentalnych pomiarów i ocen, które obejmowały analizę roztworów wzorcowych, próbki ślepej (blank) oraz wzorców certyfikowanych (CRM) o znanym stężeniu analitu. W procesie walidacji oceniła różne parametry, takie jak liniowość, granica wykrywalności (LOD), granica oznaczalności (LOQ), powtarzalność, odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna, poprawność/odzysk oraz niepewność wyników badań. Każdy z tych parametrów szczegółowo opisała i oceniła na podstawie wyników pomiarów oraz odpowiednich statystyk. Dodatkowo, kontrola jakości prowadzonych analiz zweryfikowała zarówno na poziomie wewnętrznym jak



i zewnętrznym. Wewnętrzna kontrola jakości obejmowała analizę materiałów odniesienia (CRM, SRM, BCR) oraz próbek wzbogaconych, podczas gdy zewnętrzna kontrola jakości polegała na udziale w porównaniach międzylaboratoryjnych i/lub badaniach biegłości.

W końcowej części rozdziału Doktorantka zaprezentowała wyniki ocenę narażenia i ryzyka zdrowotnego, osoby dorosłej i dziecka na związki nieorganiczne arsenu, w oparciu o model opracowany przez Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (US EPA).

Obliczenia wykonała przy założeniu, że wnikanie As (As(III)+As(V)) do organizmu następuje drogą pokarmową przez okres 70 lat oraz 6 lat, odpowiednio dla osoby dorosłej oraz dziecka spożywających ryby słodkowodne, morskie oraz wybrane gatunki małż. Określiła charakterystykę ryzyka rakotwórczego będącą miarą prawdopodobieństwa zachorowania na raka w wyniku narażenia na analizowaną substancję o działaniu kancerogennym w okresie całego życia człowieka oraz charakterystykę ryzyka nie rakotwórczego przedstawiany w postaci ilorazu zagrożenia (THQ) wskazującego prawdopodobieństwo wystąpienia negatywnych skutków zdrowotnych w wyniku długotrwałego narażenia wynikające z pobierania As wraz z mięsem ryb i/lub owoców morza.

Należy podkreślić, że prezentowane „Wyniki” potwierdzają, że autorka bardzo dobrze opanowała warsztat badawczy i swobodnie posługuje się nowoczesnymi technikami analitycznymi.

W rozdziale „Dyskusja” doktorantka na 15 stronach skonfrontowała swoje wyniki z wynikami uzyskanymi przez innych autorów i w jasny sposób wyeksponowała oryginalne wyniki własne, co dowodzi dobrego opanowania tematyki badawczej i odczytania, oraz umiejętności kierowania logicznym wywodem, w którym ważne miejsce pełni celne dobieranie argumentów z piśmiennictwa naukowego. Informacje zawarte w tym rozdziale z pewnością przyczynią się do lepszego zrozumienia problematyki związanej z As znajdującym się w mięsie rybnym oraz owocach morza wraz z zapewnieniem informacji istotnych dla oceny bezpieczeństwa żywności.

Opracowana przez Doktorantkę metoda oznaczania As w rybach i owocach morza (ICP-MS i HPLC-ICP-MS) umożliwia precyzyjne określenie zawartości całkowitego arsenu (tAs) oraz form specjacyjnych As. Wyniki analiz wykazały dominację arsenobetainy i różnice w zawartości form As między gatunkami. Narażenie na As



związane ze spożyciem tych produktów u osób dorosłych jest generalnie niskie, zaś ryzyko narażenia jest większe u dzieci.

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka sformułowała 11 wniosków końcowych podkreślających wagę włączenia do badań monitoringowych analizę specjacyjną As w rybach i owocach morza.

W Załącznikach 1 i 2 Doktorantka zawarła odpowiednio Procedurę badawczą ZFT/PB/05-08 „Oznaczanie zawartości pierwiastków w materiale biologicznym metodą spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej” i Procedurę badawczą ZFT/PB/05-09 „Oznaczanie form specjacyjnych arsenu w materiale biologicznym metodą spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej”.

Podsumowując, praca mgr inż. Anny Nawrockiej jest starannie przygotowaną rozprawą doktorską, która wnosi wartościowy wkład w dziedzinę Toksykologii. Autorce udało się przeprowadzić kompleksowe badania, dostarczając istotnych informacji na temat zawartości arsenu i jego form specjacyjnych w rybach i owocach morza. Praca ta wykazuje solidne fundamenty teoretyczne, staranność w doborze metod badawczych oraz umiejętność analizy i interpretacji wyników. Jestem przekonany, że ta rozprawa ma znaczący wkład w rozwój nauki. Gratuluję Autorce pracy oraz obu promotorom za osiągnięcia i wspólną pracę nad tym ważnym tematem.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na drobne uchybienia edytorskie zauważone przeze mnie podczas czytania rozprawy, które powinny zostać poprawione przy oddaniu pracy do druku.

W rozdziale materiał i metody w stronach 46 i 47 punkty 3.1 Wzorce chemiczne i materiały odniesienia, 3.2 Odczynniki i gazy i 3.3 Aparatura pomiarowa i sprzęt laboratoryjny mają formę tabelaryczną i wobec tego należałoby je nazwać tabelami.

W rozdziale Przebieg i wyniki badań, na stronach 55-74, od punktu 4.1 do 4.2.3 włącznie Doktorantka zamieściła informacje, które są opisem procedur i jako takie powinny one znaleźć się w rozdziale „Materiał i metody”.

W wykazie załączników na stronie 133 Autorka błędnie podała nazwy procedury badawczej, powinno być „Procedurę badawczą ZFT/PB/05-09 „Oznaczanie form specjacyjnych arsenu w materiale biologicznym metodą spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej” a jest „Oznaczanie zawartości pierwiastków w materiale biologicznym metodą spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej”.



Wniosek końcowy

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską mgr Agnieszki Nawrockiej uważam, że autorka pracy posiadała wymaganą znajomość warsztatu metodycznego, potrafi te umiejętności odpowiednio wykorzystać w pracy analitycznej, a otrzymane wyniki logicznie zinterpretować. W moim przekonaniu praca dokumentuje ważne zagrożenie ekspozycji ludzi na toksyczne działanie arsenu i jego związków obecnych w łańcuchu żywnościowym, a uwagi krytyczne dotyczą jedynie usterek redakcyjnych i nie umniejszają wysokiej wartości naukowej dysertacji.

Mając powyższe na uwadze pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Agnieszki Nawrockiej pt. „Ocena zawartości arsenu i jego form specyjalnych w rybach i owocach morza”, w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom doktorskim, określonych w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z zmianami)” i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynarii, Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr Agnieszki Nawrockiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny oraz ważny charakter recenzowanej dysertacji wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

