



Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa w Płocku

REKTOR

prof. nadzw. dr hab. n. med. Maciej Słodki

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. Anetty Karwackiej

**pt.: „Wpływ narażenia na powszechnie występujące związki środowiskowe
zaburzające funkcję endokrynną na rezerwę jajnikową”**

Recenzja została wykonana na podstawie pisma Dyrektora Instytutu Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera, Prof. dr. hab. n. med. Konrada Rydzyńskiego, z dnia 20 sierpnia 2018 r. Promotorem pracy jest dr hab. prof. IMP Joanny Jurewicz.

Ocena formalna pracy

Przedłożona do recenzji dysertacja liczy 169 ponumerowanych stron, zawarto w niej 11 tabel, 4 ryciny i 195 pozycji literaturowych. Pracę doktorską rozpoczyna spis treści, definicje i wykaz skrótów. Praca zawiera, wraz z załącznikami, 13 rozdziałów. Rozdział 11. i 12. to streszczenie w języku polskim i angielskim. We wstępie Doktorantka przedstawia doniesienia literaturowe dotyczące badanego problemu oraz uzasadnienie wyboru tematyki badawczej. Układ pracy lek. Anetty Karwackiej spełnia kryteria schematu pisania prac doktorskich oraz zawiera wszystkie niezbędne rozdziały. Praca bardzo wyraźnie została podzielona na część literaturową i część związaną z badaniami własnymi. Rozdział 2. i 3. stanowi przegląd literaturowy. Kolejne rozdziały w całości poświęcone zostały badaniom prowadzonym przez Doktorantkę. W rozdziałach tych przedstawiono problem badawczy, cel pracy, zakres podjętych analiz wraz z opisem metodyk badawczych oraz rezultaty przeprowadzonych badań wraz z dyskusją. Całość pracy jest bardzo dobrze dopracowana edytorsko i redakcyjnie. Strona graficzna recenzowanej

Biuro Rektora

Plac Dąbrowskiego 2, 09-402 Płock

tel. 24 366 54 20

e-mail: rektor@pwszplock.pl

rozprawy jest poprawna. Tabele i ryciny są czytelne. Podsumowując, praca pod względem edytorskim jest przygotowana starannie i zawiera wszystkie niezbędne elementy pracy doktorskiej, zgodnie z art.13 ust. 6 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. Ustaw Nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Ocena merytoryczna pracy

Wstęp pracy jest dość obszerny, liczy ponad 33 strony. Doktor Karwacka słusznie uzasadnia konieczność prowadzenia badań w danym temacie, przedstawiając skalę problemu zarówno w Polsce, Europie, jak i na świecie. W kolejnym etapie nawiązuje do powszechnie występujących związków chemicznych zaburzających funkcję endokrynną, które są uważane aktualnie za jeden z głównych czynników niepłodności, obok czynnika wieku, w którym kobiety podejmują decyzję o prokreacji, jak i wpływu stylu życia. Doktorantka, powołując się na opinie licznych towarzystw naukowych, polskich i zagranicznych, wskazuje, że narażenie na szeroko rozpowszechnione w środowisku substancje, zwane egzogennymi związkami endokrynnymi, inaczej substancjami zaburzającymi funkcjonowanie układu hormonalnego, określanymi w języku angielskim jako „endocrine disruptors” lub „endocrine disrupting chemicals” (EDCs) negatywnie wpływa na zdrowie reprodukcyjne zwierząt i ludzi oraz że obecność ich jest powiązana z niektórymi chorobami, w tym również z niepłodnością, co niestety jest do tej pory stosunkowo słabo poznane.

Jako główne markery potencjału rozrodczego u kobiet Doktorantka wskazuje: wiek, rezerwę jajnikową ocenianą przy pomocy badań ultrasonograficznych i biochemicznych FSH (hormon folikulotropowy) oraz AMH (hormon anty-Müllerowski), a także funkcjonowanie układu podwzgórze przysadka - jajnik.

Kolejny akapit wprowadza nas w skalę i zakres problemu, Doktorantka pisze o wzroście światowej aktywności przemysłowej doprowadzającej do zwiększenia ekspozycji ludzi na szeroką gamę nowoczesnych substancji chemicznych, takich jak: ftalany, parabeny, bisfenol A, triklosan i wiele innych. Związki te, w wyniku masowej produkcji użytkowej, znajdują się powszechnie w środowisku, a narażenie na kontakt z nimi następuje poprzez pożywienie, wodę, powietrze, plastiki czy kosmetyki. Związki te występują w produktach codziennego użytku, takich jak: plastikowe butelki, puszki z żywnością, detergenty, kosmetyki, zabawki czy pestycydy. W ostatnim akapicie rozdziału 2. Doktorantka uzasadnia podjęcie tematu badawczego, pisząc, że większość dostępnych

danych z literatury to ocena wpływu ekspozycji wybranych egzogennych związków endokrynych w odniesieniu do wyników ciąży lub płodności mężczyzn. Ze względu na fakt, że płodność u kobiet jest trudna do oceny i może być potwierdzona jedynie przez uzyskanie ciąży, tylko kilka badań dotyczy kwestii narażenia na czynniki środowiskowe i ich potencjalnego wpływu na płodność kobiet.

W części 3. wstępu Doktorantka bardzo szczegółowo przedstawia czynniki środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną (EDCs) i ich wpływ na rezerwę jajnikową. Dokładnie opisuje najczęściej występujące (bisfenol A, triklosan, parabeny, pyretroidy) substancje chemiczne z grupy zaburzających funkcję endokrynną. Związki te wobec masowej produkcji użytkowej znalazły się powszechnie w środowisku. Narażenie następuje poprzez kontakt z tymi związkami w pożywieniu, wodzie, powietrzu, poprzez kontakt z plastikami czy kosmetykami. Związki te występują w produktach codziennego użytku takich jak: plastikowe butelki, puszki z żywnością, detergenty, kosmetyki, zabawki, czy pestycydy.

W podrozdziale 3.2 możemy przeczytać o dopuszczalnej ekspozycji na wybrane EDCs oraz o rozbieżnościach dotyczących bezpieczeństwa, w informacjach podawanych przez różne światowe organizacje. W dalszej części czytamy o rozwoju gonady żeńskiej i regułach ustanowienia rezerwy jajnikowej, która, co słusznie zostaje podkreślone przez Doktorantkę, zostaje ustalona już w życiu prenatalnym. Kolejne akapity poświęcone są sposobom oceny rezerwy jajnikowej oraz przybliżają nam funkcję i sposoby działania poszczególnych związków. Podrozdział 3.3 kończy się stwierdzeniem o bezspornym ograniczeniu wszystkich metod oceny rezerwy jajnikowej, w związku z faktem, że nie dostarczają one informacji o liczbie potencjalnie prawidłowych pęcherzyków jajnikowych z kompetentnym oocytem.

Kolejny podrozdział wstępu dotyczy mechanizmów działania wybranych związków środowiskowych zaburzających funkcję endokrynną na gonadę żeńską i rezerwę jajnikową kobiet. W tej liczącej 10 stron części Doktorantka analizuje doniesienia naukowe licznych autorów, cytując najnowszą literaturę i wyniki badań.

Treść kolejnego podrozdziału przedstawiającego stan wiedzy o wpływie wybranych czynników środowiskowych zaburzających funkcję endokrynną na potencjał rozrodczy kobiet i rezerwę jajnikową powinna raczej znaleźć się w dyskusji i być od razu odniesiona do wyników badań Doktorantki, które dotyczą właśnie tego problemu, skróciłoby to trochę liczący ponad 33 strony wstęp i wzbogaciło dyskusję.

Podsumowując omówienie tej części pracy, warto podkreślić, że Autorka udowadnia, iż jest bardzo dobrze przygotowana do podjęcia wybranego tematu badawczego.

W rozdziale 4. Doktorantka formułuje problem badawczy i stawia hipotezę o badanych związkach chemicznych i ich wpływie na rezerwę jajnikową poprzez modulowanie układu endokrynnego.

W rozdziale 5. zostały przedstawione cele pracy. Celem ogólnym jest ocena wpływu ekspozycji środowiskowej na badane związki chemiczne zaburzające funkcje endokrynnie na rezerwę jajnikową kobiet. Trzy cele szczegółowe dotyczą:

1) Oceny płodności kobiet poprzez badanie rezerwy jajnikowej:

a) liczby pęcherzyków antralnych (ACF) (ang. Antral Follicle Count);

b) stężenia AMH (Anti-Müllerian Hormon);

b) stężenia hormonów: FSH (hormon folikulotropowy), estradiol.

2) Oceny narażenia na nietrwałe czynniki środowiskowe - ocena stężenia w moczu (dwukrotnie)

a) parabenów - (metylowego, etylowego, propylowego, butylowego, izobutylowego);

b). wybranych metabolitów pyretroidów

c). bisfenolu A;

d). triklosanu.

3) Oceny czynników związanych ze stylem życia (palenie, spożywanie alkoholu, aktywność fizyczna, dieta, stres) i narażeń w pracy zawodowej, które zostaną uwzględnione w analizie, jako potencjalne czynniki zakłócające.

W rozdziale dotyczącym materiału i metodyki lek. Karwacka dokładnie opisuje kryteria doboru i wykluczenia z badania. Po kwalifikacji i uzyskaniu zgody na wzięcie udziału w badaniu pacjentki wypełniały specjalny kwestionariusz. Badaniem objęto imponującą grupę 511 kobiet wieku 24-39 lat.

Informacje o badanej grupie kobiet Doktorantka pozyskała z kwestionariuszy, takich jak kwestionariusz do Subiektywnej Oceny Pracy do oceny stresu zawodowego, skala Odczuwanego Stresu posłużyła do oceny stresu życiowego. Oceniano również dietę, za pomocą kwestionariusza dotyczącego częstości spożywania wybranych produktów (FFQ- Food Frequency Questionnaire). Ocena aktywności fizycznej została dokonana na podstawie kwestionariusza Seven Day Physical Activity Recall. Natomiast ocenę środowiska pracy wykonano na podstawie kwestionariusza narażeń i pracy zawodowej przygotowanego w Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi.

Rezerwa jajnikowa została oceniona za pomocą badania: liczby pęcherzyków antralnych (ACF) (ang. Antral follicle count); stężenia hormonu AMH (Anti-Müllerian Hormone) i hormonu FSH (hormon folikulotropowy) na początku cyklu oraz stężenia estradiolu również na początku cyklu. Ocena ekspozycji na wybrane czynniki środowiskowe była badana w próbkach moczu przy pomocy oznaczeń nietrwałych zanieczyszczeń organicznych, takich jak: metabolity pyretroidów, całkowitego stężenia parabenów, bisfenolu A czy triklosanu. Izolacja analitów z matrycy przeprowadzona była z zastosowaniem półautomatycznej mikroekstrakcji do fazy stałej (Micro-Extraction by Packed Syringe - MEPS), ekstrakty zostały poddane derywatywacji i analizie z użyciem chromatografii gazowej z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS).

Analiza statystyczna została wykonana przy użyciu pakietu statystycznego R (ver.3) (R Core Team, 2016). Przyjęto poziom istotności statystycznej $p=0,05$. Doktorantka na badanie uzyskała zgodę Komisji Bioetycznej działającej przy Instytucie Medycyny Pracy w Łodzi - Uchwała nr 23/2014 z dnia 04.11.2014.

W rozdziale 7. Doktorantka przedstawia wyniki, w Tabeli 1. widzimy ogólną charakterystykę badanej populacji, którą, jak już pisałem, tworzyło 511 pacjentek kliniki leczenia niepłodności, które wyraziły zgodę na udział w badaniu. Tabela 2. przedstawia wyniki oceny rezerwy jajnikowej. Liczba pęcherzyków antralnych u badanych kobiet mieściła się w granicach normy, natomiast stężenie AMH było nieznacznie wyższe niż norma. W przypadku FSH i estradiolu średnie stężenie mieściło się w granicach norm dla tych hormonów.

Wyniki przeprowadzonego przez Doktorantkę badania są dowodem, że osoby uczestniczące w badaniu były środowiskowo ekspozowane na badane czynniki środowiskowe zaburzające funkcję endokrynną. Porównanie średnich stężeń wybranych związków środowiskowych w pierwszym i drugim badaniu moczu przedstawia Tabela 3. oraz Ryciny 2, 3 i 4.

Dalsze badanie dotyczy oceny zależności między narażeniem na wybrane czynniki środowiskowe a rezerwą jajnikową badanych kobiet. Wykazano, że stężenie parabenu propylowego i butylowego wpływało na obniżenie liczby pęcherzyków antralnych. Również narażenie na bisfenol A wpływało negatywnie na liczbę pęcherzyków antralnych. Nie wykazano natomiast związku między narażeniem na inne badane parabeny (etylowy, metylowy, izobutyłowy), triklosan i syntetyczne pyretroidy a liczbą pęcherzyków antralnych. Analiza pozostałych badanych związków, m.in.. syntetycznych pyretroidów hormonów (AMH, FSH, estradiol), metyl-parabenu, izobutyl-parabenu i triklosanu nie wykazała

istotnego związku. Oceniając narażenie jako zmienną kategorialną, wykazano, że stężenie parabenu propylowego w moczu w drugim i trzecim percentylu wpływało na zmniejszenie liczby pęcherzyków antralnych. Również stężenie bisfenolu A i parabenu butylowego w trzecim i czwartym kwartylu obniżało liczbę pęcherzyków antralnych. Natomiast stężenie bisfenolu A w czwartym kwartylu wpływało negatywnie na stężenie AMH, a stężenie propyl-parabenu w drugim i trzecim kwartylu zwiększało stężenie FSH. W przypadku estradiolu, zaobserwowano obniżenie stężenia tego hormonu w drugim i trzecim kwartylu narażenia na etyl-paraben oraz w drugim kwartylu narażenia w przypadku propyl-parabenu. Nie wykazano ponadto związku między narażeniem na inne badane parabeny (metylowy, butylowy i izbutylowy), triklosan i syntetyczne pyretroidy w drugim, trzecim i czwartym kwartylu narażenia a liczbą pęcherzyków antralnych i stężeniem badanych hormonów. Wszystkie zebrane wyniki Doktorantka przedstawiła w 11 czytelnych Tabelach i 4 Rycinach.

W dyskusji Doktorantka uzasadnia słuszność doboru oznaczeń do oceny rezerwy jajnikowej i jej wpływu na płodność kobiet. Prowadzi dyskusję z autorami prowadzonych wcześniej podobnych badań, porównując uzyskane przez siebie wyniki. Porusza zagadnienie ograniczenia wynikającego z braku danych z okresu prenatalnego (między innymi ekspozycji na EDCs i innych niekorzystnych czynników) oraz z faktu, że oogeneza jest złożonym procesem, którego początki sięgają życia płodowego. Ponadto, krytyczne okresy dla ekspozycji mogą być wielokrotne, co sprawia, że ocena zmian ilości i jakości oocytów wynikających z takich ekspozycji stanowi poważne wyzwanie epidemiologiczne.

W okresie prokreacyjnym, w celu stworzenia środowiska endokrynnego sprzyjającego przeżyciu i wzrostowi oocyta, wymagana jest złożona dwukierunkowa sygnalizacja między różnymi miejscami strategicznymi (obejmującymi jajnik, przysadkę i podwzgórze) oraz między komórką jajową i jej podtrzymującą linią komórek ziarnistych. Przewlekła ekspozycja na powszechnie występujące czynniki środowiskowe w niskich lub wysokich dawkach może zakłócać dowolne z tych istotnych interakcji i może zakłócać sygnalizację pomiędzy oocytami a komórkami ziarnistymi, ostatecznie popychając oocyt na szlak apoptozy.

Kolejnym ograniczeniem jest niewątpliwie ocena rezerwy jajnikowej wśród kobiet z kliniki leczenia niepłodności. Mimo że osoby kwalifikowane do badania nie były obarczone czynnikami wpływającymi na obniżenie rezerwy jajnikowej, wyników nie można odnieść do kobiet z populacji ogólnej. Dodatkowo, trudno by było znaleźć grupę kobiet z populacji

generalnej, które miałyby oznaczoną rezerwę jajnikową, gdyż nie jest to badanie przesiewowe zalecane kobietom z populacji generalnej.

Przeprowadzone badanie epidemiologiczne jest pierwszą w Polsce analizą oceniającą wpływ narażenia na związki endokrynnie czynne (bisfenol A, triklosan, parabeny, syntetyczne pyretroidy) na rezerwę jajnikową, będącą swego rodzaju „wskaźnikiem wieku płodnego” u kobiet. Przewagą badania, nad dotychczas opublikowanymi pracami, jest proponowana po raz pierwszy ocena narażenia na wiele czynników środowiskowych, zrekrutowanie znacząco większej grupy badanej, uwzględnienie czynników zakłócających oraz dwukrotny pomiar ekspozycji w odstępie czasowym (co w przypadku związków, które mają krótki okres połowicznego rozkładu ma ogromne znaczenie).

Badanie przeprowadzono w jednym ośrodku, a wszystkie próbki moczu zebrano i przetworzono w oparciu o jeden protokół przed określeniem parametrów rezerwy jajnikowej. Badanie dotyczyło względnie dużej populacji kobiet. Wszystkie oznaczenia czynników środowiskowych i pomiary stężeń badanych hormonów były wykonywane przez to samo laboratorium, przy użyciu tej samej metodyki. Badanie ilości pęcherzyków antralnych było przeprowadzone zgodnie z rekomendacjami. W celu zminimalizowania zmienności "między operatorami", badania były przeprowadzone wyłącznie przez lekarzy pracujących w tym samym ośrodku, certyfikowanych w zakresie badań USG w ginekologii i przeszkolonych w zakresie oceny AFC zgodnie z tymi samymi wytycznymi.

Do tej pory w literaturze światowej ukazały się pojedyncze badania dotyczące wybranych czynników środowiskowych i ich wpływu na rezerwę jajnikową kobiet, zatem prezentowane badanie będzie stanowiło istotny wkład w stan wiedzy dotyczącej wpływu powszechnie występujących czynników środowiskowych na rezerwę jajnikową kobiet.

Obecnie wiele kobiet odracza świadomie decyzję o prokreacji lub zмага się z przedwczesnym obniżaniem się rezerwy jajnikowej i z problemem niepłodności, dlatego tak ważna jest tematyka prezentowanego badania. W dyskusji zabrakło natomiast prezentacji własnych przemyśleń Doktorantki na badany temat, jak również ewentualnych zaleceń odnośnie wykorzystania uzyskanych przez Autorkę wyników.

Wnioski podsumowujące w liczbie 5 są wystarczająco udowodnione i w całości wynikają z przeprowadzonego badania. Bogate, liczące 195 pozycji piśmiennictwo to w większości najnowsze prace, publikowane w czasopiśmie z listy filadelfijskiej.



Podsumowanie i wnioski końcowe

Temat pracy podjęty przez Doktorantkę uważam za bardzo ciekawy i ważny, ponieważ większość badanych związków znajduje się w produktach codziennego użytku, takich jak produkty do higieny osobistej, produkty spożywcze, leki, detergenty i środki ochrony osobistej, a ich wpływ na nasze zdrowie nie jest do końca wyjaśniony. Ze względu na fakt, że są to związki nietrwałe, ich jednokrotne oznaczenie w moczu często może nie odzwierciedlać rzeczywistego narażenia, dlatego prowadzenie tego typu badań jest zarówno bardzo czasochłonne, jak i kosztochłonne. Kolejnym ograniczeniem jest niewątpliwie fakt, że związki te należą do grupy nietrwałych substancji organicznych, które są szybko metabolizowane i wydalane z organizmu. Myślę, że praca lek. Karwackiej stanie się bodźcem do rozważań nad metodami ograniczenia wpływu badanych substancji na nasze zdrowie.

Zgodnie z zapisami przedstawionymi w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, rozprawa doktorska „...powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego lub oryginalne dokonanie artystyczne oraz wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dyscyplinie naukowej lub artystycznej oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej”. Recenzja przedstawionej pracy doktorskiej pozwala stwierdzić, iż w tym przypadku wszystkie wspomniane warunki zostały spełnione. Chciałbym w tym miejscu podkreślić, iż weryfikacja postawionych celów wymagała przeprowadzenia szeregu czasochłonnych i pracochłonnych analiz, z których Doktorantka wywiązała się bardzo dobrze.

Uważam, że recenzowana praca Pani Anetty Karwackiej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim (ustawa z dnia 14 marca 2003 r., Dz. Ustaw Nr 65, poz. 595 z późn. zm.) i wnoszę o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W związku z tym, że praca prezentuje wysoki poziom, biorąc pod uwagę rangę rozwiązywanego problemu oraz zakres i jakość badań, wyróżnia się oryginalnością zastosowanych metod i narzędzi badawczych oraz posiada szczególne walory poznawcze, wnoszę również o jej wyróżnienie.

REKTOR
prof. nadzw. dr hab. n. med. Maciej Słodki