



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD FARMAKOLOGII DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

Prof. dr hab. n. med. Andrzej Członkowski

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr. Krzysztofa Kaszkowiaka pt. „Ocena zagrożeń zdrowotnych związanych z glifosatem na podstawie jego zawartości w wodzie pitnej i w modelu eksperymentalnym *in vitro*”

Od wielu lat trwają spory dotyczące szkodliwości glifosatu dla ludzi, zwierząt i środowiska. Jest on substancją służącą między innymi do łatwego, nieselektywnego i stosunkowo taniego niszczenia chwastów. Wprawdzie glifosfat został zatwierdzony przez Komisję Europejską do stosowania w środkach ochrony roślin, jednak decyzje mają obowiązywać do 15. 12. 2022 roku, dobrze się stało, że Doktorant podjął się badań w tym kierunku.

Rozprawa doktorska ma układ typowy, liczy 85 stron maszynopisu w tym 16 tabel i 16 rycin. Zawiera kolejno wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cel pracy, materia w metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie, abstract, piśmiennictwo oraz informacje dotyczące aktywności naukowej autora.

W interesującym wstępie zostały przedstawione między innymi informacje dotyczące zastosowania glifosatu jako herbicydu, preparaty handlowe na jego bazie. Wpływ glifosatu na organizm człowieka ze szczególnym zwrócenie uwagi na potencjalne drogi ekspozycji ludzi na glifosat, narażenie związane z żywnością oraz wpływem na organizm człowieka. Właściwością tego preparatu budzącą obawy jest jego trwałość w glebie i możliwość przenikania do wód. Autor omówił również wyniki wskazujących na szkodliwe działanie tego preparatu w tym aktywność kancerogenną i potencjalne działanie jako związku endokrynnie czynnego. Ważnym podsumowaniem wstępu są aktualne kontrowersje dotyczące różnych wyników wpływu ekspozycji ludzi na glifosat.

Celem pracy było oszacowanie wielkości skażenia glifosatem wody wodociągowej z ujęć na terenie Wielkopolski i próba oceny jak stężenia tego związku porównywalne z wykrytymi w wodzie, mogą wpływać na wybrane reakcje komórek krwi obwodowej *in vitro*.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. ocenę występowania glifosatu w wodzie wodociągowej z ujęć na terenie Wielkopolski
2. ocenę wpływu niskich stężeń glifosatu na produkcję reaktywnych pochodnych tlenowych przez ludzkie granulocyty krwi obwodowej (co świadczyłoby o wpływie tego związku na metabolizm wewnątrzkomórkowy)
3. ocenę potencjalnego wpływu niskich stężeń glifosatu na poziom glutationu, głównego czynnika zapewniającego równowagę redoks w komórkach.

Materiały i metody

Badania doświadczalne wykonano w Zakładzie Immunobiologii Wydziału Medycznego Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Zostały właściwie dobrane do założonych celów i odpowiednio opisane. Próbkę wody pitnej pobierano losowo z obiektów Stacji Uzdatniania Wody na Terenie Wielopolski (bez regionu poznańskiego) w okresie październik-grudzień 2017 r., uzyskiwano z Pracowni Badania Gleb i Wód Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej.

W pracy wykorzystano metody stosowane do oznaczania stężenia glifosatu oraz do oceny wpływu tego związku na funkcje ludzkich komórek krwi obwodowej. Badając wpływ glifosatu na leukocyty wykorzystywano próbki krwi od zdrowych dawców z Wojewódzkiej Stacji Krwiodawstwa w Poznaniu. Krew pobierano do probówek z heparyną litową i dostarczano do laboratorium w maksymalnie do 1 godziny. Stężenia glifosatu oznaczono w 66 próbkach wody wodociągowej metodami ELISA i HPLC. Oznaczanie stężeń glifosatu oparte jest na konkurencji glifosatu w badanej próbce z glifosatem wyznakowanym enzymatycznie o miejsce wiązania na króliczych przeciwciałach. Równolegle stosowano technikę wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC). Próbkę wody z glifosatem były poddawane derywatywacji. Wszystkie badane próbki analizowano co najmniej trzykrotnie.

Ocena żywotności leukocytów krwi obwodowej opiera się na ocenie odsetka komórek apoptotycznych wybarwionych znakowanymi fluorescencyjnie inhibitorami kaspaz i odsetka komórek nekrotycznych.

Do badania produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) w granulocytach użyto zestawu *PHAGOBURST*. Zetknięcie się obcej cząstki z zewnętrzną błoną neutrofila zapoczątkowuje fazę pochłaniania (endocytozy). W momencie oddzielania się błony od powierzchni komórki następuje zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu, co jest określane jako „wybuch oddechowy”.

Oceniając zdolność neutrofilów do fagocytozy badano pochłanianie bakterii przez granulocyty (użyto zestawu *PHAGOTEST*).

Do określenia zmian w potencjale oksydacyjno-redukcyjnym komórek pod wpływem glifosatu wykorzystano zestaw Glutathione Colorimetric Detection Kit *EIAGSHC* umożliwiający pomiar zredukowanego i utlenionego glutationu w lizatach komórkowych.

Wszystkie oznaczenia były przeprowadzane zgodnie z instrukcjami producentów.

Wyniki zostały wyczerpująco przedstawione, poddane odpowiednio dobranej analizie statystycznej oraz omówione z uwzględnieniem aktualnego światowego piśmiennictwa.

Obliczenia statystyczne były wykonywane w Zakładzie Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Dyskusja bardzo dobrze świadczy o wiedzy Doktoranta i czyta się ją z przyjemnością. Na podstawie uzyskanych wyników i omawianego piśmiennictwa przedstawiona została hipoteza, że niskie stężenia glifosatu mogą reagować ze ścieżkami sygnałowymi aktywowanymi przez bakteryjny oligopeptyd N-formylo-met-met-leu-phe (fMLP).

Przedstawiono osiem wniosków wśród których najważniejszy wydaje się być ostatni przedstawiony jako podsumowanie dyskusji i streszczenia: „Na podstawie uzyskanych wyników można sugerować, że glifosat wpływa na drogi sygnałowe prowadzące do aktywacji oksydazy NADPH, niezależne od aktywacji kinazy białkowej C. Można więc uznać, że choć niskie dawki glifosatu nie są szkodliwe dla ludzi, synergistyczne działanie tego związku z innymi skażeniami środowiskowymi może stanowić ważny element mechanizmów patogenetycznych. ... co musi być uwzględniane przy ocenie zagrożenia zdrowia populacji ludzkiej”

Jako czytelnik tej pracy, chętnie bym się dowiedział, czy planowano weryfikację hipotezy dotyczącej wpływu glifosatu na drogi sygnałowe prowadzące do aktywacji oksydazy NADPH? Biorąc pod uwagę, że próbki wody pitnej pobierano w okresie październik – grudzień 2017 r., czy porównywano poziom skażenia glifosatem w innych

miesiącach (przy większej aktywności rolniczej) i w późniejszych latach? Dlaczego nie pobierano próbek wody wodociągowej z regionu poznańskiego?

Na uwagę zasługuje również fakt, że część wyników zamieszczonych w pracy doktorskiej została już opublikowana w 2020 r. w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu, a Doktorant jest pierwszym autorem w tej publikacji. Praca doktorska mgr. Krzysztofa Kaszkowiaka przynosi nowe, oryginalne informacje i świadczy o naukowej dojrzałości autora. Zamierzone cele pracy zostały osiągnięte.

Pamiętając o kontrowersjach związanych z różnymi wynikami badań oraz z faktem, że wzrasta zużycie glifosatu na całym świecie, w tym i w Polsce, należy cieszyć się z wyników analizy skażeń wody wodociągowej na terenie Wielopolski. Na podstawie wstępnych wyników przeprowadzonych w Wielkopolsce w 2017 r. nie możemy oceniać aktualnej prognozy dla pozostałych regionów. Jednocześnie powinno to stanowić zachętę do przeprowadzenia aktualnej oceny zagrożeń zdrowotnych związanych z glifosadem w wodzie pitnej na terenie całej Polski.

Nie wnoszę żadnych merytorycznych zastrzeżeń do recenzowanej pracy. Według mojej opinii w pełni odpowiada warunkom określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym, stawianym pracom doktorskim.

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Kapituły Kolegium Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr. Krzysztofa Kaszkowiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 8. 07. 2022 r.

Prof. dr hab. med. Andrzej Członkowski