



Katowice/ 14.10.2017

Pan
Prof. dr hab. med.
Janusz Marcinkiewicz
Prodziekan
Wydziału Lekarskiego
Uniwersytetu Medycznego
Collegium Medicum w Krakowie

Katedra i Zakład
Epidemiologii

RECENZJA

**rozprawy na stopień doktora nauk medycznych przygotowana na zlecenie
Dziekana Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium
Medicum w Krakowie (znak: 503.5100.14.2015 z dnia 29 września 2017 r.)**

ul. Medyków 18
40-752, Katowice,
epidemiologia2.sum.edu.pl

Kierownik Katedry

Prof. dr hab. med Jan E. Zejda
tel.: (+48 32) 252 37 34
fax: (+48 32) 252 37 34

SEKRETARIAT

tel.: (+48 32) 208 85 36
fax: (+48 32) 252 37 34
epikat@sum.edu.pl

Autor: mgr Joanna Zajac

**Tytuł: Stężenie w moczu biomarkerów zawodowej ekspozycji na
wielocykliczne węglowodory aromatyczne z uwzględnieniem wpływu
wybranych mutacji genetycznych.**

Przedstawiona mi do recenzji praca zawiera 62 strony tekstu zaaranżowanego według następujących rozdziałów: 'wprowadzenie', 'cele pracy', 'teksty publikacji składające się na dysertację', 'podsumowanie metodologii badań składających się na dysertację', 'wnioski', 'streszczenie w języku polskim i angielskim', 'piśmiennictwo', oraz 'aneks', w którym zawarto oświadczenia zgody współautorów publikacji będących przedmiotem dysertacji.

Promotorem w przewodzie jest Pani prof. dr hab. Emilia Kolarzyk, były Kierownik Zakładu Higieny i Dietetyki CM Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Badanie zrealizowano za zgodą Komisji Bioetycznej wśród pracowników dwóch zakładów koksowniczych w Krakowie i Zdzeszowicach. Myślę, że dla porządku warto byłoby zamieścić w załączeniu kserokopię dokumentu potwierdzającego uzyskanie tej zgody. Pojawia się w tym miejscu pytanie do doktorantki: czy stwierdzono różnice pomiędzy stężeniami biomarkerów WWA mierzonymi u pracowników obydwu zakładów? Czy zagrożenie (dane z monitoringu stanowiska pracy) było podobne w obydwu zakładach?

Po zapoznaniu się z treścią pracy przedstawiam Wysokiej Radzie recenzję, w której w odrębnych sekcjach formułuję moją opinię, zwracam uwagę na pewne problemy i aspekty redakcyjne lub techniczne dostrzeżone w recenzowanej pracy.

Uwagi ogólne

Rozprawa dotyczy istotnego zagadnienia epidemiologii środowiskowej i higieny pracy jakim jest zawodowe narażenie na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) pracowników koksowni. Autorka dysertacji uznała, że poznanie zależności pomiędzy zagrożeniem identyfikowanym jako stężenie WWA mierzone na stanowisku pracy a stężeniem właściwych biomarkerów oznaczanych u eksponowanych pracowników może przyczynić się do poprawy bezpieczeństwa ich pracy. W uzasadnieniu wyboru tematu doktorantka podaje, że pomimo istotnych skutków zdrowotnych w związku z narażeniem na WWA, które uznano za prokancerogeny, pracownicy koksowni w Polsce nie są rutynowo badani na obecność specyficznych metabolitów w materiale biologicznym. Autorka właściwie wybrała oznaczanie stężenia 1-hydroksypirenu oraz 3-hydroksybenzo[a] pirenu w moczu, a także oceniła mutacje w genach CYP1A1, CYP1B1, GSTM1 oraz GSTT1, które biorą udział w detoksykacji WWA. Następnie oszacowała zależność pomiędzy stężeniem 3-hydroksybenzo[a] pirenu w moczu a wybranymi mutacjami w genach kodujących enzymy biorące udział w przemianach WWA w organizmie. Próbowала weryfikować zakłócenia obserwacji zasadniczej w związku z czynną ekspozycją pracowników na dym tytoniowy oraz w związku z miejscem ich zamieszkania. Brak kserokopii kwestionariusza oceniającego elementy zmiennej 'status palenia tytoniu' (aktywne i/lub bierne narażenie?) czy miejsce zamieszkania (od urodzenia? czy obecnie? dlaczego oceniano jedynie miejsca zamieszkania u osób niezatrudnionych w koksowni?) nieco utrudnia ocenę wyników prezentowanych w pracy. Uważam, że w przyszłych publikacjach należy poruszyć te kwestie, tym bardziej że proponowana tematyka jest ważna z punktu widzenia zdrowia publicznego choćby w związku z obserwowanym wzrostem zainteresowania opinii społecznej tematyką szkodliwości WWA dla ludzi (przede wszystkim w Krakowie i na Śląsku). Uzyskane wyniki mogą być wykorzystane w komunikowaniu ryzyka środowiskowego pod warunkiem ich właściwej prezentacji i krytycznej dyskusji uwzględniającej m.in. czynniki zakłócające.

Autorka omówiła we wstępie trzy główne szlaki metaboliczne, które sprawiają że WWA, początkowo niereaktywne ksenobiotyki są szkodliwe dla ludzi z uwagi na: powstawanie kancerogennych pochodnych takich jak pochodne diolepoksydowe zdolne do wiązania z cząsteczkami DNA; wytwarzanie w wyniku utleniania względnie stabilnego rodnikowego kationu na cząsteczce WWA zdolnego do reakcji z DNA; powstawanie o-chinonów katalizowanych przez dehydrogenazy dihydrodiolowe. Następnie doktorantka omówiła znaczenie monitoringu i

biomonitoringu WWA dla bezpieczeństwa ludzi w środowisku pracy. W końcowej części wprowadzenia autorka spuentowała znaczenie mutacji genetycznych dla możliwości rozwoju chorób nowotworowych (szczególnie ch.n. płuc) słusznie wskazując na trudności interpretacyjne obserwowanych różnic w częstości występowania poszczególnych mutacji w różnych populacjach z uwagi na ich odmienności etniczne.

Doktorantka założyła cel użyteczny, jakim jest ocena szkodliwości zawodowego narażenia pracowników koksowni na WWA dla potencjalnego rozwoju chorób nowotworowych w oparciu o pomiary środowiskowe oraz uznane biomarkery narażenia i wrażliwości. Zdefiniowała siedem celów szczegółowych, wśród których starała się:

- ocenić przydatność różnych biomarkerów dla oceny szkodliwości ekspozycji na WWA z uwzględnieniem zmiennych objaśniających tj. stanowisko pracy, czas trwania narażenia, etc.
- uwzględnić znaczenie narażenia pozazawodowego (np. w związku z paleniem tytoniu) na poziom mierzonych stężeń biomarkerów
- poznać zależność pomiędzy stężeniami mierzonych biomarkerów a obserwowanymi mutacjami genetycznymi, które biorą udział w procesie detoksykacji WWA.

Trzeci rozdział to wykaz dołączonych do rozprawy trzech publikacji powstałych na bazie omówionego projektu badawczego:

1. **Occupational Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Polish Coke Plant Workers** zamieszczony w **Annals of Occupational Hygiene** (IF=1,710), w którym doktorantka opisuje stężenia 1-hydroksypirenu u 619 pracowników koksowni zawodowo narażonych na WWA konfrontując je ze stężeniami ksenobiotyków mierzonymi w środowisku pracy i uwzględniając czas trwania narażenia
2. **Urinary 1-hydroxypyrene in occupationally exposed and not exposed individuals in Silesia, Poland** zamieszczony w **Annals of Agricultural and Environmental Medicine** (IF=0,829), w którym doktorantka dokonała porównania stężenia 1-hydroksypirenu w moczu pracowników koksowni (647 pracowników narażonych na WWA) ze stężeniem oznaczonym u osób pracujących poza koksownią i zamieszkających w jej sąsiedztwie (206 osób)
3. **Relationship between variants of detoxification genes and 3-hydroxybenzo[a]pyrene concentration in urine of coke plant workers** opublikowany w **Polycyclic Aromatic Compounds** (IF=1,569), w którym doktorantka omówiła przydatność 3-hydroksybenzo[a]pirenu jako biomarkera narażenia na WWA (w tym zawodowego i związanego z czynnikiem zakłócającym, jakim jest palenie tytoniu), a także oceniła związek pomiędzy poziomem tego biomarkera w organizmie a trzema wybranymi mutacjami genów I fazy detoksykacji oraz dwoma odpowiedzialnymi za delecję genów w trakcie II fazy detoksykacji;

badania prowadzono w grupie 141 pracowników koksowni w Krakowie zawodowo narażonych na WWA.

Warto w tym miejscu podkreślić, że pani mgr Joanna Zając jest pierwszym autorem wymienionych w przytoczonym cyklu publikacji a dodatkowo zamieszczone oświadczenia współautorów potwierdzają znaczący i większościowy udział doktorantki w ich przygotowaniu.

Kolejna sekcja rozprawy (Rozdział 4 zatytułowany: 'Podsumowanie metodologii badań składających się na dysertację') jest krótkim omówieniem badanej populacji (szczegóły zawarto w kolejnych publikacjach) oraz stosowanych metod poboru i analizy próbek moczu i krwi (tutaj mam pytanie, jak długi był czas pomiędzy poborem próby a analizą biochemiczną? Czy na tyle krótki, iż wystarczyło zamrażanie do -20°C ? Zazwyczaj stosuje się mrożenie do -80°C). Dalej następuje opis izolacji DNA z pobranej od badanych próbki krwi wraz z oceną mutacji w genach CYP ze wskazaniem miejsca prowadzenia analiz (Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej pod kierownictwem prof. dr hab. Marka Sanaka). Ostatnia część omawianej sekcji jest poświęcona analizie statystycznej uzyskanych wyników. Doktorantka właściwie opisała zastosowane w pracy metody statystyki opisowej i analitycznej. Trafnie skorzystała z możliwości testów dostępnych w programie Statistica oraz GenePop 4.6. W podsumowaniu tej sekcji muszę stwierdzić, że po dokładnym zapoznaniu się z tekstem dysertacji oraz z treścią dołączonych artykułów nadal mam pewien problem z identyfikacją grup badanych i w związku z tym mam prośbę do doktorantki o dokładne wyjaśnienia podczas publicznej obrony. Otóż rozumiem, że badanie prowadzono w następujących grupach: 647 pracowników koksowni Zdzeszowice oraz 141 pracowników koksowni w Krakowie, a także w grupie 208 (dane z dysertacji) czy 206 (dane z artykułu nr 3)? Proszę także o wyjaśnienie, skąd właściwie pochodziły te osoby nienarażone, ze Zdzeszowic czy z Krakowa? Nie znalazłam tej informacji ani w pracy ani w artykule nr 2 poza lakonicznym stwierdzeniem (na południu Polski – tak się składa, że obydwa miejsca są tam zlokalizowane). Jest to istotne pytanie z uwagi na możliwość wystąpienia zakłócenia związanego z odmiennością stylu życia badanych (np. częstością palenia tytoniu) lub różnym stężeniem WWA w powietrzu atmosferycznym, etc. Chciałabym wiedzieć także, czy zaobserwowano różnice pomiędzy zagrożeniem na stanowiskach pracy w obydwu zakładach koksowniczych (o tym już wspominałam we wstępie, na pierwszej stronie). Można znaleźć informację, że doktorantka posiada dane z Krakowa (z komórki BHP, str.9 dysertacji), a co z danymi ze Zdzeszowic? Jest lepiej czy gorzej, a może tak samo? Kolejne pytanie dotyczące badanych 619 osób z publikacji nr 1 – skąd to byli pracownicy? Ze Zdzeszowic, czy łącznie z obydwu zakładów? Jedyne precyzyjne dane dotyczą chyba 141 pracowników koksowni w Krakowie będących podmiotem badań opisanych w artykule nr 3.

Rozdział 5 to wnioski, w których zawarto szczegółowe odpowiedzi na poszczególne cele badawcze. Jest ich siedem i biorąc pod uwagę postawione cele pracy należy przyznać, że zostały one osiągnięte. W mojej opinii byłoby właściwsze uogólnienie wniosków, powinny być generalne – np. bez odnoszenia się do wartości wynikowych. No ale to już dyskusja akademicka i nie należy uznawać tej uwagi za zarzut, jedynie za życzliwą wskazówkę wartą rozważenia w przyszłości.

Uwagi redakcyjne

Przedstawiona do recenzji praca jest właściwie skonstruowana. Drobną uwagę dotyczy spisu bibliografii a konkretnie pozycji nr 18, nie jest to właściwy i ogólnie przyjęty sposób prezentacji informacji internetowej, w artykule dołączonym do pracy znajdujemy już poprawny, pełny opis.

Praca jest napisana poprawnym językiem, choć nie brak niewielkich błędów literowych takich jak:

- strona 4: ‘potencjał nukleofilowy cząsteczki nie zwiesza się znacząco’ raczej ‘nie zwiększa się znacząco’
- strona 7: ‘po czynnik genetyczne’ raczej ‘po czynniki genetyczne’
- strona 8: ‘uznawanego bioamrker’a’ raczej ‘uznawanego biomarkera’
- strona 11: ‘Detekcja fluoroscencyjna..’ raczej ‘Detekcję fluoroscencyjną...’ itp.

Pojawiają się również drobne błędy stylistyczne lub językowe, np.:

- strona 11: frazę ‘mocz...był nakładany na kolumny’ warto zamienić na ‘był przepuszczany przez kolumnienki do SPE’); w kolejnym zdaniu ‘Kolumny przemywano wodą destylowaną..’ należy poprawić na ‘Po przepuszczeniu próbek moczu kolumny przemywano...’; należy poprawić ‘(w gradiencie)’ na ‘(z elucją gradientową)’ (warto dopisać jaką?); dalej raczej ‘mieszanina acetonitrylu z wodą’ niż ‘mieszanka acetylonitrylu z wodą’; zamiast ‘wyniki’ napisać ‘wyniki wzbudzenia i emisji’; frazę ‘na próbki’ zamienić na ‘do probówek’
- strona 12: zamiast ‘precypitowano’ proponuję użyć polskiego określenia ‘wytrącano’; frazę ‘płukano w 70% etanolu’ zastąpić sformułowaniem ‘płukano 70% alkoholem’
- strona 21: proponuję zamienić frazę ‘Jedynie w przypadku 1-hydroksypirenu zaobserwowano korelację z monitoringiem środowiskowym w obydwu seriach próbek’ na następującą: ‘Jedynie w przypadku stężeń 1-hydroksypirenu zaobserwowano dodatnią korelację ze stężeniami mierzonych WWA (benzo-a-pirenu i benzenu) na stanowisku pracy’
- strona 22: frazę ‘istotne zróżnicowanie pomiędzy stanowiskami pracy’ proponuję zastąpić następującym fragmentem ‘istotne zróżnicowanie stężeń biomarkera u pracowników w zależności od ich stanowiska pracy’

- strona 22: zdanie 'Wykazano także istnienie zależności pomiędzy niektórymi mutacjami a ilością oznaczanego biomarkera (3-hydroksybenzo[a]piren), co może mieć znaczenie w interpretacji wyników niektórych pracowników.' należałoby doprecyzować o jakiej zależności mówimy: dodatniej czy ujemnej.

Wykazane powyżej błędy są przytoczone z obowiązku recenzenta i nie umniejszają wartości pracy.

Podsumowanie

Przedstawiona mi do oceny praca dotyczy ważnego zagadnienia jakim jest możliwość wykorzystania biomonitoringu do oceny ryzyka potencjalnych chorób nowotworowych u osób zawodowo narażonych na WWA. Praca ma duże znaczenie poznawcze a biorąc pod uwagę jedne z najwyższych w krajach europejskich stężenia benzo-a-pirenu oznaczane w powietrzu w Polsce można uznać, że wyniki są ważne także dla komunikowania ryzyka w zdrowiu środowiskowym. Warto w tym miejscu zaznaczyć, iż podjęty problem badawczy jest aktualny i ważny także z uwagi na tworzącą się sieć współpracy krajów europejskich w ramach projektu COST Action Network on the Coordination and Harmonisation of European Occupational Cohorts (OMEGA-NET) CA16216. Autorka dysertacji mogłaby kontynuować badania w wybranej grupie pracowników ukierunkowane na ocenę zmian poziomu biomarkerów i mutacji genetycznych oraz aktualnego stanu zdrowia.

Cel pracy został osiągnięty, rezultaty badań mogą okazać się przydatne w procesie konstruowania efektywnych programów profilaktycznych ukierunkowanych na poprawę stanu zdrowia pracujących. Wszelkie uwagi mają charakter życzliwych wskazówek wartych rozważenia podczas kolejnych publikacji uzyskanych wyników. Na pokreślenie zasługuje wielki trud doktorantki włożony podczas badań terenowych w związku z koniecznością zebrania materiału biologicznego do badań i przeprowadzenia badania ankietowego w dwóch oddalonych od siebie ośrodkach przemysłu koksowniczego.

Podsumowując, po uwzględnieniu przedstawionych w recenzji argumentów, przedkładam Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum wniosek o dopuszczenie Pani mgr Joanny Zając do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie biorąc pod uwagę dotychczasowy dorobek doktorantki wnioskuję o rozważenie możliwości wyróżnienia.



Katowice 14.10.2017

dr hab. n med. Małgorzata Kowalska