

Prof. dr hab. n. med. Andrzej Buczyński

Kierownik Zakładu Epidemiologii

i Zdrowia Publicznego

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Zajęc na temat: „Stężenie biomarkerów w moczu w narażeniu zawodowym na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, a także jego zależność od wybranych mutacji genetycznych”.

Urinary concentration of biomarkers of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, and its relationship to chosen genetic mutations.

Przedłożona mi do oceny rozprawa dotyczy ważnego problemu wiedzy zdrowotnej, szczególnie w zakresie chorób wywoływanych przez wielopierścieniowe związki aromatyczne oraz określenia potrzeb w zakresie działań profilaktycznych i promujących zdrowie.

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne to związki tworzące się podczas niecałkowitego spalania związków organicznych. Są one zarówno produktem procesów naturalnych jak i efektem działalności człowieka, które zawsze występowały w środowisku, jednak rozwój cywilizacyjny i technologiczny spowodował wzrost narażenia na te związki, a tym samym niesie za sobą negatywny wpływ na środowisko oraz szkodliwe efekty zdrowotne, jak również wpływa na pozyskiwaną żywność, w której kumulują się związki szkodliwe.

Wielopierścieniowe związki aromatyczne, jako związki występujące w przyrodzie w rozmaitych formach strukturalnych są środowiskowo niezwykle istotne ze względu na potencjalne właściwości genotoksyczne, mutagenne oraz kancerogenne.

Policykliczne węglowodory aromatyczne są produktami ubocznymi reakcji zachodzących podczas procesów niepełnego spalania materii organicznej i stanowią bardzo zróżnicowaną i wszechobecną grupę zanieczyszczeń, do której zalicza się kilkaset związków chemicznych.

Aktualnie ponad 660 tych związków chemicznych jest zamieszczonych przez Amerykański Narodowy Instytut Standaryzacji i Technologii (National Institute of Standards and Technology) w NIST Special Publication 922/2011, nt. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Structure Index.

Wrażliwość osobnicza w odpowiedzi na ekspozycję w miejscu pracy na policykliczne węglowodory aromatyczne jest niejednorodna. Dlatego w wyniku działań profilaktycznych prowadzone jest monitorowanie narażenia na stanowiskach pracy, a także wyodrębnienie osób potencjalnie zagrożonych rozwojem choroby nowotworowej o podłożu zawodowym.

W tym celu niezbędne jest prowadzenie monitoringu środowiskowego jak i biologicznego. Monitoring środowiskowy ma na celu określenie narażenia na szkodliwe substancje na danym stanowisku pracy w aspekcie dopuszczalnych stężeń (NDS) np. dla benzopirenu czy benzenu. W monitoringu biologicznym stosuje się oznaczenia stężeń mono – hydroksy – fenantrenów oraz 1 – hydroksypirenu w moczu, czy bardzo specyficznego markera ekspozycji jakim jest 3 – hydroksybenzo[a] piren. Niektórzy autorzy twierdzą, że ten biomarker może odzwierciedlać siłę oddziaływania kancerogennego wielopierścieniowych związków aromatycznych.

Równolegle z badaniami biomarkerów , rozwijane są zagadnienia związku pomiędzy mutacjami genetycznymi a występowaniem określonych typów nowotworów. Przyczyną tych poszukiwań są różnorodne mutacje w genach osób narażonych na aromatyczne związki wielopierścieniowe powstające podczas ich detoksykacji w organizmie, które mogą wpływać na aktywność i funkcjonowanie poszczególnych enzymów, a tym samym i na cały metabolizm tych związków w organizmach żywych.

W niektórych nowotworach płuc, przypuszczalnie spowodowanych policyklicznymi związkami aromatycznymi pojawiają się mutacje genów odpowiedzialnych za funkcjonowanie transferaz glutationowych. Badania prowadzone w ostatnich latach wskazują na dużą zmienność tych zjawisk w zależności od analizowanej populacji, gdyż przynależność etniczna w dużej mierze jest związana z występowaniem i częstością określonych mutacji.

Wśród genów ważnych z punktu widzenia narażenia na policykliczne związki aromatyczne mogących mieć wpływ na rozwój choroby nowotworowej płuc wyróżnia się geny regulujące czynność i funkcjonowanie cytochromów P450, transferazy glutationowej, hydrolazy epoksydowej czy peroksydazy glutationowej.

W związku z tym Doktorantka postanowiła przebadать ten problem. Celem badań własnych Doktorantki była ocena toksycznego wpływu wielopierścieniowych związków aromatycznych indukowanych w środowisku pracy na organizm człowieka, z uwzględnieniem różnic między poszczególnymi biomarkerami, w różnym stopniu odzwierciedlającymi szkodliwość

ekspozycji na te związki, a także określenie wpływu różnych czynników zawodowych i pozazawodowych na wydalanie tych biomarkerów z moczem.

Doktorantka uwzględniła również czynniki genetyczne, które potencjalnie mogą modyfikować procesy biochemicznych przemian policyklicznych związków aromatycznych. Wśród głównego celu pracy Doktorantka wyróżniła siedem celów szczegółowych związanych ściśle z tematem głównym pracy.

Uważam, że tak skonstruowana koncepcja pracy Autorki w zakresie rozwiązywania podjętego problemu jest w pełni uzasadniona. Zastosowane w rozprawie metody badawcze zostały trafnie dobrane do charakteru analizowanych problemów. Wskazuje to na fakt, że doktorantka w bardzo dobrym stopniu jest przygotowana do tego rodzaju badań, zarówno pod względem zdolności problemowego ujmowania zagadnień jak i szerokiej znajomości całości kształtu tematu.

Doktorantka wykazała, że potrafi samodzielnie, umiejętnie operować faktami i logicznymi argumentami badawczymi, z zastosowaniem współczesnych możliwości technik badawczych i komputerowych.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa zawiera 36 stron tekstu, wraz ze streszczeniem w języku polskim i angielskim oraz załącznik w postaci aneksu. Do części tekstowej pracy dołączono trzy publikacje zawarte w liczących się w kraju i zagranicą czasopismach o sumarycznym IF – 4.108.

Przedstawione prace dotyczą głównego tematu rozprawy doktorskiej i są bardzo dobrze skonstruowane, posiadają bardzo dobrze opisane zależności dotyczące wpływu policyklicznych związków aromatycznych na analizowane markery oraz ich wpływu na analizowane geny indukujące aktywność enzymów biorących udział w metabolizmie wielopierścieniowych związków aromatycznych generowanych w środowisku pracy.

Tak zaprojektowany cykl badań jest bardzo dobrze zaplanowany i zgodny z tematem pracy oraz szczegółowymi cząstkowymi celami analizowanej rozprawy doktorskiej.

Dokumentacja graficzna rozprawy zawarta w przedstawionych do oceny publikacjach naukowych posiada 3 ryciny oraz 8 tabel zawartych w tekście tych prac.

Piśmiennictwo rozprawy doktorskiej składa się z 25 pozycji oraz 89 zawartych w poszczególnych publikacjach przedstawionych w dysertacji obejmujących okres ostatnich lat aż do roku 2017. Układ pracy jest przejrzysty, język zwięzły i poprawny.

We wstępie pracy zawartym na 6 stronach maszynopisu Autorka omawia problematykę wpływu wielopierścieniowych związków aromatycznych na organizm człowieka oraz uregulowania prawne dotyczące narażenia zawodowego na te związki, jako czynniki szkodliwe dla zdrowia.

W dalszej części wstępu charakteryzuje budowę i znaczenie tych związków dla zdrowia człowieka oraz dość szczegółowo omawia ich metabolizm zachodzący w organizmie, z uwzględnieniem mutacji genetycznych mogących mieć wpływ na ich przemiany wewnętrzne np. poprzez zmianę aktywności poszczególnych enzymów biorących udział w tych przemianach. Ta część pracy jest bardzo dobrze zaprojektowana i ułatwia zrozumienie istniejącego problemu. Doktorantka podkreśla praktyczne znaczenie przedstawionych celów częściowych, których analiza porównawcza pozwoli na ocenę ogólnego poziomu wiedzy na temat szkodliwych działań wybranych policyklicznych związków aromatycznych i ich różnych stężeń na organizm badanych osób.

Aby osiągnąć założone cele Autorka po przeprowadzeniu analizy możliwych do zastosowania metod badawczych wybrała prowadzenie eksperymentu badawczego, obejmując badaniami osoby pracujące w środowisku aromatycznych związków policyklicznych, dobierane losowo, zgodnie z zasadą jednoczasowości dla grup badanych i kontrolnych.

Przed przystąpieniem do badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu UJ w Krakowie na prowadzenie przedstawionego projektu badawczego. Osoby badane podzielono na dwie grupy. Grupa pierwsza obejmowała pracowników koksowni narażonych na cykliczne związki aromatyczne –łącznie 788 osób; grupa druga –208 osób nienarażonych zawodowo na te związki.

Oznaczenie stężenia benzo[a]pirenu i benzenu w środowisku pracy pracowników Koksowni zostało wykonane w oddziale BHP tego zakładu. Natomiast oznaczenia stężenia 3 – hydroksybenzeno[a]pirenu w krwi oraz moczu zostały wykonane w Pracowni Toksykologii Analitycznej i Terapii Monitorowanej Szpitala Uniwersyteckiego CM UJ w Krakowie. Analiza próbek krwi pod kątem mutacji genetycznych została wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej.

Do oznaczenia mutacji w analizowanych genach wykorzystano zmodyfikowaną metodę RT – PCR (real-time polymerase chain reaction). Jako Recenzent pragnę podkreślić bardzo dobre opracowanie metody badawczej jak i poprawne przeprowadzenie całości eksperymentu.

W ocenie statystycznej wyników zastosowano analizę z wykorzystaniem typowych miar położenia i rozproszenia. W celu wybrania odpowiedniego testu sprawdzono, czy odpowiednie próby podlegają rozkładowi normalnemu, przypuszczalnie zastosowano (test Shapiro – Wilka), brak odpowiedniego opisu w tekście pracy. Autorka zastosowała szereg testów nieparametrycznych najprawdopodobniej np. test Manna – Whitneya czy test Kruskala – Wallisa (brak dokładnego opisu). Korelacje między zmiennymi ciągłymi badano z wykorzystaniem współczynnika korelacji Spermana a istotność różnic pomiędzy grupami sprawdzono testem U Manna – Whitney a.

Przyjęto poziom ufności $p < 0,05$. Wyniki badań przedstawiono bardzo szczegółowo i udokumentowano w postaci wykresów i tabel w przedstawionych publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej z dokładnymi parametrami analizy statystycznej, czemu towarzyszą szczegółowe opisy oraz krótkie omówienie wyników. Ta część rozprawy jest bardzo mocną częścią ocenianej pracy. Doskonale udokumentowane wyniki badań, uważam, że zwalniają recenzenta od ich szczegółowego omówienia.

W rozdziale dotyczącym dyskusji i omówienia uzyskanych wyników badań Autorka zastosowała poszerzoną analizę postawionych wniosków na podstawie uzyskanych wyników badań i zawarła ją na 6 stronach maszynopisu Doktorantka omawia szczegółowo swoje wyniki w zakresie poszczególnych danych zawartych w celu pracy i konfrontuje je z badaniami innych autorów zarówno krajowych jak i zagranicznych, co znacznie wzbogaca pracę i świadczy o doskonałej znajomości literatury przedmiotu przez Autorkę rozprawy.

Pracę kończy 7 wniosków sformułowanych w oparciu o wyniki przeprowadzonych badań i mieszczące się w ramach tematu pracy. Za najważniejsze uważam stwierdzenia zawarte we wnioskach trzecim i czwartym , które wyraźnie odzwierciedlają uzyskane przez Doktorantkę wyniki badań własnych.

Kończąc merytoryczną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Joanny Zając, pragnę zwrócić uwagę na pewne usterki, które z obowiązku recenzenta przy czytaniu pracy zauważyłem takie jak : drobne błędy stylistyczne i usterki maszynowe, które są łatwe do usunięcia przy przygotowywaniu tekstu do druku.

Zauważone przeze mnie usterki w żadnym wypadku nie wpływają na treść merytoryczną przedstawionej rozprawy doktorskiej. Uważam, że temat ocenianej pracy doktorskiej jest wysoce użyteczny i bardzo aktualny.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa na stopień doktora nauk medycznych mgr Joanny Zając stanowi znaczący wkład do reprezentowanej dziedziny wiedzy, a jej cel zgodnie z założeniami został osiągnięty. Praca jest ważna zarówno z merytorycznego jak i użytkowego punktu widzenia, a Autorka włożyła ogromny wysiłek w wykonanie tego opracowania naukowego

Stwierdzam, że praca spełnia warunki, jakim powinna odpowiadać rozprawa doktorska w myśl Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki.

Opierając się na zawartych w tej recenzji przesłankach mam zaszczyt zwrócić się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy pt.: „ Stężenie biomarkerów w moczu w narażeniu zawodowym na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, a także jego zależność od wybranych mutacji genetycznych”. *Urinary concentration of biomarkers of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, and its relationoship to chosen genetic mutations* jako rozprawy doktorskiej i dopuszczenie mgr Joanny Zając do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie przedstawiam propozycję do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o uznanie pracy mgr Joanny Zając za wyróżniającą się.

Łódź, dnia 16 października 2017 roku

KIEROWNIK
ZAKŁADU EPIDEMIOLOGII I ZDROWIA PUBLICZNEGO
Wydziału Wojskowo-Lekarskiego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
Artyur Hucy
prof. dr hab. n. med. Artur Hucyński

.....