

Prof. dr hab. Jan K. Ludwicki
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego –
Państwowy Zakład Higieny

Ocena
pracy doktorskiej mgr inż. Marka Zielińskiego pt.: Narażenie środowiskowe na
trwałe zanieczyszczenia organiczne a markery stresu oksydacyjnego u kobiet
w okresie ciąży i laktacji oraz wskaźniki antropometryczne noworodka

Planując badania wpływu dioksyn na zdrowie trzeba mieć na uwadze, że zasoby literaturowe na ten temat są olbrzymie. W popularnej przeglądarce internetowej hasło '*dioxin environmental exposure*' powoduje wyświetlenie przeszło 676 tysięcy wyników, z których każdy odnosi się do artykułu naukowego na ten temat. Trudno jest zatem znaleźć niewyeksplorowaną tematykę dotyczącą narażenia na dioksyny, co potwierdzają ostatnie badania chińskie z czerwca 2017 roku skupiające się na ocenie narażenia mieszkańców dorzecza Jangcy na dioksyny za pośrednictwem jaj rybitw i czapli¹. Znacznie bardziej wartościowe z naukowego punktu widzenia są badania, które wyniki oceny narażenia, będącego w gruncie rzeczy zapisem monitoringu, odnoszą do potencjalnych skutków biologicznych. Jednak w przypadku oceny narażenia środowiskowego, kiedy w praktyce nie należy oczekiwać znacznych różnic w wielkości narażenia poszczególnych przedstawicieli populacji generalnej pojawia się zasadnicza trudność o charakterze logistycznym: brak dobrej grupy odniesienia. Trudność ta zwielokrotnia się jeszcze, gdy mamy do czynienia z tak jednorodną grupą, jaką stanowią kobiety w ciąży o normalnym przebiegu. Należy bowiem założyć *a priori*, że skupienie wyników w tej grupie, z uwagi na ograniczony przedział wiekowy dawczyń i wyeliminowanie (w znacznym stopniu) ekstremalnych zwyczajów żywieniowych, będzie większe.

Zważywszy te wszystkie trudności recenzent, z niekłamanym zainteresowaniem przystąpił do lektury dysertacji, żywiąc przekonanie, że pozna w jaki sposób Doktorant ominął wszystkie pułapki kryjące się za ambitnym zamierzeniem zbadania relacji między narażeniem środowiskowym na trwałe

¹ Environ. Pollution 2017; 225:184-192

zanieczyszczenia organiczne a markerami stresu oksydacyjnego u kobiet w okresie ciąży i laktacji z uwzględnieniem wskaźników antropometrycznych noworodka.

Do wstępu, w którym Doktorant wprowadza czytelnika w zawiłą problematykę narażenia na dioksyny nie można mieć żadnych zastrzeżeń: jest w nim wszystko to, co powinno naświetlać rangę zagadnienia, znajomość przez Doktoranta tematyki i uzasadniać zakres podjętych prac. Zwraca w nim jednak szczególną uwagę syntetyczne wyjaśnienie zależności między budową chemiczną kongenerów dioksyn a ich aktywnością biologiczną, która legła u podstaw koncepcji współczynników toksyczności umożliwiając ocenę ryzyka w odniesieniu do łącznego narażenia na wszystkie kongenery dibenzo-p-dioksyn, dibenzo-p-furanów i PCB. W opisie efektów toksykologicznych narażenia na dioksyny Doktorant wykazał nadzwyczajną powściągliwość, unikając epatowania czytelnika licznymi przykładami skutków biologicznych narażenia, których dowolnie szeroki wachlarz można znaleźć w piśmiennictwie naukowym. Zdaniem Doktoranta bowiem: „Szereg toksycznych skutków narażenia na dioksyny, związanych m.in. z uszkodzeniem DNA, niesłusznie przypisywanych jest dioksynom”. Recenzent podziela to stanowisko rozumiejąc, że mgr Marek Zieliński postanowił za to skupić się na endokrynnym działaniu dioksyn w powiązaniu z receptorem węglowodorów aromatycznych (Ah). Po lekturze opisu zależności między receptorem Ah a dioksynami recenzent doszedł do wniosku, że jego lakoniczność z pewnością zrekompensują następne podrozdziały wstępu, które Doktorant poświęcił szacowaniu dziennego pobrania dioksyn przez niemowlęta karmione mlekiem matki oraz wpływowi dioksyn na dziecko i jego rozwój. I rzeczywiście. W rozdziałach tych Doktorant zamieszcza bardziej szczegółowe dane, które pozwalają powiązać oszacowane pobranie dioksyn przez noworodki z potencjalnym zagrożeniem wynikającym z ich aktywności biologicznej. Należy tu pochwalić Doktoranta za wnikliwy przegląd piśmiennictwa, uwzględniający także osiągnięcia krajowe w tym zakresie. Do mocnych stron wstępu zaliczyłbym też omówienie przez Doktoranta związku pomiędzy narażeniem na dioksyny a markerami stresu oksydacyjnego. Analiza danych z piśmiennictwa na temat tych zależności pozwoliła mgr Markowi Zielińskiemu zarysować hipotezę badawczą, która choć nie została jednoznacznie sformułowana, to jak można się domyśleć z rozdziału „Hipoteza badawcza i cele pracy” zakładała istnienie zależności pomiędzy narażeniem na dioksyny a stresem oksydacyjnym przekładającym się na jakość

wskaźników antropometrycznych dziecka. Doktorant postanowił sprawdzić tę hipotezę poszukując zależności między stężeniem polichlorowanych dioksyn, furanów oraz PCB w mleku kobiet karmiących a markerami procesów pro- i antyoksydacyjnych we krwi matek i noworodków tj. pępowinowej oraz badając relacje między narażeniem matek na badane związki a wskaźnikami antropometrycznymi noworodka.

Doktorant słusznie ograniczył opis metod analitycznych do niezbędnego minimum pozwalającego ocenić jego biegłość analityczną powołując się na odpowiednie normy europejskie, metody EPA i polskie rozporządzenie, na podstawie których w macierzystej pracowni Doktoranta została opracowana metoda analityczna, która następnie uzyskała akredytację. Skupił się za to na najbardziej istotnych aspektach całego procesu analitycznego tj. na pobieraniu próbek, ich przygotowaniu do analizy instrumentalnej i danych walidacyjnych. W tej części opisu sugeruję aby Doktorant termin 'specyficzność' zastąpił słowem 'swoistość' a słowo 'próba' zastąpił słowem 'próbka' w przypadkach gdy termin ten odnosi się do badanego materiału, a nie np. do próby wykonania jakiejś czynności.

Na podkreślenie zasługuje opis szacowania wyniku analizy wraz z obszerną dokumentacją przedstawioną w załączniku 1. Nieczęsto w pracach doktorskich, których istotnym narzędziem jest analiza ilościowa, spotyka się tak skrupulatne podejście. Należy jednak pamiętać, że niepewność wyniku badania odzwierciedla jedynie zaufanie, jakim możemy obdarzać wynik analityczny uzyskany dla określonej próbki, w tym przypadku mleka kobiecego. W jakim stopniu odzwierciedla on narażenie karmionego pokarmem matki noworodka, to już jest zupełnie inne zagadnienie. Mgr Marek Zieliński, przygotowując publikację do druku, mógłby w dyskusji wykorzystać wyniki pracy sprzed niemal 20 lat, której autorzy stwierdzili, że stężenia TZO podlegają znacznym wahaniom w kolejnych tygodniach jednej laktacji tej samej kobiety (*Czaja i wsp. Arch Env Contam Toxicol 1999, 36, 498-503*). Zatem stężenie określone na podstawie analizy jednej próbki mleka wcale nie musi odzwierciedlać średniego narażenia, chociaż siłą rzeczy tak było traktowane. Nie jest to oczywiście zarzut do pracy, a jedynie podsuniecie interesującego, zdaniem recenzenta, aspektu dyskusji stwarzającego dodatkową przestrzeń interpretacyjną.

Do doboru parametrów biochemicznych oraz innych, np. niektórych metali oznaczanych we krwi matek, nie można mieć zastrzeżeń; zostały one wskazane jako narzędzia służące weryfikacji hipotezy badawczej. Opisy oznaczania aktywności peroksydazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej, stężenia związków reagujących z kwasem 2-tiobarbiturowym, witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, uszkodzeń DNA, stężeń miedzi, selenu i cynku są precyzyjne, niektóre nawet podane w sposób umożliwiający odtworzenie tych badań w innym laboratorium.

Ostatecznym rezultatem była ogromna liczba wyników, które integrują trzy matryce biologiczne, kilkadziesiąt analizów, liczne parametry biochemiczne mierzone we krwi matek i pępowinowej oraz antropometryczne u ich potomstwa stanowiąc nie lada wyzwanie dla Doktoranta, który musiał je wykorzystać do sprawdzenia hipotezy leżącej u podstaw podjętych przez niego badań.

Wykorzystał do tego celu szereg testów statystycznych zaczynając, zgodnie z zasadami sztuki, od zbadania rozkładu wyników i uzależniając od rezultatu tego badania zastosowanie dalszych testów umożliwiających zbadanie zależności i korelacji. Opis i uzasadnienie wyboru metod statystycznych świadczy o dobrym przygotowaniu Doktoranta do interpretacji wyników badań.

Dyskusja wyników umiejscawia osiągnięcia Doktoranta wśród licznych badań innych autorów stanowiąc próbę porównania wyników własnych z rezultatami badań przeprowadzanych w innych ośrodkach naukowych na świecie. Widać tu, że Doktorant bardzo starannie dobrał pozycje piśmiennictwa, które można uznać za reprezentatywne dla omawianych zagadnień. Należy tu, o czym była już mowa na początku, mieć na uwadze, że w tak zaprojektowanych badaniach stwierdzenie silnych zależności jest raczej mało prawdopodobne, dlatego też Doktorant posłużył się dość wyrafinowanymi technikami analizy statystycznej, które pomogły mu stwierdzić zależność pomiędzy wybranymi markerami stresu oksydacyjnego krwi pępowinowej noworodków. Wykorzystał do tego celu modelowanie wielowymiarowe, które zaowocowało sformułowaniem wniosku nr 3, w którym czytamy, że „wykazano istotne zależności pomiędzy wybranymi markerami stresu oksydacyjnego krwi pępowinowej noworodków i/lub krwi żyłnej matek (...) a stężeniem TZO w mleku matek.” Sugerowałbym w tym miejscu unikanie sformułowania „i/lub” w odniesieniu do krwi matek i krwi pępowinowej ponieważ są to zupełnie różne media, jeżeli

chodzi o ich funkcje biologiczne i genezę. Celowe natomiast byłoby podanie, które markery stresu antyoksydacyjnego reagują na wewnętrzne narażenie na TZO we krwi obwodowej matek, a które we krwi pępowinowej. Takie przedstawienie wyników (bo nie jest to wniosek) otworzyłoby drzwi do sformułowania wniosku o dalszych kierunkach badań na ich podstawie.

Doktorant w części zatytułowanej „Wnioski” sformułował 4 stwierdzenia, z których ani jedno nie jest wnioskiem, jaki mógłby się nasunąć na podstawie analizy wyników. Niektóre z tych stwierdzeń to po prostu jednozdaniowe podsumowanie wyników, z wyjątkiem stwierdzenia nr 1, które w ogóle nie powinno się znaleźć w tym miejscu.

Powyższe uwagi nie umniejszają mojej wysokiej oceny zawartości merytorycznej badań przedstawionych jako zasadnicza część rozprawy doktorskiej. Uważam, że założone cele pracy zostały osiągnięte.

Poza wymienionymi wyżej uwagami, mającymi raczej charakter porządkujący, nie dostrzegłem poważniejszych uchybień, które mogłyby wpłynąć na moją pozytywną ocenę pracy.

Podsumowując, z satysfakcją wyrażam przekonanie, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr inż. Marka Zielińskiego pt.: „Narażenie środowiskowe na trwałe zanieczyszczenia organiczne a markery stresu oksydacyjnego u kobiet w okresie ciąży i laktacji oraz wskaźniki antropometryczne noworodka” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim.

Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Instytutu Medycyny Pracy im prof. dra med. Jerzego Nofera wniosek o dopuszczenie mgr inż. Marka Zielińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Na zakończenie tej recenzji nie mogę jednak powstrzymać się przed następującą refleksją: *Człowiek całe życie się uczy, ja też dowiedziałem się, że można w preambule do dysertacji zamieścić podziękowania dla recenzenta, zanim jeszcze podejmie się on trudu jej napisania.*

Warszawa, grudzień 2017

Prof. dr hab. Jan Krzysztof Ludwicki