

Prof. dr hab. med. Wojciech Hanke
Instytut Medycyny Pracy w Łodzi

Recenzja pracy doktorskiej
mgr Radosława Czernych
„Możliwości wykorzystania biotestów
w procedurze szacowania ryzyka zdrowotnego
w warunkach narażenia środowiskowego
na emisję związków chemicznych”

Zdrowie środowiskowe zajmuje się oceną występowania i uwarunkowań szerokiej gamy skutków zdrowotnych związanych z ekspozycją na czynniki szkodliwe w miejscu przebywania ludzi. Tak zdefiniowany zakres zdrowia środowiskowego obejmuje obok najbliższego zewnętrznego otoczenia miejsca zamieszkania, również środowisko domowe, nauki oraz rekreacji. Występująca w tych środowiskach ekspozycja na związki chemiczne stanowi duże wyzwanie. Podstawowym działaniem, poprzedzającym interwencje zmierzające do ewentualnego ograniczenia ekspozycji środowiskowej na dany czynnik jest proces szacowania ryzyka negatywnych efektów dla zdrowia. W polskim piśmiennictwie generalnie brakuje opracowań z tej dziedziny.

Z dużym zadowoleniem stwierdzam, iż przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Radosława Czernych poświęcona jest w całości temu zagadnieniu. Zawiera ona dwie części: teoretyczną i doświadczalną. Ta pierwsza rozpoczyna się rozdziałem obejmującym szczegółowy opis procesu oceny ryzyka, począwszy od identyfikacji zagrożenia i ocenę relacji dawka-odpowiedź, do oceny narażenia i charakterystyki ryzyka. Doktorant wskazuje na złożoność źródeł informacji potrzebnych do identyfikacji zagrożenia. Odnosząc się do etapu dawka-odpowiedź, Autor umiejętnie przedstawia problematykę związków posiadających i nie posiadających działania progowego. Dużo miejsca poświęca roli biomonitoringu medycznego w procesie oceny ekspozycji. Omawiając zagadnienie charakterystyki ryzyka, słusznie wyróżnia procesy niekancerogenne i kancerogenne, ze wskazaniem na związki działające niegenotoksycznie i genotoksycznie.

W kolejnym rozdziale Doktorant opisuje problem genotoksyczności, mutazogenezy i kancerogenezy. Oprócz mutacji somatycznych i gremialnych,

wprowadza termin mutacji genomu. Niestety, nie wyjaśnia tego terminu. W rozdziale 2.2.1 o działaniu bezprogowym substancji genotoksycznych, sporo miejsca poświęcono również działaniu mechanizmom genotoksyczności wtórnej, obejmującej m.in. powstawanie reaktywnych form tlenu.

Autor umiejętnie przybliżył metody toksykologiczne stosowane w ocenie genotoksyczności i cytotoxyczości związków chemicznych, wskazując zalety badań *in vitro*.

W rozdziale 3 poświęconym ocenie ryzyka zdrowotnego związków endokrynnie czynnych, Autor słusznie rozpoczął omówienie tej problematyki od definicji substancji zaburzających procesy hormonalne. Jest to bardzo aktualny problem ze względu na prowadzoną dyskusję. Autor w sposób poglądowy przedstawił mechanizmy oddziaływania hormonów na receptory (jądrowy i błonowy).

Rozdział kolejny poświęcony jest roli potencjalnych mechanizmów działania zaburzaczy endokrynnych. Autor wskazuje na bardzo aktualny problem niemonotonicznych zależności dawka–odpowiedź. Należy podzielić pogląd Doktoranta, że obecnie standardowe badania toksyczności nie są w stanie zapewnić wszystkich istotnych danych dotyczących toksyczności dla związków endokrynnie czynnych. Dodaje on jednocześnie, że brakuje metod oceny wiarygodności i przydatności niestandardowych badań toksykologicznych, które wykazywałyby ich potencjalną przydatność w ocenie ryzyka zdrowotnego.

W rozdziale poświęconym ocenie ryzyka wynikającego z działania łącznego związków chemicznych, Doktorant umiejętnie, w zwartej formie referuje ten złożony problem. Zadanie ułatwia poglądowa tabela obejmująca przykłady współdziałania mieszanin.

Część doświadczalna tradycyjnie rozpoczyna się prezentacją celu pracy, Sformułowano go jako: " Zastosowanie baterii testów toksykologicznych *in vitro* w metodyce szacowania ryzyka zdrowotnego człowieka narażonego na związki powszechnie występujące w środowisku życia". Jest to bardzo szerokie podejście, akcentujące bardziej charakter podejmowanego działania, niż oczekiwane efekty. Autor, prawdopodobnie zdając sobie sprawę z wątpliwości które mogą powstawać w odbiorze tak sformułowanego celu, wskazał siedem efektów końcowych, które precyzyjnie określają zakres pracy. Obejmują one ocenę stężeń wybranych ftalanów i

ich metabolitów w czterech mediach: w wodzie butelkowanej, krwi kobiecej i mleku matki oraz mleku modyfikowanym (efekty 1-3) oraz ocenę cytotoksyczności, genotoksyczności oraz aktywności endokrynej wybranych ftalanów i ich metabolitów (efekty 4-6). Ostatnim zaplanowanym etapem pracy (efekt 7) jest ocena ryzyka zdrowotnego związanego z prenatalnym oraz postnatalnym narażeniem dziecka na estry kwasu ftalowego w oparciu o wyniki badań wymienionych powyżej.

Autor dla oznaczania ftalanów w badanych mediach wykorzystał chromatograf gazowy z detektorem masowym. Dla celów oceny konsumpcji wybranych artykułów spożywczych zawierających ftalany, posłużono się autorskim kwestionariuszem opracowanym przez dr Aleksandrę Rutkowską.

Dla oceny cytotoksyczności posłużono się systemem MICROTOX®, mierzącym bioluminescencyjne reakcje gram-ujemnych bakterii morskich *Vibrio fischeri*, a ocenę genotoksyczności przeprowadzono przy użyciu testu YES-YAS wykorzystującego modyfikowane drożdże *Sacharomyces cerevisiae*.

Unikalną częścią pracy jest ocena ryzyka zdrowotnego, wynikającego z prenatalnego i postnatalnego narażenia dziecka na estry kwasu ftalowego, na podstawie wyników badań biomonitoringowych surowicy krwi kobiet oraz mleka kobiecego i modyfikowanego. Ryzyko postnatalne zostało obliczone dla dwóch scenariuszy narażenia: dziecko karmione piersią oraz dziecko karmione mlekiem modyfikowanym do 6 miesiąca życia.

Uzyskane wyniki dot. stężeń ftalanów w wodzie stanowią pierwszą w Polsce wiarygodną informację na ten temat. Zbadana próba jest względnie niewielka (10 próbek), ale ustalona metodyka postępowania pozwala na rozszerzenie tych badań w przyszłości na większą skalę. Uzyskane wyniki wykazały, iż ftalan di(2-etyluheksylu) (DEHP) został zidentyfikowany we wszystkich badanych próbkach. Również jego stężenie w każdej próbce było najwyższe; pozostałe ftalany występowały w znacznie niższych stężeniach lub poniżej poziomu oznaczalności. Porównanie uzyskanych wyników z tymi z innych badań wskazuje, iż DEHP w wodzie w Gdańsku jest 3000 razy mniejsze od największych stwierdzonych stężeń we Włoszech. Jest to raczej optymistyczna informacja.

W przebadanych 20 próbkach surowicy krwi kobiet wykryto 5 metabolitów ftalanów (MMP, MEP, MBP, MBzP, MEHP). Najwyższe stężenia, podobnie jak dla wody, wykryto dla metabolitu DEHP oraz DBP. Były one 10 krotnie niższe niż w badaniu prowadzonym wśród osób powyżej 70 r. życia w Szwecji. Unikalnym efektem pracy jest wykazanie silnej korelacji ze spożywaniem żywności w opakowaniach plastikowych.

Te same metabolity ftalanów oceniane w mleku kobiecym, również wskazały na najwyższe wartości MEHP i MEP obserwując korelację ujemną zmierzonych stężeń ftalanów z czasem trwania karmienia i spożywanie żywności z opakowań plastikowych.

W mleku matki stwierdzone stężenia MEHP były nieznacznie niższe niż w badaniu w Norwegii i dużo niższe niż w Finlandii. Odwrotna sytuacja dotyczyła MiBP. Trzeba pamiętać jednak o dużej zmienności stężeń tego parametru.

Badanie cytotoksycznego potencjału ftalanów wykazało niską toksyczność diestrów, oraz umiarkowaną monoestrów. Doktorant zwraca uwagę, że poziom toksyczności był tym niższy, im wyższa jest masa cząsteczkowa ftalanu.

Dla większości mieszanin di-ftalanu z jego metabolitem występowało zjawisko addycji. Mieszaniny ftalanów z ich metabolitami były tym bardziej toksyczne, im większy udział procentowy w składzie miał metabolit. Jest to ciekawa obserwacja, nie odnotowana dotychczas w piśmiennictwie.

Badając genotoksyczność ftalanów, Autor wykazał względnie niską aktywność tych związków. Ciekawa jest obserwacja, że ftalany inkubowane z frakcją S9 wątroby najprawdopodobniej ulegały częściowemu metabolizmowi do monoftalanów i wywołały istotny poziom indukcji w całym zakresie poziomów rozcieńczeń. Oznacza to, że zmetabolizowane formy ftalanów są bardziej aktywne.

Zgodnie z innymi doniesieniami literaturowymi, w większości badań działania genotoksycznego/mutagennego prowadzonych metodą *in vitro*, ftalany dają negatywny wynik testu. IARC ostatnio zmienił ocenę działania rakotwórczego DEHP z "możliwie działającego rakotwórczo dla ludzi" na "nieuznany za czynnik rakotwórczy u ludzi".

Badając aktywności ftalanów względem męskich i żeńskich hormonów płciowych, żaden z ftalanów nie wykazał istotnych właściwości indukujących względem obu hormonów. Jednakże, badanie potencjału do inhibicji aktywności hormonów płciowych wykazało silną aktywność badanych ftalanów. Publikacje w tym zakresie będą dobrze widziane, ponieważ do tej pory w literaturze nie zostały opisane żadne wyniki z badań aktywności endokrynnej ftalanów uzyskane przy pomocy użytego w opisanym badaniu testu Xenoscreen YES/YAS.

Jak już wspomniałem, unikalną częścią pracy jest ocena ryzyka płodu wynikająca z ekspozycji matki na ftalany. Ocena ta jest wartościowym elementem pracy. Można jedynie mieć wątpliwości czy nazbyt silnie uzasadniono jej potrzebę. W opinii Recenzenta nie ma bowiem uzasadnienia stwierdzenie „Z uwagi na opisane w części 8.6 właściwości endokrynne narażenie dziecka na te związki na wczesnym etapie rozwoju (okres embrionalny, płodowy oraz niemowlęcy) istnieje wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia zaburzeń rozwojowych na każdym z tych etapów.

Wyniki uzyskane przez Doktoranta również nie potwierdziły tej tezy. Największą wartość dawki pobranej zaobserwowano, co prawda, u dzieci o najniższej masie ciała, jednakże dawka ta maleje im większą masę ma noworodek. Trudnym do komunikowania wynikiem jest obserwacja, iż obliczone wartości dawki pobranej w przypadku noworodków karmionych mlekiem syntetycznym są wyraźnie mniejsze niż w przypadku dzieci karmionych piersią. Doktorant z uwagi na brak wartości współczynnika RfD wyznaczonego dla metabolitów ftalanów, wykorzystał wartości charakterystyczne dla związków macierzystych. Autor jest świadomy, że takie postępowanie jest niezgodne z ogólnie przyjętą metodyką oceny ryzyka zdrowotnego. Ten krok miał jedynie na celu porównanie dwóch źródeł narażenia oraz wskazanie luk informacyjnych.

W przeprowadzonej Dyskusji Doktorant umiejętnie odniósł uzyskane wyniki do tych z innych badań naukowych, wskazując na występujące różnice i podobieństwa, zachowując jednak stosowny dystans wynikający z różnic metodycznych. Świadom jest również ograniczeń wynikających w względnie niewielkich badanych przez siebie, ale również przez innych badaczy grup.

Praca jest obszernym dziełem, którego redakcja z pewnością wymagała dużego wysiłku. W tej sytuacji zrozumiałe jest iż wkradły się drobne nieprawidłowości, mające zwykle charakter kolokwializmów. Z obowiązku recenzenta poniżej je zamieszczam, tak aby mogły być usunięte przy przygotowywaniu publikacji:

- **chaotyczne** gromadzenie *niespójnych* danych – str. 11
- **galopującą chemizację** środowiska życia człowieka – str. 12
- niską **miarodajność** str. 12
- ocena ryzyka zdrowotnego ... stała się bardziej **wyrafinowana** i precyzyjna – str. 15
- rejestry danych epidemiologicznych (np. zapadalność na raka lub **przebieg ciąży**) – str. 18
- **ulepszone** techniki analityczne – str. 29
- bateria testów powinna używać tylko tych testów, które są najbardziej **przejrzyste i poprawnie** walidowane str. 32
- rzadką **formę** raka pochwy str. 38
- spadku **ilości** komórek; str. 40
- stworzenie **poprawnej** definicji „wspólnego mechanizmu działania”. str. 50

Prace kończą bardzo rozbudowane wnioski odnoszące się do każdego z etapów pracy. W sumie sformułowano 39 wniosków. W tej postaci są one trudne do oceny.

W trakcie obrony poprosiłbym Doktoranta o :

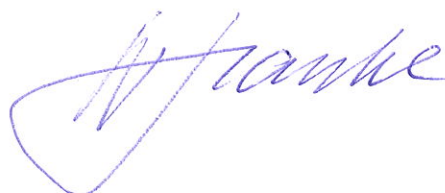
- krótkie scharakteryzowanie głównych kierunków prowadzonej aktualnie dyskusji nt. definicji zaburzaczy endokrynych
- zaprezentowanie skonsolidowanej formy wniosków z pracy

Podsumowanie:

Przedstawiona do oceny praca spełnia wymogi stawiane rozprawom przy ubieganiu się o stopień doktora. Świadczy ona, że Doktorant posiada umiejętność planowania badań naukowych, poprawnej ich realizacji i opisu oraz wnikliwej interpretacji uzyskanych rezultatów. Recenzowana przez ze mnie praca stanowi

oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wskazuje na ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w problematyce oceny ryzyka dla zdrowia wynikającego z ekspozycji środowiskowej na czynniki chemiczne, a także na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Przedstawiona rozprawa spełnia warunki określone w art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym. Dlatego też mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Nauk o Zdrowiu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Radosława Czernych do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Janke', is positioned in the lower right quadrant of the page. The signature is fluid and cursive, with a large loop at the beginning.