

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

Ocena
rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Warenik-Bany pt.: Ocena występowania i
charakterystyka kongenerów dioksyn i PCB w tkankach zwierząt łownych

W popularnej przeglądarce internetowej hasło 'dioxin' daje ponad 5,5 miliona rekordów, w serwisie Web of Science prac naukowych opublikowanych w czasopismach z 'Core Collection' czyli posiadających *Impact Factor*, dotyczących dioksyn jest ponad 24 tysiące, a od roku 2016 pojawiło się 1358 artykułów naukowych w tym samym serwisie bibliograficznym.

Trudno jest zatem znaleźć niewyeksplloatowaną tematykę dotyczącą dioksyn, co potwierdzają ostatnie badania chińskie z czerwca 2017 roku skupiające się na ocenie narażenia mieszkańców dorzecza Jangcy na dioksyny pochodzące z jaj rybitw i czapli¹.

Pani mgr Małgorzata Warenik-Bany założyła jednak, że brak w krajowym piśmiennictwie wyników badań stężeń dioksyn i związków dioksynopodobnych w tkankach zwierząt łownych pochodzących z obszarów zanieczyszczonych przemysłowo lub poddanych intensywnej eksploatacji rolniczej może być przyczyną niedoszacowania narażenia konsumentów mięsa pochodzącego od tych zwierząt. Problem ten, jak zaznaczyła Doktorantka w celu pracy, może mieć istotne znaczenie zdrowotne z uwagi na wzrost pogłowia zwierzyny łownej, a w konsekwencji wzrost spożycia dziczyzny, zwłaszcza w świetle wstępnych wyników uzyskanych w jej macierzystym Zakładzie, sugerujących, że wysokie stężenia dioksyn i związków dioksynopodobnych nie należą do rzadkości.

Do wstępu, w którym Doktorantka 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 Doktorantkę tematyki i uzasadniać zakres podjętych prac. Zwraca w nim jednak szczególną uwagę wnikliwe wyjaśnienie zależności między budową chemiczną

¹ Environ. Pollution 2017, 225:184-192

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 obecne w badanych przez nią matrycach. W kolejnych podrozdziałach wstępu Doktorantka wykazała się znajomością przepisów umożliwiających racjonalne postępowanie w odniesieniu do żywności, w której stwierdzano obecność dioksyn omawiając przy tej okazji dopuszczalne ilości (limity) i tzw. progi podejmowania działań a także wyjaśniając różnice między tymi dwiema kategoriami tak ważnymi dla zarządzania ryzykiem, komunikowania ryzyka i prewencji. W końcu skupiła się nad mechanizmami wskazującymi na możliwość wykorzystania poziomów 'dioksyn' w zwierzyńnie łownej jako bioindykatorów skażeń środowiska.

W konsekwencji tego wyczerpującego wstępu, mogącego śmiało pełnić rolę artykułu przeglądowego, Doktorantka sformułowała sześć celów badań, z których, cel 6. *'Oszacowanie narażenia konsumentów dziczyzny na dioksyny i PCB'* jest, przynajmniej z perspektywy recenzenta, najważniejszy. Pozostałe cele, np. 4. *'Ocena porównawcza procesu biokumulacji poszczególnych kongenerów dioksyn i PCB w tkankach jeleniowatych i dzików'* oraz 5. *'Porównanie poziomów w tkankach na terenach rolniczych, przemysłowych...'* są same w sobie interesujące i mogłyby śmiało funkcjonować jako oddzielne zadania badawcze, jednak w kontekście rozprawy doktorskiej są podporządkowane analizie okoliczności i zjawisk towarzyszących narażeniu, umożliwiając wyjaśnienie przyczyn zróżnicowania poziomów badanych związków w mięsie zwierząt łownych na terenie Polski. Takie podejście mgr Małgorzaty Warenik-Bany jest mocną stroną doktoratu i świadczy o dążeniu do wyjaśnienia różnorodnych aspektów narażenia zwierząt dziko żyjących na dioksyny i PCB w wyniku skażenia środowiska. Cele 1 i 2 związane z sprawdzeniem, adaptacją metod do nietypowych matryc i ich walidacją zakwalifikowałbym raczej jako opracowanie narzędzi do osiągnięcia celu nr 3, jakim było *'Wykonanie analiz zawartości 35 kongenerów PCDD, PCDF, dl-PCB i ndl-PCB w tłuszczu, wątrobie, mięśniach, treści żołądków, glebie i runie leśnym'*. Tu drobna uwaga do Doktorantki: celem nr 3 nie było chyba wykonanie analiz, lecz raczej określenie stężeń badanych związków.

W każdym razie, mimo że zakres celów zapowiada znaczny stopień skomplikowania pracy, to dalsza jej lektura budzi respekt dla jej rozległości. Autorka podjęła się bowiem zbadania stężeń PCDD, PCDF i PCB w materiale biologicznym

pochodzącym od upolowanej zwierzyny łownej z okręgów łowieckich ulokowanych na terenach narażonych na emisje przemysłowe (Górnośląski Okręg Przemysłowy, Turoszowskie Zagłębie Węgla Brunatnego, Legnicko-Głogowski Okręg Przemysłowy, Bełchatowskie Zagłębie Węgla Brunatnego) i z Pojezierza Warmińsko-Mazurskiego traktowanego raczej jako rejon odniesienia z uwagi na brak tzw. przemysłu ciężkiego, chociaż i w tym przypadku Doktorantka była świadoma obecności na tych obszarach zakładów mogących emitować dioksyny.

Stężenia dioksyn i PCB Doktorantka zbadała w mięśniach, wątrobach i w treści przewodu pokarmowego saren, jeleni i dzików odstrzelonych w powyższych rejonach. Niezależnie od tego, stężenia tych związków Autorka zbadała w próbkach roślin i gleby pobieranych w miejscach bytowania odstrzelanych zwierząt. Takie podejście umożliwiło poszukiwanie zależności między skażeniem środowiska a stężeniami w materiale pochodzącym w bytujących w nim zwierzętach.

Lektura rozdziału zatytułowanego 'Metody' sprawia, że czytający nabiera przekonania co do analitycznych kompetencji Doktorantki i doskonałego warsztatu analitycznego, który umiejętnie wykorzystywała do zweryfikowania swoich hipotez badawczych. Opis badań, począwszy od pojawienia się próbki w laboratorium, a skończywszy na statystycznej analizie wyników nie budzi żadnych zastrzeżeń i świadczy, że Doktorantka aktywnie uczestniczyła na każdym etapie skomplikowanego procesu analitycznego oznaczania dioksyn w matrycach biologicznych. Również walidacja metody przeprowadzona dla nowych matryc nie nasuwa żadnych wątpliwości świadcząc o dbałości o jakość wyniku.

W opisie pobierania próbek (przez myśliwych) zabrakło jednak informacji o czasie, jaki upływał od momentu pobrania próbki do jej zamrożenia lub schłodzenia, co Doktorantka mogłaby zdyskontować krótką informacją o tym, czy może to mieć jakieś znaczenie z uwagi na właściwości fizykochemiczne dioksyn i PCB, szczególnie w przypadku treści pokarmowej charakteryzującej się znaczną aktywnością biologiczną.

Trzy gatunki zwierząt, trzy rodzaje analizowanego materiału biologicznego, gleba i runo leśne z wielu łowisk w 5. regionach kraju daje w rezultacie szansę na ogromną liczbę analiz porównawczych nawet gdyby Doktorantka miała do czynienia z analitem stanowiącym jedno indywiduum chemiczne. Tymczasem analizów było kilkadziesiąt zgrupowanych w czterech 'rodzinach' chemicznych, tj.: PCDD, PCDF, non-*orto* PCB i mono-*orto* PCB. Sumaryczne wyniki Doktorantka przedstawiła więc w

poszczególnych matrycach w jedyny możliwy racjonalny sposób, to jest jako sumy równoważników toksyczności WHO. W przypadku próbek środowiskowych umożliwiło to Doktorantce dyskusję o wpływie działalności przemysłowej na rodzaj i stężenie zanieczyszczeń w środowisku w zależności od rodzaju i intensywności tych działań z uwzględnieniem ich potencjału biologicznego. Taki sam sposób przedstawiania wyników w materiale pochodzącym od zwierząt umożliwił mgr Warenik-Bany analizę zależności między miejscem bytowania zwierzyny łownej a stężeniami badanych związków w ich mięsie. Analizy te uwzględniły również takie parametry, jak wiek i sposób odżywiania się zwierząt. Pozwoliły też na dokonanie wielu bardzo interesujących spostrzeżeń, między innymi dotyczących zróżnicowania profili poszczególnych kongenerów badanych grup związków w próbkach środowiskowych i mięsie zwierząt. Profile, jak wykazała Doktorantka, charakteryzowały się specyfiką umożliwiającą identyfikację źródeł emisji, co może mieć duże znaczenie praktyczne i było jednym z wniosków, jakie mgr Małgorzata Warenik-Bany wyciągnęła ze swoich badań.

W tej recenzji trudno jest wyliczyć wszystkie osiągnięcia naukowe będące wynikiem jej badań, ponieważ było ich wiele. Ja jednak do ważniejszych zliczyłbym wyznaczenie współczynników biokoncentracji (BCF) poszczególnych kongenerów dioksyn i PCB w tkankach i wątrobie. Mają one wartość predykcyjną umożliwiającą szacowanie *a priori* oczekiwanych stężeń tych związków w mięsie zwierząt dziko żyjących na podstawie skażeń środowiska w otoczeniu ich bytowania. Doktorantka obliczyła współczynniki biokoncentracji dla 17 kongenerów dioksyn i 18 PCB w mięśniach i wątrobach przedstawiając je na rycinach w zależności od rodzaju kongenera i miejsca pochodzenia zwierząt (ryc. 24-27). W tym miejscu warto przypomnieć, że wartość współczynnika biokoncentracji zależy od właściwości fizyko-chemicznych danej substancji, w tym np. współczynnika podziału P_{ow} i, przede wszystkim, od metabolizmu będącego cechą charakterystyczną każdego organizmu. BCF może być obliczany np. bezpośrednio z kinetycznych stałych szybkości wchłaniania i eliminacji. Miejsce bytowania zwierzęcia nie powinno mieć zatem wpływu na wielkość tych współczynników, a jednak, sądząc po wynikach, w niektórych przypadkach miało. Może wpływał na to wiek zwierząt? Jest to prawdopodobne zakładając, że im starsze zwierzę, tym większych stężeń należy oczekiwać w jego tkance, nawet jeżeli stężenia środowiskowe pozostają na niezmiennym poziomie. W konsekwencji można oczekiwać, że BCF będzie wzrastał

wraz z wiekiem zwierzęcia. Doktorantka pisze jednak, również w Dyskusji (str. 96), że „Wartości BCF dla różnych kongenerów były różne i zależały od miejsca bytowania zwierząt”. Recenzent z zainteresowaniem zapozna się komentarzem Doktorantki na ten temat sugerując jednak uwzględnienie tych aspektów w dyskusji przy publikacji wyników.

Na szczególną uwagę zasługuje rozdział zwięźczający część doświadczalną zatytułowany: „Pobranie dioksyn z dietą i charakterystyka ryzyka”, a w nim różne scenariusze konsumpcji dziczyzny przez dorosłych i dzieci. Na podstawie tych scenariuszy mgr Warenik-Bany oszacowała teoretycznie pobranie na podstawie mediany i zakładanego w tzw. scenariuszu najgorszego, ale jeszcze prawdopodobnego spożycia, które Doktorantka, wyliczyła uwzględniając 97,5 percentyl pobrania dioksyn i dl-PCB z mięsem jeleniowatych i dzików. Trudno jest przecenić wartość tych oszacowań, z których jasno wynika, że spożywanie wątroby zwierząt dziko żyjących może być związane z dwukrotnym przekroczeniem tolerowanego tygodniowego pobrania (TWI) przez osoby dorosłe i aż z prawie siedmiokrotnym przez dzieci.

Na podkreślenie zasługuje bardzo wnikliwa dyskusja, w której Doktorantka omawia badane przez nią zależności starając się wyjaśnić ich podstawy. Dobrym przykładem może tu być przekonywująca próba wyjaśnienia braku korelacji między stężeniami ndl-PCB w środowisku i w tkankach bytujących w nim zwierząt. Bardzo wysoko oceniam tę część dysertacji, świadczy ona bowiem nie tylko o doskonałym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki, ale również o niestety rzadkiej umiejętności wyłowienia w gąszczu piśmiennictwa pozycji, stanowiących tło lub poparcie dla otrzymanych przez nią wyników i formułowanych wniosków.

Wnioski, jakie Doktorantka wyciągnęła z prezentowanych przez nią badań są uzasadnione i całkowicie poparte wynikami. Mgr Warenik-Bany uniknęła częstego, niestety, błędu, polegającego na pomyleniu wyników z wnioskami. Sformułowała tylko trzy wnioski, ale o kapitalnym znaczeniu stwierdzając, że zwierzęta łowne nadają się do bioindykacji zanieczyszczeń środowiska, apelując o ustalenie maksymalnych stężeń dioksyn w żywności pozyskiwanej od zwierzyny łownej i wskazując na możliwość wykorzystania profili kongenerów jako swego rodzaju *'fingerprint'* wspomagającego identyfikację źródeł emisji dioksyn i PCB.

Nie dostrzegłem żadnych uchybień, które mogłyby wpłynąć na moją pozytywną ocenę pracy.

Podsumowując, z satysfakcją wyrażam przekonanie, że przedstawiona do oceny rozprawa mgr Małgorzaty Warenik-Bany pod tytułem: „**Ocena występowania i charakterystyka kongenerów dioksyn i PCB w tkankach zwierząt łownych**” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim.

Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Państwowego Instytutu Weterynaryjnego Państwowego Instytutu Badawczego wniosek o dopuszczenie mgr Małgorzaty Warenik-Bany do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zwracam się także do Wysokiej Rady z wnioskiem o wyróżnienie tej rozprawy z uwagi na jej wysoki poziom merytoryczny i znaczenie dla dalszych badań nad tym złożonym problemem.

Warszawa, wrzesień 2017



.....
Prof. dr hab. Jan K. Ludwicki
Warszawa, wrzesień 2017