

Prof. dr hab. inż. Teresa Leszczyńska
Katedra Żywienia Człowieka i Dietetyki
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Moniki Sijko-Szpańskiej

pt. „Analiza zależności pomiędzy wielkością spożycia wybranych składników pokarmowych a profilem metabolicznym osób dorosłych środowiskowo narażonych na arsen”,

wykonanej w Katedrze Dietetyki, Instytutu Nauk o Żywieniu Człowieka,
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Promotor rozprawy doktorskiej Pani dr hab. Lucyna Kozłowska, prof. SGGW

Podstawa formalno-prawna:

- Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.);
- Uchwała nr 89-2022/2023 Senatu SGGW z dnia 26 czerwca 2023 r. w sprawie uchwalenia Regulaminów przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie;
- pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia SGGW w Warszawie, Pani prof. dr hab. Ewy Jakubczyk, z dnia 19.03.2025 r., o powołaniu na recenzenta ww. rozprawy doktorskiej.

O c e n a f o r m a l n a

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska stanowi spójny tematycznie cykl następujących, trzech zrecenzowanych artykułów naukowych:

1. Sijko, M., Kozłowska, L. (2021). Influence of Dietary Compounds on Arsenic Metabolism and Toxicity. Part I - Animal Model Studies. *Toxics*, 9(10), 258, <https://doi.org/10.3390/toxics9100258>
2. Sijko, M., Kozłowska, L. (2021). Influence of Dietary Compounds on Arsenic Metabolism and Toxicity. Part II - Human Studies. *Toxics*, 9(10), 259, <https://doi.org/10.3390/toxics9100259>
3. Sijko, M., Janasik, B., Wąsowicz, W., Kozłowska, L. (2023). Metabolic Changes and Their Associations with Selected Nutrients Intake in the Group of Workers Exposed to Arsenic. *Metabolites*, 13(1), 70, <https://doi.org/10.3390/metabo13010070>.

Wszystkie wymienione powyżej prace zostały opublikowane w czasopiśmie zamieszczonych na liście Journal Citation Reports (JCR) o wartościach współczynników wpływu Impact Factor (IF), wynoszących odpowiednio 4,146; 4,146; 3,4, łącznie 11,692. Punktacja, zgodnie z wykazem czasopism naukowych MEiN, wynosi 70; 70; 100, czyli łącznie 240.

Udział Doktorantki w przygotowaniu pierwszych dwóch wymienionych artykułów naukowych, przeglądowych polegał na opracowaniu koncepcji treści, układu pracy, wykonaniu wnikliwego, krytycznego przeglądu piśmiennictwa, przygotowaniu tekstu publikacji oraz prowadzeniu korespondencji z wydawcą. W przygotowaniu trzeciej publikacji udział Doktorantki został poszerzony, polegał bowiem na opracowaniu koncepcji treści i układu pracy, współudziale w opracowaniu metodyki badań metabolomicznych, wykonaniu analiz metabolomicznych, opracowaniu wyników badań dotyczących sposobu żywienia, analizie statystycznej wyników, przygotowaniu artykułu naukowego oraz na prowadzeniu korespondencji z wydawcą.

Dysertacja przedstawiona do recenzji obejmuje tekst w wymiarze 53 stron, stanowiący przejrzysty i spójny opis załączonych publikacji. Zawiera wykaz kompatybilnych trzech publikacji, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp uzasadniający wybór podjętego tematu badawczego, cel, zakres badań oraz hipotezy badawcze, charakterystykę materiału i metod badawczych, omówienie wyników badań, podsumowanie wyników badań eksperymentalnych i dyskusję, rozdział dotyczący zarówno mocnych stron, jak i ograniczeń dotyczących przeprowadzonych badań, wnioski oraz wykaz piśmiennictwa (31 pozycje). Uzupełnieniem są załączniki, czyli kopie 3 opublikowanych prac, pod którymi zamieszczono stosowne oświadczenia współautorów, dotyczące ich udziału w realizacji badań i przygotowaniu manuskryptów.

Na przeprowadzenie badań opisanych w trzeciej wymienionej publikacji uzyskano zgodę Komisji ds. Etyki Badań Naukowych w Instytucie Medycyny Pracy im. prof. dr med. Jerzego Nofera (Nr 08/2020).

O c e n a m e r y t o r y c z n a

Arsen, występujący w przyrodzie silnie toksyczny pierwiastek, dostaje się do organizmu zarówno przez przewód pokarmowy, jak i przez układ oddechowy. Największe ilości arsenu przedostają się do środowiska wskutek działalności antropogenicznej, obejmującej hutnictwo, górnictwo czy stosowanie pestycydów. W konsekwencji głównymi źródłami narażenia na ten pierwiastek mogą być: powietrze, skażona woda, gleba, żywność, wysypiska śmieci, nawozy sztuczne, ale też palenie tytoniu. Zagrożenia zdrowotne w populacjach osób ekspozowanych na związki arsenu (hutników, pracowników elektrowni i przemysłu elektronicznego, górników oraz rolników) wynikają głównie z wdychania powietrza będącego nośnikiem pyłu arsenowego, konsumpcji zanieczyszczonej arsenem wody lub żywności (produktów zbożowych, w tym ryżu, owoców morza, ryb, wodorostów, wody pitnej, warzyw liściastych itp.). Arsen kumuluje się przede wszystkim w kościach, wątrobie, nerkach oraz w tkankach bogatych w keratynę, takich jak: włosy, paznokcie, skóra. Nieorganiczne związki arsenu (III i V) wykazują wyższą toksyczność niż organiczne i mogą stanowić poważne zanieczyszczenie wód na całym świecie. Natomiast organiczne związki arsenu, mniej szkodliwe dla zdrowia, występują m.in. w rybach i owocach morza. Zatrucie arsenem u ludzi może prowadzić do zahamowania aktywności enzymów niezbędnych do prawidłowej przemiany materii. Głównym komórkowym celem ataku arsenu są mitochondria i zawarta w nich m.in. dehydrogenaza suksynianowa, biorąca udział w procesie fosforylacji oksydatywnej. W konsekwencji obniżenie wewnątrzkomórkowego poziomu ATP skutkuje zaburzeniem wszystkich ważniejszych funkcji komórki. Z kolei działanie mutagenne oraz dowiedzione kancerogenne spowodowane jest klastogenezą (wywoływaniem aberracji chromosomalnych) w limfocytach obwodowych i nasileniem procesu wymiany chromatyd siostrzanych. Działanie kancerogenne uwidocznia się głównie po ekspozycji drogą inhalacyjną. Rozwój nowotworów

dotyczy przede wszystkim tkanki płucnej i skóry (rak podstawnokomórkowy i kolczystokomórkowy), ale również pęcherza, wątroby i nerek. W patogenetycznej analizie działania arsenu szczególną uwagę zwrócono na jego tzw. efekt komutageny, skutkiem którego arsen może wykazywać szkodliwe działanie w stężeniach znacznie niższych, jeżeli występuje w połączeniu z niektórymi, innymi metalami, związkami alkilującymi lub promieniowaniem UV. Jak wykazują badania, wysycenie organizmu określonymi składnikami pokarmowymi, biorącymi udział w metabolizmie arsenu, może poskutkować zmniejszeniem toksyczności.

Rozpowszechnienie związków arsenu w środowisku oraz udowodnione szkodliwe działanie na organizm człowieka, nie do końca przebadane, uzasadniają konieczność podejmowania dalszych badań nad przyczynami, mechanizmami i skutkami jego działania.

Celem głównym niniejszej rozprawy doktorskiej była analiza zależności między wielkością spożycia wybranych składników pokarmowych, biorących udział w metabolizmie arsenu, a nasileniem zmian w profilu metabolicznym u osób dorosłych, środowiskowo narażonych na intoksykację tym pierwiastkiem, po uprzednim dokonaniu wnikliwego przeglądu przedmiotowej literatury, z podziałem na wyniki badań na zwierzętach doświadczalnych oraz z udziałem ludzi.

W związku z tym sformułowano hipotezę główną oraz trzy następujące szczegółowe hipotezy badawcze, cyt.: „H1. Narażenie na arsen indukuje zmiany w profilu metabolicznym mężczyzn narażonych na arsen; H2. Istnieje zależność między wielkością spożycia metioniny i folianów (jako donorów grup metylowych w metabolizmie arsenu) a nasileniem zmian w profilu metabolicznym mężczyzn narażonych na arsen; H3. Istnieje zależność między wielkością spożycia witamin B₂, B₆, B₁₂ i cynku (jako kofaktorów reakcji metabolizmu arsenu) a nasileniem zmian w profilu metabolicznym mężczyzn narażonych na arsen”.

Po gruntownym przeglądzie piśmiennictwa wymienione hipotezy weryfikowano poprzez odpowiednio dobrane metody badawcze, właściwie zaplanowane i realizowane badania oraz wystarczającą interpretację wyników.

W etapie pierwszym postępowania przeanalizowano dostępne wyniki badań z zakresu wpływu donorów grup metylowych (metioniny, cholicy, betainy, kwasu foliowego) i kofaktorów niektórych enzymów (witamin B₂, B₆, B₁₂ i cynku) na efektywność procesu metylacji arsenu, a także na zmniejszenie nasilenia całego spektrum zaburzeń związanych z narażeniem na arsen. Analizowano wyniki badań opublikowanych w latach 1980-2020, w tym 58 badań na modelach zwierzęcych oraz 62 z udziałem ludzi. Doktorantka, uwzględniając tak szeroki, czasowy zakres, wykonała tematyczny przegląd rezultatów uzyskanych zarówno przez prekursorów tych badań, jak również przez autorów kolejnych, licznych badań, stanowiących istotne uzupełnienie już istniejących.

W etapie drugim, po zastosowaniu odpowiednich kryteriów włączania i wyłączenia udziału, badania właściwe przeprowadzono z udziałem 116 pracowników huty miedzi. Uczestników badań podzielono na dwie grupy, na podstawie stężenia arsenu całkowitego w moczu (tAs). Pierwszą grupę (WN; n=75) stanowili pracownicy, w przypadku których stężenie arsenu w moczu mieściło się w granicach wartości dopuszczalnych (do 35 µg/l), natomiast drugą grupę (WH; n=41) pracownicy, których mocz zawierał arsen w ilościach przekraczających dopuszczalną wartość progową.

Opisane poniżej, zastosowane w pracy metody dostarczają informacji o zakresie przeprowadzonych badań, skutkujących uzyskaniem licznych, istotnych wyników.

Ocenę wielkości spożycia składników pokarmowych zaangażowanych w metabolizm arsenu przeprowadzono metodą 3-dniowego bieżącego notowania spożytych produktów, potraw i napojów. Wielkość spożycia wymienionych powyżej składników wyliczano przy pomocy programu komputerowego Dieta 6.0 i odnoszono do obowiązujących norm żywienia na poziomie średniego zapotrzebowania (EAR). Wyniki spożycia podawano w przeliczeniu na osobę/dobę oraz na kilogram masy ciała.

Analizy stężenia arsenu całkowitego w moczu (tAs) wykonano za pomocą spektrometru mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną, wyposażonego w dynamiczną komorę reakcyjną (Perkin Elmer, SCIEX, USA). Analizy stężeń arsenu nieorganicznego (iAs) i arsenobetainy wykonano również przy pomocy wymienionego spektrometru mas, w połączeniu z wysokosprawną chromatografią cieczową (Perkin Elmer, SCIEX, USA).

Analizy z zakresu metabolomiki niecelowanej, po uprzednim przygotowaniu próbek moczu zgodnie z określonym protokołem, wykonywano przy użyciu systemu ultraefektywnej chromatografii cieczowej (Waters Acquity™ Ultra Performance LC system – Waters Corp., Milford, USA), sprzężonej z wysokorozdzielczym spektrometrem mas (HRMS), Synapt G2Si Q-TOF – Waters MS Technologies, Manchester, UK), ze źródłem jonizacji typu elektrosprej (ESI source – Waters, Manchester, UK). Rozdział chromatograficzny metabolitów niepolarnych i semipolarnych oraz metabolitów polarnych przeprowadzano na dwóch odpowiednio dobranych kolumnach.

Etapy przetwarzania danych metabolomicznych w sposób jasny i wystarczający zobrazowano na rycinie 5.

Uzyskane w badaniach wyniki, opracowane za pomocą analizy statystycznej, pozwoliły na zweryfikowanie wszystkich wymienionych powyżej hipotez badawczych.

Na podstawie przeglądu literatury, dotyczącej badań na modelach zwierzęcych (publikacja nr 1), Doktorantka stwierdziła, że składniki pokarmowe, takie jak kwas foliowy i cynk, zaangażowane w metabolizm arsenu mogą zwiększać efektywność metylacji, jak również zmniejszać niekorzystne zmiany w układzie pokarmowym, moczowym, limfatycznym, krwionośnym, nerwowym i rozrodczym. Natomiast wyniki badań dotyczące wpływu metioniny, choliny, witamin B₂, B₁₂, kwasu foliowego w połączeniu z wit. B₁₂ nie były jednoznaczne, jednak wskazywały na potencjalnie korzystny wpływ. Doktorantka w tej publikacji trafnie wymienia prawdopodobne przyczyny braku możliwości sformułowania jednoznacznych wniosków.

Wyniki badań *in vitro* na ludzkich liniach komórkowych oraz z udziałem ludzi narażonych na arsen (przeważająca liczba publikacji) Doktorantka opisała i podsumowała w publikacji nr 2. W większości badań *in vitro* wykazywano, że kwas foliowy i cynk zmniejszały nasilenie procesu apoptozy, stresu oksydacyjnego i uszkodzeń DNA. Natomiast niedobór wymienionych składników powodował nasilenie apoptozy, wzrost stężenia markerów stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego, a w przypadku niedoboru jedynie kwasu foliowego zmniejszenie efektywności metylacji arsenu. Badania przeprowadzone z udziałem ludzi wykazały, że wielkość spożycia i stężenie niektórych składników pokarmowych we krwi (metioniny, choliny, folianów, witamin B₂, B₆, B₁₂, cynku) mogą mieć korzystny wpływ na poprawę metylacji arsenu i na zmniejszenie nasilenia niekorzystnych skutków zdrowotnych. Jednak, jak podsumowuje Doktorantka, jednoznaczna interpretacja wyników, na uzyskanie których ma wpływ zbyt wiele zmiennych, jest niemożliwa.

Podsumowanie to uzasadnia zatem potrzebę prowadzenia dalszych badań.

Należy podkreślić, że badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej, jak wskazuje przegląd literatury, są pierwszymi, w których skorelowano wyniki badań metabolomicznych z wielkością spożycia przez osoby narażone na intoksykację arsenem wybranych składników pokarmowych, pełniących rolę donorów grup metylowych lub kofaktorów enzymów uczestniczących w metabolizmie tego pierwiastka.

Opisując wyniki badań własnych w publikacji nr 3, Doktorantka potwierdziła wszystkie trzy hipotezy cząstkowe.

Oceniając spożycie składników pokarmowych, takich jak: metionina, wymienione powyżej wit. z gr. B oraz cynk, odnotowano odsetek osób zarówno w grupie WN, jak i WH, które nie pokrywały wartości normy EAR. Odsetek ten wynosił odpowiednio 6,7-16,0% i 4,9-9,8% dla wit. z gr. B oraz 28 i 19,5% w przypadku cynku. Był zatem większy w przypadku osób należących do grupy WN, w moczu których stężenie arsenu całkowitego było poniżej wartości dopuszczalnych.

U osób grupy WH w porównaniu z osobami grupy WN wykazano istotnie wyższą intensywność sygnału pochodzącego od 25 metabolitów należących do pięciu głównych ścieżek przemian aminokwasów, węglowodanów, glikanów, witamin i nukleotydów, co przedstawiono na rycinie 6. Wykazano zależności między wielkością spożycia składników pokarmowych a intensywnością sygnału pochodzącego od 11 zidentyfikowanych metabolitów (tabela 8), powstających w przemianach aminokwasów, węglowodanów, lipidów i nukleotydów. Wyniki te stanowią potwierdzenie rezultatów badań opisanych w dostępnej literaturze. Ponadto w większości przypadków wykazano podobieństwa dotyczące stwierdzonych zmian w podścieżkach do zmian stwierdzanych we wcześniejszych badaniach metabolomicznych. Zmiany w podścieżkach, nie potwierdzone w literaturze, m.in. dotyczące metabolizmu niektórych aminokwasów i witamin, jak wyjaśnia Doktorantka, mogą być wynikiem różnic w źródłach i poziomie narażenia na arsen, a także różnic metabolicznych związanych z płcią oraz innymi czynnikami wpływającymi na metabolizm arsenu.

Należy podkreślić, że w tych bardzo istotnych badaniach wykazano ujemne zależności między spożyciem (przez mężczyzn zawodowo narażonych na arsen) składników pokarmowych jako donorów grup metylowych oraz kofaktorów enzymów zaangażowanych w metabolizm arsenu nieorganicznego (iAs) a potencjalnie zidentyfikowanymi metabolitami. Potwierdzono tym samym, że zbyt małe pobranie z diety wymienionych składników, a w konsekwencji mała efektywność metylacji skutkować może zwiększonym ryzykiem uszkodzeń DNA, nasileniem stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego, a w konsekwencji komplikacjami zdrowotnymi dotyczącymi zmian skórnych, ryzyka cukrzycy, przewlekłej choroby nerek oraz niektórych nowotworów. Natomiast, jak wyjaśnia Doktorantka, wykazane dodatnie zależności między spożyciem składników pokarmowych a intensywnością sygnału metabolitów na tym etapie badań są trudne do wyjaśnienia, w związku z czym ich kontynuacja jest konieczna.

Doktorantka w dysertacji z pełną świadomością opisuje mocne i słabe strony badania, przedstawiając tym samym w pełni świadome podejście zarówno do warunków realizacji badań, jak i oceny uzyskanych wyników.

Po przeanalizowaniu uzyskanych wyników nasuwa się jednak spostrzeżenie, a w konsekwencji pytanie, związane z ryzykiem narażenia. Eksploatacja hut miedzi, bez wprowadzania od początku ich działalności odpowiednich inwestycji proekologicznych, spowodowała znaczną degradację terenów wokół tych zakładów oraz pogorszenie warunków

życia mieszkańców w rejonie ich oddziaływania. Emisja do atmosfery metali ciężkich, takich jak arsen, ale również miedź, ołów, kadm, cynk oraz związków siarki, tlenów azotu i węgla, prowadzi do powszechnej współekspozycji w środowiskach przemysłowych. Istnieje więc wyraźne, potencjalne narażenie na jednoczesną ekspozycję na metale ciężkie, szczególnie w populacjach zawodowo narażonych na ich oddziaływanie.

Czy zatem uzyskane wyniki badań, szczególnie te niejednoznaczne, mogą być wynikiem oddziaływania jedynie arsenu, czy może też rezultatem interakcji między niektórymi metalami ciężkimi? Czy Doktorantka, przeprowadzając przegląd literatury, uzyskała dostęp do informacji na temat zdrowotnych skutków interakcji metali ciężkich oraz czy uzasadniona i możliwa byłaby kontynuacja podobnych badań z uwzględnieniem takich interakcji?

Podsumowanie

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej przeprowadzono po raz pierwszy badania dotyczące korelacji między wielkością spożycia składników pokarmowych, jako dawców grup metylowych lub kofaktorów reakcji metabolizmu arsenu a zmianami w profilu metabolicznym osób zawodowo narażonych na arsen, przy pomocy właściwie dobranych metod, a przedstawiona interpretacja wyników pozwoliła na zweryfikowanie hipotez badawczych oraz sformułowanie ważnych wniosków, stanowiących uzupełnienie brakujących lub kontrowersyjnych danych zamieszczonych w dostępnej literaturze.

Wskazano na potrzebę edukacji ukierunkowanej na rolę i potrzebę odpowiedniego pobierania składników pokarmowych, zaangażowanych w metabolizm arsenu, szczególnie w przypadku osób narażonych na intoksykację. Uzyskane wyniki mogą zatem przyczynić się do opracowania zaleceń dietetycznych dla wymienionej grupy osób.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Moniki Sijko-Szpańskiej wnosi zatem nowe, ważne elementy do wiedzy z zakresu dyscypliny technologia żywności i żywienia, ale też do dyscypliny nauki o zdrowiu. Problem badawczy rozpracowany w niniejszej pracy doktorskiej ma duże znaczenie zarówno w wymiarze poznawczym, jak i aplikacyjnym, co podkreślono również we wnioskach.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Moniki Sijko-Szpańskiej pt. „Analiza zależności pomiędzy wielkością spożycia wybranych składników pokarmowych profilem metabolicznym osób dorosłych środowiskowo narażonych na arsen”, zrealizowana pod kierunkiem Pani dr hab. Lucyny Kozłowskiej, prof. SGGW, w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, w myśl *Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm). Doktorantka zaprezentowała oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Wykazała się bardzo dobrą znajomością tematu, popartą przedstawionym, obszernym przeglądem literatury, umiejętnością samodzielnego rozwiązywania problemu, ale również umiejętnością pracy w zespole, opanowaniem warsztatu badawczego oraz umiejętnością opisywania i interpretacji wyników badań.

W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Moniki Sijko-Szpańskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 19.05.2025 r.

Tomasz Gencur



Instytut Żywności i Żywienia
WYDZIAŁ TECHNOLOGII ŻYWIENIA
Katedra Żywności Człowieka i Dietetyki
30-149 Kraków, ul. Bałicka 122
tel./fax +4812 662 4812
adres do korespondencji: 31-120 Kraków, al. Mickiewicza 21

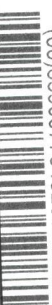
R

(00)659007734528625027



(00)659007734528625027

(00)659007734528625027

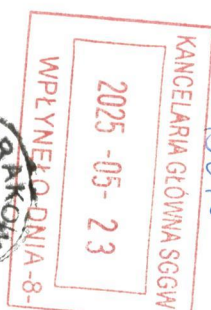


Poczta Polska

Opłata pobrana _____ zł _____ gr

2024

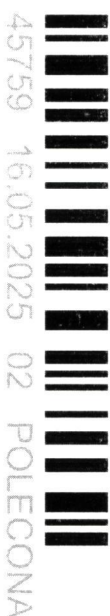
BON



OPŁATA POBRANA
TAXE PERÇUE-POLOGNE
Umowa z Poczta Polska S.A.
ID nr 583682/K



RPu/13713/2025 N
Data: 2025-05-23



45759 16.05.2025 02 POLECONA

Biurowisko Nauki Szkoła Główna Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie
Nowoursynowska 166
02-787 Warszawa
Warszawa

16.05.2025

44230