

AUTOREFERAT

**Dokumentacja do wniosku o przeprowadzenie
postępowania habilitacyjnego**

***Zastosowanie markerów narażenia w monitorowaniu
zanieczyszczeń bakteryjnych w środowisku pracy
i życia człowieka***

Dr n. med. Marcin Cyprowski

Warszawa 2019

SPIS TREŚCI

1.	DANE PERSONALNE	2
2.	POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE	2
3.	INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH	2
4.	WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U., Z 2016 R. POZ. 1311.)	3
A.	TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO	3
B.	WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE	3
B1.	PUBLIKACJE W CZASOPISMACH POSIADAJĄCYCH IF „IMPACT FACTOR” - CHRONOLOGICZNIE	3
B2.	PUBLIKACJE W CZASOPISMACH NIEPOSIADAJĄCYCH IF „IMPACT FACTOR” - CHRONOLOGICZNIE	5
C.	OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ ZE WSKAZANIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA	5
C1.	WPROWADZENIE	5
C2.	CHARAKTERYSTYKA UZYSKANYCH WYNIKÓW	7
C3.	WYKORZYSTANIE WYNIKÓW W PRZYSZŁOŚCI	10
C4.	PIŚMIENICTWO	10
5.	OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH (PO DOKTORACIE)	11

1 Dane personalne

Imię i nazwisko: **Marcin Cyprowski**
Miejsce pracy: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut
Badawczy, Warszawa

2 Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

2008: **Instytut Medycyny Pracy im. prof. Jerzego Nofera**
Uzyskanie stopnia doktora nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna
Temat pracy: Narażenie na szkodliwe czynniki biologiczne oraz ocena stanu
zdrowia pracowników oczyszczalni ścieków i kanalizacji.
Promotor: prof. dr hab. med. Irena Szadkowska-Stańczyk

1997: **Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi**
Uzyskanie tytułu magistra ochrony środowiska
Temat pracy: Makrofauna wybranego meandra rzeki Grabi ze szczególnym
uwzględnieniem skąposzczetów (*Oligocheata*): skład gatunkowy, liczebność
i zasięg pionowy w osadach dennych.
Promotor: prof. dr hab. Andrzej Piechocki

3 Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2015 - 2019: **Adiunkt**
Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy w
Warszawie, Zakład Zagrożeń Chemicznych, Pyłowych i Biologicznych

2010 - 2014: **Starszy specjalista**
Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy w
Warszawie, Zakład Zagrożeń Chemicznych, Pyłowych i Biologicznych

2008 - 2010: **Adiunkt**
Instytut Medycyny Pracy w Łodzi, Zakład Środowiskowych Zagrożeń Zdrowia

1999 - 2007 **Asystent techniczny**
Instytut Medycyny Pracy w Łodzi, Zakład Środowiskowych Zagrożeń Zdrowia

4 Wskazanie osiągnięcia naukowego wynikającego z art. 16 ust. 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U., z 2016 r. poz. 1311.)

A. Tytuł osiągnięcia naukowego.

Cykl powiązanych tematycznie publikacji pod wspólnym tytułem:

„Zastosowanie markerów narażenia w monitorowaniu zanieczyszczeń bakteryjnych w środowisku pracy i życia człowieka”

Do osiągnięcia naukowego zastało włączonych 7 prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach, w tym 6 publikacji w czasopismach indeksowanych w Journal Citation Reports (JCR). Łączna punktacja cyklu publikacji: **IF = 9,284; KBN/MNiSW = 145 pkt.**

B. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe.

B1. Publikacje w czasopismach posiadających IF „Impact Factor” – chronologicznie:

Lp.	Czasopismo	Tytuł artykułu	Autor/autorzy	Rok, tom, strony	IF	KBN/MNiSW
P1	Annals of Agricultural and Environmental Medicine	Across-shift changes in upper airways after exposure to bacterial cell wall components	<u>Cyprowski M.</u> Stobnicka-Kupiec A. Górny R.L. Gołofit-Szymczak M. Ptak-Chmielewska A. Ławniczek-Wałczyk A.	2019, DOI: 10.26444/aaem/106112	1,116	30
	W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Wykonałem pomiary, analizę laboratoryjną endotoksyn, peptydoglikanów i cytokin prozapalnych oraz część analizy statystycznej wyników. Przygotowałem tekst publikacji. Mój wkład szacuję na 60%.					
P2	Science of the Total Environment	Bacterial aerosols in a municipal landfill environment	<u>Cyprowski M.</u> Ławniczek-Wałczyk A. Gołofit-Szymczak M. Frączek K. Kozdrój J. Górny R.L.	2019, 660, 288-296.	4,610	40
	W ww. pracy brałem udział w przeprowadzeniu pomiarów. Wykonałem analizę laboratoryjną endotoksyn oraz analizę statystyczną wyników. Przygotowałem tekst publikacji. Mój wkład szacuję na 60%.					

P3	Rocznik Ochrona Środowiska	Aerozole pochodzenia bakteryjnego w pomieszczeniach roboczych zakładu gospodarki odpadami	Cyprowski M. Stobnicka A. Górny R. Gołofit- Szymczak M. Ławniczek- Wańczyk A.	2016, 18 (2), 38-60.	0,705	15
W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Wykonałem pomiary, analizę laboratoryjną endotoksyn i peptydoglikanów oraz analizę statystyczną wyników. Przygotowałem tekst publikacji. Mój wkład szacuję na 60%.						
P4	International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health	Airborne peptidoglycans as a supporting indicator of bacterial contamination in a metal processing plant	Cyprowski M. Ławniczek- Wańczyk A. Górny R.L.	2016, 29 (3), 427-437.	0,947	15
W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Wykonałem pomiary, analizę laboratoryjną endotoksyn i peptydoglikanów oraz analizę statystyczną wyników. Przygotowałem tekst publikacji. Mój wkład szacuję na 70%.						
P5	International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health	Endotoxin exposure and changes in short-term pulmonary function among sewage workers	Cyprowski M. Sobała W. Buczyńska A. Szadkowska- Stańczyk I.	2015, 28 (5), 803-811.	0,780	20
W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Wykonałem pomiary oraz analizy laboratoryjne endotoksyn. Przygotowałem tekst publikacji. Mój wkład szacuję na 70%.						
P6	Annals of Agricultural and Environmental Medicine	Peptidoglycans in cutting fluids – a good indicator of bacterial contamination?	Cyprowski M. Ławniczek- Wańczyk A. Górny R.L.	2014, 21 (2), 256-258.	1,126	20
W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Wykonałem pomiary, analizę laboratoryjną endotoksyn i peptydoglikanów oraz analizę statystyczną wyników. Przygotowałem tekst publikacji. Mój wkład szacuję na 70%.						
Razem					9,284	140

Liczba prac = 6 Suma: IF = 9,284; KBN/MNiSW = 140 pkt.

B2. Publikacje w czasopismach nieposiadających IF „Impact Factor” – chronologicznie:

Lp.	Czasopismo	Tytuł artykułu	Autor/autorzy	Rok, tom, strony	KBN/MNiSW
P7	Bezpieczeństwo Pracy. Nauka i Praktyka	Markery mikrobiologicznego zanieczyszczenia środowiska pracy przy zagospodarowaniu odpadów komunalnych	Cyprowski M. Ławniczek- Wańczyk A. Gołofit- Szymczak M. Stobnicka A. Górny R.L.	2014, 4, 35-37.	5
W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Przygotowałem tekst publikacji. Mój wkład szacuję na 80%.					
Razem					5

Liczba prac = 1 Suma: KBN/MNiSW = 5 pkt.

C. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz ze wskazaniem ich ewentualnego wykorzystania.

Przedstawiony cykl publikacji stanowi zbiór powiązanych tematycznie zagadnień dotyczących zastosowania markerów narażenia w monitorowaniu zanieczyszczeń bakteryjnych w środowisku pracy i życia człowieka.

C1. Wprowadzenie (publikacja P7)

Ilościowa i jakościowa charakterystyka drobnoustrojów bakteryjnych w środowisku pracy i życia człowieka jest bardzo ważnym elementem oceny narażenia i opartej na niej oceny ryzyka zdrowotnego różnych grup zawodowych oraz populacji generalnej. W praktyce, charakterystyka ta najczęściej oparta jest na klasycznych metodach hodowlanych, które cechują przede wszystkim stosunkowo niskie koszty identyfikowanych drobnoustrojów. Dzięki nim możemy oceniać stężenia drobnoustrojów zarówno w powietrzu, jak i na badanych powierzchniach, a także rozpoznać ich skład gatunkowy [Sloyer i wsp., 2002]. Jednakże metody te próbują oszacować stopień zanieczyszczenia środowiska żywymi drobnoustrojami nie uwzględniając dwóch istotnych faktów. Po pierwsze, bakterie wykazujące zdolność wzrostu charakteryzują się ograniczoną przeżywalnością w powietrzu. Dotyczy to w szczególności pałeczek Gram-ujemnych, które w zależności od panujących warunków mikroklimatycznych (temperatury i wilgotności względnej powietrza) są w stanie zachować swoje zdolności życiowe przez okres od kilku do około 45 minut [Tang, 2009]. Po drugie, komórki bakteryjne mogą stwarzać zagrożenie także po ich obumarciu. Dzieje się to za sprawą immunologicznie reaktywnych związków pochodzenia mikrobiologicznego takich jak endotoksyny czy peptydoglikany, które za życia bakterii stanowią integralną część ścian komórkowych, a po ich śmierci są uwalniane do środowiska. Ponadto, ocena immunologicznej reaktywności, w tym właściwości immunotoksycznych, ma znacznie szerszy

wymiar obejmując zarówno drobnoustroje pochodzące z różnych grup taksonomicznych, jak również komórki martwe, a także ich fragmenty. Jest to związane z możliwością precyzyjnej identyfikacji przez organizm człowieka najbardziej charakterystycznych struktur drobnoustrojów, selektywnie rozpoznawanych przez komórki układu immunologicznego (z ang. PAMP - Pathogen Associated Molecular Patterns). Do najważniejszych z nich zaliczane są endotoksyny oraz peptydoglikany, których występowanie w przyrodzie jest charakterystyczne odpowiednio dla bakterii Gram-ujemnych oraz bakterii ogółem. Dzięki temu można je traktować jako swoiste markery obecności tych mikroorganizmów, które mogą być wykorzystywane zarówno w badaniach środowiskowych, jak i w ocenie higienicznej środowiska pracy [Sigsgaard i wsp., 2005].

Endotoksyny bakteryjne (END) są makrocząsteczkami o masie od kilku do kilkudziesięciu megadaltonów, powstałymi przez polimeryzację mniejszych jednostek lipopolisacharydów (LPS) z białkami i fosfolipidami ściany komórkowej (heteropolimery). Uwalniają się one łatwo do środowiska poprzez fragmentację ściany komórkowej (tworzą się sferyczne pęcherzyki, które mierzą średnio 30-50 nm) lub wraz z rozpadem (obumarciem) komórki bakteryjnej [Dutkiewicz i wsp., 1992]. Odznaczają się wyjątkowo długą trwałością struktury w środowisku oraz termostabilnością (ich zniszczenie następuje po kilkugodzinnym działaniu temperatury 180°C). Do oceny stężeń endotoksyn bakteryjnych stosuje się przede wszystkim test LAL (*Limulus* Amebocyte Lysate) w wersji kinetycznej chromogennej. Stopień zanieczyszczenia powietrza endotoksynami bakteryjnymi wyrażany jest w ng/m³ lub w jednostkach JE/m³ (JE – „jednostka endotoksyczna”; stężenie endotoksyny w próbkach odnosi się do zdefiniowanego referencyjnego standardu endotoksyny (RSE) i wyrażane jest w jednostkach opartych na aktywności materiału referencyjnego w teście LAL). Średnio przyjmuje się przelicznik 10 JE ≈ 1 ng. Należy jednak zaznaczyć, że aktywność endotoksyn może różnić się między gatunkami bakterii, co może być istotne przy ocenie skutków zdrowotnych [Hansen i wsp., 1999]. Badania naukowe pozwoliły stwierdzić, iż endotoksyny, szczególnie w wysokich stężeniach, ze względu na skutki zdrowotne przez nie wywoływane są ważnym czynnikiem narażenia pracowników różnych branż. Sprawilo to, iż w wielu badaniach w obszarze higieny pracy zostały one uznane za obiektywny wskaźnik narażenia na bakterie Gram-ujemne, choć zastosowanie ich w badaniach środowiskowych jest jeszcze mało popularne.

Peptydoglikany (PGN) są ważnym składnikiem strukturalnym ściany komórkowej bakterii. Są zbudowane z biopolimeru kwasu muraminowego i N-acetyloglukozaminy, połączonych wiązaniami β-(1→4)-glikozydowymi oraz pentapeptydu. Ocenia się, że u bakterii Gram-dodatnich peptydoglikany stanowią ok. 70% całej masy ściany komórkowej, zaś u Gram-ujemnych ok. 25% [Sigsgaard i wsp., 2005]. Ocena ilościowa peptydoglikanów może być prowadzona z wykorzystaniem dwóch metod. Pierwsza polega na określaniu stężenia kwasu muraminowego metodą analizy chromatograficznej, jednakże kwas ten stanowi jedynie od 10% do 20% całej cząsteczki PGN, co może powodować w ilościowych analizach zagrożeń mikrobiologicznych ich znaczące niedoszacowanie. W drugiej, wykorzystanie jako substratu plazmy larwy jedwabnika w teście SLP (Silkworm Larvae Plasma), którego działanie polega na analizie spektrofotometrycznej stężenia melaniny, będącej produktem aktywacji przez PGN wielu proteaz serynowych, czyli tak zwanego układu fenoloksydazy (pro-PO), dało nowe możliwości prowadzenia analiz PGN. Analizy te charakteryzują się wysoką specyficznością i efektywnością na poziomie ok. 90% w porównaniu do wyników

uzyskiwanych za pomocą klasycznych metod hodowlanych [Kobayashi i wsp., 2000]. Stopień zanieczyszczenia powietrza peptydoglikanami wyrażany jest w ng/m^3 . Wykorzystanie peptydoglikanów jako markera narażenia było do tej pory sporadyczne i ograniczone do pojedynczych badań w fermach trzody chlewnej [Zhiping i wsp., 1996], w sortowniach odpadów [Laitinen i wsp., 2001] przy przeróbce biomasy [Sebastian i wsp., 2006], przy produkcji roślinnej [Góra i wsp., 2009], czy w szkołach [Fox i wsp., 2005], z czego większość opierała się na analizie kwasu muraminowego. Przy użyciu testu SLP zbadano dotychczas jedynie środowisko hodowców trzody chlewnej [Jolie i wsp., 1998].

C2. Charakterystyka uzyskanych wyników

Jak wiadomo, obecność endotoksyn na stanowiskach pracy wpływa na stan zdrowia osób zatrudnionych. W swoich badaniach opisanych w **publikacji P5** wykazałem, że niekorzystny efekt zdrowotny wywołany ich wdychaniem przez pracowników oczyszczalni ścieków może występować przy stężeniach kilkukrotnie niższych od bezpiecznej wartości granicznej ustalonej na poziomie 90 JE/m^3 [DECOS, 2010]. Analizując u 78 pracowników oczyszczalni ścieków sprawność układu oddechowego w czasie zmiany roboczej, mierzoną parametrem natężonej pierwszosekundowej objętości wydechowej FEV_1 wykazałem, że już przy średnim stężeniu END na poziomie $15,4 \text{ JE/m}^3$ obserwowane było istotne obniżenie wartości tego parametru ($p=0,044$). Jednocześnie, badanie to pokazało, że stężenia END istotnie statystycznie korelowały ze stężeniami pyłu wdychalnego, na którego cząstkach mogły być transportowane w powietrzu na stanowiskach pracy ($r=0,33$; $p=0,003$).

Wyniki tego badania pokazały jak silnym działaniem prozapalnym charakteryzują się END w tym środowisku zawodowym, ale uświadomiły również, że nawet przy zastosowaniu tego wskaźnika, w ocenie higienicznych warunków pracy nadal pozostawał niedoszacowany obszar dotyczący immunologicznie reaktywnych związków pochodzenia mikrobiologicznego, jakimi są PGN, które pozwoliłyby opisać narażenie na wszelkiego rodzaju drobnoustroje bakteryjne, a nie tylko bakterie Gram-ujemne. Wykorzystując ww. test SLP rozpocząłem zatem cykl badań, których celem była ocena występowania PGN w powietrzu różnych środowisk zawodowych.

Początkowo swoje spostrzeżenia opierałem na wynikach pochodzących z zakładów branży metalowej, gdzie w procesie produkcyjnym wykorzystywane są ciecz obróbkowe, które, jako źródło zanieczyszczeń mikrobiologicznych, również objęto badaniem. Łącznie przeanalizowałem 11 próbek cieczy obróbkowych oraz oceniłem poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego na 5 stanowiskach pracy. W trakcie badania aerozoli przeprowadziłem analizę rozkładów ziarnowych cząstek mgły olejowej, na powierzchniach których transportowane są endotoksyny. Jednakże, całkowicie nowym elementem takiej analizy była identyfikacja peptydoglikanów. Ponadto, w powietrzu na stanowiskach pracy określono całkowitą liczbę mikroorganizmów (żywych i martwych razem).

W pierwszej części badania (**publikacja P6**) wykazałem, że w cieczach obróbkowych średnie stężenie bakterii wynosiło $55,8 \text{ jtk/mL}$ (jtk – jednostki tworzące kolonie) (geometryczne odchylenie standardowe, $\text{GSD}=13,3$), peptydoglikanów – $28,2 \text{ ng/mL}$ ($\text{GSD}=6$), zaś stężenia PGN istotnie korelowały ze stężeniami żywych bakterii obecnych w cieczach obróbkowych ($R^2=0,50$; $p<0,05$). Ponadto stwierdziłem obecność PGN w próbkach cieczy, w których nie wykazano wzrostu bakterii przy zastosowaniu metod hodowlanych, co

świadczy o tym, że rozwój bakterii miał tam wcześniej miejsce, lecz został zahamowany np. poprzez dodanie do cieczy biocydu.

Druga część badania (**publikacja P4**), która skupiała się na analizie próbek powietrza wykazała średnie stężenie (mediana) endotoksyn bakteryjnych na poziomie $0,2 \text{ ng/m}^3$, zaś peptydoglikanów – $16,6 \text{ ng/m}^3$. W przypadku badania próbek mgły olejowej stwierdziłem, że stężenia PGN, podobnie jak endotoksyn, istotnie statystycznie korelowały z całkowitym stężeniem mikroorganizmów, odpowiednio: $r=0,72$ i $r=0,76$ przy $p<0,05$. Ponadto stężenia endotoksyn istotnie statystycznie korelowały ze stężeniami żywych bakterii w powietrzu ($r=0,75$; $p<0,05$). Przeprowadzona po raz pierwszy w tego typu środowisku pracy analiza rozkładów ziarnowych cząstek aerozoli dała istotne wskazówki na temat sposobu przenoszenia się tych immunologicznie reaktywnych związków pochodzenia bakteryjnego w powietrzu. Na stanowiskach pracy, w środowisku mgły olejowej PGN rozprzestrzeniały się najczęściej w postaci cząstek o średnicach aerodynamicznych od $2,1 \mu\text{m}$ do $9 \mu\text{m}$, sugerując tym samym, że mogą one deponować się w górnych i środkowych odcinkach układu oddechowego pracowników.

Badanie to dowiodło, że peptydoglikany mogą być z sukcesem wykorzystywane jako nowy marker zanieczyszczenia bakteryjnego w środowisku zawodowym zanieczyszczonym mgłą olejową. Jednakże, słuszność swoich spostrzeżeń chciałem zweryfikować również wśród innych grup zawodowych. W tym celu rozpocząłem realizację projektu badawczego dedykowanego zanieczyszczeniu aerozolem bakteryjnym, w tym PGN i END, w sortowni odpadów komunalnych, w oczyszczalni ścieków oraz w budynku biurowym. Ponadto, poza identyfikacją tych cząstek w powietrzu ww. środowisk pracy, zbadałem czy i w jakim stopniu aerozole pochodzenia bakteryjnego oddziałują na układ immunologiczny pracowników pobudzając go do produkcji cytokin prozapalnych identyfikowanych w próbkach popłuczyn nosowych.

W swoich badaniach przeprowadziłem ocenę narażenia opartą na stacjonarnych pomiarach stężeń żywych bakterii oraz END i PGN w powietrzu, uwzględniając rozkłady ziarnowe cząstek. Ponadto za pomocą dozymetrii indywidualnej, u 10 pracowników sortowni odpadów, 20 pracowników oczyszczalni ścieków oraz 8 pracowników biurowych pobrałem próbki pyłu organicznego we frakcji wdychalnej. Od wszystkich osób biorących udział w badaniu, przed i po zakończeniu zmiany roboczej pobrałem także popłuczyny nosowe, w których oznaczyłem poziomy cytokin prozapalnych takich jak interleukiny: 1β (IL- 1β), 6 (IL-6), 8 (IL-6) oraz czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α).

Badanie na terenie sortowni odpadów komunalnych przy zastosowaniu stacjonarnego, 8-stopniowego impaktora kaskadowego (**publikacja P3**) wykazało, że średnie stężenia END, wynosiło $173,6 \text{ ng/m}^3$ (GSD=2,39), zaś PGN – $1446,6 \text{ ng/m}^3$ (GSD=1,21). Ponadto, obserwacje rozkładów ziarnowych wykazały, w sposób zbliżony jak w przypadku mgły olejowej, że stężenia PGN stopniowo wzrastały wśród cząstek o średnicach aerodynamicznych w zakresie $3,3\text{--}11 \mu\text{m}$. Wyniki tej analizy świadczą o tym, że cząstki PGN podlegają zjawisku agregacji na powierzchni pyłu organicznego.

Dzięki zastosowaniu pomiarów indywidualnych w realizowanym projekcie (**publikacja P1**) wykazałem, że najbardziej skażonym środowiskiem pracy była sortownia odpadów komunalnych, gdzie średnie stężenia pyłu organicznego wynosiło $3,47 \text{ mg/m}^3$ (odchylenie standardowe, SD=4,66), END – $96,31 \text{ ng/m}^3$ (SD=162,49), zaś PGN – $571,88 \text{ ng/m}^3$

(SD=1426,96). Stwierdziłem ponadto, istotną statystycznie korelację stężeń pyłu organicznego i END ($r=0,54$; $p<0,001$). Analizę popłuczyn nosowych przeprowadziłem finalnie jedynie w odniesieniu do IL-8, gdyż dla pozostałych badanych cytokin wartości stężeń w 80% przypadków były poniżej poziomu detekcji. Analiza wyników wykazała, że pomiędzy badanymi grupami widoczne były istotne ($p<0,01$) różnice poziomów IL-8 (po zmianie roboczej). Ponadto, tylko w grupie pracowników sortowni odpadów zaobserwowałem, że stężenia IL-8 pod koniec zmiany roboczej istotnie statystycznie wzrosły względem poziomów przed rozpoczęciem pracy ($p<0,05$).

Badanie to po raz pierwszy pozwoliło ocenić niekorzystne skutki zdrowotne występujące po jednoczesnym narażeniu inhalacyjnym na END i PGN, których stężenia oznaczano testem SLP. Należy podkreślić, iż oceny tej dokonano w warunkach rzeczywistych w czasie trwania zmiany roboczej, poprzez ocenę stopnia uwalniania cytokin prozapalnych w popłuczynach nosowych, w tym szczególnie interleukiny 8 (IL-8). Wykazałem, że pył organiczny będący nośnikiem tych immunologicznie reaktywnych cząstek pochodzenia bakteryjnego najsilniej wpływa na powstawanie procesów zapalnych w górnym odcinku układu oddechowego pracowników.

Potwierdzenie fenomenu przenoszenia endotoksyn i peptydoglikanów na cząstkach pyłu organicznego w różnych środowiskach zawodowych, w połączeniu z ich dużą trwałością, dało merytoryczne podstawy do wykorzystania tych markerów narażenia do monitorowania stanu mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza w znacznie większej skali przestrzennej, aniżeli tylko dla zamkniętych pomieszczeń lub niewielkich przestrzeni środowiska pracy.

W swoim ostatnim badaniu z tego cyklu przeprowadziłem więc analizę rozprzestrzeniania się aerozoli bakteryjnych, w tym endotoksyn, w środowisku składowiska odpadów komunalnych oraz w jego otoczeniu (**publikacja P2**). Na badanym terenie wyznaczono 17, równo oddalonych od siebie, punktów pomiarowych, tworząc w ten sposób siatkę obejmującą zarówno teren samego składowiska, jak i tereny sąsiadujące, w tym: w granicach eksploatowanego sektora, a także na terenie okolicznych lasów, pól oraz pastwisk. Pomiaru stężeń bakterii przeprowadzono w czasie jednego roku kalendarzowego, w tym w trakcie pracy składowiska oraz w czasie jego przestoju. Analizie mikrobiologicznej poddano bakterie ogółem, bakterie Gram-ujemne oraz END. Dzięki zastosowaniu technik geostatystycznych i stworzeniu barwnych map konturowych, w pracy tej, jako jednej z pierwszych dokonano wizualizacji rozprzestrzeniania się aerozoli bakteryjnych na określonym terenie.

Wykazałem, że składowisko odpadów komunalnych jest istotnym źródłem pałeczek Gram-ujemnych. Ponieważ czas przeżycia tych bakterii w powietrzu jest stosunkowo krótki, następował rozpad ich komórek, a przez to uwolnienie się do środowiska znaczących ilości endotoksyn. W sposób szczególny zjawisko to zostało pokazane w czasie przestoju składowiska, kiedy to średnie stężenia END ($1,50 \text{ JE/m}^3$; $SD=1,22$) były istotnie wyższe ($p<0,01$) niż w czasie jego pracy ($1,23 \text{ JE/m}^3$; $SD=0,76$). W przypadku pałeczek Gram-ujemnych wykazano tendencję odwrotną. Istotnie wyższe ($p<0,01$) stężenia tych bakterii na poziomie $1,02 \times 10^2 \text{ jtk/m}^3$; $SD=163$ stwierdzono w czasie, gdy odpady komunalne były przywożone na składowisko, natomiast kiedy składowisko nie pracowało ich średnie stężenie wynosiło $0,16 \times 10^2 \text{ jtk/m}^3$; $SD=0,46$. Dodatkowo wykazałem, że pomiędzy stężeniami pyłu

organicznego i END występowała istotna statystycznie korelacja ($r=0,48$; $p<0,01$). Natomiast wykorzystanie metody modelowania przestrzennego pozwoliło wyznaczyć prognozowany zakres oddziaływania aktywnego sektora składowiska na otaczające go tereny. Na przedstawionych w publikacji mapach widać, iż wykreślone izolinie stężeń bakterii zwykle rozchodzą się promieniście od miejsca aktualnego składowania odpadów, a maksymalny zasięg rozprzestrzeniania się bioaerozoli można ocenić na około 600-700 m.

Przeprowadzone badanie wykazało, że endotoksyny łącznie z cząstkami pyłowymi są przenoszone na znacznie większe odległości powiększając w ten sposób zasięg oddziaływania składowiska odpadów o obszary zamieszkałe przez ludzi. Ponadto badanie udowodniło, że nowoczesna wizualizacja wyników umożliwia lepszą ocenę higienicznego stanu powietrza na badanym obszarze, ułatwia planowanie przestrzenne oraz podejmowanie racjonalnych działań profilaktycznych w zakresie ochrony zdrowia.

Niniejsza rozprawa habilitacyjna wykazała, że endotoksyny bakteryjne i peptydoglikany mogą być skutecznie wykorzystywane jako markery narażenia w monitorowaniu zanieczyszczeń bakteryjnych w środowisku pracy i życia człowieka.

C3. Wykorzystanie wyników w przyszłości

1. Oznaczenie stężenia peptydoglikanów powinno być immanentną częścią oceny narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne pracowników różnych gałęzi przemysłu, pozwalając tym samym uwzględnić immunotoksyczne właściwości drobnoustrojów bakteryjnych.
2. Ocena oddziaływania na środowisko obiektów komunalnych (m.in. składowisk odpadów, kompostowni, oczyszczalni ścieków) czy zakładów przemysłowych, z których następuje silna emisja aerozoli bakteryjnych (m.in. ferm drobiu i trzody chlewnej) powinna uwzględniać pomiary endotoksyn jako markerów rozprzestrzeniania się tego typu zanieczyszczeń.
3. Silne właściwości prozapalne endotoksyn (nawet jeśli są one obecne w niskich stężeniach w powietrzu) sprawiają, że środowiskowa obecność tych cząstek powinna być uwzględniana jako immanentna część oceny ryzyka zdrowotnego nie tylko różnych grup zawodowych, ale także ludzi zamieszkujących w okolicy obiektów komunalnych.

C4. Piśmiennictwo

- 1) Sloyer JL, Novitsky TJ, Nugent SJ. Rapid bacterial counts in metal working fluids. *Ind Microbiol Biotechnol*. 2002; 29(6): 323-324.
- 2) Tang JW. The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *J R Soc Interface*. 2009; 6: S737-S746.
- 3) Sigsgaard T, Bonefeld-Jorgensen EC, Hoffmann HJ, Bønløkke J, Krüger T. Microbial cell wall agents as an occupational hazard. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 207: S310-S319.
- 4) Dutkiewicz J, Tucker J, Burrell R, Olenchock SA, Schwegler-Berry D, Keller GE, Ochalska B, Kaczmarek F, Skórska C. Ultrastructure of the endotoxin produced by Gram-negative bacteria associated with organic dusts. *Syst Appl Microbiol*. 1992; 15(3): 474-485.

- 5) Hansen LA, Poulsen OM, Würtz H. Endotoxin potency in the A549 lung epithelial cell bioassay and the *Limulus* amebocyte lysate assay. J Immunol Methods. 1999; 226: 49-58
- 6) Kobayashi T, Tani T, Yokota T, Kodama M. Detection of peptidoglycan in human plasma using the silkworm larvae plasma test. FEMS Immunol Med Microbiol. 2000; 28: 49-53.
- 7) Zhiping W, Malmberg P, Larsson BM, Larsson K, Larsson L, Saraf A. Exposure to bacteria in swine-house dust and acute inflammatory reactions in humans. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 1261–1266.
- 8) Laitinen S, Kangas J, Husman K, Susitaival P. Evaluation of exposure to airborne bacterial endotoxins and peptidoglycans in selected work environments. Ann Agric Environ Med 2001; 8: 213–219.
- 9) Sebastian A, Madsen AM, Martensson L, Pomorska D, Larsson L. Assessment of microbial exposure risks from handling of biofuel wood chips and straw--effect of outdoor storage. Ann Agric Environ Med 2006; 13: 139–145.
- 10) Góra A, Mackiewicz B, Krawczyk P, Golec M, Skorska C, Sitkowska J, Cholewa G, Larsson L, Jarosz M, Wojcik-Fatla A, Dutkiewicz J. Occupational exposure to organic dust, microorganisms, endotoxin and peptidoglycan among plants processing workers in Poland. Ann Agric Environ Med 2009; 16: 143–150.
- 11) Fox A, Harley W, Feigley C, Salzberg D, Toole C, Sebastian A, Larsson L. Large particles are responsible for elevated bacterial marker levels in school air upon occupation. J Environ Monit 2005; 7: 450–456.
- 12) Jolie R, Bäckström L, Gunderson P. Airborne contaminants and farmers health in swine farms with high and low prevalence of respiratory diseases in pigs. Ann Agric Environ Med 1998; 5: 87–92.
- 13) DECOS, Health Council of the Netherlands. Endotoxins. Health-based recommended occupational exposure limit. The Hague: The Council; 2010.

5 Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (po doktoracie)

Zdobyte przeze mnie w trakcie realizacji przewodu doktorskiego doświadczenia z sukcesem były wykorzystane podczas projektu badawczego koncentrującego się na ocenie toksycznego oddziaływania endotoksyn i (1→3)-β-D-glukanów na układ oddechowy pracowników zatrudnionych przy intensywnej hodowli trzody chlewnej (**publikacje D14, D15, D20**). Między innymi dokonałem szczegółowej charakterystyki narażenia tej grupy zawodowej na (1→3)-β-D-glukany (**publikacja D14**), gdzie wykazałem istotne statystycznie korelacje pomiędzy stężeniami pyłu organicznego (w frakcji wdychalnej i respirabilnej), a stężeniami tych związków oraz fakt, że występowanie (1→3)-β-D-glukanów było uzależnione od zastosowania na fermach wyściółki ze słomy. Ponadto stwierdziłem, że na ich poziomy miały wpływ takie czynności zawodowe jak ręczne podawanie paszy i mechaniczne usuwanie obornika, a także brak pojemnika na gnojowicę w budynkach hodowlanych.

Swoje naukowe zainteresowanie (1→3)-β-D-glukanami wyraziłem także badając ich występowanie w innych środowiskach zawodowych, takich jak sortownie odpadów komunalnych (**publikacja D5**), kompostownie odpadów, oczyszczalnie ścieków i zakłady branży metalowej (**publikacja D19**). W drugiej z wymienionych prac wykazałem między innymi, że najwyższe stężenia (1→3)-β-D-glukanów występowały na terenie kompostowni, gdzie istotnie statystycznie korelowały one ze stężeniami grzybów w powietrzu. Natomiast w oczyszczalni ścieków stwierdziłem, że udział frakcji rozpuszczalnej w zasadach był na poziomie 73%, podczas gdy w dwóch pozostałych środowiskach wyraźnie przekraczał 90% wszystkich oznaczonych (1→3)-β-D-glukanów.

W swojej pracy zawodowej cały czas starałem się poszerzać zakres zainteresowań naukowych uczestnicząc m.in. w badaniu, które miało na celu identyfikację biologicznych czynników alergizujących w środowisku przedszkoli miasta Łodzi (**publikacja D13**). W badaniu tym przeanalizowano próbki pyłu osiadłego w pomieszczeniach przedszkoli, a także próbki z powierzchni ubrań dzieci, w których identyfikowano alergeny roztoczy (Der p1), psa (Can f1), kota (Fel d1) oraz karalucha (Bla g2). Wykazałem m.in. że stężenia alergenu Fel d1 w klasach dzieci w wieku 3-4 lat były istotnie wyższe niż w klasach dzieci w wieku 5-6 lat, zaś występowanie alergenu Can f1 w przedszkolach było uzależnione od pory roku. Ponadto potwierdziłem fakt transportowania tych dwóch alergenów na powierzchni ubrań dzieci, które posiadały w domu kota lub psa.

Innym przykładem poszerzania przeze mnie obszarów zainteresowań naukowych było badanie bakterii beztlenowych w oczyszczalni ścieków (**publikacja D2**), które do tej pory były zwykle pomijane w ocenie narażenia pracowników tej branży. W pracy tej wykazałem, że zarówno w ściekach, osadach ściekowych, jak i w powietrzu na stanowiskach pracy obecnych jest wiele gatunków bakterii beztlenowych, w tym patogenne szczepy *Clostridium perfringens*, których występowanie zostało potwierdzone dzięki zastosowaniu metod molekularnych. Ponadto najwyższe stężenia tej grupy bakterii występowały w zamkniętych przestrzeniach budynków, w których miało miejsce mechaniczne oczyszczanie ścieków.

Poza wymienionymi powyżej badaniami, zwieńczonymi artykułami o charakterze oryginalnym, brałem także udział w realizacji licznych projektów badawczych, których celem była identyfikacja szkodliwych czynników biologicznych w różnych środowiskach zawodowych, takich jak: spalarnie odpadów (**publikacja D1**), elektrownie, w których spalana jest biomasa (**publikacje D4, D6, D8, D16**), składowiska odpadów komunalnych (**publikacja D7**), małe samoloty pasażerskie (**publikacja D9**), pracownie konserwacji zabytków (**publikacja D10**), firmy zajmujące się sprzątaniem (**publikacja D11**), pomieszczenia biurowe (**publikacja D17**). Dodatkowo uczestniczyłem w projekcie na temat szkodliwych czynników biologicznych w pomieszczeniach mieszkalnych, w aspekcie gromadzenia w nich odpadów komunalnych (**publikacja D18**), a także badałem mało jeszcze rozpoznane zjawisko transportowania bakterii i grzybów na powierzchni naturalnych, syntetycznych i sztucznych włókien (**publikacje D3 i D12**).

Lp.	Czasopismo	Tytuł artykułu	Autor/autorzy	Rok, tom, Strony	IF	KBN/MNiSW
D1	Medycyna Pracy	Szkodliwe czynniki biologiczne w zakładach termicznego unieszkodliwiania odpadów komunalnych	<u>Cyprowski M.</u>	2019, 70 (1), 99-105.	0,610	15
W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Stworzyłem rycinę i przygotowałem tekst publikacji. Mój wkład szacuję na 100%.						
D2	International Archives of Occupational and Environmental Health	Anaerobic bacteria in wastewater treatment plant	<u>Cyprowski M.</u> Stobnicka-Kupiec A. Ławniczek-Wałczyk A. Bakał-Kijek A. Gołofit-Szymczak M. Górny R.L.	2018, 91 (5), 571-579.	2,148	30
W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Wykonałem pomiary oraz analizę statystyczną wyników. Stworzyłem wykres i przygotowałem tekst publikacji. Mój wkład szacuję na 55%.						
D3	Journal of Aerosol Science	Effect of electrical charges on potential of fibers for transport of microbial particles in dry and humid air	Górny R.L. Gołofit-Szymczak M. <u>Cyprowski M.</u> Stobnicka A. Ławniczek-Wałczyk A.	2018, 116, 66-82.	2,281	35
W ww. pracy brałem udział w przeprowadzeniu pomiarów. Mój wkład szacuję na 15%.						
D4	Medycyna Pracy	Ocena narażenia na aerozol grzybowy na wybranych stanowiskach pracy zanieczyszczonych pyłem organicznym o różnym pochodzeniu	Ławniczek-Wałczyk A. <u>Cyprowski M.</u> Gołofit-Szymczak M. Wójcik-Fatla A. Zajac V. Górny R.L.	2018, 69 (3), 269-280.	0,610	15
W ww. pracy brałem udział w przeprowadzeniu pomiarów. Mój wkład szacuję na 15%.						
D5	Aerobiologia	Inhalable dust, endotoxins and (1-3)-β-d-glucans as indicators of exposure in waste sorting plant environment	Kozajda A. Jeżak K. <u>Cyprowski M.</u> Szadkowska-Stańczyk I.	2017 33 (4), 481-491.	1,515	25
W ww. pracy brałem udział w wykonaniu części analiz laboratoryjnych. Mój wkład szacuję na 20%.						

D6	International Archives of Occupational and Environmental Health	Monitoring of bacterial pathogens at workplaces in power plant using biochemical and molecular methods	Ławniczek-Wałczyk A. Gołofit-Szymczak M. <u>Cyprowski M.</u> Stobnicka A. Górny R.L.	2017, 90 (3), 285-295.	2,148	30
W ww. pracy brałem udział w przeprowadzeniu pomiarów. Mój wkład szacuję na 15%.						
D7	International Journal of Environmental Science and Technology	Fungal air contamination in distinct sites within a municipal landfill area	Frączek K. Kozdrój J. Górny R.L. <u>Cyprowski M.</u> Gołofit-Szymczak M.	2017, 14, 2637-2648.	2,037	30
W ww. pracy brałem udział w przeprowadzeniu pomiarów oraz przygotowaniu tekstu publikacji. Mój wkład szacuję na 15%.						
D8	Rocznik Ochrona Środowiska	Charakterystyka zagrożeń biologicznych występujących przy przetwarzaniu biomasy do celów energetycznych	Gołofit-Szymczak M. Ławniczek-Wałczyk A. Górny R.L. <u>Cyprowski M.</u> Stobnicka A.	2016, 18 (2), 193-204.	0,705	15
W ww. pracy brałem udział w przeprowadzeniu pomiarów oraz przygotowaniu tekstu publikacji. Mój wkład szacuję na 15%.						
D9	Rocznik Ochrona Środowiska	Czynniki mikrobiologiczne na pokładzie lekkich samolotów pasażerskich	Stobnicka A. Górny R. Gołofit-Szymczak M. <u>Cyprowski M.</u> Ławniczek-Wałczyk A.	2016, 18 (2), 492-505.	0,705	15
W ww. pracy brałem udział w przeprowadzeniu pomiarów oraz przygotowaniu tekstu publikacji. Mój wkład szacuję na 15%.						

D10	International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health	Exposure to culturable and total microbiota in cultural heritage conservation laboratories	Górny R.L. Harkawy A.S. Ławniczek-Wałczyk A. Karbowska-Berent J. Wlazło A. Niesler A. Gołofit-Szymczak M. <u>Cyprowski M.</u>	2016, 29 (2), 255-275.	0,947	15
W ww. pracy brałem udział w przeprowadzeniu pomiarów oraz przygotowaniu tekstu publikacji. Mój wkład szacuję na 15%.						
D11	Medycyna Pracy	Aerozole bakteryjne i grzybowe w środowisku pracy firm sprzątających	Gołofit-Szymczak M. Górny R.L. Ławniczek-Wałczyk A. <u>Cyprowski M.</u> Stobnicka A.	2015, 66 (6), 779-791.	0,401	15
W ww. pracy brałem udział w przygotowaniu tekstu publikacji. Mój wkład szacuję na 10%.						
D12	Medycyna Pracy	Włókna jako nośniki cząstek mikrobiologicznych	Górny R.L. Ławniczek-Wałczyk A. Stobnicka A. Gołofit-Szymczak M. <u>Cyprowski M.</u>	2015, 66 (4), 511-523.	0,401	15
W ww. pracy brałem udział w przygotowaniu tekstu publikacji. Mój wkład szacuję na 10%.						
D13	International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health	Indoor allergens in settled dust from kindergartens in city of Lodz, Poland	<u>Cyprowski M.</u> Buczyńska A. Szadkowska-Stańczyk I.	2013, 26 (6), 890-899.	1,094	20
W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Wykonałem pomiary, część analiz laboratoryjnych oraz analizę statystyczną wyników. Stworzyłem wykresy i przygotowałem tekst publikacji. Mój wkład szacuję na 60%.						

D14	Aerobiologia	Exposure to (1→3)-β-D-glucans in swine farms	Cyprowski M. Buczyńska A. Kozajda A. Sowiak M. Bródka K. Szadkowska- Stańczyk I.	2012, 28, 161-168.	1,333	25
W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Wykonałem pomiary oraz analizy laboratoryjne. Przygotowałem tekst publikacji. Mój wkład szacuję na 60%.						
D15	Aerobiologia	An assessment of potential exposure to bioaerosols among swine farm workers with particular reference to airborne microorganisms in the respirable fraction under various breeding conditions	Sowiak M. Bródka K. Buczyńska A. Cyprowski M. Kozajda A. Sobala W Szadkowska- Stańczyk I.	2012, 28, 121-133.	1,333	25
W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Wykonałem pomiary oraz brałem udział w przygotowaniu tekstu publikacji. Mój wkład szacuję na 20%.						
D16	Medycyna Pracy	Exposure to harmful microbiological agents during the handling of biomass for power production purposes	Ławniczek- Wańczyk A. Gołofit- Szymczak M. Cyprowski M. Górny R.L.	2012, 63 (4), 395-407.	0,391	15
W ww. pracy brałem udział w przeprowadzeniu pomiarów. Mój wkład szacuję na 15%.						
D17	Medycyna Pracy	Czynniki biologiczne wpływające na jakość powietrza w pomieszczeniach biurowych	Bródka K. Sowiak M. Kozajda A. Cyprowski M. Szadkowska- Stańczyk I.	2012, 63 (3), 303-315.	0,391	15
W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Wykonałem część pomiarów. Mój wkład szacuję na 15%.						
D18	Polish Journal of Environmental Studies	Indoor disposal of household waste as a source of environmental biohazard exposure	Buczyńska A. Cyprowski M. Szadkowska- Stańczyk I.	2011, 20 (4), 851-856.	0,508	13
W ww. pracy brałem udział w przeprowadzeniu pomiarów oraz wykonaniu części analiz laboratoryjnych. Stworzyłem ryciny i przygotowałem tekst publikacji. Mój wkład szacuję na 40%.						

D19	Aerobiologia	β (1 $\rightarrow$ 3)-glucan aerosols in different occupational environments	<u>Cyprowski M.</u> Sowiak M. Szadkowska-Stańczyk I.	2011, 27, 345-351.	1,515	20
W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Wykonałem pomiary, część analiz laboratoryjnych oraz analizę statystyczną wyników. Wykonałem wykresy i przygotowałem tekst publikacji. Mój wkład szacuję na 65%.						
D20	Medycyna Pracy	Ocena narażania bioaerozoli pracowników zatrudnionych przy intensywnej hodowli trzody chlewnej	Szadkowska-Stańczyk I. Bródka K. Buczyńska A. <u>Cyprowski M.</u> Kozajda A. Sowiak M.	2010, 61 (3), 257-269.	0,268	9
W ww. pracy brałem udział w sformułowaniu problemu badawczego. Wykonałem pomiary oraz część analiz laboratoryjnych. Mój wkład szacuję na 15%.						
Razem:					21,341	397

Liczba prac = **20** Suma punktów: IF = **21,341** KBN/MNiSW = **397**

Marcel Cyprowski