

Prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski
Katedra Farmakologii i Toksykologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 13.07.2015 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Marty Piątkowskiej pt. „Pozostałości leków weterynaryjnych, kokcydiostatyków i barwników w jajach – aspekty analityczne i toksykologiczne”.

Recenzję opracowano w oparciu o Uchwałę 31/2014 Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 25.06.2014 r.

Systematyczna kontrola produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do spożycia przez ludzi jest jednym z priorytetowych działań w krajach Unii Europejskiej. Jej celem jest ochrona zdrowia konsumentów przed negatywnymi skutkami, jakie mogłyby wywoływać pozostałości substancji zakazanych lub dopuszczonych do stosowania u zwierząt ale obecnych w żywności w ilościach przekraczających maksymalne limity pozostałości. Kontrola ta jest możliwa dzięki stosowaniu czułych i wiarygodnych metod analitycznych w ośrodkach referencyjnych. Biorąc pod uwagę powyższe wybór tematyki badań polegający na opracowaniu wieloskładnikowej metody potwierdzającej do oznaczania pozostałości leków weterynaryjnych, kokcydiostatyków i barwników w jajach i wybranych produktach jajecznych jest w pełni uzasadniony. Ponadto Doktoranta wykorzystwała opracowaną metodykę do oznaczenia pozostałości w próbkach świeżych jaj pobranych w ramach krajowego programu badań kontrolnych, próbkach archiwalnych świeżych jaj, liofilizatów jaj, żółtek lub albuminy jaja kurzego oraz w próbkach jaj, tkanek i paszy pozyskanych w trakcie eksperymentu dotyczącego zanikania barwnika Sudan I w jajach. Szczególnie cenne są wyniki badań dotyczące oceny narażenia konsumenta na pozostałości obecne w jajach oraz wyniki dotyczące zanikania barwnika Sudan I, które wcześniej nie były znane. Biorąc pod uwagę powyższe cel podjętych badań jest bardzo aktualny, kompleksowy i w pełni zasadny.

Oceniana praca ma 144 strony maszynopisu, w którym można wyróżnić wstęp, cel badań, materiały i metody, przebieg i wyniki badań, dyskusję, wnioski, streszczenia w języku

polskim i angielskim oraz bibliografię. Wstęp poprzedza spis treści oraz wykazy skrótów, tabel, rycin i załączników (zamieszczonych na końcu pracy). Część opisowa została wzbogacona o 33 ryciny i 19 tabel. W pracy Doktorantka powołuje się na piśmiennictwo liczące 186 pozycji bibliograficznych. Oceniana praca ma typowy układ, a zawartość merytoryczna spełnia wymogi rozprawy doktorskiej, jakkolwiek Doktorantka nie ustrzegła się dość licznych niezgrabności stylistycznych, które zaznaczyłem bezpośrednio w pracy.

We „Wstępie” Doktorantka w pierwszej kolejności, w sposób skondensowany, przedstawiła charakterystykę wybranych leków weterynaryjnych (przeciwbakteryjnych i przeciw pasożytniczych) oraz barwników, których pozostałości mogą być stwierdzone w jajach konsumpcyjnych. Następnie omówiła źródła i przyczyny występowania pozostałości oraz kryteria oceny metod oznaczania pozostałości leków weterynaryjnych i dodatków paszowych w żywności pochodzenia zwierzęcego. Poruszane w tym rozdziale zagadnienia zostały poparte odpowiednio dobranym piśmiennictwem i w sposób logiczny korespondują z podjętą tematyką badawczą, co świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. Wstęp w wystarczającym stopniu wprowadza czytającego w tematykę podjętych badań, jednakże można w nim zauważyć pewne niedociągnięcia, które wymagają korekty:

- na str. 28 Doktorantka podaje, że sulfonamidy stosuje się ze „...wzmacniaczami diaminopirymidyny”, takimi jak trimetoprim...”, co sugerowałoby, iż trimetoprim potęguje działanie diaminopirymidyny,
- na str. 31 znajduje się informacja, że „...trimetoprim był stosowany łącznie z sulfametoksazolem...”, podczas gdy na rynku nadal dostępne są 3 preparaty (FEEDMIX TS, Methoxasol i Trimsulfasol) przeznaczone do stosowania doustnego u świń i kur,
- na str. 31 w opisie bezoimidazoli znajduje się informacja, że „...do stosowania u niosek dozwolony jest flubendazol i fenbendazol, natomiast zakazane jest stosowanie lewamizolu”; zapis ten wymaga korekty, ponieważ lewamizol nie należy do benzimidazoli,
- na str. 33 Doktorantka podaje, że dekokwinat jest pochodną fluorochinolonów, podczas gdy jest to pochodna hydroksychinolonów,
- w opisie tabeli 3 na str. 41 cennym uzupełnieniem byłaby informacja, w którym roku pobierano próbki do badań,
- w tabeli 7 na str. 45 dotyczącej względnej intensywności jonów błędnie podano zakres „> 10% do 2%”; poprawny zapis to: > 10% do 20%.

W rozdziale „Cel badań” Doktorantka wskazała 4 cele badawcze, na które chciałaby uzyskać odpowiedź w trakcie realizacji kompleksowych badań. Są one prawidłowo

sformułowane, ale nie w pełni obejmują zakres prac przedstawionych w dysertacji w odniesieniu do opracowanej metody analitycznej. Z analizy dalszej części dysertacji wynika, że Doktorantka opracowała 2 wieloskładnikowe potwierdzające metody oznaczania pozostałości leków weterynaryjnych, kokcydiostatyków i barwników; jedną dla jaj pozwalającą na oznaczanie 120 analitów i drugą dla albuminy jaja kurzego umożliwiającą oznaczanie 85 analitów. Ponadto opracowano 2 wieloskładnikowe metody oznaczania barwników; jedną dla oznaczania ich zawartości w żółtkach jaj i drugą w próbkach paszy. Doprecyzowanie celu badań w tym zakresie ułatwiłoby czytającemu analizę dalszej części pracy.

W rozdziale „Materiały i metody” Doktorantka w skondensowany sposób opisała materiał biologiczny (rodzaj próbek), odczynniki chemiczne, substancje wzorcowe wraz ze sposobem przygotowania podstawowych i roboczych roztworów wzorcowych, aparaturę pomiarową, parametry walidacyjne, zastosowane testy statystyczne oraz sposób obliczenia narażenia konsumenta na pozostałości leków weterynaryjnych i dodatków paszowych w jajach. Sposób opisu tego rozdziału świadczy o dobrej znajomości opisywanych zagadnień. Również dobór testów statystycznych jest adekwatny do zaplanowanych badań. W rozdziale tym znajduje się również informacja o wykorzystaniu próbek archiwalnych pasz (str. 53), ale takich wyników nie ma w dalszej części pracy.

W rozdziale „Przebieg i wyniki badań” w pierwszej kolejności Doktorantka opisała kolejne etapy postępowania dotyczące optymalizacji rozdziału chromatograficznego, warunków detekcji, efektywnego sposobu izolacji analitów oraz optymalizacji etapu oczyszczania ekstraktów. Opis postępowania analitycznego wzbogacony o liczne chromatogramy, wykresy, tabele i schematy postępowania jest zrozumiały i świadczy o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego przez Doktorantkę. Potwierdzeniem prawidłowego postępowania analitycznego jest fakt, że opracowane metody w pełni spełniły kryteria walidacyjne w zakresie badanych parametrów. Ponadto wiarygodność opracowanych metod potwierdziły wyniki oznaczeń próbek archiwalnych. Na uwagę zasługuje fakt, że w badaniach archiwalnych próbek liofilizowanej albuminy jaja kurzego nie tylko potwierdzono obecność pozostałości enrofloksacyny wykrytej we wcześniejszych badaniach ale dodatkowo stwierdzono obecność doksycykliny, co potwierdza zasadność opracowywania metod wieloskładnikowych. Opracowaną metodę oznaczania pozostałości w jajach wykorzystano w badaniach kontrolnych 150 próbek jaj pobranych w 2014 roku. Dla badanych próbek uzyskano 58% próbek dodatnich zgodnych i 8,7% próbek niezgodnych. Przeprowadzona w

oparciu o uzyskane wyniki ocena narażenia konsumenta wykazała, że w żadnym z analizowanych przypadków spożycie skażonych jaj lub albuminy jaja kurzego nie naraziłoby konsumenta na przyjęcie dawek przekraczających dopuszczalne dzienne spożycie. Z punktu widzenia konsumenta jest to bardzo cenna informacja potwierdzająca dobrą jakość jaj i ich przetworów.

W dalszej części Doktorantka opisała postępowanie analityczne w odniesieniu do metod oznaczania barwników w żółtkach i białkach jaj oraz w paszy jak również przebieg doświadczenia dotyczącego zanikania Sudanu I w jajach. Opracowane metodyki oznaczania barwników spełniły kryteria walidacyjne w zakresie badanych parametrów i zostały wykorzystane do analizy próbek pobranych w trakcie doświadczenia. Obecność badanego barwnika (w niskich stężeniach) stwierdzono jedynie w żółtkach jaj po stosowaniu paszy zawierającej najwyższe jego stężenie (50 mg/kg paszy), co świadczy o małej zdolności przenikania Sudanu I do jaj. Uważam, że pewne fragmenty opisane w tej części pracy (charakterystyka paszy, użyte ptaki czy schemat doświadczenia) powinny być zamieszczone w rozdziale „Materiały i metody”. Ponadto uzupełnienia wymaga opis podrozdziału 4.3.2.4 „Wyniki analiz tkanek zwierzęcych” w odniesieniu do sposobu pobierania, przechowywania i przygotowania próbek do analizy chromatograficznej. Reasumując, mimo pewnych niedociągnięć, materiał przedstawiony w tym rozdziale wymagał dobrego opanowania warsztatu badawczego oraz dużego zaangażowania Doktorantki w jego przygotowanie. Odpowiednio dobrany materiał ilustracyjny bardzo ułatwia analizę prowadzonego postępowania analitycznego i uzyskanych wyników.

Rezultaty badań Doktorantka omówiła i umiejętnie skonfrontowała z wynikami badań innych autorów w liczącym 17 stron rozdziale „Dyskusja”. W mojej opinii w rozdziale tym zbędne są ryciny 30-33. Ponadto w dyskusji znajduje się zbyt duży fragment dotyczący metabolizmu Sudanu I, ponieważ Doktorantka nie zajmowała się tym zagadnieniem.

W oparciu o uzyskane wyniki Doktorantka sformułowała 5 wniosków. Dwa pierwsze mają odzwierciedlenie w badaniach i zgadzam się z nimi całkowicie. Wniosek trzeci zawiera przypuszczenia (przyczyny występowania pozostałości nie były tematem badań) i nie ma potwierdzenia w uzyskanych wynikach. We wniosku czwartym tylko jego pierwsza część ma potwierdzenie w badaniach. Drugie zdanie zostało sformułowane jedynie w oparciu o jeden parametr tj. lipofilność i nie ma potwierdzenia w badaniach Doktorantki. Również wniosek piąty nie ma potwierdzenia w badaniach własnych. W aktualnej formie jego treść byłaby bardzo dobrym podsumowaniem ostatniego fragmentu dyskusji.

W rozdziale „Piśmiennictwo” Doktorantka zestawiała w kolejności cytowania pozycje literaturowe, do których umiejętnie odwołuje się w tekście. Są one dobrze dobrane i aktualne, co świadczy o tym, że Doktorantka gruntownie przeanalizowała piśmiennictwo naukowe powiązane z tematyką prowadzonych badań i umiejętnie korzysta z najistotniejszych i aktualnych danych literatury fachowej.

Reasumując stwierdzam, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Marty Piątkowskiej w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk. Zastosowana metodyka odpowiada standardom obowiązującym w tego typu badaniach i nie wzbudza jakichkolwiek wątpliwości. Doktorantka wykazała się umiejętnością korzystania z literatury fachowej oraz opanowaniem pracochłonnych metod analitycznych. Uzyskane wyniki badań stanowią cenny wkład w opracowanie czułych i wiarygodnych metod badawczych do oznaczania pozostałości leków weterynaryjnych, kokcydiostatyków i barwników w jajach i wybranych produktach jajecznych. Ponadto wyniki badań eksperymentalnych istotnie wzbogacają wiedzę na temat zanikania barwnika Sudan I w jajach. Przytoczone powyżej uwagi, głównie natury redakcyjnej, nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy. Dlatego uważam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Marty Piątkowskiej w pełni odpowiada warunkom określonym w artykule w art. 13 ust. 1 Ustawy o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

Biorąc powyższe pod uwagę przedkładam Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr Marty Piątkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski