

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

Olsztyn, 10.09.2018 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Kowalczyk pt. „Zastosowanie technik chromatograficznych do analizy alkaloidów pirolizydynowych w paszach i żywności” wykonanej w Zakładzie Higieny Pasz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem promotora prof. dr hab. Krzysztofa Kwiatka i promotora pomocniczego dr inż. Zbigniewa Sieradzkiego

Recenzję opracowano w oparciu o uchwałę Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 15.04.2015 r.

1. Ogólna charakterystyka rozprawy

Oceniana rozprawa doktorska stanowi kompilację spójnych tematycznie pięciu prac (jednej przeglądowej i czterech prac oryginalnych opublikowanych w czasopismach z listy A Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego). Łączna liczba punktów wg. klasyfikacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi 105, a współczynnik wpływu (*Impact Factor*) według Journal of Citation Reports wynosi 6,11. Liczba publikacji jak również ich treść merytoryczna w pełni spełnia kryteria rozprawy na stopień doktora nauk. Każda z publikacji zawiera stosowne oświadczenia potwierdzające indywidualny udział współautorów w przygotowaniu prac, które jednoznacznie wskazują na wiodący (90% w pracy przeglądowej i jednej pracy oryginalnej oraz 95% w pozostałych trzech pracach oryginalnych) udział mgr Eweliny Kowalczyk w opracowaniu metod analitycznych, wykonaniu badań i przygotowaniu publikacji. Integralną część rozprawy stanowi skondensowany komentarz cyklu publikacji będących przedmiotem dysertacji, który liczy 40 stron maszynopisu i w którym można wyróżnić wstęp, cel i zakres pracy, materiały i metody, wyniki, wnioski, streszczenia polskie i angielskie oraz bibliografię. Prace stanowiące rozprawę doktorską przeszły proces recenzencki, co świadczy, że poruszana w nich tematyka jest istotna i aktualna. Z kolei zwięzły komentarz ujmuje najważniejsze zagadnienia rozprawy i odzwierciedla zarówno nowatorski charakter badań jak i bardzo dobre przygotowanie merytoryczne i analityczne mgr Eweliny Kowalczyk do ich realizacji.

Podjęty przez Autorkę temat związany z opracowaniem i walidacją metod oznaczania alkaloidów pirolizydynowych w paszach i żywności opartych na chromatografii gazowej oraz chromatografii ciekłowej sprzężonej ze spektrometrią ma istotne znaczenie praktyczne, gdyż pozwala na precyzyjne i wiarygodne oznaczanie badanych alkaloidów w odmiennych matrycach z użyciem dwóch różnych technik analitycznych. Co szczególnie istotne opracowane metody zostały wykorzystane do analizy próbek pasz oraz próbek miodów, a uzyskane wyniki pozwoliły na ocenę bezpieczeństwa zarówno pasz stosowanych u zwierząt jak i miodów spożywanych przez ludzi. Uzyskane wyniki mają istotne walory poznawcze i wnoszą nowy wkład do wiedzy światowej w zakresie występowania alkaloidów pirolizydynowych w pokarmie jak i potencjalnego zagrożenia dla zdrowia ludzi i zwierząt wynikającego ze spożycia produktów zawierających te związki.

2. Ocena merytoryczna pracy

2.1. *Sformułowanie problemu naukowego i aktualność tematyki badań*

Alkaloidy pirolizydynowe są najprawdopodobniej najbardziej rozpowszechnionymi pro-toksynami roślinnymi, które po spożyciu przez ludzi i zwierzęta w wyniku ich metabolizmu ulegają aktywacji do toksycznych związków i mogą być odpowiedzialne za wystąpienie zatruc. Pomimo powszechnego występowania na świecie, w tym w Polsce, roślin wytwarzających alkaloidy pirolizydynowe wiedza na ich temat jest wciąż niewystarczająca. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że mimo udowodnionego działania toksycznego i kancerogennego tych związków do chwili obecnej nie wprowadzono uregulowań prawnych określających maksymalne poziomy alkaloidów pirolizydynowych w żywności i paszach. Z drugiej strony do chwili obecnej nie wdrożono również skutecznych metod leczenia zatruc wywołanych przez te związki, zatem jedynym sposobem ochrony jest unikanie ich spożycia. By było to możliwe konieczne wydaje się doskonalenie metod analitycznych pozwalających na uzyskanie wiarygodnych wyników oraz umożliwiających detekcję niskich stężeń alkaloidów pirolizydynowych w różnorodnych matrycach. Biorąc pod uwagę powyższe oceniana rozprawa wychodzi naprzeciw tym oczekiwaniom, ponieważ efektem jej realizacji jest opracowanie czterech w pełni wiarygodnych metod analitycznych, które pozwalają na wykrywanie niskich stężeń tych związków w kiszonkach, sianie i miodach.

W publikacji przeglądowej pt. „Alkaloidy pirolizydynowe zagrożeniem dla zdrowia ludzi i zwierząt” mgr Ewelina Kowalczyk dokonała przeglądu aktualnej wiedzy na temat występowania tych alkaloidów, ich toksyczności i metabolizmu, objawów zatrucia, zagrożeń ze strony żywności i pasz oraz zaleceń Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności

w odniesieniu do tych związków. Charakterystyka ta została uzupełniona o najnowsze dane literaturowe w wstępie komentarza do cyklu publikacji będących przedmiotem dysertacji, co świadczy, że Doktorantka na bieżąco śledziła postęp wiedzy w tym zakresie. Z kolei w czterech pracach oryginalnych opublikowano sposób opracowania i walidacji metod analitycznych opartych na chromatografii gazowej oraz chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią oraz przedstawiono wyniki analiz potwierdzających przydatność opracowanych metod do badania zawartości alkaloidów pirolizydynowych w sianie, kiszonkach i miodzie a więc złożonych matrycach, które wymagają bardzo dobrego przygotowania analitycznego. Uzyskane wyniki pozwoliły na ocenę bezpieczeństwa badanych produktów w odniesieniu do zdrowia ludzi i zwierząt, co ma istotne znaczenie z punktu widzenia konsumenta.

Reasumując uważam, że podjęta tematyka jest bardzo interesująca, aktualna i w istotnym stopniu wzbogaca stan wiedzy zarówno w zakresie analitycznym jak i występowania alkaloidów pirolizydynowych w paszach dla zwierząt oraz w miodzie.

2.2. Cel rozprawy

Cele pracy zostały sformułowane w komentarzu do cyklu publikacji będących przedmiotem dysertacji jak również w publikacjach oryginalnych. Pierwszym celem prowadzonych badań było opracowanie czułych i wiarygodnych metod analitycznych opartych na technikach chromatograficznych umożliwiających analizę alkaloidów pirolizydynowych w wybranych rodzajach pasz oraz miodzie. Drugim celem było zastosowanie opracowanych metod do oznaczania alkaloidów pirolizydynowych w paszach i miodzie oraz ocena bezpieczeństwa zbadanych produktów. W oparciu o przedstawiony do oceny materiał stwierdzam, że cel rozprawy został jasno zdefiniowany i w pełni zrealizowany.

2.3. Poprawność i oryginalność metodyczna

Metodyka badań wykorzystana do realizacji celów badawczych została właściwie dobrana i jest zgodna ze standardami międzynarodowymi w tym zakresie. Opracowane metody chromatograficzne połączone ze spektrometrią mas spełniły kryteria walidacyjne, co zagwarantowało, iż uzyskane wyniki stężeń alkaloidów pirolizydynowych są wiarygodne i powtarzalne. Również sposób oceny bezpieczeństwa badanych produktów został przeprowadzony zgodnie z najnowszą wiedzą i nie budzi wątpliwości. Biorąc pod uwagę powyższe uważam, że pod względem metodycznym oceniana praca nie budzi zastrzeżeń.

2.4. Znaczenie uzyskanych wyników badań

W wyniku realizacji zaplanowanych badań opracowano cztery czułe metody analityczne, które spełniły kryteria walidacyjne i mogą być wykorzystywane do oznaczania alkaloidów pirolizydynowych. Posłużyły one Autorce do analizy 69 próbek pasz i 104 próbek miodów. Obecność alkaloidów stwierdzono w 39% próbek pasz jednakże ich zawartość była na tyle niska, że nie powinna stanowić zagrożenia spowodowania zatrucia ostrego ale mogłaby doprowadzić do pogorszenia stanu zdrowotnego zwierząt w przypadku spożywania zanieczyszczonej paszy przez długi okres czasu. Stwierdzone ilości alkaloidów nie powinny również stanowić zagrożenia zdrowia konsumentów spożywających produkty (mięso i mleko) pochodzące od zwierząt żywionych taką paszą. Zdecydowanie większy odsetek (54%) próbek zawierających alkaloidy pirolizydynowe stwierdzono w przypadku miodów, zwłaszcza importowanych z Azji, co mogłaby być źródłem zbyt wysokiego narażenia na te związki, zwłaszcza dla dzieci. Uzyskane wyniki wnoszą wartościowy wkład wiedzy do nauki światowej w odniesieniu do łańcucha „zdrowe zwierzę - zdrowa żywność”. Jednocześnie wskazują, że badania w kierunku obecności alkaloidów pirolizydynowych w paszach i żywności powinny być kontynuowane w celu zapewnienia zdrowia zwierząt i ludzi.

2.5. Znajomość literatury związanej z tematyką pracy

Zarówno analiza cyklu publikacji będących przedmiotem dysertacji jak i dołączonego do nich komentarza wskazuje, że mgr Ewelina Kowalczyk doskonale orientuje się w aktualnym piśmiennictwie związanym z podjętą tematyką badań i potrafi je trafnie skonfrontować z wynikami badań własnych.

2.6. Uwagi polemiczne

Pewne wątpliwości budzi tytuł rozprawy doktorskiej, który moim zdaniem jest zbyt ogólny i nie odzwierciedla w pełni zakresu wykonanych badań. W związku z tym, że opracowane metody analityczne wykorzystane zostały do określenia zawartości alkaloidów w próbkach kiszzonek, siana i miodu w mojej opinii bardziej poprawny byłby tytuł: „Zastosowanie technik chromatograficznych do analizy alkaloidów pirolizydynowych w wybranych paszach i miodzie”. Z kolei w komentarzu do cyklu publikacji będących przedmiotem dysertacji dopatrzyłem się kilku niezgrabności stylistycznych, które zaznaczyłem w tekście. Chcę jednak zaznaczyć, że wymienione wątpliwości nie wpływają na moją jednoznacznie pozytywną i wysoką ocenę przedstawionej do recenzji pracy.

3. Wniosek końcowy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Eweliny Kowalczyk pt. „Zastosowanie technik chromatograficznych do analizy alkaloidów pirolizydynowych w paszach i żywności” w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk. Jasno sformułowany cel badań, który został w całości osiągnięty odpowiada standardom obowiązującym w tego typu badaniach i nie wzbudza jakichkolwiek wątpliwości. Cztery opracowane metody analityczne mogą być z powodzeniem wykorzystywane do analizy pasz i miodów nie tylko w laboratorium w Puławach ale również w innych ośrodkach krajowych i zagranicznych, zatem poza aspektem poznawczym oceniana praca ma również istotny wymiar użyteczny. Dlatego uważam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Eweliny Kowalczyk 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 Eweliny Kowalczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, uwzględniając szeroki zakres prowadzonych prac oraz ich wysoką jakość potwierdzoną publikacjami w czasopiśmie z listy A MNiSW wnioskuję o przyznanie mgr Ewelinie Kowalczyk stosownej nagrody.

Prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski

