

## **Recenzja**

### **rozprawy doktorskiej mgr Marty Piątkowskiej**

### **pt. „Pozostałości leków weterynaryjnych, kokcydiostatyków i barwników w jajach – aspekty analityczne i toksykologiczne”.**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi część badań zrealizowanych w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki konkurs Sonata (2012/07/D/NZ7/03242) pt. „**Pozostałości niedozwolonych barwników syntetycznych w jajach i wybranych produktach jajecznych**”. Ponadto, część badań wykonana została w ramach projektów systemowych „**Stypendia naukowe dla doktorantów II**” oraz „**Stypendia naukowe dla doktorantów pracujących w ramach zespołów badawczych**”, które były współfinansowane ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, budżetu państwa i budżetu województwa lubelskiego.

Podjęcie przez Doktorantkę powyższych badań ma wysoce istotne znaczenie zarówno poznawcze, ale przede wszystkim aplikacyjne ze względu na podjęcie się opracowania i walidacji wieloskładnikowej metody pozwalającej na równoczesne oznaczanie pozostałości leków weterynaryjnych z grupy chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych, przeciw pasożytniczych, w tym kokcydiostatyków, a także barwników dodawanych do pasz kur niosek w celu uzyskania żółtka o intensywnej barwie w jajach. Ze względu na konieczność oznaczania wielu analitów jednocześnie oraz zapewnienia czułości i selektywności opracowywanej metody Doktorantka wykorzystwała technikę chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas. Do badań wybrano substancje chemiczne, których obecność jest monitorowana standardowo w ramach krajowego programu badań kontrolnych pozostałości chemicznych, biologicznych i leków w tkankach zwierząt i żywności pochodzenia zwierzęcego. Dlatego też wybór przez Doktorantkę tematu badań należy uznać za bardzo aktualny i o istotnym znaczeniu aplikacyjnym ze względu na

możliwość wykorzystania w zapewnieniu bezpieczeństwa i ochrony zdrowia konsumentów produktów żywnościowych pochodzenia zwierzęcego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska obejmuje 144 strony maszynopisu, w których zawarte jest 19 zestawień tabelarycznych, 33 ryciny, 5 załączników, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów wykorzystywanych w tekście dysertacji, wykaz tabel oraz rycin oraz 186 pozycji piśmiennictwa. Zarówno zestawienia tabelaryczne jak również ryciny odpowiednio ponumerowane i opisane zostały umieszczone w kolejnych rozdziałach dysertacji co istotnie ułatwia czytelnikowi zrozumienie trudnych i wielowątkowych zagadnień przedstawionych w powyższej dysertacji.

Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wykorzystane przez Doktorantkę przy pisaniu dysertacji piśmiennictwo w liczbie 186 pozycji obejmuje 139 pozycji prac oryginalnych, 15 pozycji stanowią monografie lub podręczniki akademickie, 36 pozycji to stosowne dyrektywy oraz 1 pozycja to konsultacja ustna. Wykorzystanie przez Doktorantkę w opracowaniu uzyskanych wyników licznych dokumentów prawnych wskazuje na aplikacyjne znaczenie i w konsekwencji możliwość wdrożenia do przeprowadzanych w Polsce badań kontrolnych, opracowanych wieloskładnikowych metod oznaczania pozostałości leków weterynaryjnych. Liczba, zakres i jakość wykorzystanego przy pisaniu dysertacji piśmiennictwa świadczy o bardzo rzetelnym przygotowaniu Doktorantki do podjętego tematu badawczego. Należy również podkreślić 105 pozycji piśmiennictwa obejmuje oryginalne prace doświadczalne opublikowane w latach 2000-2015 w czasopiśmie obcojęzycznych wyróżnionych w *Journal Citation Reports* co świadczy o znaczeniu i aktualności wykonanych przez Doktorantkę badań metodycznych.

Przedstawiona dysertacja jest podzielona na standardowe rozdziały obejmujące wstęp, cel badań, materiał i metody, przebieg i wyniki badań, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo i streszczenie w języku polskim i angielskim oraz 5 załączników. Załączniki stanowią dokumentację potwierdzającą, że technika chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) jest czułą i wiarygodną techniką pozwalającą na równoczesne oznaczanie pozostałości wielu substancji czynnych z grupy chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych i przeciwpasożytniczych i barwników zakazanych w jajach oraz w produktach jajowych. Ponadto, analiza uzyskanych wyników badań przedstawionych w załącznikach jest niekwestionowanym dowodem wskazującym szeroki, wielowątkowy zakres badań podjętych przez Doktorantkę.

Rozdziały dysertacji takie jak wstęp, materiał i metody, przebieg i wyniki badań oraz dyskusja zawierają odpowiednie podrozdziały posiadające własne, logicznie sformułowane

podtytuły. Przed częścią opisową pracy umieszczony został starannie przygotowany spis treści, wykaz skrótów oraz opis tabel i rycin z podaną numeracją każdej pozycji oraz numerem strony pracy na której dana tabela lub rycina została umieszczona.

Celem wykonanych przez Doktorantkę badań było:

1. Opracowanie i walidacja wieloskładnikowej metody potwierdzającej oznaczenia pozostałości leków weterynaryjnych z grupy chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych i przeciw pasożytniczych, w tym kokcydiostatyków w jajach świeżych i wybranych, sproszkowanych produktach jajecznych z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), która spełnia międzynarodowe wymagania analityczne.
2. Zbadanie obecności pozostałości leków weterynaryjnych z grupy chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych i przeciw pasożytniczych w tym kokcydiostatyków oraz barwników zakazanych w próbkach archiwalnych pozyskanych z jaj przy użyciu opracowanej metody wieloskładnikowej dla jaj świeżych techniką LC-MS/MS.
3. Ocena narażenia konsumenta na obecność w jajach pozostałości oznaczanych substancji czynnych (leków i barwników zakazanych).
4. Określenie zdolności dystrybucji do jaj oraz kinetyka zanikania barwnika Sudan I w jajach po stosowaniu u kur niosek paszy zawierającej barwnik Sudan I we wzrastających stężeniach: 0,5 mg/kg paszy przez pierwsze 16 dni doświadczenia, 5 mg/kg paszy przez kolejne 14 dni oraz 50 mg/kg przez kolejne 14 dni.

Należy stwierdzić, że zakres badań podjętych przez Doktorantkę jest bardzo szeroki przede wszystkim ze względu na liczbę oznaczanych substancji czynnych o zróżnicowanej budowie chemicznej do których należą: 1.) chemioterapeutyki przeciwbakteryjne z grupy sulfonamidów (17 substancji), fluorochinolonów (11 substancji), diaminopyrymidyn (1 substancja); 2) antybiotyki przeciwbakteryjne: tetracykliny (6 związków), makrolidy (10 związków, w tym 1 z grupy pleuromutylin), penicyliny (8 związków), cefalosporyny (7 związków), nitroimidazole (13 związków), linkozamidy (1 związek), amfenikole (2 związki) oraz aminoglikozydy (10 związków); 3) chemioterapeutyki przeciw pasożytnicze z grupy benzoimidazoli (21 związków, przy czym błędne jest zaklasyfikowanie lewamizolu do tej grupy, ponieważ lewamizol należy do imidazotiazoli, które wywierają działanie nicieniobójcze ale przez inny mechanizm działania niż benzoimidazole), insektycydów z grupy fosforoorganicznych lub karbaminianów (3 substancje czynne) oraz kokcydiostatyków (9 związków) oraz 4) barwników zakazanych (11 związków).

Do opracowania wieloskładnikowej metody oznaczenia pozostałości w jajach świeżych lub produktach jajecznych wymienionych powyżej grup leków lub barwników zakazanych dodawanych do pasz Doktorantka wybrała technikę chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), która aktualnie ze względu na czułość, precyzyjność i dokładność należy do uznanych i stosowanych w świecie technik stosowanych w analizie żywności. Technika ta pozwala na oznaczanie wysoce niskich stężeń badanych substancji oraz co jest niezwykle korzystne umożliwia równoczesne oznaczenie pozostałości substancji o zróżnicowanej budowie chemicznej. To oznacza, że technika LC-MS/MS należy do technik z wyboru w analityce pozostałości zarówno w procedurach potwierdzających jak również przesiewowych.

Wstęp dysertacji został opracowany przez Doktorantkę w sposób poprawny, a jego treść świadczy o wiedzy Autorki i teoretycznym przygotowaniu do podjęcia powyższego tematu badawczego. We wstępie Doktorantka przedstawiła w sposób zwięzły charakterystykę uwzględniając budowę chemiczną, właściwości farmakodynamiczne, farmakokinetyczne oraz zastosowanie kliniczne u docelowych gatunków zwierząt chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych z grupy sulfonamidów, fluorochinolonów, nitroimidazoli oraz antybiotyków  $\beta$ -laktamowych (penicylin i cefalosporyn), antybiotyków makrolidowych w tym pleuromutylin, amfenikoli, tetracyklin, a także grup leków przeciw pasożytniczych stosowanych u zwierząt do zwalczania i/lub prewencji przed inwazją pasożytów wewnętrznych z grupy benzoimidazoli i kokcydiostatyków oraz do zwalczania pasożytów zewnętrznych (karbaminiany i insektycy fosforoorganiczne). Jeden z podrozdziałów wstępu przedstawia wykaz i charakterystykę barwników dopuszczonych do stosowania u drobiu oraz barwników zakazanych. Wstęp zawiera też istotne informacje dotyczące kryteriów oceny metod przesiewowych i potwierdzających stosowanych do oznaczania leków weterynaryjnych i dodatków paszowych w żywności pochodzenia zwierzęcego, a także wymagania analityczne dla metod przesiewowych oraz zasady i kryteria walidacji metod służących do oznaczania pozostałości leków w żywności pochodzenia zwierzęcego. W ostatnim podrozdziale wstępu Doktorantka przedstawiła przegląd stosowanych w analizie pozostałości substancji chemicznych metod wieloskładnikowych, które pozwalają na jednoczesne oznaczenie pozostałości wielu substancji różniących się między sobą strukturą chemiczną. Pomimo, że zostały opracowane i są stosowane wieloskładnikowe metody pozwalające na jednoczesne oznaczenie kilkudziesięciu leków weterynaryjnych i dodatków paszowych w różnych matrycach to niewiele tego typu metod zostało opracowanych dla matrycy jaką są jaja. Powyższe stanowiło wymierne uzasadnienie do podjęcia badań nad

opracowaniem i walidacją wieloskładnikowej metody oznaczania pozostałości leków weterynaryjnych z grupy chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych i przeciw pasożytniczych, w tym kokcydiostatyków w jajach świeżych i wybranych, sproszkowanych produktach jajecznych z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS), która spełniałaby międzynarodowe wymagania analityczne. Opracowany przez Doktoranta rozdział „Materiał i metody” oraz ‘Przebieg i wyniki badań’ budzi uznanie za zwięzłość, logiczność, oryginalność i nowatorstwo podjętego tematu, żmudnego i trudnego pod względem metodycznym do wykonania.

W rozdziale „Materiał i metody” Doktorantka przedstawiła wykaz i pochodzenie prób stanowiących materiał biologiczny do badań, wykaz odczynników i substancji wzorcowych, zasady sporządzania podstawowych i roboczych roztworów wzorcowych, wykaz aparatury pomiarowej wykorzystanej w badaniach oraz walidację wieloskładnikowej metody według obowiązujących procedur obejmujących: selektywność, liniowość sygnału, zakres roboczy, granicę wykrywalności, granicę oznaczalności, powtarzalność, odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną, odzysk, limit decyzyjny, zdolność wykrywania, stabilność oraz odporność. Tak dobre przygotowanie metodyczne dało gwarancję, że uzyskane przez Doktorantkę wyniki analiz są powtarzalne i w pełni wiarygodne co zostało potwierdzone przez zastosowanie wewnętrznego sterowania jakością przy użyciu karty kontrolnej wartości średniej.

Z kolei w rozdziale „Przebieg i wyniki badań” Doktorantka przedstawiła w sposób zwięzły podstawy ustalenia wykazu analitów (leków przeciwbakteryjnych i przeciw pasożytniczych oraz barwników) oznaczanych w opracowywanej procedurze badawczej oraz zakres badań wykonanych w odpowiedniej kolejności polegających na doborze odpowiednich warunków detekcji analitów techniką LC-MS/MS, warunków chromatograficznych HPLC-MS/MS, warunków izolacji analitów z matrycy stanowiącej próbki świeżych jaj oraz sproszkowanych produktów jajecznych oraz przeprowadzeniu walidacji opracowanych metod. Na podstawie uzyskanych wyników należy stwierdzić, że Doktorantka opracowała dwie wieloskładnikowe potwierdzające metody oznaczania pozostałości chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych i przeciw pasożytniczych oraz obecności barwników zakazanych w dwóch matrycach (jajach oraz albuminie jaja kurzego) z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Opracowane metody pozwalają na równoczesne oznaczenie, odpowiednio 120 i 85 analitów i spełniają międzynarodowe wymagania analityczne. Wiarygodność opracowanej metody wieloskładnikowej dla świeżych jaj została sprawdzona na archiwalnych próbkach pochodzących z międzylaboratoryjnych

badan porównawczych przez potwierdzenie obecności wykrytych związków metodami urzędowymi służącymi do oznaczania pozostałości chemioterapeutyków przeciwbakteryjnych i kokcydiostatyków w jajach kur.

Drugi etap stanowiły badania *in vivo* wykonane na kurach nioskach skarmianych paszą zawierającą wzrastające stężenia barwnika Sudan I, która została przygotowana w warunkach laboratoryjnych. Badania *in vivo* polegały na określeniu zawartości badanego barwnika w żółtkach i białkach jaj pochodzących od kur poddanych ekspozycji na barwnik Sudan I oraz określeniu czasu zanikania barwnika w żółtkach jaj. Wykonanie doświadczeń na kurach zostało poprzedzone doбором odpowiednich warunków detekcji barwników techniką LC-MS/MS, warunków chromatograficznych do oznaczania barwników, warunków izolacji barwników z żółtek jaj oraz przeprowadzeniem walidacji opracowanych metod. Badania wykonane na kurach nioskach zostały wykonane prawidłowo, chociaż brakuje uzasadnienia dlaczego co dwa tygodnie zwiększano 10 krotnie stężenie badanego barwnika. Być może ze względu na czas ekspozycji kur niosek na barwnik Sudan I oraz wielkość jego stężenia w paszy proces dystrybucji barwnika w organizmie kur oraz jego eliminacja z organizmu nie została w sposób zadowalający wyjaśniona. W dokumentacji badań brakuje informacji dotyczącej zgody Lokalnej Komisji Etycznej na przeprowadzenie badań na kurach nioskach. W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka w sposób bardzo rzeczowy i rzetelny podejmuje w polemikę z danymi naukowymi na zrealizowany temat badawczy, które zostały opublikowane przez innych autorów z innych ośrodków naukowych.

Dobrze udokumentowane wyniki badań pozwoliły Doktorantce na postawienie 4 prawidłowo skonstruowanych wniosków, które stanowią zadowalającą odpowiedź na założone cele badawcze. Piąty punkt, nie może być traktowany jako wniosek, ponieważ nie dotyczy uzyskanych wyników badań, natomiast jest jedynie sugestią wskazującą na zasadność opracowania i wykonania badań określających szybkość i stopień degradacji Sudanu I przez florę bakteryjną przewodu pokarmowego drobiu oraz oznaczenie jego pozostałości w jajach i tkankach drobiu po ekspozycji na ten barwnik.

Ponadto należy zwrócić uwagę na fakt, że maszynopis pracy został przygotowany w sposób staranny, a praca została napisana poprawnie pod względem językowym.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska mgr Marty Piątkowskiej zatytułowana „**Pozostałości leków weterynaryjnych, kokcydiostatyków i barwników w jajach – aspekty analityczne i toksykologiczne**” jest oryginalnym,

nowatorskim osiągnięciem Autorki. Praca ma dużą wartość aplikacyjną a założone cele badawcze zostały osiągnięte i przeanalizowane zgodnie z obowiązującymi standardami. Uważam, że powyższa praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim zawartym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 0365595 z dnia 16.04.2003). Wnoszę o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Marty Piątkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę również do wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o wyróżnienie powyższej rozprawy doktorskiej ze względu na wysoce istotne znaczenie aplikacyjne dla bezpieczeństwa i ochrony zdrowia konsumentów produktów żywnościowych pochodzenia zwierzęcego.

Prof. dr hab. Bożena Obmińska-Mrukowicz