

Prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski
Katedra Farmakologii i Toksykologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
UWM w Olsztynie

Olsztyn, 07.03.2015 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Patyry pt. „Wykrywanie i oznaczanie tetracyklin w paszach technikami chromatograficznymi”.

Recenzję opracowano zgodnie z uchwałą 152 Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z dnia 18.04.2012 r.

Tetracykliny, z uwagi na szerokie spektrum działania i stosunkowo dobre wchłanianie z przewodu pokarmowego, są powszechnie stosowane w leczeniu infekcji bakteryjnych w chowie wielkostatnym. Potwierdzają to dane dotyczące ilości tetracyklin podawanych corocznie u świń i drobiu. Wynika to przede wszystkim z możliwości podawania tetracyklin w wodzie lub paszy. W tym ostatnim przypadku w celach terapeutycznych stosuje się pasze lecznicze. Należy mieć świadomość, że taka droga podania ma również szereg ograniczeń polegających m.in. na tym, że zwierzęta chore najczęściej pobierają mniej paszy, w której jednocześnie premiks leczniczy może być nierównomiernie wymieszany. Konsekwencją tego może być pobieranie zbyt małej lub zbyt dużej ilości leku przez poszczególne osobniki, co przekłada się na gorszy efekt terapeutyczny lub możliwość dłuższego pozostawiania leku w organizmie leczonych zwierząt. W tym ostatnim przypadku może dochodzić do występowania pozostałości leku w tkankach i produktach pochodzenia zwierzęcego powyżej dopuszczalnych limitów pozostałości. Podobna sytuacja może wystąpić w przypadku nielegalnego (poza nadzorem lekarza weterynarii) stosowania leków lub przypadkowego zanieczyszczenia pasz w procesie produkcji pasz leczniczych. Biorąc pod uwagę powyższe wybór tematyki pracy doktorskiej polegający na opracowaniu czułych i wiarygodnych metod oznaczania tetracyklin w paszy jest uzasadniony.

Oceniana praca ma 147 stron maszynopisu w typowym układzie: wstęp, cel i założenia badań, materiały i metodyka badań, przebieg i wyniki badań, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo. Wstęp poprzedza spis treści oraz wykaz skrótów, a na końcu pracy zamieszczono trzy załączniki opisujące procedury badawcze opracowane w oparciu o podjętą tematykę. Część opisowa została wzbogacona o 40 rycin

(dwie ryciny błędnie opatrzone numerem 2, ponadto w tekście brak ryciny nr 14) i 26 tabel (dwie tabele błędnie opatrzone numerem 10, dwie numerem 11 oraz dokonano przeskoku numeracji od 22 do 30). W pracy Doktorantka powołuje się na piśmiennictwo liczące 139 pozycji bibliograficznych.

Spis treści jest bardzo precyzyjny i istotnie ułatwia odszukiwanie poszczególnych rozdziałów/podrozdziałów w pracy.

Zastosowany wykaz używanych skrótów ułatwia zrozumienie tekstu, w którym są one stosowane. W wykazie tym korekty wymaga tłumaczenie parametru $CC\beta$ - zdolność wykrywania; w miejsce „decision limit” powinno być capability limit, ponieważ aktualnie rozwinięcie skrótów dla dwóch parametrów tj. $CC\beta$ i $CC\beta$ jest identyczne.

We „Wstępie” Doktorantka w sposób skondensowany scharakteryzowała pasze stosowane w żywieniu zwierząt, przedstawiła charakterystykę tetracyklin oraz przyczyny i konsekwencje występowania pozostałości leków w tkankach i produktach spożywanych przez ludzi. Następnie omówiła wymagania dla metod analitycznych stosowanych do wykrywania antybiotyków w paszach oraz aktualny stan wiedzy na ten temat. Informacje zawarte w tym rozdziale poparte zostały odpowiednio dobranym piśmiennictwem, co świadczy o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. Wstęp napisany został jasno i zwięźle, a poruszane w tym rozdziale zagadnienia w sposób logiczny korespondują z podjętą przez Doktorantkę tematyką badawczą. Uważam, że w rozdziale tym należy skorygować następujące niedociągnięcia:

- na str. 14 i 15 Doktorantka podaje, że jako dodatek paszowy była stosowana penicylina; jest to zbyt duże uogólnienie i wymaga doprecyzowania, ponieważ do grupy penicylin należy wiele substancji czynnych, a niektóre z nich stosowane są wyłącznie parenteralnie,
- na str. 14 błędnie podano nazwę streptograminy stosowanej jako antybiotykowy stymulator wzrostu; wirgamycyna powinna być zmieniona na wirginiamycynę.
- wartości objętości dystrybucji i okresu półtrwania prezentowane na str. 24 winny być poparte stosownym piśmiennictwem, ponieważ parametry te różnią się istotnie u poszczególnych gatunków zwierząt.
- tabela 5 zamieszczona na str. 40 cytowana jest po raz pierwszy już na str. 36, co utrudnia jej odszukanie.

W rozdziale „Cel i założenia badań” Doktorantka precyzyjnie wskazuje, dlaczego podjęła tematykę badawczą prezentowaną w pracy oraz wskazała cele badawcze, na które chciałaby uzyskać odpowiedź w trakcie realizacji badań. Są one prawidłowo sformułowane i w sposób całościowy ujmują problem, któremu poświęcona jest rozprawa.

W rozdziale „Materiały i metodyka badań” Doktorantka opisała materiał (próbki), aparaturę, odczynniki i materiały wykorzystane w badaniach oraz kryteria oceny opracowywanych metod analitycznych. Opis analizy statystycznej wskazuje na prawidłowy dobór testów, które zastosowano do oceny uzyskanych wyników. Uważam, że druga część nazwy tego rozdziału (metodyka badań) nie w pełni odpowiada prezentowanym treściom, ponieważ nie ma w nich opisu metod wykorzystywanych w badaniach, a jedynie kryteria oceny tych metod. Ponadto doprecyzowania wymaga opis próbek (str. 43) poddanych badaniu (ile użyto mieszanek paszowych wolnych od tetracyklin, które z nich fortyfikowano; ile próbek pobrano w ramach Krajowego Planu Urzędowej Kontroli Pasz w Polsce). W tabeli 6 (str. 44) można wyeliminować powtórzenia, dzięki czemu byłaby ona bardziej czytelna.

W rozdziale „Przebieg i wyniki badań” Doktorantka opisała dobór warunków detekcji, rozdziału chromatograficznego, sposób ekstrakcji analitów oraz dobór warunków oczyszczania ekstraktów. Efektem prowadzonych prac było opracowanie metody HPLC-DAD i HPLC-MS do oznaczania zawartości tetracyklin w paszach leczniczych oraz metody HPLC-MS do oznaczania zawartości tych leków w innych rodzajach pasz. Opis postępowania analitycznego wzbogacony o liczne chromatogramy, wykresy i tabele jest zrozumiały i świadczy o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego przez Doktorantkę. Potwierdzeniem prawidłowego postępowania analitycznego jest fakt, że wszystkie opracowane metody w pełni spełniły kryteria walidacyjne określone w Rozporządzeniu Komisji 2002/657/EC. Opracowane metody Doktorantka wykorzystwała do oznaczenia zawartości tetracyklin w 36 próbkach pasz leczniczych i 62 próbkach innych pasz pobranych w latach 2012-2014. Stanowi to dowód na aplikacyjne zastosowanie opracowanych metod. Jednakże w tym miejscu rodzi się pytanie czy już w 2012 roku metody będące przedmiotem niniejszej dysertacji były opracowane i w pełni zwalidowane?

Ponadto w rozdziale tym należy skorygować następujące niedociągnięcia:

- na rysunkach i w tabelach, w przypadku prezentacji wartości średnich, powinny być zamieszczone informacje na temat wartości odchylenia standardowego oraz liczby „n”,
- pod tabelą nr 13 brakuje wyjaśnienia jak była sprawność kolumnienek w przypadku „++” i „+++”,
- opis ryciny 28 winien być skorygowany, gdyż aktualnie odnosi się jedynie do próbki ślepej i nie uwzględnia informacji na temat próbki fortyfikowanej innymi lekami przeciwbakteryjnymi, o czym jest mowa na str. 84,

- w opisie wyników próbek z „monitoringu” należy dodać wartości bezwzględne tj. ile tetracyklin stwierdzono w badanych próbkach; aktualnie takie informacje można znaleźć jedynie w dyskusji.

Reasumując, mimo pewnych niedociągnięć, materiał przedstawiony w tym rozdziale wymagał dobrego opanowania warsztatu badawczego oraz bardzo dużego zaangażowania w jego przygotowanie. Bogaty materiał ilustracyjny bardzo ułatwia analizę prowadzonego postępowania analitycznego i uzyskanych wyników.

Uzyskane rezultaty badań Doktorantka omówiła i skonfrontowała z wynikami badań innych autorów w liczącym 17 stron rozdziale „Dyskusja”, którego struktura wewnętrzna jest przejrzysta, z konsekwentnie następującą po sobie sekwencją dyskutowanych zjawisk, co w znacznej mierze uporządkowało tę trudną do napisania część rozprawy doktorskiej. W mojej opinii dwa ostatnie akapity podrozdziału 6.1.1 są w znacznej mierze powtórzeniem wyników a nie ich interpretacją. Ponadto na str. 126 Doktorantka podaje, że w badaniach potwierdzających obecność tetracyklin stwierdzono w 23 próbkach, co stanowiło 37% uzyskanych wyników niezgodnych. Informacja ta nie ma potwierdzenia w wynikach, ponieważ dane przedstawione w tabeli 31 na str. 108 wskazują, że wyniki niezgodne stanowiły ok. 30%.

W oparciu o uzyskane wyniki Doktorantka sformułowała 7 wniosków, które w pełni korespondują z tematyką pracy.

Rozdział „Streszczenie” w syntetyczny sposób odzwierciedla całość rozprawy i nie budzi zastrzeżeń, podobnie jak „Summary”, które jest wiernym tłumaczeniem tekstu polskiego.

Dysertację kończy rozdział „Piśmiennictwo”, w którym Doktorantka zestawiała pozycje literaturowe, do których umiejętnie odwołuje się w tekście. Są one prawidłowo dobrane, co świadczy o tym, że Doktorantka wnikliwie przeanalizowała piśmiennictwo naukowe powiązane z tematyką rozprawy.

Reasumując stwierdzam, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Eweliny Patyry spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk. Oceniana praca ma układ typowy dla rozpraw na stopień doktora nauk. Napisana jest przejrzysto, poprawnym językiem, z bogatą szatą graficzną, a Doktorantka wykazała się umiejętnością korzystania z literatury fachowej, opanowaniem pracochłonnych metod analitycznych oraz zdolnością formułowania logicznych wniosków. Uzyskane wyniki badań stanowią cenny wkład w opracowanie czułych i wiarygodnych metod badawczych służących do oznaczania

tetracyklin w paszach. Przytoczone powyżej uwagi, głównie natury redakcyjnej, nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy. Dlatego uważam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Eweliny Patyry 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 inż. Eweliny Patyry** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski

