

Prof. dr hab. Arkadiusz Zasadowski, prof. zw.
ul. Dworcowa 23/60, 10-437 Olsztyn

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Warenik-Bany pt. „Ocena występowania i charakterystyka kongenerów dioksyn i PCB w tkankach zwierząt łownych”

Praca doktorska mgr Małgorzaty Warenik-Bany została wykonana w Zakładzie Radiobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Promotorem pracy jest profesor dr hab. Jadwiga Piskorska-Pliszczyńska.

Problematyka, realizacji której podjęła się Doktorantka ma ważne znaczenie z punktu widzenia zdrowia publicznego i higieny weterynaryjnej. Dioksyny (PCDD/PCDF) i polichlorowane bifenyle (PCB) zajmują szczególne miejsce w kontroli weterynaryjnej żywności pochodzenia zwierzęcego. Właściwości fizykochemiczne tych związków powodują, że są one persystentne, ulegają biokoncentracji i biomagnifikacji w łańcuchach troficznych lądowym i wodnym. Związki te zaburzają działanie układu hormonalnego (ang. *endocrine disrupters*) i immunologicznego oraz neurologicznego.

Prawo unijne oraz krajowe obejmuje te ksenobiotyki szeregiem aktów prawnych pozwalających na kontrolę ogniów łańcucha żywieniowego oraz na zabezpieczenie konsumentów przed ich szkodliwym wpływem. Wymaga kontroli obecności 35 kongenerów PCDD, PCDF, dl-PCB i ndl-PCB w żywności i w paszach wprowadzanych na rynek europejski. Dotychczas istnieje jednak luka w wiedzy na temat poziomów tych kontaminantów w mięsie zwierząt łownych, czynników powodujących zanieczyszczenie mięsa pozyskiwanego od zwierząt wolno żyjących zarówno roślinożernych jak i wszystkożernych. Dotąd nie ustalono najwyższych dopuszczalnych poziomów dioksyn i PCB, zapewniających bezpieczeństwo konsumentom dzicyzyny.

W związku z powyższym cele badawcze przedstawione w ocenianej dysertacji mgr Małgorzaty Warenik-Bany należy przyjąć z uznaniem. Doktorantka ujęła cele badawcze w 6 punktach, a mianowicie:

1. Sprawdzenie przydatności stosowanej w Zakładzie Radiobiologii chemicznej metody oznaczania dioksyn i PCB (HRGC-HRMS) w badaniu tkanki tłuszczowej, wątroby i mięśni zwierząt łownych, poprzez ocenę jej parametrów wykonawczych.
2. Opracowanie metody do analizy dioksyn i PCB w próbkach gleby i runa leśnego oraz w próbkach treści żołądków zwierząt łownych.
3. Wykonanie analiz zawartości 35 kongenerów PCDD, PCDF, dl-PCB i ndl-PCB w badanych próbkach (tłuszcz, wątroba, mięśnie), w treści żołądków oraz próbkach gleby i runa leśnego.
4. Dokonanie oceny porównawczej procesu bioakumulacji poszczególnych kongenerów dioksyn i PCB w tkankach badanych gatunków zwierząt.

5. Określenie wpływu środowiska bytowania zwierząt na poziomy badanych kontaminantów.
6. Oszacowanie narażenia konsumentów dziczyzny na dioksyny i PCB

Rozprawa doktorska liczy 126 stron, Układ pracy jest konwencjonalny. Obejmuje część doświadczalną i literaturową. Dokumentacja rozprawy to 37 tabel i 30 rycin. Piśmiennictwo liczy 230 pozycji i zawiera zarówno najnowsze publikacje naukowe, pozycje książkowe oraz dokumenty urzędowe. Rozprawa przygotowana jest starannie, poszczególne rozdziały następują po sobie logicznie, z czego widać, że pod względem konstrukcyjnym praca jest dobrze przemyślana. Warto podkreślić jest odniesienie do regulacji prawnych, które ukazują historyczne i bieżące prace Komisji Europejskiej nad zapewnieniem bezpieczeństwa konsumentów oraz uzasadnia podjęte prace mające na celu określenie zanieczyszczenia mięsa zwierząt łownych, wpływu środowiska na kumulację dioksyn i PCB oraz pobrania tych ksenobiotyków z żywnością.

We wstępie Doktorantka omówiła najważniejsze zagadnienia związane z podjętą tematyką, tj. właściwości fizykochemiczne oraz źródła dioksyn i PCB w środowisku, zarówno przemysłowych jak i pozaprzemysłowych, działanie toksyczne, biokumulację, koncepcję równoważników toksyczności. Podkreślona została rola żywności pochodzenia zwierzęcego, jako głównego czynnika powodującego narażenie ludzi na dioksyny i PCB. Doktorantka zwróciła uwagę również na skomplikowany proces, jakim jest ocena ryzyka związanego z narażeniem człowieka na dioksyny i PCB. Wspominała również o roli zwierząt wolno żyjących, jako bioindykatorów skażenia środowiska.

W dalszej części pracy Doktorantka omówiła miejsca poboru materiału badawczego, do których należały regiony przemysłowe i rolnicze. Rejony przemysłowe reprezentowane były przez Górnośląski Okręg Przemysłowy (GOP), Turoszowskie Zagłębie Węgla Brunatnego (TZWB), Legnicko-Głogowski Okręg Przemysłowy (LGOM) oraz Bełchatowskie Zagłębie Węgla Brunatnego (BŁZWB). Region rolniczy reprezentowało Pojezierze Warmińsko-Mazurskie (PWM). W związanych opisach Autorka zasygnalizowała możliwość wpływu różnych gałęzi przemysłu rozwiniętych na terenach objętych badaniami na zanieczyszczenie środowiska i poziomy w tkankach zwierząt łownych. W przypadku Pojezierza Warmińsko-Mazurskiego zwróciła uwagę na możliwość historycznego wpływu stosowanych środków ochrony roślin i obecności składowisk tych preparatów (tzw. mogilników) na zanieczyszczenie tkanek zwierząt bytujących na tym terenie.

Próbki do badań zostały pobrane przez członków kół łowieckich dzierżawiących obwody łowieckie zlokalizowane na terenach bezpośrednio sąsiadujących z emiterami zanieczyszczeń środowiska lub terenami rolniczymi. Materiał stanowiły tkanki, narządy i próbki treści przewodu pokarmowego oraz elementy środowiska, w którym bytowały zwierzęta. Pobrano próbki od 19 jeleni, 10 saren i 47 dzików. Z niektórych regionów, próbki pobrano od niewielkiej liczby zwierząt (BŁZWB czy PWM). Jednak dla ogólnej oceny występowania w Polsce i charakterystyki kongenerów dioksyn i PCB nie miało to negatywnego znaczenia.

Można natomiast zasugerować, aby w przyszłości rozszerzyć badania na tych terenach o większą liczbę próbek. Doktorantka w sposób syntetyczny przedstawiła charakterystykę badanych gatunków zwierząt, zwracając uwagę na występowanie, dietę i przeciętną długość życia badanych gatunków zwierząt. Aby określić wpływ środowiska na kumulację badanych ksenobiotyków, badaniami objęte zostały również rośliny wchodzące w skład diety zwierząt oraz gleba, która pobierana jest wraz z karmą przez zwierzęta. Łącznie przebadano 75 próbek roślin i 28 próbek gleby.

Doktorantka zastosowała w badaniach opracowaną i zwalidowaną w Zakładzie Radiobiologii PIWet-PIB metodę oznaczania zawartości dioksyn i PCB w żywności i paszach. Metoda ta spełnia wymagania rozporządzeń unijnych i krajowych w zakresie oznaczania dioksyn i PCB w żywności i paszach oraz posiada akredytację Polskiego Centrum Akredytacji (PCA). Ta skomplikowana i wysoce specyficzna metoda oparta jest na technice rozcieńczeń izotopowych (IDMS) z użyciem do detekcji i ilościowego oznaczania techniką HRGC-HRMS. W rozdziale „Metody” Autorka przedstawiła przykładowe parametry wykonawcze zastosowanej metody oraz szczegółowo opisała etapy przygotowania próbek do analiz chemicznych uwzględniając rodzaj badanych matryc i modyfikację procedury badawczej. W sposób przejrzysty w tabeli 15 zostały wymienione wszystkie etapy analityczne dla badanych matryc, zaś w tabeli 16 warunki pracy zestawów wysokorozdzielczych chromatografów gazowych sprzężonych z wysokorozdzielczymi spektrometrami mas (HRGC-HRMS). W opisie „Metody” Doktorantka podała wzór na podstawie, którego obliczane jest stężenie badanych kongenerów dioksyn i PCB oraz wspominała o stosowanych narzędziach zapewniających jakość i wiarygodność uzyskiwanych wyników.

Poziomy dioksyn i PCB oznaczone w materiale pobranym od zwierząt i w elementach środowiska Doktorantka przedstawiła w rozdziale D „Poziomy dioksyn i PCB w tkankach zwierząt łownych i próbkach środowiskowych”. W pierwszej kolejności opisała występowanie kongenerów w tkankach jeleni, saren i dzików, a następnie roślinach i glebie. Otrzymane wyniki ze względu na brak limitów ustanowionych dla mięsa zwierząt łownych porównała do poziomów oznaczanych w mięsie zwierząt hodowlanych i limitów ustalonych w rozporządzeniach dla mięsa zwierząt hodowlanych. Porównując wzięła pod uwagę sposób odżywiania badanych gatunków zwierząt. Dzięki temu czytelnik może zwrócić uwagę na wysoką zawartość dioksyn i PCB w mięsie zwierząt łownych. Analizując zanieczyszczenie mięsa zwierząt łownych Doktorantka przeanalizowała wpływ PCDD, PCDF i DL-PCB na całkowitą toksyczność próbek, określiła ich udział procentowy w sumie PCDD/PCDF/dl-PCB. Zbadała również czy istnieją statystycznie istotne różnice pomiędzy stężeniami dioksyn, furanów i PCB pomiędzy tkankami w obrębie organizmu oraz pomiędzy badanymi gatunkami. Do tego celu wykorzystowała test Kruskala-Wallisa. Do oceny różnic pomiędzy płciami badanych gatunków zastosowała test U-Manna-Whitneya. Szkoda jedynie, że Doktorantce nie udało się statystycznie ocenić wpływu wieku na kumulację badanych zanieczyszczeń

organicznych. Analizy statystyczne zostały wykonane w profesjonalnym i zwalidowanym programie STATISTICA wersja 10.

Wydaje się, że można rozwinąć pracę w zakresie oznaczenia poziomów dioksyn i PCB w treści przewodów pokarmowych, jednak ze względu na skomplikowany etap przygotowania próbek wymagający zastosowania zestawu Total-Prep, wykorzystującego gotowe i drogie kolumny z tlenkiem glinu, można uznać, że do wstępnej oceny zawartości dioksyn i PCB w treściach przewodów pokarmowych uzyskane wyniki są wystarczające.

Doktorantka bardzo szczegółowo opisała poziomy dioksyn i PCB w próbkach środowiskowych. Zanieczyszczenie dioksynami roślin i gleby przedstawiła najpierw ogólnie, a następnie z rozbiem na regiony objęte badaniami. Oprócz poziomów kontaminantów przedstawiła również udział procentowy badanych grup związków. Zbadała korelacje pomiędzy poziomami dioksyn i PCB w środowisku i tkankach zwierząt. Do tego celu wykorzystowała test korelacji rang Spermmana, a w celu łatwiejszej oceny wpływu środowiska w tabeli 34 przedstawiła siłę korelacji pomiędzy badanymi elementami wykorzystując klasyfikację Guilforda.

Dużą uwagę Doktorantka zwróciła na profile kongenerów PCDD, PCDF i PCB w badanych tkankach i elementach środowiska. Na rycinach nr 15-18 przedstawiła profile dioksyn i PCB w mięśniach i wątrobach jeleniowatych oraz dzików z 5 badanych regionów. W kolejnym podrozdziale przedstawiła profile z podziałem na badane regiony. Aby uwydatnić podobieństwa i różnice zastosowała, obok typowego wykresu przedstawiającego profile kongenerów dioksyn i PCB, również wykresy profili w skali logarytmicznej. Czytelnik może w łatwy sposób zauważyć wpływy elementów środowiska na kumulację dioksyn i PCB w organizmach badanych zwierząt.

W rozdziale 5 Autorka omówiła proces biokoncentracji badanych TZO w organizmach zwierząt. Aby porównać biokoncentrację u badanych przedstawicieli zwierzyny łownej zastosowała współczynniki biokoncentracji. Obliczyła je dla dwóch układów: mięśnie/gleba oraz wątroba/gleba dla jeleniowatych i dzików ze wszystkich badanych regionów. Zostały one przedstawione w postaci wykresów słupkowych dzięki czemu łatwo zaobserwować zmiany pomiędzy badanymi gatunkami zwierząt łownych. Widać również, które kongenery kumulowane są w najwyższym stopniu w mięśniach lub wątrobie. Doktorantka starała się również wyjaśnić brak korelacji pomiędzy poziomami ndl-PCB w elementach środowiska i organizmach zwierząt podkreślając wpływ właściwości fizykochemicznych i wpływ metabolizmu na gromadzenie PCB.

Bardzo ważnym elementem pracy jest ocena pobrania dioksyn wraz z dietą i oszacowanie narażenia na dioksyny i PCB w wyniku konsumpcji mięsa zwierząt łownych. Doktorantka scharakteryzowała ryzyko dla zdrowia konsumentów dziczyzny porównując oszacowane narażenie z tolerowanym tygodniowym pobraniem (TWI). Zastosowała trzy scenariusze konsumpcji (bardzo często, często i sporadycznie) uwzględniając dzieci i dorosłych. Uzyskane wyniki wskazują, że istnieje ryzyko związane z konsumpcją potraw przygotowanych z wątrób zwierząt łownych.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka podsumowuje uzyskane wyniki, omawia je i podejmuje dyskusję z innymi autorami podobnych badań zarówno krajowych jak i zagranicznych. Po kolei odpowiada na cele wyznaczone w celu i uzasadnieniu podjętych badań. Ocenia wpływ różnych czynników (zarówno biologicznych jak i chemicznych) na biokumulację dioksyn i PCB w organizmach zwierząt. Pod uwagę bierze dane dotyczące skażenia środowiska dioksynami i PCB publikowane przez Krajowy Ośrodek Bilansowania i Zarządzania Emisjami. Zwraca uwagę również na konieczność zabezpieczenia zdrowia szczególnej grupy konsumentów dziczyzny jakimi są myśliwi i ich rodziny. Niedosyt dyskusji z wynikami innych autorów spowodowany jest brakiem w piśmiennictwie tak szczegółowych wyników badań u trzech badanych gatunków zwierząt, jakie uzyskała doktorantka.

Na zakończenie Doktorantka przedstawia trzy według niej najważniejsze wnioski z przeprowadzonych badań:

1. Potwierdzono, że zwierzęta łowne są dobrymi bioindykatorami zanieczyszczenia środowiska, w którym żyją.
2. Powinny zostać ustalone przez właściwe organy maksymalne dopuszczalne stężenia dioksyn i PCB w żywności pozyskiwanej od tych zwierząt.
3. Na podstawie profili kongenerów obecnych w tkankach zwierząt łownych można wskazać z dużym prawdopodobieństwem źródła tych kontaminantów w terenie.

Powyższe wnioski mają znaczenie dla zapewnienia bezpieczeństwa zdrowia konsumentów oraz zwierząt wolnożyjących i mają charakter aplikacyjny.

Zauważone drobne niedociągnięcia i błędy redakcyjne zaznaczono w tekście pracy, jednak w niczym one nie umniejszają jej wysokich merytorycznych wartości oraz oryginalności otrzymanych w badaniach wyników.

Oceniając przeprowadzone badania, rzeczową dyskusję z interpretacją wyników i wnioskami uważam, że Doktorantka umiejętnie zrealizowała badania określone w temacie pracy. Świadczy to o dobrym opanowaniu przez Autorkę nowoczesnych technik analizy laboratoryjnej w tym zakresie i równocześnie o dobrym przygotowaniu do pracy naukowo-badawczej.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki stawiane dysertacjom doktorskim określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z dn. 2014., poz. 1852 ze zm. w Dz. U. z 2015 r. poz. 249) i przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr Małgorzaty Werenik-Bany do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn, dn.18.10.2017 r.


prof. dr hab. Arkadiusz Zasadowski
prof. zw.