

Prof. dr hab. Jose Luis Valverde Piedra  
Zakład Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska  
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Sebastiana Maszewskiego pt. „Ocena zanieczyszczeń krajowej żywności dioksynami i związkami pokrewnymi”, wykonana pod kierunkiem Prof. dr hab. Jadwigi Piskorskiej-Pliszczyńskiej i Promotora pomocniczego: dr Stanisława Semeniuka w Zakładzie Radiobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach**

W ostatnich kilkudziesięciu latach dioksyny cieszyły się dużym zainteresowaniem społecznym oraz w środowisku naukowym. Wynika to z faktu powszechnego ich występowania w środowisku oraz łatwości dostania się do łańcucha pokarmowego ludzi i ich kumulacji w organizmie. Dioksyny występują w środowisku w bardzo małych stężeniach rzędu  $10^{-9}$  do  $10^{-12}$  g/l, lecz zachowują ich aktywność nawet przez 100 lat, zaś w organizmach żywych czas okres eliminacji wynosi nawet do 30 lat.

Dioksyny są substancjami litofilnymi, dlatego dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach niepolarnych, takich jak tłuszcze czy oleje. Wykazują oporność na działanie utleniaczy i kwasów, a także na podwyższoną temperaturę. Wyniki badań epidemiologicznych i badań laboratoryjnych są często niejednoznaczne, co utrudnia ocenę realnego zagrożenia dla zdrowia ludzi. Problem ten wynika z trudności w znalezieniu odpowiedniego zwierzęcego modelu doświadczalnego, który mógłby służyć do ustalenia poziomu dioksyn bezpiecznego dla zdrowia człowieka. Różnorodność reakcji biochemicznych wywoływanych przez dioksyny, jak i duże różnice we wrażliwości zwierząt modelowych na te związki są przyczyną tego problemu.

Mediatorem efektów toksycznego działania dioksyn, a także wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) jest „receptor węglowodorów aromatycznych” (AhR). Receptor ten jest białkiem znajdującym się w cytozolu komórek, który pod względem budowy i działania wykazuje bardzo duże podobieństwo do receptora hormonów sterydowych, gdyż oba typy receptorów mogą się wiązać z DNA.

Dioksyny wpływają na wiele reakcji immunologicznych, które przebiegają pod postacią przewlekłych alergii skórnych. Związki te charakteryzują się różną toksycznością, która zależy zarówno od liczby atomów chloru bądź bromu (lub innego atomu) w cząsteczce, jak i od miejsca ich podstawienia. Za najbardziej toksyczną dla organizmów żywych uznaje się 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioksynę (2,3,7,8-Tetra-Chloro-Dibenzo-p-Dioxin — TCDD). Dawka LD50 powoduje spadek masy ciała, zanik grasicy, indukuje syntezy wątrobowej hydroksylazy węglowodorów aromatycznych, hamuje aktywność glukoneogenezy i powoduje wzrost stężenia tryptofanu we krwi. U szczurów powolnie dawkowana TCDD prowadzi do zaniku rozrodczości, większe dawki działają teratogennie, a duże wywołują zaburzenia procesu embriogenezy.

Człowiek może zostać narażony na działanie dioksyn poprzez kontakt ze skażoną wodą lub powietrzem, a także w wyniku spożycia zanieczyszczonej żywności. Bezpośrednia ekspozycja na duże stężenia dioksyn może mieć miejsce przy produkcji chemikaliów oraz wyniku awarii zakładów przemysłowych lub w trakcie stosowania pestycydów. Emisja dioksyn towarzyszy wielu naturalnym procesom, takim jak wybuchy wulkanów, wyładowania atmosferyczne, a także pożary lasów. Obecność dioksyn stwierdzono zarówno w żywności pochodzenia zwierzęcego, jak i roślinnego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **mgr Sebastiana Maszewskiego** została napisana w języku polskim i przedstawiona do recenzji w postaci wydruku komputerowego na 178 stronach formatu A4. Dysertację przedstawiono w układzie zawierającym spis treści, wykaz stosowanych skrótów i akronimów, wstęp, cel pracy, badania własne, wnioski, streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, piśmiennictwo, załączniki stanowiące wykaz zamieszczonych tabel i rycin.

Rozprawa zawiera 43 ryciny, 36 tabel i 212 pozycje piśmiennictwa w większości anglojęzycznych, z czego mniej niż połowa pochodzi z ostatnich 10 lat. Szata graficzna dysertacji jest staranna i estetyczna. Praca została napisana poprawnym językiem i w sposób zrozumiały.

Wstęp zajmuje 22 strony i zawiera przegląd piśmiennictwa wzbogacony o pięć tabel i pięć rycin. Autor opisał pochodzenie zanieczyszczenia środowiska grupą związków znanych jako trwałe związki organiczne do których zaliczane są dioksyny. Przedstawił budowę i właściwości fizykochemiczne dioksyn oraz ich toksyczność dla ludzi i zwierząt. Wprowadza czytelnika w koncepcję równoważników toksyczności dla tej grupy związków i zamieszcza tabelę zawierającą szczegółowy opis współczynników toksyczności dla 22

dioksyn uznanych przez WHO. Doktorant opisuje przypadki masowych zatruc ludzi i zwierząt, które miały miejsce na świecie w okresie od 1947 do 1999r w wyniku ekspozycji na działanie dioksyn. W dalszej części wstępu doktorant przedstawia obowiązujące w UE przepisy prawne i monitoringu w zakresie kontroli zawartości dioksyn w łańcuchu żywnościowym człowieka. Wyczerpująco opisuje metody biologiczne i nowoczesne instrumentalne metody oznaczania dioksyn przy użyciu techniki wysokiej rozdzielczości spektrometrii mas. Dodatkowo wzbogaca te informacje trzema rycinami ilustrujące budowę wysokiej rozdzielczości spektrometru mas oraz skalę wymaganej rozdzielczości dla identyfikacji pierwotnych i wtórnych związków.

Rozdział ten zawiera dostępne dane ze światowej literatury w obszarze chemii i analizy instrumentalnej, co świadczy o dużej wiedzy doktoranta i umiejętności doboru technik do opisanych zagadnień. Tematyka ta stała się inspiracją do podjęcia badań objętych w dysertacji doktorskiej.

W rozdziale II „Cel i uzasadnienie podjęcia badań”, autor postawił sobie za główny cel scharakteryzować istniejące poziomy zanieczyszczeń dioksynami i PCB w szerokiej gamie produktów żywnościowych pochodzenia zwierzęcego w latach 2009-2014. Do realizacji tego celu postanowił określić jakościowo i ilościowo, na poziomie femtogramów, zawartości 35 toksycznych kongenerów dioksyn w próbkach pochodzących od zwierząt hodowlanych przy zastosowaniu techniki wysokiej rozdzielczości spektrometrii mas i własnej modyfikacji metody rozcieńczeń izotopowych. Ponadto, doktorant nakreślił sobie trzy dodatkowe cele badawcze: (1) ustalenie najczęściej zanieczyszczonych produktów żywnościowych i śledzenie tendencji czasowych; (2) znalezienie przypadków stężeń analizowanych związków niezgodnych z wymaganiami obowiązujących przepisów i określenie źródeł tych zagrożeń; oraz; (3) oszacowanie narażenia konsumentów na ponad normatywną zawartość dioksyn i PCB w żywności na podstawie wykonanych badań monitoringowych.

Rozdział III. „Badania własne” zajmuje 80 stron, zawiera 38 rycin i 30 tabel. Doktorant zamieszcza tu informacje o adaptacji i optymalizacji metod analitycznych walidowanych i akredytowanych w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym – Państwowym Instytucie Badawczym w Puławach dla 29 kongenerów PCDD, PCDF i dl-PCB oraz 6 ndl-PCB. Następnie opisuje badane anality za pomocą tabeli w której zamieścił ich nazwy chemiczne i wzory strukturalne. Opisuje wzorce analityczne dla 35 badanych kongenerów i stężenia ich roztworów kalibracyjnych. Doktorant podaje wykaz aparatury laboratoryjnej i instrumentów

pomiarowych stosowanych w badaniach. Bardzo szczegółowo opisuje sposób przygotowania próbek do badań, łącznie z procesem ekstrakcji i oczyszczania ekstraktów. Opisuje metody rozdzielania chromatograficznego badanych związków i ich detekcję, techniki dozowania próbek oraz wyniki weryfikowane odpowiednimi metodami statystycznymi.

W podrozdziale B doktorant przedstawia weryfikację metod analitycznych poprzez walidację pod względem specyficzności, selektywności, granicy wykrywalności, powtarzalności, poprawności, zakresu roboczego, niepewności i odzysk oraz metody zapewnienia jakości badań.

Szczegółowe przedstawienie procedur metodycznych z łatwością pozwoli osobie biegłej w technice spektrometrii mas odtworzyć badania.

W podrozdziale III. C. doktorant przedstawił istotę badań monitoringowych i w punktach 1 i 2 określił materiał badawczy i metody oznaczania użyte w tych badaniach w latach 2009-2014.

W punkcie III.C.3. zamieścił wyniki badań uwzględniające poziomy i zakresy stężeń badanych związków w mięśniach, wątrobie, mleku, jajach kurzych i mięśniach ryb hodowlanych oraz zaprezentował rozkład analizowanych związków w badanych tkankach i narządach. W dalszej części podrozdziału III. C. Doktorant zamieścił informacje opisujące narażenie konsumentów na ekspozycję dioksyn i związków dioksynopodobnych i niedioksynopodobnych w oparciu o odsetek tolerowanego dziennego pobrania (TDI) i tolerowanego pobrania tygodniowego (TWI) na podstawie łącznej zawartości kongenerów w próbkach niezgodnych z wymaganiami przepisów europejskich. W punkcie 5 podrozdziału III.C. doktorant zamieścił opracowaną dyskusję swoich wyników. Należy podkreślić, że prezentowane „Wyniki” potwierdzają, że autor bardzo dobrze opanował warsztat i swobodnie posługuje się nowoczesnymi technikami analitycznymi.

W punkcie „Dyskusja” doktorant na 12 stronach skonfrontował swoje wyniki z wynikami uzyskanymi przez innych autorów i w jasny sposób wyeksponował oryginalne wyniki własne, co dowodzi dobrego opanowania tematyki badawczej i odczytania, oraz umiejętności kierowania logicznym wywodem, w którym ważne miejsce pełni celne dobieranie argumentów z piśmiennictwa naukowego. Na podstawie uzyskanych wyników Autor sformułował 5 wniosków końcowych podkreślających ważność prowadzenia badań monitoringowych dioksyn, dioksyno i nie dioksynopodobne związki w łańcuchu żywnościowym człowieka.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na drobne uchybienia edytorskie zauważone przeze mnie podczas czytania rozprawy, które powinny zostać poprawione przy oddaniu pracy do druku.

Brak jest wyraźnie wydzielonych rozdziałów „materiał i metody”, „wyniki” oraz „dyskusja”.

Rozdział III „Badania własne” jest nietypowy dla tego typu prac, gdyż zawiera podrozdziały i punkty, które w typowych dysertacjach są kolejnymi rozdziałami, a w obecnym ujęciu pojawiają się dopiero w podrozdziale III.C. jako punkt C.1. „materiał badawczy i jako punkt C.2. „metoda oznaczania” oraz, punkt C.3. „wyniki badań” i C.5. „dyskusja”. Opisane w podrozdziale III.A. pt. „Adaptacja i optymalizacja metody analitycznej”, podrozdziale III.B. „Weryfikacja zastosowanej metody analitycznej” oraz w podrozdziale III.C. punkt 1 i 2 z pewnością należy je umieścić w rozdziale pod nazwą „materiał i metody”, zaś punkt 3 podrozdziału III. C.3. i C.4. „narażenie konsumentów” należy przemianować jako rozdział „Wyniki”. Punkt 5 „Dyskusja” powinien zostać przemianowany na rozdział „Dyskusja”.

Na stronie 19 przy opisie metod instrumentalnych doktorant nie zamieścił rozwinięcia skrótu ECD, w oryginalnym języku, dotyczącego detektora wychwyty elektronów. Na stronie 32 w tytule tabeli 8 należy uściślić, że chodzi o ekstrakcję badanych substancji z żywności a nie o ekstrakcję żywności z użyciem ekstraktora ASE 300. Na rycinie 6, w środkowym polu tekstowym w trzecim rzędzie napisane jest „mięśnie zwierząt” logicznie byłoby napisać mięśnie ssaków, gdyż w poprzedzającym polu tekstowym napisane jest „mięśnie ryb”, które też są zaliczane do królestwa zwierząt.

Wielokrotnie w pracy stosowano zamiennie terminy: chów i hodowla zwierząt, podczas gdy wyrazy te nie są jednoznaczne. Termin chów wg słownika Języka Polskiego PWN oznacza, cytuje «karmienie i pielęgnowanie zwierząt hodowlanych» podczas gdy hodowla to, cytuje:

1. «planowa opieka nad wzrostem i rozwojem zwierząt lub roślin; też: zwierzęta lub rośliny będące pod taką opieką»
2. «wiedza o doskonaleniu dziedzicznych cech hodowanych zwierząt lub roślin».

Na stronie 87 doktorant zastosował skrót myślowy w podtytule „Jaja z hodowli klatkowej”, jak można się domyśleć badane próbki jaj pochodziły od kur utrzymywanych w systemie chowu klatkowego. Podobne skróty myślowe zastosował na str. 88 w podtytułach „Jaja z hodowli ekologicznych” oraz „jaja z hodowli wybiegowych”. Przy pisaniu prac

naukowych powinno się unikać stosowania skrótów myślowych i stosować poprawne nazewnictwo naukowe, więc należy stosować termin „chów” zamiast terminu „hodowla”.

Na stronie 94 w wierszu czwartym „PCDD/PCDF. Średni poziom w tkance mięśniowej wynosił...” oraz na stronie 97 w tytule tabeli 34 zastosowano nie właściwą nazwę badanej próby, „Poziomy PCDD, PCDF i PCB w tkance mięśniowej karpia i pstrąga” bardziej zasadne byłoby zastosować poziomy PCDD, PCDF i PCB w mięśniach karpia i pstrąga. Mięśnie oprócz tkanki mięśniowej zawierają, między innymi, tkankę tłuszczową, która jest predylekcyjnym miejscem gromadzenia się tych lipofilnych związków.

Dokładność jest cechą wymaganą zarówno w analizach laboratoryjnych związków jak również w opisywaniu badanego materiału. Wielokrotnie w tekście doktorant użył nie dokładne określenia względem właściwej nazwy próby badanej. Dla przykładu podaję kilka zdarzeń: na stronie 94 (23 wiersz) „...poziomy stężenie w karpniu nie przekraczały...”, na stronie 95 (29 wiersz) „Dioksyny i furany u karpia stanowiły...” , i w tytule ryciny 24 na stronie 102 „Rozkład stężeń PCDD/PCDF, sumy dioksyn, furanów i dl-PCB oraz ndl-PCB w rybach hodowlanych”. Nazwy badanych prób powinny być precyzyjne określone jako „mięśnie karpia czy w mięśniach ryb”. Kolejny brak precyzji w nazewnictwie pojawia się w dyskusji na stronie 135 (wiersze 19) „w tkankach świń i drobiu” i (wiersz 25) „w tkankach drobiu i bydła” gdyż w rzeczywistości badano zawartość związków w próbkach narządów tych gatunków zwierząt.

W dyskusji zabrakło mi podrozdziałów rozdzielających dyskutowane zawartości badanych związków w różnych matrycach. Ułatwiłoby to uporządkowanie prowadzonej dyskusji.

### **Wniosek końcowy**

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską mgr Sebastiana Maszewskiego uważam, że autor pracy posiadał wymaganą znajomość warsztatu metodycznego, potrafi te umiejętności odpowiednio wykorzystać w pracy analitycznej, a otrzymane wyniki logicznie zinterpretować. Praca dokumentuje w moim przekonaniu kilka ważnych udoskonaleń metod analitycznych, które zostały stosowane w trakcie realizacji niniejszej pracy a uwagi krytyczne dotyczą jedynie usterki redakcyjne i nie umniejszają wysokiej wartości naukowej dysertacji.

**Mając powyższe na uwadze pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Sebastiana Maszewskiego pt.: „Ocena zanieczyszczeń krajowej żywności dioksynami i związkami pokrewnymi”, w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003r. „O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” i wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynarii, Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr Sebastiana Maszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Ponadto, mając na uwadze wysoki poziom merytoryczny oraz nowatorski charakter recenzowanej dysertacji wnioskuję o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.

  
Prof. dr hab. Jose Luis Valverde Piedra