

Lublin, 01 października 2019 r.

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 Szczepana Mikołajczyka pt. „Dioksyny i związki pokrewne w rybach morskich i słodkowodnych”, wykonana pod kierunkiem pani Prof. dr hab. Jadwigi Piskorskiej-Pliszczyńskiej w Zakładzie Radiobiologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego, Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Duże zainteresowanie społeczne oraz naukowe dioksynami wynika z faktu powszechnego ich występowania w środowisku oraz łatwości dostania się do łańcucha pokarmowego ludzi i ich kumulacji w organizmie. Występują one w środowisku w bardzo małych stężeniach, lecz zachowują aktywność nawet przez 100 lat, zaś w organizmach żywych czasokres eliminacji wynosi nawet do 30 lat. Dioksyny są substancjami lipofilnymi, dlatego dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach niepolarnych, takich jak tłuszcze czy oleje. Wykazują oporność na działanie utleniaczy i kwasów, a także na podwyższoną temperaturę.

Liczne badania naukowe potwierdzają niekorzystny wpływ dioksyn na organizmy żywe już w bardzo małych dawkach. Wyniki badań bezsprzecznie dowodzą, że TCDD powoduje zmiany skórne, zaburzenia hormonalne, bezpłodność oraz uszkodzenia wątroby. Należy jednak uwzględnić, że w badaniach laboratoryjnych są wykorzystywane bardzo duże stężenia dioksyn (rzędu kilku $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c.), podczas gdy organizmy żywe w warunkach naturalnych są narażone na znacznie niższe stężenia tych substancji (rzędu kilku ng TEQ/kg m.c.).

W celu ochrony przed nadmierną ekspozycją na dioksyny wprowadzono nowoczesne metody spalania odpadów oraz produkcji związków chloropochodnych, co umożliwiło znaczne ograniczenie emisji dioksyn do atmosfery. Ponadto, Unia Europejska wprowadziła dyrektywy ściśle określające dopuszczalne stężenia PCDD i PCDF w glebie, wodzie i produktach spożywczych, dzięki czemu przypadkowe zatrucie tymi substancjami należą do rzadkości. Niebezpieczeństwo narażenia na dioksyny pojawia się dopiero wtedy, gdy

w wyniku niezamierzonego działania ludzi ich znaczne ilości przedostają się do środowiska. Niemniej jednak narażenie człowieka na działanie tych związków jest wciąż możliwe, dlatego też badania monitoringowe mające na celu określenia ich poziomów w środkach spożywczych w tym i w rybach są bardzo istotne z punktu widzenia weterynaryjnej ochrony zdrowia publicznego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **mgr inż. Szczepana Mikołajczyka** została napisana w języku polskim i przedstawiona do recenzji w postaci wydruku komputerowego na 163 stronach formatu A4. Dysertację przedstawiono w układzie zawierającym spis treści, wykaz skrótów, wstęp, cel i uzasadnienia badań, badania własne, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, piśmiennictwo oraz wykaz tabel i rycin.

Rozprawa zawiera 46 rycin, 52 tabele i 314 pozycji piśmiennictwa w większości anglojęzycznych, z czego jedna trzecia pochodzi z ostatnich 10 lat. Szata graficzna dysertacji jest bardzo staranna i estetyczna. Praca została napisana poprawnym i zrozumiałym językiem polskim.

Wstęp zajmuje 13 stron i zawiera przegląd piśmiennictwa wzbogacony o trzy tabele i trzy ryciny. Doktorant przedstawił czytelnikowi żywieniowe przesłanki przemawiające za spożywaniem ryb przez ludzi jak również ujawnił niebezpieczeństwo ich narażenia na działanie toksycznych związków takich jak polichlorowane dibenzo-p-dioksyny (PCDD), polichlorowane dibenzenofurany (PCDF) i polichlorowane bifenile (PCB), które mogą występować w tkankach ryb bytujących w skażonym tymi związkami środowisku. Podkreślił aktualność i ważność problemu występowania tych związków w żywności mimo wysiłków czynionych przez wiele instytucji międzynarodowych z Unią Europejską na czele. Omówił metody analiz jak również dopuszczalnych limitów dla różnych kategorii produktów w tym i dla ryb. Doktorant opisał strukturę chemiczną PCDD, PCDF i PCB oraz opisał ich właściwości fizykochemiczne, precyzyjnie określił źródła i mobilność tych zanieczyszczeń w środowisku w kraju i na świecie. Przedstawił toksyczność i drogi narażenia tymi związkami dla ludzi. Zapoznał czytelnika ze strategią wprowadzoną przez Unię Europejską w celu oceny stanu zanieczyszczenia środowiska dioksynami i PCB, redukcję ich wpływu na środowisko oraz zmniejszenie i utrzymywanie narażenia ludzi na bezpiecznym poziomie. Przedstawił obowiązujące akty prawne i opisał koncepcję równoważników toksyczności dla tej grupy związków. Zamieścił tabelę zawierającą dopuszczalne zawartości dioksyn i PCB w tkankach ryb. Doktorant w klarowny sposób opisał zjawiska bioakumulacji i biomagnifikacji dioksyn i PCB w tkankach ryb.

Rozdział ten zawiera dostępne dane ze światowej literatury w obszarze skażenia środowiska PCDD, PCDF i PCB ich cech fizykochemicznych oraz mobilności i toksyczności w środowisku wodnym i w organizmach w nim bytujących a w szczególności u ryb co zostało wykorzystane w planowaniu badań objętych w dysertacji doktorskiej.

W rozdziale II „Cel i uzasadnienie podjęcia badań”, autor uzasadnia potrzeby prowadzenia badań objętych dysertacją. Postawił sobie za główny cel scharakteryzować istniejące poziomy zanieczyszczeń dioksynami i PCB w tkankach ryb. Wobec braku informacji o poziomach dioksyn i PCB w tkankach ryb słodkowodnych w Polsce koniecznym wg. Doktoranta było zbadanie stężeń tych związków i porównanie do ich zawartości w rybach z dalekich i bliskich akwenów oraz w rybach hodowlanych jak również ocena narażenia potencjalnych konsumentów na zanieczyszczenia tymi związkami. Dla realizacji tego celu Doktorant postanowił ocenić poziomy zanieczyszczeń dioksynami i PCB ryb morskich i słodkowodnych. Postanowił określić profile 17 kongenerów PCDD/PCDF, 12 dl-PCB i 6 ndl-PCB w próbkach mięśni ryb. Wskazanie korelacji między zanieczyszczeniem w rybach dioksynami a zawartości w nich tłuszczu i poziomu zanieczyszczeń w osadach oraz korelacji między poziomem zanieczyszczeń w mięśniach i zanieczyszczeń w osadach. Charakteryzowanie bioakumulacji w wolnożyjących rybach słodkowodnych oraz potencjalnego wpływu stężeń dioksyn w mięśniach ryb na zdrowie konsumentów.

Rozdział III. „Badania własne” zajmuje 92 strony, zawiera 43 ryciny i 43 tabele. W podrozdziale „Materiał i metody” Doktorant zamieścił krótką charakterystykę badanych gatunków ryb stanowiących źródło materiału do badań. Obejmuje siedem gatunków ryb bałtyckich, sześć gatunków ryb dalekomorskich, siedem gatunków hodowlanych ryb słodkowodnych i 12 gatunków wolnożyjących ryb słodkowodnych. Doktorant scharakteryzował akweny wodne, z których pochodziły ryby objęte w badaniach. Wyszczególnił zawartość zanieczyszczeń chemicznych w tych akwenach, co uzasadnia wybór pobierania materiału do badań z tych miejsc. Ponadto, zamieścił informację o uwarunkowaniach geograficznych mogących wpłynąć na zanieczyszczenia dioksynami i PCB w trzynastu miejscowościach, w których pobrano osady denne do badań.

W podrozdziale „Metody” Autor zamieścił szczegółowe informacje nt. aparatury badawczej, materiałach odniesienia, odczynnikach i szkle laboratoryjnym użytym w analizach laboratoryjnych. Następnie również szczegółowo opisał procedury akredytowanej metody oznaczania PCDD/PCDF/PCB w mięśniach ryb oraz walidacji metody analizy PCDD, PCDF i PCB w osadach dennych. Opisał również procedury zapewniające jakość

przeprowadzonych badań. W analizie statystycznej otrzymanych wyników Doktorant zastosował test Shapiro-Wilka do określenia typu rozkładu danych, test Kruskala-Wallisa do weryfikacji braku różnicy stężeń dioksyn i PCB między gatunkami ryb i siedliskami i współczynnik korelacji Spearmana do weryfikacji zależności między zawartością tłuszczu w mięśniach ryb a poziomami dioksyn i PCB oraz między zanieczyszczeniem osadów dennych a zanieczyszczeniem mięśni ryb.

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

W podrozdziale II „Wyniki” doktorant zamieścił wyniki badań uwzględniające poziomy i zakresy stężeń badanych związków w mięśniach ryb basenu Morza Bałtyckiego, ryb dalekomorskich, ryb słodkowodnych wolnożyjących i hodowlanych, oraz zaprezentował udział procentowy PCDD, PCDF i dl-PCB w sumarycznej toksyczności w mięśniach badanych ryb. Bardzo ciekawym rozwiązaniem przedstawienia wyników badań jest stosowany przez doktoranta profil kongenerów w mięśniach poszczególnych grup ryb. Pozwala to graficznie przedstawić udział poszczególnych związków w sumarycznej toksyczności.

W dalszej części podrozdziału Doktorant przedstawił wyniki pokazujące zależności poziomów stężeń dioksyn i PCB od zawartości tłuszczu w mięśniach ryb akwenu bałtyckiego i akwenów dalekomorskich. W odniesieniu do występowania zanieczyszczeń dioksynami i PCB w mięśniach wolnożyjących ryb słodkowodnych Doktorant przedstawił w klarowny sposób wyniki w zależności od lokalizacji rzek i jezior w pobliżu aglomeracji miejskiej czy obszarów rolniczych. Wykazał zróżnicowane zanieczyszczenie łowisk w rzekach w Polsce oraz istnienie zależności między zanieczyszczeniem siedliska a stopniem zanieczyszczenia mięśni ryb. Zgodnie z hipotezą badawczą, że kumulacja toksycznych PCDD, PCDF i PCB w rybach jest zależna od zanieczyszczenia środowiska wodnego i poziomów badanych związków w osadach dennych Doktorant przeprowadził analizy ww. związków w osadach dennych wybranych polskich rzek i jezior. Wykazał zróżnicowane stężenia badanych związków w osadach dennych w zależności od umiejscowienia łowiska w rzece lub jeziorze w terenach rolniczych i zurbanizowanych. Ponadto, wykazał istnienie korelacji między zanieczyszczeniami osadów a poziomem PCDD, PCDF i PCB w mięśniach ryb, co dowodzi o istotnym wpływie środowiska bytowania ryb.

Doktorant scharakteryzował bioakumulację PCDD, PCDF, dl-PCB i ndl-PCB u trzech reprezentatywnych gatunków wolnożyjących ryb słodkowodnych. Podjął się trudu oceny potencjalnego wpływu stwierdzonych stężeń PCDD, PCDF i dl-PCB w mięśniach ryb na

zdrowie konsumentów. 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), tymczasową dawkę miesięczną (PTMI) na podstawie łącznej zawartości kongenerów w próbkach i konkluduje, że pomimo spełnienia wymagań dotyczących dopuszczalnych limitów ryby mogą stanowić poważne źródło dioksyn, furanów i PCB w diecie człowieka.

Należy podkreślić, że prezentowane „Wyniki” potwierdzają, że autor bardzo dobrze opanował warsztat badawczy i swobodnie posługuje się nowoczesnymi technikami analitycznymi oraz umiejętnie posługuje się graficznym przedstawieniem otrzymanych wyników.

W rozdziale IV „Dyskusja” Doktorant na 20 stronach, wzbogaconych 3 tabelami, skonfrontował swoje wyniki z wynikami uzyskanymi przez innych autorów i w jasny sposób wyeksponował oryginalne wyniki własne, co dowodzi dobrego opanowania tematyki badawczej i czytania, oraz umiejętności kierowania logicznym wywodem, w którym ważne miejsce pełni celne dobieranie argumentów z piśmiennictwa naukowego.

Na podstawie uzyskanych wyników Autor sformułował 6 wniosków końcowych podkreślających wagę prowadzenia badań monitoringowych dioksyn, dioksyno i nie dioksynopodobnych związków w mięśniach ryb będących istotnym produktem żywnościowym w diecie 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.

Na stronie 7 w ostatnich wierszach Doktorant zamieścił informację o głównych źródłach dioksyn w Polsce wskazując na procesy spalania przemysłowe i pozaprzemysłowe, które wynoszą 70 i 90 % odpowiednio dla PCDD/F i dla PCB podając odnośnik do ich graficznego przedstawienia rycinę 2, natomiast jak wskazuję podpis ryciny 2 na stronie 8 dotyczy ona transportu dioksyn w środowisku.

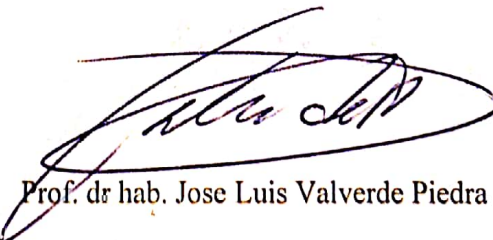
Na stronie 13 przy opisie stref połowowych Morza Bałtyckiego Doktorant nie zamieścił rozwinięcia skrótu ICES (International Council for the Exploration of the Sea). Również skrót ten nie został zamieszczony w wykazie stosowanych skrótów.

Wniosek końcowy

Po dokładnym zapoznaniu się z pracą doktorską mgr Szczepana Mikołajczyka uważam, że Doktorant 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 zależności między zanieczyszczeniem środowiska wodnego, zawartością tkanki tłuszczowej w rybach oraz zawartością dioksyn i PCB w mięśniach ryb. Uwagi krytyczne dotyczą jedynie usterek redakcyjnych i nie umniejszają wysokiej wartości naukowej dysertacji.

Mając powyższe na uwadze pragnę stwierdzić, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Szczepana Mikołajczyka pt.: „Dioksyny i związki pokrewne w rybach morskich i słodkowodnych”, 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 Szczepana Mikołajczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

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



Prof. dr hab. Jose Luis Valverde Piedra