

KATEDRA FARMAKOLOGII, TOKSYKOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA

WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

20-950 Lublin ul. Akademicka 12

tel. (81) 445-60-04, fax. (81) 445-60-88

Lublin, 2021-10-28

Prof. dr hab. Cezary Jacek Kowalski
Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Angeliki Tkaczyk-Wlizło pt.:

**„Barwniki farmakologicznie czynne jako zanieczyszczenie
środowiska wodnego”**

wykonanej

w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu
Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod
kierunkiem naukowym dr hab. Kamili Mirowskiej, prof. instytutu oraz
promotora pomocniczego dr Tomasza Błądka.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest zwieńczeniem projektu sfinansowanego w ramach Konsorcjum KNOW „Zdrowe zwierzę – bezpieczna Żywność” decyzja MNiSW nr 05 1/KNOWQ2/2015. Zanieczyszczenie środowiska naturalnego to jeden z istotnych problemów dzisiejszego świata. To zjawisko jest szczególnie niebezpieczne w kontekście barwników, które ze względu na aktywność

biologiczną mogą negatywnie oddziaływać na organizmy żywe występujące w środowisku naturalnym. Aby nadzorować powyższe zagrożenie, w wielu krajach podejmuje się szereg działań legislacyjnych, których celem jest kontrola leków jako źródła zanieczyszczenia środowiska, a opracowanie i wdrożenie metod ich skutecznego monitorowania w wodach i rybach konsumpcyjnych to wiodący temat wielu projektów naukowych realizowanych na całym świecie. Za niedopuszczeniem do legalnego stosowania barwników farmakologicznie czynnych u ryb konsumpcyjnych przemawia fakt, że zarówno substancje czynne jak i ich metabolity, wykazują potencjalne działanie kancerogenne, mutagenne i genotoksyczne. W oparciu o dane literaturowe Doktorantka wyselekcjonowała barwniki, które ze względu na właściwości farmakologiczne, mogą być stosowane nielegalnie w hodowlach ryb, lub ich obecność może zaburzać funkcjonowanie środowiska wodnego. Ograniczone informacje na temat zanieczyszczenia wybranymi barwnikami jezior i rzek w Polsce, skłoniły Doktorantkę do podjęcia próby oszacowania skali problemu występowania tych związków w środowisku wodnym. Dlatego, głównym celem dysertacji było określenie, czy w rybach wolno żyjących, osadach dennych i wodzie z wybranych polskich jezior i rzek, narażonych na różne formy oddziaływania człowieka, występują barwniki farmakologicznie czynne stosowane w różnych gałęziach przemysłu, oraz w medycynie ludzkiej jak i w praktyce weterynaryjnej.

W świetle powyższego, tematyka badań podjętych przez Doktorantkę jest aktualna i ma wysoce istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i aplikacyjne. Problematyka pracy jest również interesująca z analitycznego punktu widzenia, gdyż nie lada wyzwaniem było opracowanie i walidacja metody pozwalającej na równoczesne oznaczanie 22 barwników w mięśniach ryb i osadach dennych, oraz 20 barwników w wodzie. Wiarygodność analizy tego typu materiału biologicznego, zależy zarówno od doboru i optymalizacji warunków procesu wstępnego przygotowania próbek do analiz, jak i od właściwie wybranej i zastosowanej techniki pomiarowej. Problemy te są tym trudniejsze, im mniejsze jest stężenie oznaczanego analitu w próbce. Inną trudność analityczną stwarzają składniki matrycy badanej

próbki, które występując zwykle w nadmiarze w stosunku do analitu są potencjalnym źródłem efektów interferujących i w konsekwencji – błędów o charakterze systematycznym. Opanowanie tych wszystkich problemów wymaga od badacza dużej wiedzy chemicznej i znacznych umiejętności analitycznych. Ze względu na konieczność oznaczania wielu analitów jednocześnie oraz zapewnienia czułości i selektywności opracowywanej metody, Doktorantka wykorzystwała ultra wysokosprawną chromatografię cieczową z tandemową spektrometrią mas.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 173 strony maszynopisu, w którym zawarte jest 23 zestawienia tabelaryczne, 33 ryciny, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów wykorzystywanych w tekście dysertacji oraz ponad 200 pozycji piśmiennictwa. Zarówno zestawienia tabelaryczne jak i ryciny odpowiednio ponumerowane i opisane zostały umieszczone w kolejnych rozdziałach rozprawy, co istotnie ułatwia czytelnikowi zrozumienie trudnych i wielowątkowych zagadnień przedstawionych w powyższej dysertacji.

Wykorzystane przez Doktorantkę przy pisaniu dysertacji piśmiennictwo obejmuje w większości oryginalne prace doświadczalne opublikowane w fachowych czasopismach obcojęzycznych, co świadczy o znaczeniu i aktualności wykonywanych przez Doktorantkę badań metodycznych.

Układ przedstawionej pracy jest logiczny i przejrzysty z następującymi po sobie rozdziałami: Wykaz stosowanych skrótów, Wstęp, Cel pracy, Materiał i metodyka, Opracowanie procedur badawczych oznaczania barwników farmakologicznie czynnych w materiale biologicznym i środowiskowym, Wyniki opracowania metod oznaczania barwników, Badania występowania barwników w rybach wolno żyjących, osadach dennych i wodzie z wybranych jezior i rzek, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Piśmiennictwo.

Wstęp dysertacji został opracowany przez Doktorantkę w sposób poprawny, a jego treść świadczy o wiedzy Autorki i teoretycznym przygotowaniu do podjęcia powyższego tematu badawczego. Doktorantka wprowadza czytelnika w problematykę stosowania barwników farmakologicznie czynnych, ich toksycznego działania u ryb i ssaków, obszernie opisuje ich występowanie w środowisku wodnym

i produktach akwakultury oraz krótko przedstawia metody oznaczania barwników w materiale biologicznym i środowiskowym. W dalszej części następuje uzasadnienie celowości badań, po tym opis substancji wzorcowych, odczynników, materiałów oraz sprzętu i aparatury użytych w doświadczeniu. W tym rozdziale Doktorantka szczegółowo omawia także walidację wieloskładnikowej metody i charakteryzuje parametry, jakie będzie brała pod uwagę w trakcie walidacji. W rozdziale dotyczącym opracowania procedur badawczych oznaczania barwników farmakologicznie czynnych, Doktorantka przedstawia optymalizację warunków ich detekcji oraz rozdzielania za pomocą tandemowej spektrometrii mas i ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej, odpowiednio. Poszczególne etapy doświadczenia zostały opisane w sposób staranny i klarowny, pozwalający na dokładne śledzenie uzyskiwanych postępów. W kolejnym rozdziale następuje podsumowanie wcześniejszych działań mających na celu opracowanie warunków ekstrakcyjnych i chromatograficznych poprzez przedstawienie na rycinach 24 i 29 schematu metod oznaczania 22 barwników w mięśniach ryb, osadzie dennym i wodzie, odpowiednio. Doktorantka prezentuje także wyniki walidacji, które usystematyzowane są w odpowiednich tabelach, a rozdział barwników i ich detekcja przedstawione są na odpowiednich chromatogramach.

Tak dobre przygotowanie metodyczne doprowadziło do opracowania nowej metody oznaczania 22 barwników farmakologicznie czynnych należących do pięciu różnych klas chemicznych w mięśniach ryb w jednym postępowaniu analitycznym. Poza tym spełnienie wszystkich kryteriów walidacyjnych potwierdza, że wyniki analiz są powtarzalne i w pełni wiarygodne. Opracowana i zwalidowana metoda analityczna dała Doktorantce gwarancję uzyskania rzetelnych wyników badań.

Na szczególną uwagę zasługuje ilość danych doświadczalnych. Ich omówienie i polemika z wynikami badań innych naukowców następuje w rozdziale „Dyskusja”. Autorka w usystematyzowany sposób podsumowała kolejne kroki budowania metody analitycznej oraz zinterpretowała wyniki prac doświadczalnych odnosząc się do kolejnych etapów badań. W moim przekonaniu dyskusja otrzymanych wyników jest przekonywująca, a dobrze udokumentowane rezultaty badań pozwoliły Doktorantce

na postawienie 9 prawidłowo skonstruowanych wniosków, które stanowią odpowiedź na założone cele badawcze. Martwi jedynie fakt, że barwniki, które są zabronione do stosowania w środowisku wodnym są nadal wykrywane. Należałoby się tutaj odwołać do odpowiedzialności człowieka, który decyduje się, mimo zakazu, na ich wykorzystywanie.

Na uwagę zasługuje, że Doktorantka osiągnęła zasadniczy cel badawczy, a mianowicie opracowała czułą metodę oznaczania 22 barwników farmakologicznie czynnych w mięśniach ryb i osadach dennych za pomocą UHPLC-MS/MS. Należy dobitnie podkreślić, że jest to pierwsza metoda pozwalająca na jednoczesne oznaczenie tak wielu analitów na poziomie $LOQ=0,5\mu\text{g}/\text{kg}$.

Dodam jeszcze, że uzyskane wyniki badań przeprowadzonych na jednej grupie zwierząt mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych projektów naukowych.

Zauważone w trakcie czytania pracy niedociągnięcia i pojedyncze błędy literowe nie umniejszają jej wartości i całość rozprawy doktorskiej oceniam pozytywnie, zaś otrzymane wyniki badań mają dużą wartość poznawczą i praktyczną, wnoszą bowiem istotny wkład do badań z zakresu medycyny i praktyki lekarsko-weterynaryjnej.

W całości, praca mgr Angeliki Tkaczyk-Wlizło spełnia warunki stawiane współczesnym rozprawom doktorskim, zwłaszcza jej aspekt aplikacyjny. Autorka wykazała się zrozumieniem tematyki badań, opanowała szeroki wachlarz technik ekstrakcyjnych i pomiarowych. Kompetencje Autorki w świetle znaczących z punktu widzenia praktycznego oraz poznawczego wyników oceniam wysoce pozytywnie.

W wyniku analizy merytorycznej oraz formalnej rozprawy doktorskiej Pani mgr Angeliki Tkaczyk-Wlizło z pełnym przekonaniem stwierdzam, że odpowiada ona warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. Powyższe stwierdzenie upoważnia mnie do przedłożenia Wysokiej Radzie Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

wniosku o jej przyjęcie i dopuszczenie Pani mgr Angeliki Tkaczyk-Wlizło do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę niewątpliwie elementy nowości naukowej wyników badań przedstawionych w rozprawie, oraz potencjał innowacyjny uzyskanych rezultatów wyrażający się w ich znaczeniu dla diagnostyki medycznej i weterynaryjnej, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.



Prof. dr hab. Cezary Jacek Kowalski