



UNIwersytet Medyczny w Lublinie

Wydział Farmaceutyczny

Chodźki 1 (Collegium Universum)

20-093 Lublin

Tel. +48 81448 7002

Prof. dr hab. Jolanta Flieger

Zakład Chemii Analitycznej

ul. Chodźki 4a (Collegium Pharmaceuticum)

20-093 Lublin

Tel. +48 81535 7350

Lublin 15. 09. 2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Angeliki Tkaczyk-Wlizło pod tytułem "Barwniki farmakologicznie czynne jako zanieczyszczenia środowiska wodnego"

Praca doktorska pani mgr Angeliki Tkaczyk-Wlizło została wykonana pod kierunkiem dr hab. Kamili Mitrowskiej, prof. Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach, a promotorem pomocniczym był pan dr Tomasz Błądek. Badania finansowano w ramach Konsorcjum KNOW "Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność", decyzją Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05 - 1/KNOW2/2015.

Tematyka będąca przedmiotem dysertacji wpisuje się w aktualne trendy, dotyczące losów związków chemicznych w środowisku antropogenicznym. Chociaż opublikowano wiele raportów o obecności w środowisku, takich chemikaliów jak np. pestycydy, wciąż niewiele wiadomo na temat syntetycznych barwników organicznych jako mikrozanieczyszczeń. W związku z szerokim zastosowaniem barwników w wielu dziedzinach przemysłu, a także w medycynie i weterynarii, istnieje wysokie prawdopodobieństwo ich przenikania do środowiska wodnego i glebowego. Z uwagi na właściwości toksykologiczne i aktywność farmakologiczną mogą one stanowić zagrożenie dla zdrowia zwierząt i ludzi jako konsumentów wyższego rzędu. Nie ma zatem wątpliwości, że należy monitorować ich obecność w środowisku za pomocą wiarygodnych procedur przy użyciu najbardziej zaawansowanych technologii analitycznych. Należy podkreślić, że tematyka badawcza, dotycząca barwników farmakologicznie czynnych, jest od kilku lat z powodzeniem realizowana przez członków zespołu w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii, a szczególnie promotorkę pracy.

Praca doktorska mgr Angeliki Tkaczyk-Wlizło napisana jest w układzie klasycznym. Na 183 stronach Autorka zawarła wstęp, obejmujący przegląd literatury związanej z barwnikami farmakologicznie czynnymi, w tym zagadnienia związane z charakterystyką fizyko-chemiczną, działaniem terapeutycznym i zastosowaniem barwników w medycynie ludzkiej. Najbardziej obszerny fragment dotyczy aspektów toksykologicznych u różnych gatunków ryb i ssaków oraz regulacji prawnych odnoszących się do pozostałości barwników farmakologicznie czynnych w żywności pochodzenia zwierzęcego. Na szczególną uwagę zasługuje rozdział poświęcony występowaniu barwników farmakologicznie czynnych w produktach akwakultury i środowisku wodnym. Autorka zebrała wyniki badań kontrolnych pozostałości barwników w rybach występujących na obszarze UE (2012-2019 r.) oraz przedstawiła schematycznie drogi ich biotransformacji w środowisku. Za szczególnie cenne uważam tabele zbiorcze opracowane na podstawie

opublikowanych badań naukowych, przedstawiające wyniki analiz produktów akwakultury w kierunku obecności barwników farmakologicznie czynnych z informacjami o użytych metodach analitycznych, dokładnymi wartościami oznaczonych stężeń, limitów detekcji i oznaczalności. Te zbiorcze tabele i ryciny wymagały od Autorki prześledzenia literatury (ponad 200 pozycji aktualnej literatury) i selektywnego wyboru istotnych informacji. Należy podkreślić, że zaprezentowany wstęp nie jest tylko zbiorem danych, ale krytycznym przeglądem, w którym Autorka porównuje i ocenia zebrane informacje oraz przedstawia aktualne trendy w eksplorowanym obszarze badań wraz z finalną oceną ryzyka tych mikrozanieczyszczeń dla człowieka i środowiska.

Kolejnym rozdziałem jest cel pracy, który jednocześnie, stanowi uzasadnienie podjętego tematu i przewidywane korzyści wynikające z uzyskanych wyników. W tym miejscu Autorka przedstawiła również szczegółowy plan badań, który konsekwentnie realizowała przez całą pracę. Jest to ewidentny dowód na dojrzałość naukową Doktorantki i świadome podejście do wykonywanej pracy.

W swoich badaniach Doktorantka wykorzystała materiał biologiczny jakim były ryby wolno żyjące oraz materiał środowiskowy, który stanowiły osady dennego oraz woda. Badany materiał pozyskano z 36 różnych akwenów (wody płynące, wody stojące) zlokalizowanych na terenie 10 województw w obrębie których wyznaczono 75 punktów pobierania w latach 2017-2019. W sumie Autorka pozyskała z obszaru naszego kraju 165 próbek w których oznaczyła ilościowo 22 barwniki. To daje w sumie 10.890 analiz uwzględniając prawdopodobnie (tej informacji nie ma jednak w pracy) trzy powtórzenia każdego wyniku.

Badania własne stanowią 2/3 całej pracy, co uważam za odpowiednią proporcję w pracach doktorskich. Na końcu znajdują się dyskusja wyników i związane wnioski końcowe. Praca zawiera również techniczne dodatki, takie jak spis stosowanych skrótów, streszczenie po polsku i po angielsku, referencje literaturowe (227 pozycji).

Wykonanie oznaczeń ilościowych w matrycy biologicznej wymagało od Doktorantki zwalidowania procedur badawczych, które przeprowadzono zgodnie z obowiązującymi normami tj. PN-ISO 5725-2:2002 i PN-ISO 5725-2:2002. Walidacja objęła:

- ocenę stabilności w warunkach przechowywania analitów w roztworach wzorcowych oraz w matrycy biologicznej z użyciem różnych rozpuszczalników w różnych temperaturach i oświetleniu w określonych odstępach czasu.
- ocenę specyficzności procedur w obecności substancji potencjalnie interferujących (ciprofloksacynę, enrofloksacynę, metronidazol i sulfametoksazol)
- ocenę liniowości sygnału w oparciu o analizę regresji liniowej.

Analizy ilościowe Doktorantka wykonała metodą krzywej kalibracyjnej wzorca wewnętrznego dla próbek wzbogaconych na sześciu poziomach stężeń w trzech równoległych seriach z udziałem izotopowo znakowanych pochodnych. Podczas walidacji metody wyznaczyła takie parametry jak: zakres roboczy, odzysk, powtarzalność, odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną, granicę wykrywalności, granicę oznaczalności oraz niepewność pomiaru. Oceniała także efekt matrycowy. Uzyskane wyniki walidacyjne poddała analizie statystycznej w celu wyeliminowania wyników odbiegających testem Q-Dixon'a.

Doktorantka w kolejnych podrozdziałach szczegółowo opisała dalsze kroki optymalizacji obejmujące: warunki detekcji barwników za pomocą tandemowej spektrometrii mas (MS/MS), oraz warunki rozdzielania barwników za pomocą ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej (UHPLC) testując różne kolumny chromatograficzne z wypełnieniem fenylowo-heksylovym, oktadecylovym (C18) i

pentafluorofenylowym (F5), różne fazy ruchome i rodzaje elucji (izokratyczna, gradientowa), objętości dozowanej próbki oraz temperatury kolumny. To pozwoliło wyłonić świadomie optymalne warunki, które zapewniły, zgodnie z deklaracją Doktorantki, odpowiednie rozdzielenie, symetryczność pików i intensywność sygnału.

Szczególnie wymagającym etapem pracy był, w mojej ocenie, etap opracowania warunków izolacji barwników ze złożonych wieloskładnikowych matryc jak mięśnie ryb, osady dennie i wody naturalne. W tym miejscu, bardzo doceniam wysiłki Doktorantki zmierzające do zapewnienia warunków spełniających wymagania zielonej chemii, której celem jest m.in. ograniczanie zużycia rozpuszczalników organicznych. Dzięki zastosowaniu dwuetapowej ekstrakcji oraz ultradźwięków udało się jej znacznie ograniczyć zużycie acetonitrylu. Opracowywanie warunków oczyszczania ekstraktów, również świadczy o świadomych i wytrwałych poszukiwaniach badawczych. Doktorantce udało się znaleźć sposób na oczyszczenie ekstraktów i zapewnienie wysokiego odzysku nie dzięki komercyjnie dostępnym kolumnom SPE, ale zastosowaniu tlenku glinu i samodzielnie wykonanych kolumniek wypełnionych PSA. W celu przygotowania próbek do analizy chromatograficznej dobrała także odpowiedni filtr strzykawkowy, metodą prób i błędów, spośród kilku dostępnych produktów przeznaczonych do tego celu. Etapy przygotowania próbek do analizy Doktorantka przedstawiła na przejrzystych, komunikatywnych schematach, które są wynikiem jej żmudnych poszukiwań.

W dyskusji, otrzymane wyniki zawartości wybranego barwnika zieleni leukomalachitowej w mięśniach ryb, Doktorantka skorelowała z zawartością tłuszczu oraz zależnościami troficznymi pomiędzy odłowionymi gatunkami ryb. Podjęła się również przeanalizowania zależności między występowaniem barwników farmakologicznie czynnych w organizmach ryb wolno żyjących, osadach dennych oraz wodzie a działalnością człowieka. Wymagało to z pewnością dużej pracy, aby poznać dokładnie region, z którego zostały pobrane próbki i zidentyfikować ewentualne źródło zanieczyszczenia.

W ostatnim rozdziale Doktorantka dokonała oceny ryzyka dla zdrowia człowieka wynikającego ze spożycia ryb zawierających barwniki tj. zieleni malachitowej i zieleni leukomalachitowej oraz ryzyka dla środowiska wynikającego z obecności barwników farmakologicznie czynnych w osadach dennych i wodzie.

W dyskusji Autorka odniosła się do danych literaturowych, które poddała krytycznej ocenie. Ten zabieg umożliwił uwypuklenie nowatorskich aspektów własnych badań. Należy podkreślić, że opracowanie metod ilościowego oznaczania analitów w złożonych matrycach biologicznych to wieloetapowy i złożony proces analityczny wymagający doświadczenia, wprawy i niewątpliwie zdolności badacza. Nie ulega wątpliwości, że zastosowanie ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (UHPLC-MS/MS) było współcześnie najlepszym wyborem do tego celu, dzięki zapewnieniu odpowiedniej czułości i selektywności oznaczeń. Opracowane przez Doktorantkę warunki analizy umożliwiły, po raz pierwszy, oznaczenie 22 barwników należących do pięciu różnych klas chemicznych (akrydynowe, fenotiazynowe, fenoksazynowe, ksantenowe, trifenylometanowe barwniki), a uzyskane wartości granicy wykrywalności i granicy oznaczalności są nawet niższe niż w innych opublikowanych metodach, co jest niewątpliwym sukcesem tej pracy. Zastosowana metoda wzorca wewnętrznego do oznaczeń ilościowych, wykorzystująca deuterowane pochodne barwników, pozwoliła na ograniczenie błędów pomiarów analitycznych wynikających z efektów matrycowych.

Brak tego typu badań na terenie Polski przemawia jednoznacznie za nowatorskim charakterem pracy, która ma wyraźny aspekt poznawczy, dotyczący zanieczyszczenia środowiska wodnego Polski. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę są unikatowe,

gdyż wykonano je po raz pierwszy na taką skalę. I chociaż nie stwierdzono obecności większości barwników farmakologicznie czynnych powyżej LOQ, opracowane metody, które są rzetelnie zwalidowane, mogą posłużyć w przyszłości do kontroli próbek środowiskowych pod kątem zawartości szerokiej gamy barwników.

Z obowiązku recenzenta pozwolę sobie zwrócić uwagę na nieznaczne niedociągnięcia, które mogą być przydatne dla Autorki w przyszłości, jeśli zdecyduje się opublikować swoje wyniki. Sugeruję następujące poprawki:

- Ryc. 1 błąd we wzorze zieleni leukomalachitowej
- Str. 24 przesunięty podpis pod ryciną
- zamiast barwienia przyżyciowego użyto terminu „barwienia przeżyciowego”
- Ryc.12-19-brak słupków błędów
- wyjaśnienia użytych skrótów pod tabelami wydają się zbędne w związku z zamieszczoną tabelą skrótów
- opis materiałów powinien zawierać firmę, miasto, kraj zgodnie z wymogami czasopism międzynarodowych
- nie podano w jaki sposób pozyskano wodę do badań. Zwykle podaje się wartość przewodnictwa i stosowaną aparaturę
- opis akwenów z których pozyskano materiał biologiczny i środowiskowy powinien znaleźć się w części Materiały, a znalazł się w tab.18 na str. 143
- nie znalazłam w ilu powtórzeniach analizowano próbki. Brak SD przy wynikach w tabelach 19, 20, 21
- programy komputerowe stosowane w pracy powinny być wymienione w metodyce
- brak spisu tabel i rycin oraz dodatkowych informacji, jak np. spis publikacji własnych, udział w projektach badawczych
- w przypadku optymalizacji warunków analizy i detekcji zabrakło tabeli lub wykresu, które pozwoliłyby porównać wyniki uzyskane przez Doktorantkę w toku optymalizacji, odnośnie mierzonych parametrów (A_s , N , R_s , α)
- ryciny będące zbiorem chromatogramów powinny być opisane szczegółowo w podpisie
- zamiast przecinków w liczbach ułamkowych powinny być kropki
- ujednolicenia wymaga dokładność podawanych wartości w Tabelach (chodzi o ilość miejsc po przecinku)
- brak wyjaśnienia zjawiska bioakumulacji barwników w tłuszczu ryb. W charakterystyce barwników należało dodać parametr liofilowości np. $\log P$, aby wiarygodnie uzasadnić powinowactwo do tkanki tłuszczowej
- ocena stabilności barwników w postaci roztworów jak i w matrycy biologicznej powinna być opisana w rozdziałach początkowych. Należała także uwzględnić wpływ pH na stabilność w szerszym zakresie, a nie tylko dla pH 3.5 zwłaszcza, że część badań dotyczyła zakresu pH od 2 do 12
- można było przy okazji optymalizacji warunków chromatograficznych wykonać testy przeładowania objętościowego i stężeniowego

Pomimo tych drobnych uchybień, w większości edytorskich, rozprawa doktorska jest napisana bardzo starannie, poprawnym językiem, opracowana graficznie z dbałością o szczegóły. Lektura całości pozwala na stwierdzenie, że wszystkie cele zostały osiągnięte.

W pracy nie znalazłam elementów, które budziłyby jakiekolwiek merytoryczne wątpliwości, co bez wątpienia jest zasługą ogromnego analitycznego doświadczenia promotorki pracy. Propozycje zmian, które zebrałam powyżej nie są *conditio sine qua non*, a raczej propozycjami do rozważenia, do których Doktorantka będzie mogła się odnieść w czasie obrony.

Na koniec chciałabym podkreślić, że wspomniane przeze mnie nieścisłości nie wpływają na wartość naukową przedstawionej rozprawy. Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska pani mgr Angeliki Tkaczyk-Wlizio spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 4 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. Ustaw z 2017 r., poz.1789, ze zm.) i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę ogrom włożonej pracy analitycznej, opracowanie nowatorskich rozwiązań izolacji analitów z matryc biologicznych, wysiłek zgromadzenia materiału do badań z obszaru całej Polski i wysoki poziom dysertacji, wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny pracy.

Prof. dr hab. Jolanta Flieger

Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny
Katedra Chemii, Zakład Chemii Analitycznej

UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
Katedra Chemii
Zakład Chemii Analitycznej
20-093 Lublin, ul. dr W. Chodźki 4a
Tel. (81) 448-71-80, Fax (81) 448-71-81