

**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**

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

Lublin, 2023-08-10

### **RECENZJA**

Rozprawy doktorskiej mgr Aleksandry Grelik pt.:

**„Zastosowanie chromatografii gazowej do oznaczania triheptanianu  
glicerolu(GTH) w przetworzonych ubocznych produktach pochodzenia  
zwierzęcego i paszach”**

wykonanej w

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach  
pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Krzysztofa Kwiatka

oraz

Promotor pomocniczy – dr Ewelina Kowalczyk.

*Podstawą wykonania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu  
Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach podjętej  
w dniu 08.03.2019r. i pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej*

*Prof. dr hab. Dariusza Bednarka*



BSE (*Bovine Spongiform Encephalopathy*), czyli gąbczasta encefalopatia była to groźna, zakaźna choroba wywoływana przez priony. Potocznie jest nazywana chorobą szalonych krów lub chorobą wściekłych krów, choć ze wścieklizną nie ma nic wspólnego. Najbardziej prawdopodobną przyczyną są priony – białkowe cząsteczki zakaźne, które występują w wersji niegroźnej oraz chorobotwórczej. Z różnych przyczyn priony mogą zmienić swoją postać i wywołać groźne objawy chorobowe. W przebiegu choroby wściekłych krów w ośrodkowym układzie nerwowym odkłada się białko o nieprawidłowej konstrukcji. BSE jest więc chorobą neurozwyrodnieniową. Okres inkubacji choroby jest długi – trwa nawet kilka lat. Nasilające się objawy zawsze prowadzą do śmierci zwierzęcia.

Gąbczasta encefalopatia bydła (BSE) została po raz pierwszy zdiagnozowana w Zjednoczonym Królestwie w 1986 r., kiedy to duża liczba bydła i pojedynczych stad została dotknięta chorobą. Wiadomo, że BSE jest chorobą nabywaną w wyniku spożycia paszy (np. mączki mięsno-kostnej) pochodzącej od zwierząt chorych na TSE. W innych państwach przypadki BSE wystąpiły bądź to u zwierząt przywożonych ze Zjednoczonego Królestwa, bądź u zwierząt rodzimych. Istnieją przekonujące dowody na to, że wariant choroby CJD (vCJD) wywoływany jest przez czynnik odpowiedzialny za BSE u bydła. Obecnie nie są jeszcze dostępne szybkie testy diagnostyczne *in vivo* pozwalające ocenić zakaźność czynnika TSE. Diagnoza opiera się na poubojowym stwierdzeniu charakterystycznych uszkodzeń mózgu w badaniu histopatologicznym lub wykryciu PrPTSE metodą Western Blot lub metodą testu immunologicznego.

W celu potwierdzenia zakaźności przeprowadza się również inokulację podejrzanym o zakaźność materiałem tkankowym gatunków docelowych lub zwierząt laboratoryjnych. Jednakże ze względu na długie okresy inkubacji wszystkich TSE wyniki testów *in vivo* są dostępne dopiero po upływie miesięcy lub lat. Opracowano pewne testy immunochemiczne na wykrycie PrPTSE w badaniach próbek pobranych po uboju, i niektóre z nich uważane są za bardzo czułe. Ich zdolność do wykrycia zarażonego zwierzęcia zależy jednak od czasu pobrania próbki



w zależności do czasu, kiedy zwierzę było narażone na zakażenie, rodzaju pobranego materiału tkankowego i przyswojonej dawki zakażającej, wraz z późniejszym momentem klinicznego początku choroby. Nie istnieją obecnie wystarczające dane na temat tego, w jaki sposób mogłyby na to wpłynąć rodzaje szczepów.

Pomimo że badania przesiewowe zwierząt, od których pobrano materiał metodą testów *in vitro*, zapobiegają wykorzystywaniu zwierząt w późnym okresie wylegania choroby i mogą dostarczyć danych epidemiologicznych dotyczących danego państwa lub regionu, żaden z tych testów nie jest uznany za odpowiedni, aby jednoznacznie potwierdzić negatywny status zwierzęcia. Metody zwalczania choroby w państwach Unii Europejskiej oparto początkowo na zaleceniach OIE, a następnie na rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady Europy z 22 maja 2001 r. ustanawiające przepisy w zakresie zapobiegania, zwalczania oraz likwidacji pewnych zakaźnych encefalopatii gąbczastych, określając systemy i zakres monitorowania bydła, owiec i kóz, oraz dobrowolne monitorowanie innych gatunków zwierząt. Na podstawie opinii Naukowego Komitetu Sterującego (Scientific Steering Committee) Polska zaliczona została do poziomu III rejonu geograficznego, który definiowano jako mającego obecność zwierząt zakażonych prawdopodobnie. Na podstawie rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 3 lutego 2022 r. w sprawie wprowadzenia programu zwalczania gąbczastej encefalopatii bydła na lata 2022–2024 ogłoszono program walki z chorobą nazywaną potocznie „chorobą szalonych krów”. Program obowiązuje od dnia 1 stycznia 2022 r. do dnia 31 grudnia 2024 r. na terenie całego kraju, a jego finansowanie pochodzi ze środków budżetowych państwa. Zgodnie z ust. 2 załącznika do niniejszego rozporządzenia, podstawowym narzędziem do walki z rozprzestrzenianiem się choroby miała być skuteczna i efektywna kontrola prowadzona w postaci „aktywnego nadzoru, przez który rozumie się badanie bydła w wieku powyżej 48 miesięcy życia, zaliczanego do grup ryzyka. Obecnie do poszukiwania biomarkerów różnych jednostek chorobowych coraz częściej wykorzystuje się nowoczesne narzędzia analityczne, które umożliwiają ilościowe i jakościowe oznaczenie wybranych analitów.



Informacje uzyskane dzięki technikom analitycznym pozwalają niejednokrotnie na znacznie precyzyjniejszą diagnostykę chorych, a także umożliwiają skuteczniejsze prowadzenie badań profilaktycznych. To tu właśnie wykorzystywane są techniki chromatograficzne, które dążą do wyjaśnienia jednostkowych procesów biologicznochemicznych składających się na funkcjonowanie organizmu. Wieloletnie badania dowodzą, że zaburzenia tych procesów są związane, między innymi, ze zmianami stężeń różnych endogennych substancji, które mogą być wynikiem schorzeń spowodowanych ubocznym działaniem procesów chorobotwórczych. To właśnie identyfikacja i ilościowe określenie stężeń tych związków znalazły się w kręgu zainteresowań Pani mgr Aleksandry Grelik. Tematykę badawczą umiejscowiono ściśle w obrębie zagadnień, które od lat realizowane są przez Promotora i Jego Zespół. Oceniana rozprawa to kolejny, cenny etap w metodycznie prowadzonych badaniach, które pozwalają na wytypowanie potencjalnych biomarkerów. Chcąc uzyskać odpowiedź na niewyjaśnione do tej pory zagadnienia.

Wstęp został opracowany przez Doktorantkę w sposób poprawny, napisany jest interesująco i sam w sobie może stanowić kompendium dotyczącym obecnego stanu wiedzy.

Doktorantka wytyczyła sobie główny cel badań, którym było zastosowanie technik chromatograficznych do optymalizacji metody oznaczania triheptanianu glicerolu w przetworzonych ubocznych produktach pochodzenia zwierzęcego. Cele pracy zostały sformułowane jednoznacznie, jasno sprecyzowane i konsekwentnie realizowane w dalszej części pracy. Należy podkreślić, że mają istotne znaczenie praktyczne.

Rozprawa doktorska posiada zwykły układ, zgodny z wymaganiami stawianymi rozprawie doktorskiej. Obejmuje 114 stron maszynopisu, plus dołączone wzory procedur badawczych. W Dysertacji zawarte jest 27 Tabel, 13 Rycin, wykaz 2 załączników. Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz 57 pozycji piśmiennictwa. Wykaz skrótów Doktorantka umieściła na początku pracy, co zdecydowanie ułatwiło posiłkowanie się nim w trakcie czytania. Wykorzystane przez



Doktorantkę przy pisaniu dysertacji piśmiennictwo obejmuje zarówno prace oryginalne, przeglądowe jak i monografie lub podręczniki. Oryginalne prace doświadczalne, na które Doktorantka powołuje się w rozprawie opublikowane były w fachowych czasopismach polskich i obcojęzycznych, co świadczy o znaczeniu i aktualności wykonywanych przez Doktorantkę badań metodycznych.

Dokonując oceny części doświadczalnej, na początku należy odnieść się do sprecyzowanych w rozdziale drugim, celów pracy. Nadrzędnym celem rozprawy była optymalizacja metody oznaczania triheptanianu glicerolu w przetworzonych ubocznych produktach pochodzenia zwierzęcego z zastosowaniem technik chromatograficznych. Uważam, że cel pracy został sformułowany precyzyjnie, gdyż zastosowanie technik chromatograficznych z wykorzystaniem opisanych procedur dostępnych w literaturze (cytowana literatura) pozwala na pomyślne sfinalizowanie tak ujętego tematu.

Oceniając formę przedłożonego manuskryptu należy stwierdzić, że:

- Tytuł pracy jest klarowny i adekwatny do zawartej w niej treści.
- Układ pracy jest logiczny i spełnia wymagania stawiane dysertacjom doktorskim.
- Praca napisana jest językiem zrozumiałym i poprawnym stylistycznie.
- Opis realizacji pracy doktorskiej umożliwia sprawne śledzenie procesu prowadzenia badań oraz analizę przedstawionych wyników.
- Pozycje literatury (57) pod względem formalnym są cytowane w sposób właściwy, który umożliwia czytelnikowi ich odszukanie w zbiorach bibliotecznych i zbiorach aktów prawnych. Należy podkreślić również, że w dokonanym przeglądzie wskazano wszystkie przełomowe akty legislacyjne dotyczące analityki i procedur badawczych. Również opisywany postęp w nauce został przedstawiony ze wskazaniem referencji do znaczących i szeroko cytowanych prac naukowych.

Rozdział Wnioski podsumowano w sześciu punktach, które odpowiadają celom pracy i są oryginalnymi opracowaniami Autorki. W mojej ocenie wszystkie założone w pracy cele zostały osiągnięte. Materiały i metody są przedstawione wyczerpująco, klarownie i nie budzą moich wątpliwości



Po tym rozdziale Doktorantka umieściła rozdział Streszczenie, które okazało się cennym ułatwieniem i usystematyzowaniem znacznej ilości danych eksperymentalnych. Moim zdaniem powinno się znajdować na początku Dysertacji. Pozwoliłoby zapoznać się wcześniej ze skróconą formą pracy.

Moim zdaniem również Tabele, które rozdzielone są na kolejnych stronach powinny być drukowane w całości na jednej stronie. W sposób w jaki przedstawiła to Autorka stają się mniej czytelne.

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 analityki i bezpiecznej żywności.

## **Podsumowanie**

- Praca doktorska dotyczy zagadnień aktualnych i istotnych dla zapobiegania, zwalczania oraz likwidacji zakaźnych encefalopatii gąbczastych, a co za tym idzie ochronie zdrowia konsumentów.
- Doktorantka w sposób czytelny sformułowała problem badawczy
- Wybór materiałów i metod badań pod względem merytorycznym nie budzi zastrzeżeń. Analiza danych została przeprowadzona starannie, ich opis jest konsekwentny i spójny. Wyniki prac laboratoryjnych zostały zinterpretowane w oparciu o właściwe wnioskowanie statystyczne. Przeprowadzona dyskusja i sformułowane wnioski w pełni odpowiadają wynikom prac laboratoryjnych.
- W rezultacie należy stwierdzić, że przeprowadzone badania naukowe doprowadziły do osiągnięcia wyników, które odpowiedziały na określone w pracy doktorskiej cele.

Doktorantka wykazała się także bardzo dobrą znajomością badanej problematyki. Przeprowadziła badania analityczne i empiryczne, których wyniki pozwoliły wzbogacić istniejącą wiedzę w zakresie analityki i istotnych procedur badawczych. Rezultat ostateczny przedłożonej dysertacji stanowi oryginalne

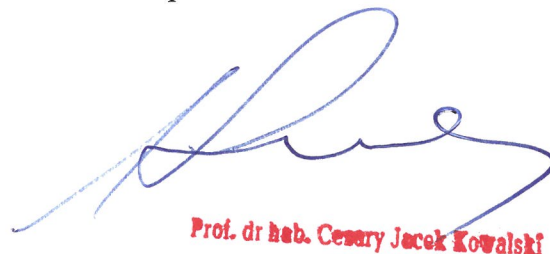


rozwiązanie zagadnienia naukowego. Reasumując stwierdzam jednoznacznie, że pomimo zgłoszonych zastrzeżeń rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Grelik spełnia ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Wobec tego wnoszę o przyjęcie recenzowanej dysertacji doktorskiej i dopuszczenie jej do publicznej obrony.

### **Wniosek końcowy**

Stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Aleksandry Grelik. pt.: „**Zastosowanie chromatografii gazowej do oznaczania triheptanianu glicerolu(GTH) w przetworzonych ubocznych produktach pochodzenia zwierzęcego i paszach**” całkowicie spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w świetle obowiązującej Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskim i habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora i kwalifikuję Kandydatkę do ubiegania się o stopień doktora. W związku z powyższym, zwracam się do Rady Naukowej Państwowego Instytut Weterynaryjny – Państwowego Instytut Badawczy w Puławach o dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Grelik do dalszych etapów procedury postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

UNIwersytet PRZYRODniczy w LUBLINIE  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Katedra Farmakologii, Toksykologii i Ochrony Środowiska  
20-033 Lublin, ul. Akademicka 12  
tel. +48/81 445-60-04, 81 445-65-68



Prof. dr hab. Czesław Jacek Kowalski