

---

dr hab. Joanna Pławińska-Czarnak

Szkoła Główna Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Katedra Higieny Żywności i Ochrony  
Zdrowia Publicznego

ul. Nowoursynowska 159,  
bud. 24, pok. 304,  
02-776 Warszawa

tel. +48 22 593 60 74  
joanna\_plawinska\_czarnak@sggw.edu.pl



Warszawa, dnia 22.06.2023 r.

## **Recenzja rozprawy doktorskiej**

mgr inż. Huberta Iwińskiego, pt.: „Analiza właściwości przeciwpasożytniczych i przeciwpierwotniakowych wybranych ekstraktów ziołowych”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Antoniego Szumnego z Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz opiekuna pomocniczego dr Henryka Różańskiego z ramienia AdiFeed Sp. z o. o. z siedzibą w Warszawie przy ul. Opaczewskiej 43.

### **1. Podstawa wykonania recenzji**

Podstawę formalną przygotowania niniejszej recenzji stanowi Uchwała nr 9.2023.TZZ podjęta przez Radę Dyscypliny Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu w dniu 18.04.2023 r. o powołaniu mojej osoby na recenzenta w przewodzie doktorskim mgr inż. Huberta Iwińskiego.

### **2. Ogólna charakterystyka ocenianej pracy**

Rozprawa doktorska mieści się na 165 stronach wraz ze streszczeniem w języku polskim i angielskim i obejmuje 8 rozdziałów (wstęp, cele i hipotezy, wyniki i dyskusja, wdrożenie, wnioski, oświadczenia, wykaz dorobku naukowego doktoranta oraz wykaz literatury). Praca składa się z cyklu 3 artykułów, opisu patentu i 3 opisów graficzno-marketingowych dodatków paszowych dla drobiu i trzody chlewnej. Zawiera 47 tabel (43 w załączonych artykułach i 4 w opisie patentowym), 8 rycin i 13 zdjęć. 15 oświadczeń dotyczących współautorstwa i wkładu w publikacje, które ukazały się w recenzowanych zagranicznych czasopismach.

### **3. Ocena merytoryczna pracy**

We wstępie doktorant przedstawił niezwykle ważny i bieżący problem antybiotykooporności u bakterii chorobotwórczych i pierwotniaków pasożytniczych zwierząt. Opisał najnowsze



wytyczne WHO, EFSA i FDA prowadzące do ograniczenia stosowania antybiotyków w hodowli zwierzęcej. Szczególną uwagę doktorant poświęca problemom antybiotykooporności występującej u *Salmonella* spp., *E. coli* i pierwotniaków prasożytniczych *Eimeria* spp. w hodowli drobiu. Alternatywę dla obecnie stosowanych chemioterapeutyków uparuje w odpowiednim zastosowaniu ekstraktów i olejków eterycznych pochodzenia roślinnego. Celem pracy badawczej w ramach realizacji doktoratu wdrożeniowego było opracowanie składu, formulacji i wdrożenie do produkcji preparatów o właściwościach przeciwpasożytniczych i przeciwpierwotniaczych opartych na wybranych olejkach eterycznych oraz ich mieszaniny z kwasami organicznymi i jonami metali – jako najbardziej optymalne we wdrożeniu. W rozdziale 3. Wyniki i dyskusja załączone zostały 3 artykuły oraz 6 patentów. Artykuły ukazały się w recenzowanych zagranicznych czasopismach znajdujących się w indeksie czasopism punktowanych przez MEN. W artykułach opisano po kolei podjęte działania badawcze tj. stworzenie nowych związków o działaniu przeciwpierwotniaczym. Badania *in vitro* na modelowych pierwotniakach żyjących w środowisku wodnym tj. *Amoeba proteus*, *Paramecium caudatum* i *Euglena gracilis* oraz *Gregarina blattarum* żyjące w przewodach pokarmowych lub jamach ciała bezkręgowców oraz *Pentatrichomonas hominis* pasożytujący w jelitach człowieka. Określone zostały podstawowe parametry LD50 i LD100 utworzonych mieszanin, w których skład wchodziły odpowiednio olejki eteryczne (eukaliptusowy, z drzewa herbacianego, cedrowy i lawendowy) połączone z kwasami (kw. octowym, kw. propionowym i kw. mlekowym) oraz z jonami metali (manganu, miedzi i cynku) i porównane do substancji pierwotniakobójczych tj. chloramfenikolu i metronidazolu jako kontroli.

W drugim artykule przedstawiono potencjał przeciwbakteryjny zupełnie innej formuły chemicznej o bardzo ciekawym składzie (anetol, linalol, 1,8-cyneol, thymol, p-cymene) w badaniu *in vitro* na bakteriach referencyjnych jak i na szczepach terenowych izolowanych z hodowli pierwotnej drobiu tj. wielolekoopornych *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* i *S. Kentucky*. W trzecim artykule przedstawiono badania formuły przeciwpierwotniaczej (opisanej w pierwszym artykule) i jej aspekt cytotoksyczności na wybrane linie komórkowe pochodzenia ludzkiego tj. linia fibroblastów izolowanych ze skóry człowieka oraz 4 linie nowotworowe min. raka piersi, raka płuca, gruczolakoraka okrężnicy (LoVo, HT-29).

W dalszej części rozdziału 3 przedstawiono 6 patentów: I. Kompozycja pierwotniakobójcza zawierająca olejek cedrowy, sposób jej wytwarzania oraz jej zastosowanie do zapobiegania i/lub leczenia chorób wywołanych przez pierwotniaki u ludzi. W dalszej kolejności patent II dotyczy olejku eukaliptusowego z w/w kwasami organicznymi i jonami metali, p.III - olejku herbacianego, p.IV - kompozycje olejków z grupy fenylopropanoidowych, p.V - kompozycję olejków ftalidowych i p.VI kompozycje olejków z grupy olejków izoprenoidowych. Patenty te w streszczeniu w j. polskim zostały określone jako zgłoszenia patentowe. Pierwszy został uznany za patent, kolejne 5 pozostaje w trybie zgłoszenia patentowego (zgodnie z informacjami znajdującymi się na stronie Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej).

W rozdziale 4 wdrożenie; został przedstawiony opis ogólnej technologii wytwarzania nowych formuł chemicznych jak i pilotażowa linia produkcyjna oraz 3 produkty stworzone na bazie kompozycji chemicznej opisanej w drugim artykule, które są dedykowane jako dodatki do wody lub paszy dla drobiu i trzody chlewnej.

W rozdziale 5 przedstawiono 6 wniosków, z których dwa pierwsze po odpowiedniej modyfikacji mogą być prawdziwe.



W rozdziale 6 zamieszczono oświadczenia wszystkich współautorów opublikowanych prac naukowych. Należy zaznaczyć, że mgr inż. Hubert Iwiński jest autorem pierwszym i korespondencyjnym we wszystkich wymienionych pracach – co wskazuje na jego zasadniczy wkład w układ i koncepcję prowadzonych badań, opracowaniu metodyki w tym przygotowanie mieszanin chemicznych, analizę wyników i ich opis.

W rozdziale 7 został przedstawiony dorobek publikacyjny doktoranta i jego aktywny udział w konferencjach. W rozdziale 8 znajduje się 21 pozycji piśmiennictwa, wszystkie anglojęzyczne.

#### 4. Uwagi dyskusyjne i wymagające wyjaśnienia.

Przedstawiona do recenzji dysertacja jako doktorat wdrożeniowy jest zaprezentowana z małą dbałością o jasność przedstawienia wyników oraz nie zawiera dyskusji, która w obliczu mnogości badań przeprowadzonych przez doktoranta bardzo pomogłaby w ustaleniu właściwych wniosków i wartości doktoratu wdrożeniowego.

Mimo klasycznego układu rozdziałów w dysertacji pana mgr inż. Huberta Iwińskiego, praca w swojej treści wydaje się być niekompletna i niespójna. Tytuł pracy odnosi się do działań przeciwpasożytniczych i przeciwpierwotniakowych wybranych ekstraktów roślinnych. Natomiast załączony cykl artykułów dotyczy badań działania przeciwpierwotniakowego i określenia cytotoksyczności nowo wytworzonych związków chemicznych z udziałem olejków eterycznych (eukaliptusowego, z drzewa herbacianego, cedrowego i lawendowego) połączonych z kwasami (kw. octowym, kw. propionowym i kw. mlekowym) oraz jonami metali (manganu, miedzi i cynku) - artykuł 1 i 3. Oraz działania przeciwbakteryjnego zupełnie innej formuły w której skład wchodziły związki z olejków eterycznych innych roślin tj. anetol który pochodzi z olejków anyżowego i koprowego, linalool (nienasycony alkohol alifatyczny z grupy terpenów imitujący zapach konwalii), 1,8-cyneol (z olejków eterycznych liści eukaliptusa gałkowego), thymol (składnik olejków eterycznych głównie tymianku, oregano i cząbrku), *p*-cymene (składnik olejków eterycznych kminku i tymianku) oraz mentol opisano w artykule 2. Dlatego sugerowałabym zmianę tytułu doktoratu lub jego odpowiednie rozszerzenie. Rozprawa doktorska powinna prezentować ogólną wiedzę teoretyczną doktoranta. W załączonych multidyscyplinarnych artykułach, w których pan mgr inż. Hubert Iwiński jest pierwszym i korespondencyjnym autorem o ustalonym udziale na podstawie załączonych oświadczeń, wiedzy nie brakuje. Jednak nie można powiedzieć, że cykl 3 artykułów jest ze sobą powiązany. Znajduję ciągłość myśli i procedur badawczych w artykule 1 i 3.

Do tego cyklu artykułów mam pytania:

1. Dlaczego do porównania potencjału przeciwpierwotniakowego nowych formuł (olejków eterycznych, kwasów organicznych i związków metali) wybrano chloramfenikol i metronidazol skoro nie zbadano działania tych leków dla wszystkich modelowych pierwotniaków?
2. Dlaczego bazową linią komórkową były fibroblasty ludzkie a nie linia komórek jelita grubego? *Pentatrichomonas hominis* pasożytuje w jelicie grubym człowieka. W jakim celu badania prowadzono na nowotworowych liniach komórkowych?
3. Dlaczego w badaniu o działaniu przeciwbakteryjnym fitobiotycznej mieszanki nie użyto tej samej formuły (olejków eterycznych, kwasów organicznych i związków metali) co przy badaniu jej przeciwpierwotniaczej aktywności?



W dysertacji w rozdziale 3 przedstawiono 5 tytułów patentów, które *de facto* są tytułami **zgłoszeń patentowych** a nie patentami. Uważam to, za bardzo duży błąd gdyż te informacje należało jasno przedstawić w pracy doktorskiej.

W Patencie 1. Opisano kompozycję pierwotniakobójczą na bazie olejku cedrowego, kwasów organicznych i jonów metalu jako środek do zapobiegania i/lub leczenia chorób wywołanych przez pierwotniaki u ludzi. Wskazując na korzyści wynalazku cytuję: „właściwości pierwotniakobójcze kompozycji zapewniają całkowitą eliminację infekcji”.

Badania były prowadzone *in vitro*, nie opisano mechanizmu działania kompozycji w organizmie żywym, z uwzględnieniem cyklu rozwojowego pasożytniczego pierwotniaka u ludzi ani nie przedstawiono modelowego założenia.

Natomiast opracowanie technologii wytwarzania badanych kompozycji i stworzenie linii pilotażowej ma jak najbardziej charakter wdrożeniowy.

Załączone opisy preparatów dodatków paszowych dla zwierząt mają w swoim składzie komponenty opisane w artykule 2 czyli mieszaninę wielu olejków eterycznych eukaliptusowego, anyżowego i składowe olejków tymianku, oregano czy kminku z kwasami organicznymi i jonami metali. Opisy są bardziej ulotkami marketingowymi produktu o przemyślanej kolorystyce i ciekawej grafice niż opisem naukowym. Doktorant załączając te opisy nie wyjaśnił w jakim celu i jakie ma to powiązanie z działaniem „przeciw” chorobotwórczym pierwotniakom. W każdym opisie podkreślany jest wpływ poszczególnych składników kompozycji na grasicę, układ siateczkowo-śródbłonkowy, perystaltykę przewodu pokarmowego czy zapobieganie wzdęciom u trzody chlewnej i drobiu.

Wnioski wynikające z pracy doktorskiej są napisane nieprawidłowo i raczej mają charakter życzeniowy, a nie naukowy wynikający z przeprowadzonych badań.

1. Najbardziej efektywne okazały się połączenia olejków eterycznych goździkowego, cynamonowego oraz cedrowego w szczególności z mieszaniną kwasów (octowy, propionowy, mlekowy) i jonami manganu;

Doktorant w dysertacji opisał badania mieszanin z olejkami: eukaliptusowym, cedrowym, lawendowym i z drzewa herbacianego. Wniosek należy doprecyzować

2. Badane połączenia fitoncydów z kwasami organicznymi i jonami metali, charakteryzują się dobrymi właściwościami przeciwpierwotniaczymi wobec *Amoeba proteus*, *Paramecium caudatum*, *Gregarina blattarum*, *Euglena gracilis*, *Trichomonas hominis*, jak również przeciwbakteryjnymi wobec lekoopornych szczepów *Salmonella* spp. oraz ptasich szczepów *Escherichia coli* (Avian Pathogenic *Escherichia coli* - APEC) i innych szczepów *Escherichia coli*. Większość analizowanych połączeń charakteryzuje się znacznie silniejszym działaniem bójczym aniżeli stosowane antybiotyki;

W dysertacji nie opisano badań dotyczących oddziaływania wspomnianej formuły na ptasie szczepy *Escherichia coli* (Avian Pathogenic *Escherichia coli* - APEC) i inne szczepy *Escherichia coli*. Wniosek należy doprecyzować.

3. Analizowane mieszaniny wykazują dużą efektywność w kontekście ich potencjalnego działania przeciwnowotworowego, przy jednocześnie niskiej cytotoksyczności wobec zdrowych komórek;

Jest to zbyt daleko idący wniosek, badania na liniach komórkowych nie przekładają się bezpośrednio na żywy organizm. Badano linie nowotworów złośliwych, które charakteryzują się wzrostem naciekającym zdrową tkankę. Najpierw należałoby przeprowadzić badania na modelu organizmu żywego, określić stężenie w surowicy krwi i hemodynamikę związku.

Wnioski 4. 5. i 6 nie znajdują potwierdzenia w badaniach przedstawionych w dysertacji.

Biorąc pod uwagę cykl 2 artykułów oraz wdrożenie pilotażowej linii do produkcji opisanych w nich formuł (artykuły 1 i 3) w firmie AdiFeed Sp. z o.o. stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. **Huberta Iwińskiego** spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020, poz. 85 ze zm.) i wnioskuję do Rady Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie Huberta Iwińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Joanna Kanińska - Kanińska