

Wrocław, 30.06.2022

dr hab. Błażej Poźniak, prof. uczelni
Katedra Farmakologii i Toksykologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr inż. Agnieszki Tkaczyk
pt. „Oznaczanie biomarkerów mikotoksyn u trzody chlewnej jako nowoczesne narzędzie
do oceny narażenia świń na mikotoksyny”

Wykonanej w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego
– Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach
pod kierunkiem prof. dr. hab. Piotra Jedziniaka (promotora)
i dr. Arkadiusza Dorsa (promotora pomocniczego)

Problematyka mikotoksyn, czyli wtórnych metabolitów grzybów niższych pojawiających się jako zanieczyszczenia produktów roślinnych oraz niekiedy również produktów pochodzenia zwierzęcego, od lat stanowi ważne zagadnienie nie tylko dla toksykologii weterynaryjnej, ale również dla szeregu dziedzin pokrewnych. Według niektórych autorów dotychczas zidentyfikowano ponad 500 mikotoksyn o zróżnicowanej budowie chemicznej i działaniu na organizmy żywe. Choć uznaje się, że największe zagrożenie stanowi relatywnie niewielka grupa tych związków, to ogromna złożoność czynników, które wpływają na finalne ryzyko dla człowieka i zwierząt czyni mikotoksyny dużym wyzwaniem dla badaczy i systemów kontroli bezpieczeństwa pasz i żywności. Substancje te mogą pojawiać się w żywności na bardzo różnym etapie: od momentu wzrostu i dojrzewania roślin, przez ich zbiór i magazynowanie, po gotowe produkty spożywcze. Mogą też wraz z zanieczyszczoną paszą dostawać się do organizmów zwierząt gospodarskich, a następnie gromadzić się w pozyskiwanej od nich żywności przeznaczonej dla ludzi. Obecnie bardzo rzadko obserwuje się masowe ostre zatrucia mikotoksynami u ludzi i są one ograniczone zwykle do krajów tropikalnych i rozwijających się. U zwierząt pojawiają się one częściej, ale i tak największy problem stanowią zatrucia przewlekłe i powtarzalna ekspozycja na stosunkowo niewielkie dawki. Takie sytuacje prowadzą do rozwoju mało specyficznych objawów, często ograniczających się do spadku produktywności, immunosupresji i pojawiania się innych, wtórnych problemów, co skutkuje znacznymi stratami ekonomicznymi i pogorszeniem dobrostanu zwierząt. Niestety często zidentyfikowanie mikotoksyn jako przyczyny choroby zwierzęcia stanowi duże wyzwanie dla lekarza klinicysty. Dlatego diagnostyka mikotoksykozy u zwierząt, a także ich prewencja polega obecnie głównie na badaniach paszy pod kątem

obecności toksyn grzybiczych. Od lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku, kiedy to po raz pierwszy zidentyfikowano aflatoksynę jako przyczynę masowego zatrucia u drobiu, dokonał się olbrzymi skok w analityce mikotoksyn. Dysponujemy coraz lepszymi, coraz czulszymi, coraz tańszymi metodami, które pozwalają wykryć coraz więcej związków w czasie pojedynczej analizy. Systemy kontroli bezpieczeństwa żywności, przynajmniej w Unii Europejskiej, działają coraz sprawniej. Czy oznacza to, że problem mikotoksyn jest bliski rozwiązania? Niekoniecznie. W ostatnich latach pojawia się coraz więcej badań wskazujących na problem mikotoksyn modyfikowanych (też „zamaskowanych”, ang. *masked mycotoxins*), czyli toksyn grzybiczych, które uległy chemicznej przemianie pod wpływem np. mechanizmów obronnych zaatakowanej rośliny lub procesów metabolicznych wyekspozowanego zwierzęcia. Często związki te pozostają niewykryte w standardowych procedurach analitycznych, natomiast w organizmie zwierzęcia, czy człowieka mogą być rozkładane z uwolnieniem pierwotnej formy toksyny, mogą również wykazywać nowe swoiste działanie toksyczne. Innym ważnym problemem jest jednoczesne oddziaływanie na organizm wielu mikotoksyn w różnych, często niskich dawkach. Większość dostępnej wiedzy na temat mechanizmów toksycznego działania toksyn grzybiczych została uzyskana w wyniku prowadzenia kontrolowanych badań na zwierzętach, którym podawano konkretne oczyszczone związki. Jednak badania pasz pobranych z ferm często wskazują na obecność kilku toksyn jednocześnie. Istnieją poważne przesłanki wskazujące, że takie przypadki ekspozycji mogą nasilać szkodliwe działanie mikotoksyn, jednak nasza wiedza na ten temat jest ciągle niewystarczająca.

W tym kontekście, podjęte przez Doktorantkę badania nad opracowaniem nowej wieloskładnikowej metody analitycznej służącej ocenie aż 37 mikotoksyn w moczu i surowicy świń, a następnie zastosowanie jej do badań przeprowadzonych na zwierzętach w warunkach kontrolowanej ekspozycji na 4 mikotoksyny, oceniam jako wartościowy wkład w naukę zarówno w aspekcie czysto poznawczym, jak i ze względu na wymierne korzyści praktyczne. W mojej ocenie Doktorantka bardzo dobrze wywiązała się ze swojego zadania, a przedstawione w dysertacji wyniki są interesujące i wskazują na Jej dużą biegłość w temacie analityki mikotoksyn.

Przedstawiona do oceny rozprawa stanowi spójny zbiór trzech powiązanych ze sobą publikacji. Dwie z nich to prace doświadczalne:

Tkaczyk A., Jedziniak P.: Development of a multi-mycotoxin LC-MS/MS method for the determination of biomarkers in pig urine. *Mycotoxin Research* 2021, 37, 169-181.

oraz

Tkaczyk A., Jedziniak P., Zielonka Ł., Dąbrowski M., Ochodzki P., Rudawska A.: Biomarkers of deoxynivalenol, citrinin, ochratoxin A and zearalenone in pigs after exposure to naturally contaminated feed close to guidance values. *Toxins* 2021, 13(11), 750.

Natomiast trzecia praca:

Tkaczyk A., Jedziniak P.: Mycotoxin biomarkers in pigs – current state of knowledge and analytics. *Toxins* 2021, 13(8), 586.

to artykuł przeglądowy. Wymienione prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z bazy JCR, a łączny współczynnik oddziaływania IF tych prac wynosi 12,26. Łączna liczba cytowań wg bazy Google Scholar w momencie przygotowywania niniejszej recenzji to 13 (w tym 3 autocytowania). We wszystkich artykułach Doktorantka jest pierwszą autorką. Praca przeglądowa i jedna z prac eksperymentalnych została opublikowana wspólnie z promotorem, natomiast drugą pracę doświadczalną, opisującą doświadczenia na zwierzętach, opublikowano w zespole sześciuosobowym.

Oprócz trzech wspomnianych publikacji, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera podsumowanie osiągnięcia w formie zbliżonej do autoreferatu. Po przejrzystym wykazie skrótów, Doktorantka przechodzi do szerokiego i logicznie ustrukturyzowanego wstępu do swoich badań. Ta część rozprawy jest w pewnym sensie podsumowaniem opublikowanej pracy przeglądowej. Omawia w niej wpływ mikotoksyn na zdrowie i produktywność świń, a także analizuje źródła i drogi ekspozycji zwierząt na te związki. Zwraca uwagę na istotną rolę w tym zakresie dwóch mikotoksyn: deoksyniwalenolu i zearalenonu. W naszym klimacie są to dwie najczęściej pojawiające się toksyny w paszach, co więcej, świny wydają się być na nie szczególnie wrażliwe, co Autorka tłumaczy w kontekście specyfiki ich procesów metabolicznych. Zwraca jednak też uwagę na inne mikotoksyny, na temat których jest znacznie mniej dostępnych badań: ochratoksynę A i cytrulinę. Następnie Doktorantka szczegółowo omawia dostępne dane literaturowe na temat biomarkerów ekspozycji na mikotoksyny. Rozróżnia ocenę ekspozycji polegającą na badaniu paszy od oceny faktycznego narażenia *in vivo*, a zatem ilościowej oceny mikotoksyn i ich metabolitów w płynach ustrojowych i wydalinach zwierzęcia. Autorka poświęca wiele uwagi przeglądowi metod analitycznych stosowanych w pomiarze wspomnianych biomarkerów. Zwraca uwagę szczególnie na dwa ważne z punktu widzenia swoich zainteresowań aspekty, a mianowicie normalizację stężeń biomarkerów w oparciu o stężenia kreatyniny w moczu, a także na zastosowanie etapu enzymatycznej hydrolizy koniugatów z kwasem glukuronowym. Ten drugi etap ma pomóc w identyfikacji frakcji mikotoksyny, która umyka standardowym metodom analitycznym – przykład wspomnianych mikotoksyn zmodyfikowanych. Następnie Doktorantka formułuje cele podjętej przez siebie pracy, a są nimi: 1. opracowanie wieloskładnikowej metody oznaczania mikotoksyn w moczu i surowicy świń, 2. weryfikacja biomarkerów narażenia dla deoksyniwalenolu, zearalenonu, ochratoksyny A i cytruliny w moczu i surowicy świń, 3. wyznaczenie korelacji pomiędzy poziomem mikotoksyn w paszy, a stężeniem ich biomarkerów w matrycach biologicznych, i powiązany z nim cel 4. wskazanie odpowiednich matryc dla prowadzenia monitoringu biomarkerów narażenia dla wybranych mikotoksyn. Na koniec Doktorantka formułuje cel 5. ustalenie kinetyki biomarkerów wspomnianych mikotoksyn w płynach ustrojowych świń po podaniu paszy skażonej nimi doświadczalnie. Nakreślony następnie zakres prac ułatwia czytelnikowi zrozumienie planu realizacji wyżej wspomnianych celów.

Kolejny rozdział, „Metodyka badań”, rozpoczyna się od opisu realizacji pierwszego z celów, czyli opracowania wieloskładnikowej metody oznaczania mikotoksyn w moczu i surowicy świń. Doktorantka w przejrzysty sposób streszcza proces doboru analitów, a

następnie optymalizację ekstrakcji, rozdziału chromatograficznego oraz detekcji przy użyciu spektrometrii mas. Szczegółowo opisana została procedura walidacji metody. Następnie opisano doświadczenia przeprowadzone na zwierzętach, którym podawano paszę naturalnie zanieczyszczoną czterema mikotoksynami. Opis dopełnia przejrzysta grafika ilustrująca układ doświadczalny. Nieco zaskoczył mnie brak informacji w tym miejscu na temat konkretnych dawek mikotoksyn. W moim przekonaniu jest to ważny element opisu układu doświadczalnego. Informacja ta znalazła się w kolejnym rozdziale – Wyniki badań i dyskusja.

Rozdział ten rozpoczyna streszczenie wyników pierwszej pracy eksperymentalnej dotyczącej opracowania metody analitycznej dla 37 biomarkerów, w tym toksyn, które do tej pory u świń nie były badane. Doktorantka szczegółowo opisuje proces dochodzenia do optymalnych parametrów metody, a sposób w jaki to robi wskazuje na dużą biegłość analityczną. Skrupulatnie opisano wyniki walidacji i opracowanie problemu efektu matrycowego. Jednak w mojej ocenie najistotniejszym elementem tego osiągnięcia było opracowanie dwóch dodatkowych etapów analityki mikotoksyn w moczu: przeliczenia stężeń toksyn w odniesieniu do stężenia kreatyniny, oraz enzymatycznej hydrolizy koniugatów z kwasem glukuronowym. Należy podkreślić, że w literaturze etapy te najczęściej są pomijane. Zwrócenie przez autorkę uwagi na te aspekty analizy sprawia, że uzyskane wyniki mają zdecydowanie większy sens fizjologiczny i dają lepszy wgląd w procesy zachodzące w organizmie zwierzęcia. Uważam, że stanowi to ważne osiągnięcie Doktorantki i zdecydowanie przyczynia się do lepszego zrozumienia roli biomarkerów ekspozycji na mikotoksyny u świń.

Następnie Autorka opisuje wyniki uzyskane w badaniach na zwierzętach. Uzasadnienie wyboru czterech mikotoksyn użytych w badaniu jest bardzo rzeczowe. Szczególnie nowatorskie wydaje się uwzględnienie ochratoksyny A i cytruliny, mikotoksyn, o których kinetyce i działaniu toksycznym u świń wiemy zdecydowanie mniej, niż o pozostałych dwóch wybranych toksynach – deoksyniwalenolu i zearalenonie. Doktorantka podkreśla fakt naturalnej kontaminacji surowców roślinnych użytych do produkcji paszy doświadczalnej i wskazuje na wyższość takiego podejścia nad częściej pojawiającym się w publikacjach podawaniem pasz wzbogaconych w sposób sztuczny standardem toksyny lub hodowlą grzyba. Chociaż zgadzam się w tej kwestii z Autorką, to w mojej ocenie w samej dysertacji zabrakło głębszego przedyskutowania tego tematu w kontekście wpływu formy podawania mikotoksyn na ich biodostępność i, co za tym idzie, ekspozycję wewnętrzną u karmionych zwierząt. Co więcej, nie trafiłem na informację, czy pasza była badana pod kątem mikotoksyn modyfikowanych, które mogą pojawić się w materiale roślinnym. Jeżeli nie, to istnieje ryzyko, że po hydrolizie w przewodzie pokarmowym i wchłonięciu do krwi mogły zafałszować w jakimś stopniu ocenę ekspozycji wewnętrznej i tym samym relację stężeń oznaczonych w paszy do stężeń we krwi. Bardzo proszę Doktorantkę o odniesienie się do tej kwestii.

W kolejnej części rozdziału Autorka opisuje wyniki doświadczeń na świnia. Zastosowanie klatek metabolicznych pozwoliło na pozyskanie moczu dobowego, co stanowi dużo bardziej wartościowy materiał niż pojedyncza próbka moczu. Tu chciałbym zapytać autorkę o ryzyko zanieczyszczenia zbieranego moczu paszą, którą zwierzę pobiera, lub kałem

z niewchłoniętymi toksynami. Czy istniało takie ryzyko w zastosowanym układzie doświadczalnym?

Autorka rzetelnie analizuje biomarkery ekspozycji na mikotoksyny zidentyfikowane w moczu i surowicy badanych zwierząt. Biorąc pod uwagę, że część z nich została po raz pierwszy oznaczona w materiale biologicznym pobranym od świń (np. OT α , czy biomarkery cytruliny w moczu), należy uznać ten etap badań za szczególnie wartościowy. Następnie Doktorantka przechodzi do rozważań mających związek z aspektami toksykokinetyki mikotoksyn. Wyciąga uprawnione wnioski co do doboru czasu, w którym można oczekiwać wysokiego stężenia danej mikotoksyny, a zatem należy dokonać pomiaru. Natomiast sam rozdział poświęcony kinetyce mikotoksyn w przeprowadzonym badaniu wskazuje na pewne nieporozumienie konceptualne, bowiem Doktorantka zdaje się mylić pomiar stężeń toksyn z analizą toksykokinetyczną. Sam pomiar stężeń jest informacją statyczną, podczas gdy toksykokinetyka oznacza opis procesu w czasie pozwalający na pewne uogólnienia za pośrednictwem parametrów toksykokinetycznych. Oczywiście nie oczekuję od Doktorantki posługiwania się wyrafinowanymi narzędziami obliczeniowymi. I bez tego Jej dzieło jest imponujące i niezwykle wartościowe. Natomiast ważne jest by być świadomym ograniczeń przyjętego sposobu analizy danych. Dlatego, w mojej ocenie, posługiwanie się podanym przez Autorkę „czasem zanikania” danej mikotoksyny jako uniwersalną informacją jest błędne, ponieważ czas ten będzie zależny od dawki. Dużo lepszym wyborem byłoby, szczególnie w przypadku ochratoksyny, wyliczenie najprostszego parametru – okresu półtrwania fazy eliminacji, co można zrobić w zwykłym arkuszu kalkulacyjnym. Z załączonych rycin wynika, że najprawdopodobniej mamy do czynienia z procesem kinetycznym pierwszego rzędu (przynajmniej we krwi). Wprowadzenie tych bardzo podstawowych obliczeń pozwoliłoby zwiększyć wartość predykcyjną wyników, np. odpowiedzieć na pytanie, czy mamy do czynienia z procesem kumulacji po zastosowaniu dawki wyższej? Po jakim czasie faktycznie poziom toksyny spada do wartości bliskich limitowi oznaczalności w moczu i w surowicy? Czy faktycznie stan ustalony stężenia ochratoksyny pojawia się po 4 dniach dla obu dawek? Chciałbym jednak podkreślić, że brak analizy toksykokinetycznej nie zmniejsza wartości badań Doktorantki. Moim celem jest jedynie wskazanie pewnego niewykorzystanego potencjału pracy, który mógłby zwiększyć wartość niektórych wniosków.

Po omówieniu wyników i dyskusji Doktorantka przedstawia pięć wniosków. Identyfikuje najważniejsze biomarkery ekspozycji na badane mikotoksyny oraz optymalne dla nich matryce. W większości wnioski są logiczne i uzasadnione, ale w przypadku dwóch ostatnich nasunęły mi się pewne uwagi. Wniosek czwarty brzmi „Stężenia mikotoksyn oznaczonych w moczu i surowicy były bardzo dobrze skorelowane (...) z ich poziomami w paszy”. A zatem czy nie lepiej jednak uznać, że to oznaczenia w paszy wydają się nadrzędną formą oceny ekspozycji zwierząt na mikotoksyny? Paszę zdecydowanie łatwiej pobrać. Chciałbym poprosić Doktorantkę o podanie przykładów sytuacji, kiedy to pobranie materiału biologicznego od zwierzęcia będzie najbardziej uzasadnione (nie licząc badań naukowych). Kolejny wniosek, który zwrócił moją uwagę to: „W przypadku analizy biomarkerów DON, ZEN i CIT możliwe jest pobieranie próbek raz na dwa tygodnie.” Na jakiej podstawie ustalono

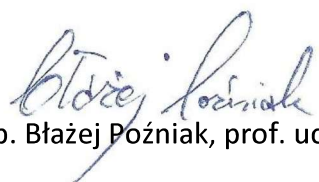
akurat dwa tygodnie? Czy to jest jakaś ogólna rekomendacja, czy ma zastosowanie tylko do przeprowadzonego doświadczenia?

Po wnioskach zamieszczone jest streszczenie w języku polskim i angielskim, a także spis piśmiennictwa zawierający 67 pozycji. Są to prawie wyłącznie prace opublikowane po 2000 roku, a znakomita ich część to prace z ostatnich kilku lat, co wskazuje na bardzo dobre orientowanie się Doktorantki w najnowszej literaturze naukowej poświęconej mikotoksynom.

Z obowiązku recenzenta zmuszony jestem zwrócić uwagę na pewne błędy językowe. Niekiedy można odnieść wrażenie, że pewne pojęcia, czy zwroty z zakresu opisu procesów patologicznych towarzyszących zatruciom stanowią dla Doktorantki pewną trudność. Dla przykładu stwierdzenie „rozległa cyrkulacja wątrobowo-jelitowa” jest raczej mało zgrabnym bezpośrednim tłumaczeniem z języka angielskiego i sformułowanie to powinno brzmieć „intensywne krążenie wątrobowo-jelitowe”. Podobnie pojęcie „efekty niepożądane” raczej odnosi się do leków, a nie do trucizn, ponieważ implikuje, że mogą być jakieś efekty „pożądane” dla danej substancji. Lepszym wyborem byłoby ogólne określenie „efekty toksyczne”. Podobnie niefortunnie brzmi zdanie „DON wydalany jest w surowicy świń w ponad 30% w postaci glukuronidów”. Zapewne Autorka ma na myśli, że „obecny jest” w takim procencie. Jednak należy zwrócić uwagę, że Autorka, nie mając wykształcenia weterynaryjnego i tak bardzo sprawnie operuje pojęciami toksykologicznymi i umiejętnie łączy wiedzę z wielu dyscyplin.

Podsumowując, uważam, że mgr inż. Agnieszka Tkaczyk znakomicie wywiązała się ze swojego zadania, a przedstawiona do oceny dysertacja doktorska i dorobek w postaci trzech publikacji cechuje się wysoką wartością naukową. W mojej ocenie osiągnięcia Doktorantki stanowią ważny wkład w naukę, mają dużą wartość poznawczą oraz aplikacyjną, a także świadczą o wysokich kompetencjach jakie nabyła podczas studiów doktoranckich.

W mojej ocenie praca doktorska mgr inż. Agnieszki Tkaczyk p.t. „Oznaczanie biomarkerów mikotoksyn u trzody chlewnej jako nowoczesne narzędzie do oceny narażenia świń na mikotoksyny” w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim zawartym w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. Zm.). W związku z powyższym, wnioskuję do wysokiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego, jednocześnie rekomenduję wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.


dr hab. Błażej Poźniak, prof. uczelni