

Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni
Uniwersytet Kazimierza Wielkiego
Wydział Nauk Biologicznych
Katedra Fizjologii i Toksykologii

Bydgoszcz, 08.05.2020 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Panasiuka

pt.: *„Opracowanie wieloskładnikowych metod oznaczania mikotoksyn w paszach oraz ocena narażenia zwierząt”*

wykonana w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii, Państwowego Instytutu
Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach
pod kierunkiem dr hab. Piotra Jedziniaka, prof. instytutu
promotor pomocniczy: dr inż. Małgorzata Gbylik-Sikorska

Mikotoksynami określa się niskocząsteczkowe ($M < 1,5$ kDa), wtórne metabolity grzybów pleśniowych, które wprowadzone do organizmu nawet w niewielkich dawkach drogą pokarmową, oddechową bądź przez skórę i błony śluzowe wywołują reakcje toksyczne. Mikotoksyny są produktami różnych rodzajów grzybów, tzw. pleśni, i stwierdza się je w surowcach roślinnych, w żywności i w paszach. W dzisiejszych czasach rozwój toksynotwórczych grzybów pleśniowych w paszach powoduje ogromne straty ekonomiczne. Według szacunków FAO, mniej więcej 25% ziarna zbóż na świecie, a według niektórych prac nawet do 40%, jest skażone co najmniej jedną mikotoksyną. Obecność mikotoksyn w paszach lub żywności stanowi duże zagrożenie zdrowotne zarówno dla ludzi jak i dla zwierząt. Mikotoksyny mogą wywoływać zespół objawów klinicznych i zmian patologicznych, które nazywamy mikotoksykozami. Komisja Europejska w stosownych rozporządzeniach ustaliła najwyższe dopuszczalne poziomy dla kilkunastu mikotoksyn w środkach spożywczych, natomiast w zaleceniu z 2006 roku określiła wartości tolerancyjne w paszach. W celu określenia narażenia na zanieczyszczenia obecne w żywności i paszach oraz monitorowania przestrzegania wytycznych, konieczne jest dysponowanie wiarygodnymi i skutecznymi metodami oznaczania tych związków. Metody analityczne pozwalające na jakościową i ilościową analizę poszczególnych mikotoksyn w materiale roślinnym i w żywności są wykorzystywane i doskonalone od dziesięcioleci. Dostępność odpowiednich procedur analitycznych jest jednym z czynników, obok danych toksykologicznych oraz informacji o narażeniu, warunkujących najwyższe dopuszczalne poziomy zanieczyszczeń w żywności i paszach. Opracowanie metodyk wykrywania i oznaczania mikotoksyn stanowi wyzwanie dla analityków, ze względu na niskie poziomy stężeń, zróżnicowane właściwości fizykochemiczne, złożoność matrycy próbek i możliwe zakłócenia ze strony pozostałych analitów. Opracowanie metodyk pozwalających na oznaczanie szerszego spektrum analitów w ramach jednego cyklu analitycznego, przy jednoczesnym obniżeniu zużycia

odczynników wymaga zastosowania najnowocześniejszych metod o dużej czułości i specyfice detekcji badanego związku. Takie możliwości daje wykorzystanie chromatografu cieczowego ze spektrometrem mas.

W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej mgr Łukasz Panasiuk podjął się zadania opracowania wieloskładnikowych metod oznaczania mikotoksyn w paszach. Temat pracy doktorskiej należy uznać za bardzo ciekawy i ważny, zarówno z naukowego punktu widzenia, jak i praktycznego.

Praca ma układ właściwy dla rozpraw o charakterze eksperymentalnym i obejmuje 169 stron wydruku komputerowego plus załączniki. Rozprawa zawiera: 18 tabel oraz 33 rycin, które są czytelne i znacząco ułatwiają czytelnikowi zapoznanie się z dużą liczbą uzyskanych wyników. Brakuje jednak źródeł piśmiennictwa, przy części rycin i tabel.

Dysertacja ma klasyczny układ, na który składa się pomocny wykaz stosowanych skrótów i akronimów w pracy. Wykaz skrótów mikotoksyn mógłby być ustawiony alfabetycznie (brakuje skrótów: dla aflatoksyny M1 i patuliny). Brakuje wyjaśnienia dla DOM-1. Dla aflatoksyny zastosowano skrót AFL, a czy obowiązującym skrótem nie jest raczej AF? Mimo wykazu skrótów w pracy Doktorant ponownie wyjaśnia skróty nazw, co wydaje się już niekonieczne. W dalszej części pracy pojawia się wykaz załączników, tabel i rycin.

Kolejny rozdział to wstęp obejmujący 2,5 strony wydruku komputerowego. Pojawia się tutaj zdanie: ...W ramach realizacji pracy doktorskiej przeprowadzono badania nad opracowaniem wieloskładnikowych metod oznaczania mikotoksyn w **paszach oraz materiałach paszowych** z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS. Zgodnie z Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) NR 767/2009 z dnia 13 lipca 2009 r. ...Pasze mogą występować w formie materiałów paszowych, mieszanek paszowych, dodatków paszowych, premiksów lub pasz leczniczych. Także błędne jest rozdzielenie materiału na pasze i materiały paszowe, gdyż materiał paszowy jest formą paszy. Takie wyszczególnienie pojawia się jeszcze kilka razy w pracy (str. 49, 56, 74, 75, 77, 84, 89, 101, 119, 124). Czy badane materiały były tylko produktem, czy były składnikami mieszanek paszowych?

Część teoretyczna jest zwięzłym przeglądem literatury liczącym 29 stron, wprowadzającym czytelnika w przedstawioną problematykę. W pierwszej części zasygnalizowano charakterystykę głównych grup mikotoksyn i ich toksyczność. W pracy oznaczana jest również cytrynina, powinna być również umieszczona we wstępie wraz z krótką charakterystyką. W kolejnej części zasygnalizowano metody oznaczania mikotoksyn mających zastosowanie w analityce tych związków. Ubolewam jednak, że ta część jest przedstawiona zbyt ogólnie. Kolejne rozdziały to przedstawienie rodzajów pasz oraz uregulowań prawnych związanych z obecnością mikotoksyn w produktach spożywczych i przeznaczonych do żywienia zwierząt. Zwieńczeniem rozważań teoretycznych jest zestawienie danych dotyczących występowania mikotoksyn w paszach oraz ocena narażenia zwierząt.

Do tej części mam kilka uwag:

Str.28-29 – niefortunne wydaje się użycie słowa infekować: powodować infekcję. Słowo infekcja ma bardziej zastosowanie w medycynie

Str. 18 – rozwinięcie skrótu MRM jest niedokładne, powinno być monitorowanie wielu reakcji fragmentacji (równolegle)

Str. 25 – Doktorant mógłby zaproponować określenie w języku polskim dla „emerging mycotoxins”

Str. 28 – żeby być konsekwentnym (w porównaniu do innych opisywanych mikotoksyn) dla T-2 i HT-2 brakuje informacji w jakich zbożach występują głównie te toksyny (owies, jęczmień)

Str. 32 – informacje o fumonizynach mogłyby być po zearalenonie (żeby zachować powiązanie z rodzajem grzyba który produkuje dane toksyny)

Str. 36/37 – Doktorant powinien podać odniesienia do prac oryginalnych nie do przeglądowej [72]

Cel pracy, który został sprecyzowany prawidłowo, dla jego osiągnięcia postawiono również 4 cele szczegółowe rozprawy.

Materiał i metody zostały przedstawione w części eksperymentalnej bardzo precyzyjnie na 12 stronach wydruku i 13 stronach załączników. Doktorant w pracy używa również alkaloidów sporyszu, czy nie powinna być podana odpowiednia zgoda na wykorzystanie tych substancji do badań.

Wyniki swoich badań Doktorant przedstawił na 49 stronach wydruku komputerowego i 18 stronach załączników. Rezultaty uzyskanych wyników autor opisał w tekście i umieścił w tabelach oraz czytelnych rysunkach, co znacznie ułatwia śledzenie danych.

Pracę zamyka dyskusja na 28 stronach wydruku komputerowego. Ta część rozprawy jest jednym z najtrudniejszych elementów, w tym przypadku Doktorant w pełni poradził sobie z tym wyzwaniem. Pracę zakończono 7 wnioskami, których podstawę stanowią przedyskutowane wyniki badań własnych.

W dalszej części pracy Doktorant zamieścił dobrze sformułowane streszczenie w języku polskim i angielskim.

Ostatni rozdział to Piśmiennictwo. Należy zwrócić szczególną uwagę na imponującą liczbę publikacji wykorzystanych zarówno w części teoretycznej jak i dyskusji. Praca oparta jest na 246 pozycjach piśmiennictwa (w tym 14 pozycji polskojęzycznych (5,7%) i 232 pozycje obcojęzyczne, głównie anglojęzyczne (94,3%). Zdecydowana większość z nich to najnowsze artykuły naukowe (76%) – 188 pozycje pochodzą z lat 2010-2020. Bibliografia jest właściwie dobrana w celu

nakreślenia problemu oraz oceny uzyskanych wyników. Dobór piśmiennictwa w pełni potwierdza celowość prowadzonych badań.

Uwagi dotyczące piśmiennictwa: Osobiście jestem zwolenniczką systemu harwardzkiego, czyli systemu autor-rok cytowań, nie systemu vancouverkiego. Spis piśmiennictwa powinien rozpoczynać się nazwiskiem, nie inicjałem imienia. Ułatwiłoby to znacznie weryfikację cytowań.

W trakcie czytania pracy zauważyłam pewne błędy redakcyjne, edytorskie, nieściśłości sformułowań. W całej pracy jest brak interpunkcji, co powoduje trudności w zrozumieniu zdań wielokrotnie złożonych. Z obowiązku recenzenta należy również zwrócić uwagę na sprzeczną ze stanowiskiem Rady Języka Polskiego przy Prezydium PAN pisownię słowa miktotoksyny. Rada ta ustaliła w 2011 roku formę fonetyczno-graficzną nazwy jako jedynie poprawną formę zapisywaną przez „y”. Muszę jednak przyznać, że jako osoba od ponad 20 lat zajmująca się miktotoksynami nie stosuje tego stanowiska i nadal używam formy zapisywanej przez „i”.

Dodatkowe drobne uwagi i komentarze dotyczące rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Panasiuka przedstawione poniżej mimo natury szczegółowej, nie mają jednak wpływu na ocenę pracy jako całości, która jest pozytywna.

Podczas lektury pracy nasuwają się pewne pytania i komentarze, które wymagają wyjaśnienia:

- Czy Doktorant mógłby wyjaśnić, jak dodatek do fazy ruchomej kwasu mrówkowego, kwasu octowego lub ich soli amonowych prowadzi do powstawania adduktów z jonami metali jednowartościowych? (str. 42 w 20)
- Dlaczego Doktorant nie zastosował wzorca wewnętrznego dla fumonizyn? (str. 61)
- Czy Doktorant badał stabilność roztworów podstawowych i ich mieszaniny? (str. 62 w 10)
- Czy Doktorant próbował zatężyć próbkę np. przez odparowanie 200 μ l supernatantu z 10 μ l IS ? (str. 75 w 5 i w 15)
- Czy Doktorant znalazł informację dlaczego dla wszystkich matryc uzyskano o wiele większe wzmocnienie sygnału dla fuzarenonu-X w porównaniu z innymi trichotecenami B? Jaki był powód zastosowania jonizacji dodatkowej dla tego analitu? (str. 79)
- Dlaczego Doktorant wybrał dla NIV, DON i DON-3Glc po trzy jony potomne? (str. 81 tabela 8)
- Czy Doktorant sprawdzał również inne dodatki do fazy ruchomej? Jeżeli tak to jakie, jeżeli nie to dlaczego wybrał akurat 0,2% CH₃COOH? (str. 81 w 16)
- Przydatne byłoby tłumaczenie – *dwell time* (str. 81)
- Doktorant powołuje się na zalety metody wynikające z obniżenia kosztów analizy (co oczywiście jest prawdą), czy zatem poprawa parametrów walidacyjnych wynikających z zastosowania kolumnienek Mycosep 225 jest na tyle duża, żeby zastosować je zamiast znacznie mniej kosztownej ekstrakcji bez oczyszczania? (str. 122 w 19)

- Wspomniany wcześniej brak zastosowania wzorca wewnętrznego fumonizyn. Czy Doktorant przez zastosowanie wzorca wewnętrznego danej toksyny kompensował efekty matrycy tylko dla niej czy również innych toksyn o podobnej budowie np. 13C AFLB1 tylko AFLB1 czy również dla pozostałych aflatoksyn? (str. 124 w13)

Inne uwagi:

Str 113 Uzyskane wyniki stężeń pasz ... - jest źle sformułowane

Str 34 „W przypadku ENs karmienie szczurów w paszą zawierającą...” – powinno być „W przypadku ENs karmienie szczurów paszą zawierającą...”

Str 35 „W średniowieczu choroba wywoływana przez sporysz i jego alkaloidy nazywana była „ogniami świętego Antoniego.” – powinno być „W średniowieczu choroba wywoływana przez sporysz i jego alkaloidy nazywana była „ogniem świętego Antoniego”?

Str 41 „Istnieje kilka możliwości minimalizacji ME, jednak obecnie brakuje rozwiązania, który w pełni kompensowałby wszelkie straty.” – powinno być „Istnieje kilka możliwości minimalizacji ME, jednak obecnie brakuje rozwiązania, które w pełni kompensowałoby wszelkie straty.”

Str 42 „...IAC) może przenieść znaczące korzyści, ...” – powinno być „...IAC) może przynieść znaczące korzyści, ...”

Str 43 „ Sulyok i współpracownicy ...” – powinno być „ Sulyok i in. ...”

Str 58 „... opinii EFSA, w których podkreślana jest koniczność oznaczania...” – powinno być „... opinii EFSA, w których podkreślana jest konieczność oznaczania...”

Str 77 „ ... zróżnicowane matryce, o różnym składzie, konieczne było...” – powinno być „ ... zróżnicowane matryce, o różnym składzie, konieczne było...”

Str 89 „ ...w paszach dla świń, drobiu, kiszonek z kukurydzy...” – powinno być „ ...w paszach dla świń, drobiu, kiszonkach z kukurydzy...”

Str 98 „... przeprowadzanych na zwierzętach laboratoryjnych dobór właściwej jakości paszy zwierającej...” – powinno być „... przeprowadzanych na zwierzętach laboratoryjnych dobór właściwej jakości paszy zawierającej...”

Str 116 „... zmniejszonego pobierania paszy oraz przyrosty masy;...” – powinno być „... zmniejszonego pobierania paszy oraz przyrostu masy;...”

Str 120 „... bydła) obejmują głównie mikotoksyny posiadające regulacje prawe, ich metabolity oraz...” – powinno być „... bydła) obejmują głównie mikotoksyny posiadające regulacje prawne, ich metabolity oraz...”

Praca została logicznie skonstruowana i konsekwentnie zrealizowana z użyciem bardzo dużej liczby próbek oraz odpowiednich metod badawczych. Zaplecze aparaturowe stanowiło zapewne ułatwienie w uzyskaniu tak dużej ilości wyników. Ważne są też umiejętności operatora i znajomość technik analitycznych. Uważam, że praca stanowi oryginalny dorobek o wysokiej wartości poznawczej i praktycznej. Podejście do tematu wskazuje na dobre przygotowanie Doktoranta do pracy naukowej.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż praca mgr Łukasza Panasiuka zatytułowana „*Opracowanie wieloskładnikowych metod oznaczania mikotoksyn w paszach oraz ocena narażenia zwierząt*” spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, wynikające z aktualnych wymagań merytorycznych oraz formalnych i w związku z powyższym wnoszę do Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę fakt, iż przedstawiona do recenzji tematyka rozprawy doktorskiej jest ważna i interesująca, wpisuje się w nurt opracowania nowoczesnych rozwiązań analitycznych oraz za nowatorski charakter otrzymanych wyników badań wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr Łukasza Panasiuka. Za cenne należy uznać aplikacyjny charakter uzyskanych wyników badań w postaci opracowanych procedur analitycznych, które z powodzeniem mogą być wykorzystane w laboratoriach związanych z oznaczaniem mikotoksyn.



Dr hab. Magdalena Twarużek, prof. uczelni