



Olsztyn, dnia 12.05.2020 r.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr. Łukasza Panasiuka pt.: "Opracowanie wieloskładnikowych metod oznaczania mikotoksyn w paszach oraz ocena narażenia zwierząt"

wykonanej w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem naukowym dr hab. Piotra Jedziniaka, prof. Instytutu oraz promotora pomocniczego dr. inż. Małgorzaty Gbylik-Sikorskiej.

Podstawa formalna:

Recenzja została wykonana na podstawie pisma z dnia 25 marca 2020 roku, skierowanego przez Przewodniczącego Komisji Doktorskiej Prof. dr hab. Dariusza Bednarka z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego- Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

Grzyby pleśniowe są jednymi z najczęściej spotykanych patogenów porażających uprawy roślin występujących w krajach o klimacie umiarkowanym. Patogeny te porażają niemal wszystkie ważne gospodarczo gatunki roślin, a przez swoją aktywność biologiczną stwarzają zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Obecność mikotoksyn w materiałach paszowych oraz w paszy może powodować wystąpienie stanów chorobowych określanych jako mikotoksykozy. Kliniczne objawy mikotoksykozy u zwierząt są zróżnicowane w zależności od stężenia mikotoksyny, gatunku zwierzęcia, jego stanu fizjologicznego, płci czy wieku. Znaczący wpływ na dynamikę i kierunek procesów będących wynikiem przyjęcia mikotoksyn ma również szereg interakcji zachodzących w organizmie zwierząt. Interakcje te dotyczą również obecności kilku a czasami kilkudziesięciu związków biologicznie aktywnych, które wspólnie mogą wywoływać znacznie silniej wyrażony efekt zmian chorobowych czy dysfunkcji produkcyjnych (możliwe jest także oddziaływanie antagonistyczne).

Fakt obecności w prawie wszystkich próbkach badanych więcej niż jednej mikotoksyny nie jest jednak uwzględniony w żaden sposób w aktach prawnych (zarówno krajowych jak i uregulowaniach Unii Europejskiej) dotyczących limitów obecności tych substancji w paszach i materiałach paszowych. Co więcej bezwzględnie limitowane są tylko: aflatoksyna B₁ i sporysz (*claviceps purpurea*). Regulacje dotyczą również obecności: deoskyniwalenolu, zearalenonu, ochratoksyny, fumonizyny B₁ i B₂, toksyny T-2 i





HT-2, są to jednak tylko zalecenia dotyczące maksymalnych poziomów. W praktyce lekarsko-weterynaryjnej taka sytuacja powoduje powstawanie konfliktów na linii wytwórca paszy – hodowca, co wynika bardzo często z takiego rozumienia rekomendacji Komisji przez wytwórców paszy, że jeżeli tylko poziom mieści się poniżej poziomu rekomendacji to pasza jest w pełni wartościowa. Takie podejście zdaje się nie dostrzegać ogromnego przedziału wartości stężeń mikotoksyn który znajduje się pomiędzy poziomem określanym jako LOAEL (lowest-observed-adverse-effect level) a poziomem rekomendowanym jako maksymalny.

Obecność w badanych próbkach pasz wielu związków należących do grupy mikotoksyn stwarza również ogromne wyzwanie analityczne. Wynika to z faktu, że związków zaliczanych do mikotoksyn opisano już ponad tysiąc a ich budowa chemiczna, właściwości fizyko-chemiczne, aktywność biologiczna jest bardzo często krańcowo różna. Z tego wynika problem dobrania warunków przygotowania próbki do badań oraz prowadzenia analizy chromatograficznej w drodze pewnego kompromisu. Z jednej strony chcemy uzyskać jak najniższy poziom oznaczalności a z drugiej strony oznaczyć jak największą liczbę substancji.

Przedstawiona do oceny rozprawa została wykonana w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach, wiodącym ośrodku naukowym specjalizującym się od lat w analizie instrumentalnej substancji zabronionych czy niepożądanych we wszystkich rodzajach matryc biologicznych. Praca została wykonana w ramach projektu finansowanego przez Konsorcjum KNOW „Zdrowe Zwierzę- Bezpieczna Żywność” i w pełni wpisuje się w założenia przyjęte w ramach realizacji projektu.

Biorąc powyższe argumenty pod uwagę uważam, że problematykę oraz sformułowanie problemu badawczego i jego aktualność należy ocenić bardzo wysoko, przede wszystkim ze względu na walory aplikacyjne.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska przygotowana została w formie manuskryptu o typowej dla tego rodzaju opracowań redakcji. Chciałbym wyrazić nadzieję, że uzyskane wyniki zostaną również w bliskiej przyszłości opublikowane w czasopiśmie o wysokim współczynniku oddziaływania, bo niewątpliwie na taką formę upowszechnienia zasługują.

Manuskrypt zawiera 169 kolejno ponumerowanych stron oraz 39 stron załączników zawierających między innymi dane z procesu walidacji metod oraz wyniki szczegółowe poziomu mikotoksyn i opracowanie statystyczne.

W pracy zawarte są 33 ryciny, 18 tabel oraz 246 pozycji piśmiennictwa. Zarówno tabele jak i ryciny zostały odpowiednio ponumerowane i opisane oraz umieszczone w kolejnych rozdziałach rozprawy. Dołączony także został stosowny wykaz tabel, rycin, załączników oraz stosowanych w manuskrypcie skrótów.





W liczącym 43 strony wstępie Doktorant przedstawił charakterystykę głównych grup mikotoksyn (wraz ze stosunkowo nowym tematem „Emerging mycotoxins”), problem mikotoksyn modyfikowanych, metody analityczne stosowane w diagnostyce. Wstęp zawiera również charakterystykę wybranych rodzajów pasz stosowanych w żywieniu zwierząt, opis regulacji prawnych w zakresie obecności mikotoksyn, opis prevalencji mikotoksyn oraz zasady przeprowadzania oceny narażenia i charakterystyki ryzyka. Wstęp jest napisany w sposób przejrzysty z dobrym wykorzystaniem dostępnej w tym zakresie literatury.

Po obszernym wstępie następuje opis celu pracy. Doktorant założył realizację czterech celów szczegółowych, dwa z nich dotyczą opracowania metod analizy chromatograficznej. Kolejny dotyczy określenia częstości występowania i oznaczenia stężeń mikotoksyn w próbkach pasz i materiałów paszowych. Ostatni cel to ocena narażenia zwierząt gospodarskich na obecność wybranych mikotoksyn w paszach w oparciu o regulacje prawne i wartości LOAEL.

Kolejny rozdział to „Materiał i metody” zawierający szczegółowy opis doboru analitów do badań, odczynników i roztworów, aparatury, charakterystyki i pochodzenia próbek do badań, sposobu prowadzenia walidacji, analizy statystycznej i sposobu przeprowadzenia oceny narażenia zwierząt.

Następnie doktorant przechodzi do omówienia wyników, co w manuskrypcie zajmuje 48 stron i jest logicznym odzwierciedleniem przyjętych założeń pracy i zastosowanych metod badawczych. Rozdział „Wyniki” w zasadzie można podzielić na dwie części, pierwszą opisującą optymalizację warunków analizy chromatograficznej dla dwóch opracowanych metod (metoda wieloskładnikowa oraz metoda oznaczania mikotoksyn z grupy B – trichotecenów) i walidację opracowanych metod. Druga część rozdziału to przedstawienie wyników analizy 438 próbek pasz i 237 próbek materiałów paszowych, oraz wykorzystanie tych wyników do krótkiej oceny narażenia zwierząt na mikotoksyny obecne w paszach z których pozyskano próbki do badań. Wyniki przedstawione zostały w sposób uporządkowany i czytelny pozwalając czytelnikowi na łatwe i analityczne zapoznanie się z prezentowaną treścią.

Kolejnym elementem ocenianej dysertacji jest rozdział „Dyskusja, w którym doktorant w umiejętny sposób przedstawia korzyści płynące ze stosowania opracowanych metod oraz przedstawia merytoryczne uzasadnienie wyborów dokonanych w procedurze analitycznej. Jest to niewątpliwie najcenniejsza część dysertacji, która pozwoli wielu naukowcom na wykorzystanie tych danych w optymalizacji stosowanych procedur analitycznych. Doktorant wykazuje się przy tym bardzo dobrą znajomością warsztatu analitycznego, udowadnia zrozumienie zależności pomiędzy doбором metod i uzyskanymi efektami co jest niezwykle cenne w każdym laboratorium analitycznym.





Następnie doktorant przechodzi do omówienia i analizy wyników uzyskanych z próbek pasz i materiałów paszowych. Tu szczególnie ważna wydaje się być analiza poszczególnych materiałów paszowych, co pozwolić może na krytyczną ocenę stosowania niektórych z analizowanych materiałów. Kolejnym zagadnieniem omawianym w rozdziale dyskusja jest temat współwystępowania mikotoksyn. Omówienie zagadnienia jest o tyle trudne, że nie istnieje jednolity system pobierania próbek do badań i wykonywania analiz, który umożliwiłby wiarygodną i rzetelną analizę sytuacji w tym zakresie. Doktorant odnosi uzyskane przez siebie wyniki do publikacji innych autorów, raportów EFSA i danych z systemu RASFF. Jest to o tyle niepełnowartościowe porównanie, że do systemu RASFF wprowadzane są tylko wyniki z wyników badań w kierunku obecności mikotoksyn objętych regulacjami prawnymi a najwięcej badań wykonywanych jest w kierunku obecności aflatoksyny B₁.

Aby taka analiza była rzetelna powinniśmy poddawać każdą próbkę takiej samej procedurze analitycznej z dokładnie opisanymi limitami detekcji i oznaczalności. Niestety taki system w Europie nie istnieje. Raporty EFSA w tym zakresie również pozostawiają dużo do życzenia. Brak w nich czasami elementarnej logiki badań toksykologicznych. Dla przykładu poziom deoksyniwalenolu dopuszczalny w paszy pełnoporcjowej dla świń to 0,9 mg/kg paszy a jednocześnie w tym samym raporcie czytamy, że 2,8 mg/kg paszy wywołuje wymioty.

EFSA wyznacza poziom LOAEL dla klinicznej obecności wymiotów, chociaż w toksykologii takie odniesienia nie istnieją. Nie jest jednak żadnym uchybieniem Doktoranta, że odnosi się do raportów naukowych EFSA, bo przecież powinny one zawierać wiarygodne informacje.

Część eksperymentalna pracy znajduje swoje zwięźczenie w postaci siedmiu wniosków. Najważniejszym dokonaniem pracy jest opracowanie dwóch metod analitycznych, które mogą znaleźć praktyczne zastosowanie. Nie mogę się jednak w pełni zgodzić z wnioskiem nr 2. mówiącym o tym, że „mikotoksyny z określonymi regulacjami prawnymi w paszach nie stanowią zagrożenia dla zdrowia większości grup zwierząt”. Z wyników uzyskanych w pracy wynika, że w większości stężenia oznaczone w próbkach nie przekraczają wyznaczonych wartości regulacyjnych. Wpływu omawianych stężeń mikotoksyn na stan zdrowia zwierząt Doktorant nie badał. Warto więc ten wniosek zredagować nieco inaczej.

Z przedstawionych wniosków wynika, że cele pracy zostały w pełni osiągnięte a uzyskane wyniki mają charakter zarówno poznawczy jaki i przede wszystkim praktyczny.

Mimo że jakość merytoryczna nie budzi zastrzeżeń, to obowiązkiem recenzenta, jest zwrócenie uwagi na pewne niedociągnięcia czy też niejasności celem ich wyeliminowania w czasie redakcji późniejszych manuskryptów publikacyjnych.

I tak Doktorant kilkakrotnie używa sformułowania „pleśnie” co należałoby zamienić na „grzyby pleśniowe”. Określenie „zatrucia” również przez niektórych (podkreślam niektórych) toksykologów bywa rozumiane jako intoksykacja ze skutkiem śmiertelnym. Nie





chcę stawać w tej dyskusji po którejkolwiek ze stron, ale zamiana określenia „zatrucia” na „intoksykacja” wydaje się być rozsądnym rozwiązaniem. Podobnie jak zamiana określenia „toksyny grzybowe” na „mikotoksyny” bo toksyny wytwarzane przez „grzyby wyższe” to zupełnie inna historia.

„Obrzęk płuc i jamy opłucnowej” to nie jednostka chorobowa a objaw obserwowany w przebiegu licznych jednostek chorobowych.

Pewnego uporządkowania wymaga również klasyfikacja mikotoksyn modyfikowanych.

Doktorant opisuje na stronie 30., że zearalenon jest metabolizowany w wątrobie do zredukowanych form α i β - zearalenolu (nawiasem mówiąc nie tylko w wątrobie, bo aktywność enzymatyczna nabłonka enterocytów przewodu pokarmowego jest równie efektywna) a jednocześnie na kilku stronach podaje wyniki obecności α i β - zearalenolu w paszy i materiałach paszowych (np. str. 90., 101.).

Przedstawione uwagi krytyczne w niczym nie umniejszają jednak wartości pracy.

Do przeprowadzenia badań zastosowano właściwe postępowanie metodyczne, które odpowiada ogólnoswiatowym wymaganiom w tym zakresie. Dobór piśmiennictwa i przeprowadzona dyskusja wskazują na znajomość poruszanej problematyki, umiejętność krytycznego odniesienia się do przedstawianych przez innych autorów treści oraz prawidłowego formułowania wniosków.

Przedstawiona do recenzji dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a Doktorant wykazał się wiedzą teoretyczną oraz umiejętnościami prowadzenia analizy instrumentalnej.

Biorąc pod uwagę wartość aplikacyjną dysertacji, zakres prac analitycznych, nowoczesny warsztat badawczy oraz potencjał praktycznego wykorzystania wyników badań stawiam wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Na podstawie dokonanej analizy przedstawionej do oceny pracy doktorskiej mgr. Łukasza Panasiuka pt.: „Opracowanie wieloskładnikowych metod oznaczania mikotoksyn w paszach oraz ocena narażenia zwierząt” stwierdzam, że dysertacja odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki i przedstawiam Komisji Doktorskiej Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego -Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie Pana mgr. Łukasza Panasiuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK KATEDRY

dr hab. Łukasz Zielonka, prof. UWM

Łukasz Zielonka

