

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
Zakład Farmakologii i Toksykologii

mgr inż. Agnieszka Tkaczyk

**Oznaczanie biomarkerów mikotoksyn u trzody
chlewnej jako nowoczesne narzędzie do oceny
narażenia świń na mikotoksyny**

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Promotor:
dr hab. Piotr Jedziniak, prof. instytutu**

**Promotor pomocniczy:
dr Arkadiusz Dors**

Puławy, 2021 r.

*Serdeczne podziękowania
kieruję do mojego promotora Pana dr hab. Piotra Jedziniaka, prof. instytutu,
za pomoc, cenne rady merytoryczne, inspirujące dyskusje i wsparcie
w trakcie realizacji pracy doktorskiej.*

*Pragnę podziękować także dr Arkadiuszowi Dorsowi – promotorowi
pomocniczemu, współautorom publikacji oraz kolegom i koleżankom
z Zakładu Farmakologii i Toksykologii
za poświęcony mi czas i wsparcie.*

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria.

Data.....

Podpis promotora pracy.....

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że rozprawa doktorska przygotowana przeze mnie nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data.....

Podpis autora pracy.....

Spis treści

Wykaz publikacji składających się na rozprawę doktorską	1
Wykaz skrótów	2
1. Wstęp	4
1.1 Wpływ mikotoksyn na zdrowie świń	6
1.2 Ocena narażenia świń na mikotoksyny	9
1.3 Biomarkery narażenia na mikotoksyny (biomarkery mikotoksyn) u świń – obecny stan wiedzy	10
1.4 Metody oznaczania mikotoksyn w płynach ustrojowych świń	12
2. Cel i zakres pracy	15
3. Metodyka badań	16
3.1 Opracowanie metod analitycznych	16
3.2 Walidacja opracowanych metod	17
4. Wyniki badań i dyskusja	20
4.1 Opracowanie metod analitycznych	20
4.2 Walidacja procedur	23
4.3 Poziomy mikotoksyn w paszach doświadczalnych	24
4.4 Poziomy biomarkerów mikotoksyn w płynach ustrojowych po spożyciu paszy doświadczalnej	25
4.4.1 Poziomy biomarkerów mikotoksyn w moczu świń	26
4.4.2 Poziomy biomarkerów mikotoksyn w surowicy świń	28
4.5 Kinetyka biomarkerów mikotoksyn w płynach ustrojowych świń	30
5. Wnioski	35
6. Streszczenie	36
7. Summary	37
Publikacje składające się na rozprawę doktorską	44

Wykaz publikacji składających się na rozprawę doktorską:

1. Prace oryginalne

1.1 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.

(liczba pkt. MNiSW = 70; IF = 3,164)

1.2 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.

(liczba pkt. MNiSW = 100; IF = 4,546)

2. Praca przeglądowa

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

(liczba pkt. MNiSW = 100; IF = 4,546)

Łącznie: pkt. MNiSW = 270; IF = 12,26

Punktacja podana według listy czasopism punktowanych MNiSW oraz Impact Factor (IF) wg. Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania

Badania opisane w tej pracy zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki, projekt SONATA – BIS grant nr.: 2016/22/E/NZ7/00640. “Biomarkers of mycotoxins in pigs“.

Wykaz skrótów

3-AcDON	3- acetylo-deoksyniwalenol
15-AcDON	15-acetylo-deoksyniwalenol
ACN	acetonitryl
AFB ₁	aflatoksyna B ₁
AFB ₂	aflatoksyna B ₂
AFG ₁	aflatoksyna G ₁
AFG ₂	aflatoksyna G ₂
AFM ₁	aflatoksyna M ₁
ALTX-I	altertoksyna I
AME	eter monoetylowy alternariolu
AOH	alternariol
α -ZAL	α -zearalanol
α -ZEL	α -zearalenol
β -ZAL	β -zearalanol
β -ZEL	β -zearalenol
BEA	bowerycyna
DAS	diacetoksyscirpenol
DOM-1	deepoksydeoksyniwanlenol
DON	deoksyniwalenol
DON-3-GlcAc	glukuronid-3-deoksyniwalenolu
DH-CIT	dihydrocytrynina
CIT	cytrynina
CV	współczynnik zmienności
EFSA	Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności
ELISA	test immunoenzymatyczny
EMEA	Europejska Agencja Leków
ENA	enniatyna A
ENA ₁	enniatyna A ₁
ENB	enniatyna B
ENB ₁	enniatyna B ₁
ESI	elektrozpraszanie
EtOAc	octan etylu

FB ₁	fumonizyna B ₁
FB ₂	fumonizyna B ₂
HFB ₁	hydrolizowana fumonizyna B ₁
HR-MS	wysokorozdzielcza spektrometria mas
HT-2	toksyna HT-2
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
LC-MS/MS	chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
LLE	ekstrakcja ciecz-ciecz
LLOQ	granica oznaczalności
LOAEL	najniższy poziom, przy którym obserwuje się szkodliwe zmiany
IAC	kolumnienki powinowactwa immunologicznego
IS	standard wewnętrzny
IS-normalised-SSE	efekt matrycy znormalizowany względem standardu wewnętrznego
MeOH	metanol
MRM	monitorowana reakcja fragmentacji
NOAEL	poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków
NIV	niwalenol
OTA	ochratoksyna A
OT α	ochratoksyna alfa
<i>P</i>	poziom istotności
<i>r</i>	współczynnik korelacji Personna
R _A	odzysk całkowity
R _E	odzysk ekstrakcji
SSE	efekt matrycy
SPE	ekstrakcja ciecz-ciało stałe
STC	sterygmatocystyna
T-2	toksyna T-2
TEN	tentoksyna
ZEN	zearalenon
ZEN-GlcAc	glukuronid zearalenonu

1. Wstęp

Mikotoksyny są to wtórne produkty przemiany materii grzybów pleśniowych – wytwarza je głównie rodzaj *Aspergillus*, *Penicillium*, czy *Fusarium*; wykrywane m.in. w wielu produktach rolniczych – głównie w zbożach, paszach i żywności pochodzenia roślinnego oraz zwierzęcego przeznaczonej dla ludzi. Związki te są zaliczane do zanieczyszczeń środowiskowych, które wytwarzane są przez pleśnie w trakcie uprawy zbóż, bądź w trakcie niewłaściwego przechowywania materiałów zbożowych np. przy zbyt dużej wilgotności ziarna (van der Fels-Klerx et al. 2012).

Mikotoksyny od lat są uważane za istotny problem w toksykologii weterynaryjnej. Pomimo tego, że rzadko dochodzi do ostrych zatruc mikotoksynami, to konsumpcja paszy skażonej mikotoksynami ma negatywny wpływ na zdrowie zwierząt, co może prowadzić do obniżenia ich produktywności, powstania poważnych chorób i związanych z tym strat ekonomicznych (Bryden 2012). Ponadto zwierzęta często są narażone na działanie wielu mikotoksyn równocześnie, przy czym wpływ „koktajlu” mikotoksyn na ich zdrowie nadal nie jest dobrze poznany (Alassane-Kpembé et al. 2013).

Do tej grupy należy obecnie kilkaset związków, w tym oprócz form macierzystych należą także tzw. modyfikowane mikotoksyny – związki pochodne powstające w wyniku biotransformacji mikotoksyn m.in. poprzez sprzęganie toksyn ze związkami hydrofilowymi (np. cukrami) bądź w wyniku metabolizmu bakterii, roślin lub grzybów. Mogą one wykazywać toksyczność porównywalną lub/i wyższą niż formy podstawowe, bądź mogą ulec hydrolizie do form macierzystych w przewodzie pokarmowym zwierząt, dlatego potencjalnie mają one duże znaczenie toksykologiczne.

Toksyczność mikotoksyn dla ludzi i zwierząt oraz ich częste występowanie w zbożach wymusiło wprowadzenie regulacji prawnych określających dopuszczalne lub zalecane poziomy w żywności i paszach. Aktualnie w Unii Europejskiej regulacjom prawnym w paszach podlega osiem mikotoksyn, w tym aflatoksyna B₁ (European Parliament and the Council of the EU 2002), deoksyniwalenol, fumonizyna B₁ i B₂, ochratoksyna A, toksyna T-2 i HT-2 oraz zearalenon (European Commission 2006) (mikotoksyny regulowane prawnie).

Wśród zwierząt gatunkiem szczególnie narażonym na działanie toksyczne mikotoksyn są świnie, których produkcja stanowi istotną gałąź rolnictwa na świecie. Mikotoksykozy są zagrożeniem dla prawidłowego funkcjonowania większości narządów świń (Pierron et al. 2016). Objawy zatrucia mikotoksynami, to spadek apetytu, połączony

niekiedy z wystąpieniem biegunki (Goyarts et al. 2007). Silne zatrucie, może skutkować zaleganiem zwierząt, całkowitym zaprzestaniem pobierania paszy i wystąpieniem przebarwień skórnych (Pierron et al. 2016). Obecność mikotoksyn w paszy, może prowadzić do uszkodzenia wątroby i płuc, a w przypadku wyjątkowo silnych zatruc, dochodzić może do padnięć zwierząt (Kanora and Maes 2009). Zatruciom mikotoksynami, często towarzyszą zaburzenia w rozrodzie (Dänicke et al. 2005b). Niezbędna jest zatem odpowiednia diagnostyka określająca poziom narażenia świń na mikotoksyny.

Podstawowym narzędziem do oceny narażenia świń na mikotoksyny jest kontrolowanie ich poziomów w paszy i produktach paszowych. Analiza taka nie uwzględnia jednak indywidualnego wpływu mikotoksyn na zdrowie świń czy alternatywnych dróg ekspozycji np. narażenia oddechowego.

W ostatnich latach szczególnego znaczenia nabrała ocena narażenia poprzez analizę biomarkerów narażenia na mikotoksyny (biomonitoring). W przypadku mikotoksyn są nimi m.in. związki macierzyste lub ich metabolity występujące w płynach ustrojowych i wydalinach zwierząt.

Istotne jest, że zwierzęta nierzadko narażone są na co najmniej kilka mikotoksyn jednocześnie (Pinotti et al. 2016), zatem kluczowe jest stosowanie metodyki wieloskładnikowej. Technika z wyboru, zapewniająca również odpowiednio niskie granice wykrywalności oraz dokładność i precyzję analiz ilościowych jest chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas. Pomimo powszechnego wykorzystania techniki LC-MS/MS w analizie biomarkerów mikotoksyn, nadal istnieje potrzeba opracowania nowych metod analitycznych ze względu na stale pojawiające się doniesienia naukowe na temat nowych biomarkerów.

Biomarkery mikotoksyn są od kilku lat wykorzystywane do oceny narażenia u ludzi i zwierząt. Zdecydowana większość publikacji dotyczy ludzi (Warth et al. 2013; Solfrizzo et al. 2014; Wallin et al. 2015). Mniejsza liczba doniesień naukowych opisuje badania biomarkerów u świń. Dotyczą one głównie dwóch najczęściej występujących w paszach w Europie mikotoksyn – DON i ZEN (Dänicke et al. 2004; Gambacorta et al. 2013; Brezina et al. 2014; Thanner et al. 2016)

Biomarkery innych mikotoksyn m.in. OTA czy CIT, które również często oznaczane są w paszy, nie są dobrze poznane. Poza tym, dotychczasowe doświadczenia nie uwzględniały wielu istotnych kwestii m.in. narażenia świń na kilka mikotoksyn obecnych w paszy równocześnie, paszy naturalnie skażonej mikotoksynami, czy wpływu czasu

narażenia świń na mikotoksyny na zawartość ich biomarkerów w matrycach biologicznych.

Dlatego, aby w pełni móc wykorzystać potencjał biomonitoringu w ocenie narażenia świń na mikotoksyny, niezbędne jest doskonalenie metodyki oznaczania biomarkerów i wykorzystywanie jej w badaniach *in vivo*. Aspekty te były podstawą podjęcia tematu tej pracy doktorskiej.

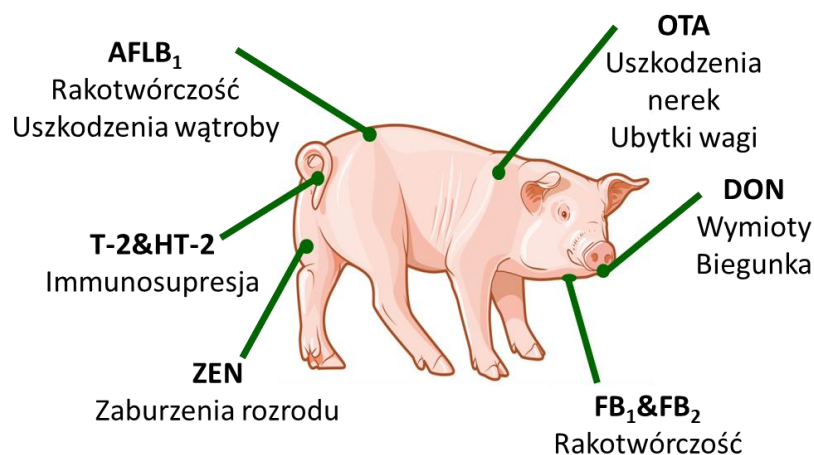
1.1 Wpływ mikotoksyn na zdrowie świń

Spośród wszystkich mikotoksyn to aflatoksyny są uważane za najbardziej toksyczne (Ostry et al. 2017), wykazują one właściwości mutagenne, teratogenne i hepatotoksyczne. Jednak w Europie to DON i ZEN najczęściej występują w paszy (Kovalsky et al. 2016), dlatego świnię są najbardziej narażone na ich działanie toksyczne, będąc jednocześnie gatunkiem zwierząt najbardziej podatnym na szkodliwe działanie tych związków.

Deoksyniwalenol u świń jest szybko i prawie całkowicie absorbowany. Zwierzęta te mają niską zdolność do metabolizmu DON do mniej toksycznych związków np. DOM-1, co powoduje wysoką dostępność systemową DON. Ponadto, DON obecny w paszy może powodować zmniejszenie jej pobierania przez świnię, a co za tym idzie obniżenie przyrostów masy ciała i pogorszenie efektywności produkcji (Tiemann and Dänicke 2007). U świń DON może być przyczyną wystąpienia zmian histopatologicznych w obrębie wielu narządów m.in. w okolicy przełyku, w żołądku, wątrobie, płucach i nerkach, a także zmiany różnych parametrów biochemicznych we krwi (Tiemann and Dänicke 2007).

Zearalenon i jego metabolity akumulują się w organizmie, ponieważ biorą udział w rozległej cyrkulacji wątrobowo-jelitowej. Dodatkowo głównym metabolitem ZEN jest α -ZEL, który ma większą aktywność estrogenową niż ZEN (Takemura et al. 2007). Głównym problemem jaki może wystąpić u świń po spożyciu paszy skażonej zearalenonem jest hiperestrogenizm, którego objawami mogą być bezpłodność, zaburzenia w rozrodzie loch i loszek, obrzęk sromu, czasami wypadanie pochwy, a nawet odbytu (Minervini and Aquila 2008).

Mikotoksyny mogą wywoływać u świń zatrucia ostre, podostre lub przewlekłe, aczkolwiek każda z toksyn posiada charakterystyczne dla swojego działania objawy (Ryc.1.).



Ryc. 1. Przykłady niekorzystnych konsekwencji narażenia na wybrane mikotoksyny u świń.

W pracy 2.1 przedstawiono szczegółowy opis wpływu mikotoksyn regulowanych prawnie na zdrowie świń.

Skutki toksycznego działania mikotoksyn u świń podsumowane są również w opiniach EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain 2005a, b, 2017a, b; EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain 2006).

Panel EFSA ds. zanieczyszczeń w łańcuchu pokarmowym (CONTAM) ustanowił poziom narażenia świń na DON i ZEN, przy którym nie obserwuje się szkodliwych zmian (NOAEL) oraz najniższy poziom, przy którym obserwuje się szkodliwe zmiany (LOAEL) (Tabela 1.). LOAEL jest także wyznaczony dla OTA, FB₁ i T-2/HT-2, jednak brakuje danych dotyczących toksyczności innych mikotoksyn, aby ustanowić dla nich wartości NOAEL.

Warto też wspomnieć, że oprócz podstawowych form mikotoksyn w paszy występują także formy modyfikowane (Berthiller et al. 2009), dla których brakuje badań toksykologicznych, które umożliwiłyby wyznaczenie wartości LOAEL/NOAEL (European Food Safety Authority (EFSA) 2014).

Tabela 1. Efekty niepożądane i wartości LOAEL i NOAEL dla mikotoksyn u świń (m.c. – masa ciała).

Mikotoksyna	Efekt niepożądany	LOAEL	NOAEL	Źródło
DON	Wymioty	2,8 mg/kg paszy	0,7-12 mg/kg paszy	(EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain 2017b)
	Zmniejszone pobieranie paszy oraz przyrosty masy	0,35 mg/kg paszy	0,7 mg/kg paszy	
FB ₁	Uszkodzenia płuc	0,4 mg/kg m.c./dzień	-	(EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain 2005b)
	Podwyższony stosunek Sa:So (sfinganina:sfingozyna) w krwi	5 mg/kg paszy (0,2 mg/kg m.c./dzień)	-	
OTA	Postępująca nefropatia	1 mg/kg paszy (40 µg/kg m.c.)	-	(EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain 2006)
	Wpływ na poziom enzymów nerkowych i pracę nerek	0,2 mg/kg paszy (8 µg/kg m.c.)	-	
T-2	Efekt immunologiczny lub hematologiczny	0,2 mg/kg paszy (8 µg/kg m.c.)	-	(EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain 2011)
ZEN	Efekty estrogenowe tj. powiększona macica, zaczerwieniony i opuchnięty srom (u prosiąt)	17,6 µg/kg m.c./dzień	10,4 µg/kg m.c./dzień	(EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain 2017a)

Podsumowując, mikotoksyny stanowią istotny czynnik chorobotwórczy u świń i przyczyniają się do spadku wydajności produkcji i upadków zwierząt. Niezbędna jest zatem odpowiednia diagnostyka określająca poziom narażenia świń na mikotoksyny.

1.2 Ocena narażenia świń na mikotoksyny

Istnieją dwie możliwości oceny narażenia świń na mikotoksyny. Pierwszą z nich i najbardziej powszechną jest bezpośrednia analiza paszy w połączeniu z danymi dotyczącymi spożycia (Guerre 2016). Nie uwzględnia ona jednak informacji o indywidualnym narażeniu – różnice pomiędzy zwierzętami w spożyciu paszy oraz absorpcji, dystrybucji, metabolizmie i wydalaniu, a także alternatywnych dróg narażenia – oddechowa, przed skórę, czy niejednorodności materiału paszowego. Musimy także pamiętać o możliwej konwersji modyfikowanych form mikotoksyn do form podstawowych, które przyczyniają się do zwiększenia całkowitej toksyczności.

Te problemy mogą być częściowo rozwiązane za pomocą monitoringu biologicznego zwierząt i analizie biomarkerów narażenia na mikotoksyny w matrycach biologicznych. Polega on na badaniu stężenia związków toksycznych i/lub metabolitów w materiale biologicznym tj. płyny ustrojowe czy wydaliny. Znając drogę i szybkość przemian jakim są poddawane poszczególne toksyny w organizmie, można na podstawie analizy biomarkerów narażenia ocenić wielkość wchłoniętej dawki mikotoksyny i wynikające z niej ryzyko dla zdrowia. Analiza odpowiednich biomarkerów narażenia w płynach ustrojowych i wydalinach może pomóc w całościowej ocenie narażenia zwierząt.

Warto wspomnieć również o tym, że część dodatków paszowych mających na celu wiązanie mikotoksyn w paszach aktywowane jest dopiero w przewodzie pokarmowym, dlatego do oceny ich skuteczności niezbędna jest analiza mikotoksyn w matrycach biologicznych (Lauwers et al. 2019a).

W pracy 2.1 dokonano przeglądu dotychczasowych badań *in vivo* z wykorzystaniem świń. Ograniczały się one głównie do oznaczania biomarkerów DON i ZEN w moczu oraz surowicy. Nie uwzględniały one jednak rzeczywistych warunków hodowlanych – pasza doświadczalna była wzbogacona wzorcem mikotoksyn lub świniom podawano zboża – najczęściej kukurydzę zanieczyszczoną mikotoksynami. Wątpliwości budzi także czas pobierania próbek moczu – najczęściej pobierany był jednokrotnie około 3 h przed ubojem (Brezina et al. 2014), co może być niewystarczające do rzetelnej oceny zawartości biomarkerów. Ponadto mikotoksyny mogą być wydalone znacznie dłużej – w przypadku ZEN nawet 3 dni (Thanner et al. 2016), dlatego powinien być zbierany mocz z całej doby, by dostarczyć wiarygodnych wyników oznaczeń biomarkerów mikotoksyn.

W związku z tym, że pasze i materiały paszowe mogą być porażone różnymi gatunkami grzybów, możemy mieć do czynienia z zanieczyszczeniami pasz wieloma mikotoksynami. Ostatnie badania pokazały, że od 30 do 100% pasz zanieczyszczona jest kilkoma mikotoksynami równocześnie (Pinotti et al. 2016). W paszach dla świń ponad 40% przebadanych próbek zawierało co najmniej 5 mikotoksyn (Arroyo-Manzanares et al. 2019). Występujące mikotoksyny mogą współdziałać ze sobą, a wpływ kombinacji mikotoksyn na zdrowie świń jest niewystarczająco poznany (Battilani et al. 2020). Konieczna jest więc ocena wpływu narażenia kilku mikotoksyn równocześnie na ich zdrowie, jednak dotychczasowe badania z wykorzystaniem świń tego nie uwzględniały.

Najdłuższy eksperyment, w którym świnom podawano paszę skażoną mikotoksynami trwał 37 dni (Döll et al. 2003), ale próbki moczu i surowicy pobrano w nim jedynie raz – przed ubojem świń. Nie przeprowadzono też eksperymentu, w którym monitorowano by stężenia biomarkerów w płynach ustrojowych po zmianie paszy zanieczyszczonej mikotoksynami na paszę o minimalnym skażeniu mikotoksynami przez dłużej niż 3 dni (Thanner et al. 2016). Brakuje więc informacji, czy czas narażenia na mikotoksyny wpływa na zawartość ich biomarkerów w matrycach biologicznych oraz jak długo po spożyciu paszy skażonej mikotoksynami, biomarkery mogą być oznaczone w materiale biologicznym (kinetyka mikotoksyn).

1.3 Biomarkery narażenia na mikotoksyny (biomarkery mikotoksyn) u świń – obecny stan wiedzy

Dotychczasowe doświadczenia *in vivo* pozwoliły ustalić jakie są najważniejsze biomarkery narażenia mikotoksyn regulowanych prawnie w moczu i surowicy świń. Szczegółowo omówiono je w pracy 2.1. Biomarkerami narażenia są mikotoksyny jak również ich metabolity.

Brakuje danych dotyczących biomarkerów innych mikotoksyn, które wraz z DON i ZEN często współwystępują w paszy np. OTA czy CIT (Doughari 2015). EFSA w ostatnich opiniach dotyczących ryzyka związanego z obecnością w żywności OTA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain 2020) i CIT (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain 2012) wskazuje na potrzebę przeprowadzenia doświadczeń *in vivo* po podaniu paszy skażonej tymi mikotoksynami, aby uzyskać więcej danych na temat ich biomarkerów. Aktualną wiedzę na temat biomarkerów mikotoksyn

(DON, ZEN, OTA, CIT) analizowanych w matrycach biologicznych w ramach przeprowadzonego doświadczenia podsumowano w Tabeli 2.

Tabela 2. Najważniejsze biomarkery mikotoksyn wybranych do badań (DON, ZEN, OTA, CIT) oznaczone w moczu i surowicy świń. (W nawiasie podano informację po jakim czasie należy pobrać próbkę dla biomarkerów, dla których jest on określony. Pogrubiono biomarkery, które oznaczano w najwyższym stężeniu.)

Mikotoksyna w paszy	Biomarker w moczu	Biomarker w surowicy
DON	DON (4–8 h) DOM-1 DON-GlcAc	DON-3-GlcAc * (3–4 h) /DON ** (3–4 h) DOM-1
ZEN	ZEN-GlcAc (12–24 h) * /ZEN ** (12–24 h) α -ZEL, β -ZEL, ZAN, α -ZAL, β -ZAL	ZEN-GlcAc * (0.25–3 h) /ZEN ** (0.25–3 h) α -ZEL (0.25–4 h)
OTA	OTA	OTA (72–120 h)
CIT	brak danych	CIT DH-CIT (dane niepełne)

*analiza metodą LC-HR-MS (bezpośrednie oznaczenie glukuronidów mikotoksyn)

**analiza metodą LC-MS/MS po hydrolizie enzymatycznej (pośrednie oznaczenie glukuronidów mikotoksyn)

Z wcześniejszych doświadczeniach na świniami, którym podawano paszę skażoną najczęściej występującymi w paszach w Europie mikotoksynami tj. DON i ZEN, można zauważyć znaczne różnice w poziomach biomarkerów DON i ZEN w moczu i surowicy od różnych świń jak i grup eksperymentalnych (praca 1.2, Supplementary Material, Table S1). W pracy przeglądowej (praca 2.1) wyznaczono wprawdzie liniową zależność między poziomem DON i ZEN spożytych w paszy, a ich biomarkerów oznaczonych w materiale biologicznym (praca 2.1, Figure 1-3). Jednak dla poziomów rekomendowanych przez UE w paszy występuje znaczna rozbieżność stężeń biomarkerów oznaczonych w materiale biologicznym.

W doświadczeniu, w którym świniom podawano m.in. 1270 μ g DON/kg paszy i 80 μ g ZEN/kg paszy, w moczu oznaczono średnio: 1065 ng DON/mL (96,2-2120 ng/mL) i 70,3 ng DOM-1/mL (1,6-336 ng/mL) a także 51,7 ng ZEN/mL (1,1-122 ng/mL), 18,6 ng α -ZEL (0-63,2 ng/mL), 1,4 ng β -ZEL (<LOQ-18,2 ng/mL), 0,4 ng ZAN/mL

(<LOQ-1,4 ng/mL); a w surowicy średnio: 8,6 ng DON/mL (4,6-15,9) (Brezina et al. 2014). Podczas gdy w innym doświadczeniu, świnie otrzymywały m.in. 1000 µg DON/kg paszy i 60 µg ZEN/kg paszy, w moczu oznaczono średnio: 360 ng DON/mL i 14 ng DOM-1/mL oraz 34,8 ng ZEN/mL i 10,2 ng α-ZEL/mL; a w surowicy średnio: 5 ng DON/mL (<LOQ-12 ng/mL) (Döll et al. 2003).

Z tego względu do tej pory nie było możliwe ustalenie wiarygodnych poziomów biomarkerów DON i ZEN w materiale biologicznym odpowiadających im poziomom rekomendowanym dla DON i ZEN w paszy.

1.4 Metody oznaczania mikotoksyn w płynach ustrojowych świń

Ze względu na to, że mikotoksyny są obecne w płynach ustrojowych ludzi i zwierząt w niskich stężeniach (poniżej 10-100 ng/mL) wymagana jest metoda analityczna pozwalająca na jednoczesną analizę szerokiego panelu biomarkerów z odpowiednio niskimi granicami oznaczalności dla poszczególnych analitów. Złotym standardem jest chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas.

Biorąc pod uwagę różnice w budowie chemicznej wielu biomarkerów mikotoksyn, optymalizacja przygotowania próbek do analizy jest najtrudniejszym etapem w trakcie opracowywania metody analitycznej. Dlatego w pracy przeglądowej (praca 2.1) przedstawiono omówienie metod oznaczania mikotoksyn w próbkach moczu i surowicy świń.

W piśmiennictwie naukowym opisywano wiele sposobów przygotowania próbek moczu do analizy biomarkerów mikotoksyn (praca 2.1, Supplementary Material, Table S1). Po etapie ekstrakcji analitów z próbki metodą ciecz-ciecz autorzy wykorzystywali różnego rodzaju sposoby oczyszczenia ekstraktu m.in. ekstrakcja ciecz-ciało stałe, oczyszczenie ekstraktu z wykorzystaniem kolumnienek powinowactwa immunologicznego oraz metoda „rozcieńcz i nastrzyknij” (ang. dilute and shoot). Kolumnienki SPE i (w szczególności) IAC umożliwiają osiągnięcie bardzo niskich wartości LOQ, jednak dla wąskiego zakresu analitów – ograniczonego do ich selektywności. Ich wadą są również znaczne koszty analizy. Dlatego najbardziej efektywną i najczęściej wykorzystywaną metodą w analizie wieloskładnikowej (>20 mikotoksyn i ich metabolitów) jest metoda LLE. Najczęściej wykorzystywanymi rozpuszczalnikami do ekstrakcji jest acetonitryl i octan etylu (Song et al. 2013; Rui Guo and Xiao Ou 2015; Lauwers et al. 2019b).

Istnieją jednak dwa problemy, które nie zostały uwzględnione w dotychczasowych metodach wieloskładnikowych bazujących na metodzie LLE i wykorzystywanych do oznaczeń biomarkerów mikotoksyn w moczu świń (Song et al. 2013; Rui Guo and Xiao Ou 2015; Lauwers et al. 2019b).

Po pierwsze, DON i ZEN występują w moczu i surowicy u świń w postaci m.in. glukuronidów. Z powodu braku na rynku standardów glukuronidów mikotoksyn nie jest możliwe ich bezpośrednie oznaczenie. Aby oznaczyć je pośrednio w formie nieskoniugowanej jako formy podstawowe mikotoksyn, konieczne jest przeprowadzenie na etapie przygotowania próbki reakcji hydrolizy (np. hydrolizy enzymatycznej z wykorzystaniem enzymu beta-glukuronidazy). Warto podkreślić, że etapu tego nie uwzględnia żadna z dotychczas opracowanych metod wieloskładnikowych bazujących na LLE.

Ponadto mocz poszczególnych osobników może znacznie różnić się w zależności od płci, wieku, statusu zdrowotnego, a przede wszystkim diety, która wpływa na różną zawartość wody w moczu (Warth et al. 2013). Często stosowaną metodą normalizacji próbek moczu jest pomiar stężenia kreatyniny w moczu, który dostarcza nam informacji na temat rozcieńczenia moczu. Stężenia kreatyniny mogą się znacznie różnić między gatunkami, od niższych wartości oznaczanych u ludzi (0,28–2,59 mg/mL) (Arndt 2009) do znacznie wyższych oznaczanych u świń (0,07–10,8 mg/mL) (Tkaczyk and Jedziniak 2020). W przypadku biomarkerów mikotoksyn w moczu świń normalizację dla różnych rozcieńczeń moczu przeprowadzono tylko w trzech pracach (Thanner et al. 2016; Binder et al. 2017; Gambacorta et al. 2019). Dodatkowym aspektem wartym podkreślenia jest fakt stosowania przez innych autorów do oznaczania kreatyniny w moczu techniki spektrofotometrycznej (Ali et al. 2015; Franco et al. 2019), której wadą jest niska odporność na interferencje składników matrycy biologicznych (Lo and Tsai 1994). Test ELISA jest także powszechnie wykorzystywany do oznaczeń kreatyniny w moczu (Wallin et al. 2015), jednak cechuje się niską powtarzalnością uzyskiwanych wyników (Tkaczyk and Jedziniak 2020). Aspekt ten został szczegółowo opisany i rozwiązany w pracy, gdzie zastosowano w technikę HPLC uzyskując wiarygodne (powtarzalne) wyniki (Tkaczyk and Jedziniak 2020).

Aby rozwiązać powyższe problemy opracowano w ramach pracy doktorskiej nową metodę analityczną, która umożliwia jednoczesne oznaczenie 37 mikotoksyn i ich metabolitów w moczu świń oraz uwzględnia hydrolizę enzymatyczną jak i normalizację do stałego poziomu kreatyniny. Opisano ją dokładnie w pracy 1.2.

Opracowaną metodę (po stosowanych modyfikacjach) wykorzystano również do analizy próbek surowicy. Najczęściej wykorzystywaną metodą przygotowania próbek surowicy do analizy biomarkerów mikotoksyn jest, podobnie jak dla moczu, ekstrakcja z wykorzystaniem rozpuszczalników organicznych (De Baere et al. 2012; Devreese et al. 2012; Lauwers et al. 2019b). Najbardziej popularnym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji jest acetonitryl. Konieczna jest również hydroliza enzymatyczna, ponieważ DON wydalany jest w surowicy świń w ponad 30% w postaci glukuronidów (Dänicke et al. 2005a). Jednak tylko w jednej metodzie oznaczania ZEN i jego metabolitów wykorzystującej ekstrakcję ciec-z-ciecz, próbki przed analizą biomarkerów mikotoksyn inkubowano z beta-glukuronidazą (De Baere et al. 2012). Ponadto dotychczasowe metody nie uwzględniały szerokiego panelu mikotoksyn i ich metabolitów, które mogą występować w surowicy. Również proces walidacji istniejących metod najczęściej nie uwzględniał istotnego obecnie parametru walidacji metod: efektu matrycy. Niezbędne było więc opracowanie nowej metody, która nie tylko obejmuje szeroki zakres biomarkerów mikotoksyn, ale także umożliwia w sposób pośredni oznaczyć glukuronidy mikotoksyn w surowicy świń. Szczegółowy opis metody znajduje się w pracy 1.2.

2. Cel i zakres pracy

Celami niniejszej pracy było:

1. Opracowanie wieloskładnikowej metody oznaczania mikotoksyn w moczu i surowicy świń, która obejmowałaby możliwie najszerszy zakres biomarkerów mikotoksyn.
2. Weryfikacja biomarkerów narażenia dla mikotoksyn: DON, ZEN, OTA i CIT w płynach ustrojowych (mocz i surowica) świń.
3. Wyznaczenie wiarygodnej korelacji pomiędzy poziomem mikotoksyn w paszy, a stężeniem ich biomarkerów w matrycach biologicznych.
4. Wskazanie odpowiednich matryc (mocz, surowica) dla prowadzenia monitoringu biomarkerów narażenia dla wybranych mikotoksyn.
5. Ustalenie kinetyki biomarkerów mikotoksyn (DON, ZEN, OTA i CIT) w płynach ustrojowych (mocz i surowica) świń po podaniu paszy doświadczalnej naturalnie skażonej mikotoksynami na poziomach zbliżonych do poziomów rekomendowanych.

Zakres pracy:

1. Omówienie zagadnienia wpływu mikotoksyn na zdrowie świń, dotychczasowych badań *in vivo* na świniach oraz metod analitycznych stosowanych do analizy biomarkerów mikotoksyn (praca 2.1).
2. Opracowanie metody LC-MS/MS oznaczania biomarkerów mikotoksyn w moczu świń (dodatkowo optymalizacja procesu hydrolizy enzymatycznej) (praca 1.1) i surowicy świń (praca 1.2).
3. Walidacja opracowanych procedur analitycznych (prace 1.1 i 1.2).
4. Przygotowanie i analiza paszy o minimalnym skażeniu mikotoksynami oraz pasz naturalnie skażonych (dwa poziomy) mikotoksynami (DON, ZEN, OTA, CIT) do doświadczenia na świniach (praca 1.2).
5. Przeprowadzenie doświadczenia z udziałem świń, którym podawano paszę naturalnie skażoną mikotoksynami (praca 1.2).
6. Analiza próbek moczu i surowicy świń pochodzących z doświadczenia (praca 1.2).

3. Metodyka badań

Szczegółowy opis materiałów wykorzystanych do opracowania metod analitycznych i przeprowadzenia doświadczenia *in vivo* z wykorzystaniem świń zamieszczono w publikacjach (prace 1.1-1.2).

3.1 Opracowanie metod analitycznych

Etapy badań obejmowały:

- Przegląd piśmiennictwa i ustalenie listy analitów (3-AcDON, 15-AcDON, α -ZEL, α -ZAL, AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁, AOH, AME, ALTX-I, β -ZEL, β -ZAL, BEA, CIT, DAS, DH-CIT, DOM-1, DON, ENA, ENA₁, ENB, ENB₁, FB₁, FB₂, HFB₁, HT-2, NIV, OT α , OTA, STC, T-2, T-2 triol, TEN, ZAN, ZEN) oraz ich weryfikacja pod kątem możliwości analizy metodą wieloskładnikową;
- Optymalizacja warunków pracy detektora mas typu potrójny kwadrupol w zestawie LC-MS/MS:
 - ustalenie monitorowanych reakcji fragmentacji dla każdego analitu wraz z parametrami pracy detektora charakterystycznymi dla danego analitu tj. energia kolizji, czas zbierania danych, potencjał rozproszenia, napięcie na wyjściu z komory kolizyjnej;
 - ustalenie warunków pracy źródła jonów tj. rodzaj jonizacji, napięcie kapilary, temperatura, ciśnienie gazu osłonowego, ciśnienie gazu kolizyjnego, ciśnienie gazu rozpraszającego oraz ciśnienie gazu grzewczego;
- Optymalizacja warunków pracy LC:
 - dobór kolumny chromatograficznej;
 - dobór składu fazy ruchomej;
 - dobór optymalnego programu elucji gradientowej (testowanie temperatury i przepływu fazy ruchomej, ustalenie objętości dozowania i optymalnego czasu analizy).
- Optymalizacja procedury przygotowania próbek do analizy:
 - dobór warunków ekstrakcji analitów z matrycy;
 - dobór sorbentów do oczyszczania ekstraktów i optymalizacja ich składu.

3.2 Walidacja opracowanych metod

Procedurę poddano walidacji zgodnie z wytycznymi Europejskiej Agencji Leków dla walidacji metod bioanalitycznych (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) 2011) poprzez wyznaczenie następujących parametrów dla każdego analitu:

- liniowość i zakres roboczy:
 - analiza dwóch równoległych serii próbek wzbogaconych (sześć poziomów wzbogacenia);
- granica wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LLOQ=LOQ) jako najniższego stężenia, które wykryto i oznaczono z wystarczającym odzyskiem i precyzją:
 - analiza próbek substancji badanej o danym stężeniu po ekstrakcji z materiału biologicznego;
 - pik substancji badanej na chromatogramie musi być możliwy do identyfikacji;
 - stosunek wysokości sygnału pochodzącego od substancji badanej do szumów linii podstawowej w próbce ślepej musi wynosić co najmniej 3 ($S/N \geq 3$) (LOD);
 - stosunek wysokości sygnału pochodzącego od substancji badanej do szumów linii podstawowej w próbce ślepej musi wynosić co najmniej 5 ($S/N \geq 5$) (LLOQ);
- dokładność (odzysk) i precyzja (powtarzalność i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna);
 - analiza próbek wzbogaconych (cztery poziomy wzbogacenia);
 - analiza w sześciu powtórzeniach dla każdego poziomu stężeń;
 - porównanie stężenia oznaczonego ze stężeniem zaplanowanym;
 - obliczenie względnego odchylenia standardowego powtarzalności;
- efekt matrycy;
 - wyznaczenie współczynnika „IS normalised SSE” dla każdego analitu poprzez analizę sześciu różnych próbek ślepych oraz porównanie współczynnika nachylenia krzywej kalibracyjnej z matrycą próbki ze współczynnikiem nachylenia krzywej kalibracyjnej bez matrycy.

3.3. Przeprowadzenie doświadczenia z wykorzystaniem świń

Doświadczenie zostało przeprowadzone w Katedrze Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz przy Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie. Wszystkie działania wykonywane w trakcie doświadczenia przeprowadzane były zgodnie z przepisami w zakresie etyki badań na zwierzętach. Pozwolenie na przeprowadzenie doświadczenia na zwierzętach wydała Lokalna Komisja Etyczna ds. Doświadczeń na

Zwierzętach przy Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie (Nr Uchwały 42/2019).

Do badań użyto świnię w wieku około 4 tygodni pochodzącą z hodowli o wysokim statusie zdrowotnym (Jabłonowo, Polska). W czasie jednotygodniowej aklimatyzacji zwierzęta miały nieograniczony dostęp do wody i paszy o minimalnym skażeniu mikotoksynami. Świnie umieszczono w klatkach metabolicznych.

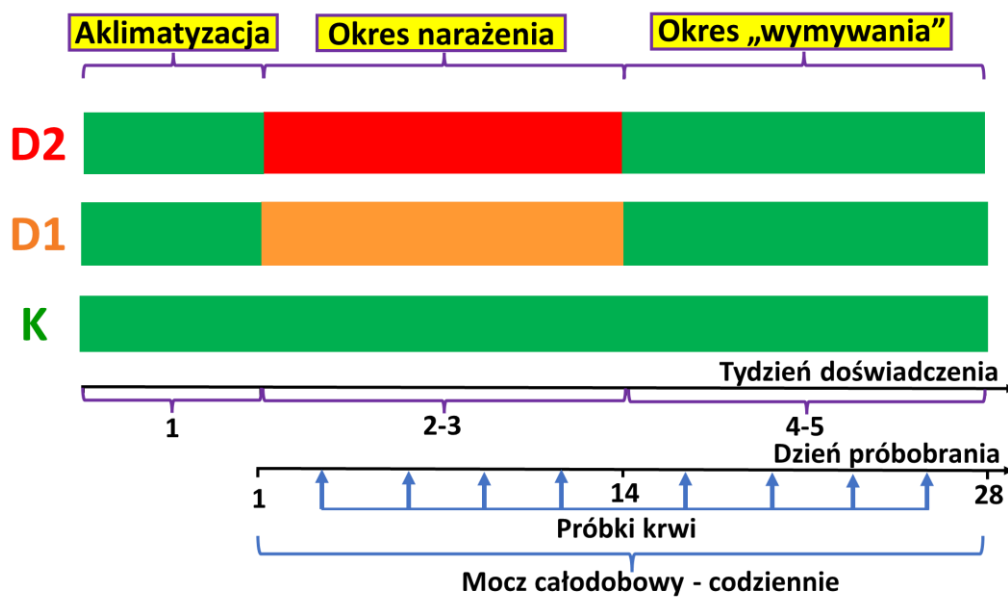
Eksperyment przeprowadzono na 24 świniami, które zostały podzielone na trzy grupy po osiem świń w każdej:

- Grupa kontrolna (K) – zwierzęta otrzymywały przez pięć tygodni paszę o minimalnym skażeniu mikotoksynami,
- Grupa doświadczalna D1 i grupa doświadczalna D2 - zwierzęta z tych grup przez pierwszy tydzień (aklimatyzacja) otrzymywały paszę o minimalnym skażeniu mikotoksynami, a przez dwa tygodnie (tydzień 2-3) karmione były dwa razy dziennie paszą skażoną mikotoksynami. Przez kolejne dwa tygodnie (tydzień 4-5) otrzymywały paszę o minimalnym skażeniu mikotoksynami w celu ustalenia kinetyki zanikania mikotoksyn. Stężenia mikotoksyn w paszy D1 były dwukrotnie mniejsze od grupy D2 (Ryc. 2.).

Pasza dla grup eksperymentalnych została przygotowana z naturalnie zanieczyszczonej mikotoksynami (DON, ZEN, OTA, CIT) kukurydzy oraz żyta, które było inokulowane na polu grzybami produkującymi DON gatunku *Fusarium culmorum* (paragraf 4.3).

Próbki całodobowego moczu pobierano każdego dnia rano z pojemników umieszczonych pod klatkami metabolicznymi. Po dokładnym wymieszaniu, pobierano około 50 mL moczu. Próbki następnie były wirowane (5000 g, 15 min, 4 °C) i przechowywane w zamrażarce (≤ -18 °C) do czasu analizy.

Próbki krwi były pobierane 3,5 h po podaniu paszy osiem razy w trakcie doświadczenia, mając na uwadze dobrostan zwierząt. Następnie próbki umieszczano w lodówce i po 4 h wirowano (3724 g, 10 min, 4 °C). Uzyskaną w ten sposób surowicę przechowywano w zamrażarce (≤ -18 °C) do czasu analizy.



Ryc.2. Schemat doświadczenia na świniach, K – grupa kontrolna, D1 - grupa doświadczalna otrzymująca paszę zanieczyszczoną mikotoksynami, D2 - grupa doświadczalna otrzymująca paszę zanieczyszczoną mikotoksynami, stężenia mikotoksyn w paszy dla grupy D1 były dwukrotnie mniejsze od stężeń w paszy dla grupy D2 (Tabela 3.).

4. Wyniki badań i dyskusja

4.1 Opracowanie metod analitycznych

W pracy 1.1 przedstawiono opracowaną i poddaną walidacji metodę oznaczania mikotoksyn oraz ich metabolitów w próbkach moczu świń.

Opracowana metoda umożliwia oznaczanie w moczu 37 związków, w tym wiele istotnych metabolitów mikotoksyn, techniką LC-MS/MS. Oznaczanie tak szerokiego zakresu związków, które w znacznym stopniu różnią się swoimi właściwościami fizykochemicznymi, możliwe było dzięki doborowi odpowiednich warunków ekstrakcji i oczyszczania próbek oraz optymalizacji analizy instrumentalnej.

Badania rozpoczęto od ustalenia warunków detekcji analitów z zastosowaniem techniki LC-MS/MS. Strojenie (z ang. tuning) spektrometru mas zostało przeprowadzone z zastosowaniem jonizacji typu ESI w trybie dodatnim (ESI+) i ujemnym (ESI-) poprzez dozowanie roztworu analitu o stężeniu 10 µg/mL rozpuszczonego w mieszaninie metanolu i wody (50/50; v/v) z natężeniem przepływu 10 µL/min bezpośrednio na detektor. Zoptymalizowane parametry pracy źródła jonów przedstawiono na Ryc.3. Do zbierania danych wykorzystano tryb MRM i monitorowano jeden jon macierzysty i 1-2 jony potomne (praca 1.1, Supplementary Material, Table S1-S2).

Kolejnym krokiem była optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego. Testowano kilka różnych kolumn analitycznych i faz ruchomych, a także różne programy gradientu (szczegółowo opisane w pracy 1.1), aby uzyskać zadowalającą retencję, rozdzielenie i kształt pików. Optymalne warunki pracy chromatografu cieczowego przedstawiono na rycinie 3.

Opracowane warunki pracy spektrometru mas i chromatografu cieczowego były takie same dla analiz próbek moczu i surowicy.

Przygotowanie moczu do analizy biomarkerów mikotoksyn było istotnym wyzwaniem analitycznym ze względu na skład próbki, zróżnicowanie fizykochemiczne analitów oraz niskie poziomy ich występowania w matrycach biologicznych (praca 2.1). Testowano najczęściej wykorzystywane metody przygotowania próbek moczu: kolumnienki SPE, IAC i LLE. Zastosowanie kolumnienek SPE skutkowało interferencjami ze składnikami matrycy w badanym zakresie stężeń, co spowodowało uzyskanie znacznie wyższych wartości LOD/LOQ poszczególnych mikotoksyn w porównaniu do dwóch pozostałych metod. Najniższe wartości LOD/LOQ analitów uzyskano po zastosowaniu kolumnienek IAC. Należy jednak uwzględnić ich wysoki koszt, a także ograniczoną do

zakresu ich selektywności liczbę analitów, które można oznaczyć z ich wykorzystaniem. Metoda LLE umożliwiła stosunkowo niedrogi i odpowiedni (niskie wartości LOQ) sposób oczyszczenia próbki dla szerokiego zakresu mikotoksyn, dlatego została wybrana do dalszej optymalizacji.

Zanim przystąpiono do optymalizacji metody LLE rozwiązano dwa ważne problemy analityczne (opisane w paragrafie 1.3).

Bardzo ważnym etapem była optymalizacja hydrolizy enzymatycznej. Po raz pierwszy dla moczu świń, wybrano odpowiednie warunki: enzym (β -glukuronidaza z *E. coli*), temperaturę i czas inkubacji (2 h, 40 °C).

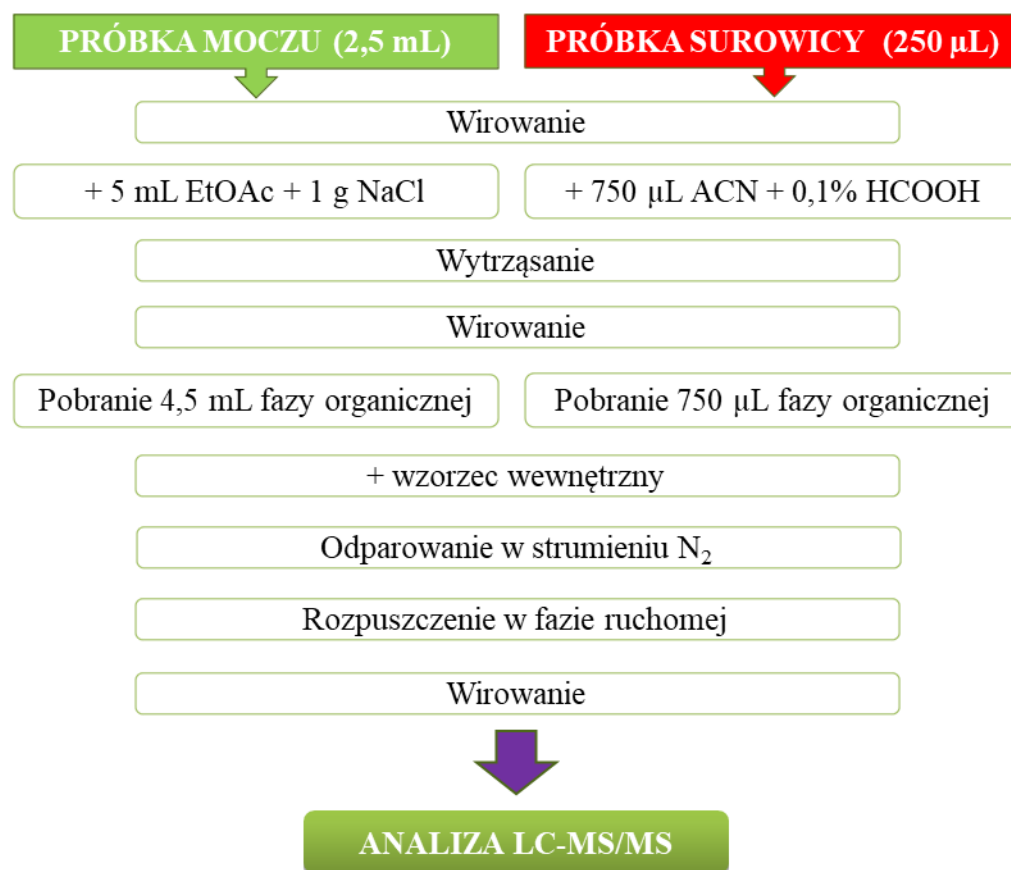
Niezbędne było również opracowanie wiarygodnej metody HPLC-UV oznaczania kreatyniny w moczu świń i wykorzystania jej do normalizacji moczu o różnej zawartości wody (Tkaczyk and Jedziniak 2020).

Po rozwiązaniu tych istotnych, a pomijanych we wcześniejszych metodach oznaczania biomarkerów mikotoksyn, problemów analitycznych przystąpiono do optymalizacji nowej metody LLE. Aby uzyskać jak najlepszą efektywność ekstrakcji, testowano odzyski ekstrakcji analitów przy użyciu dwóch rozpuszczalników (ACN i EtOAc) (Sun et al. 2014; Rui Guo and Xiao Ou 2015; Lauwers et al. 2019b), przy różnych wartościach pH moczu (3,9; 6,5; 7,5) i dodatku różnych soli ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$, NaCl i MgSO_4). Najbardziej efektywnym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji dla większości mikotoksyn z moczu świń okazał się octan etylu stosowany przy pH moczu równym 7,5. Dodatkowo, aby zwiększyć odzysk istotnego analitu (OTA) już na etapie ekstrakcji zastosowano dodatek chlorku sodu. W przypadku analiz moczu świń dodatek soli (2M MgSO_4) na etapie ekstrakcji zastosowano tylko raz dla metody wieloskładnikowej (Song et al. 2013).

Przygotowanie próbek surowicy do analiz bazowało na ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym i precypitacji białka. Testowano różne rozpuszczalniki i ich mieszaniny (ACN, ACN (0,1% HCOOH), MeOH i ACN:MeOH (1:1)), aby uzyskać jak najlepszą efektywność ekstrakcji. Dotychczas najczęściej wykorzystywanym rozpuszczalnikiem był ACN (praca 2.1, Supplementary Material, Table S1). Optymalizacja tej metody została szczegółowo opisana w pracy 1.2. Aby uzyskać odpowiednią efektywność ekstrakcji dla fumonizyn (>60%) niezbędny był dodatek 0,1% HCOOH do ACN. Zakwaszony ACN (0,1% HCOOH) został także użyty do ekstrakcji wielu mikotoksyn z surowicy w ostatnio opracowanej metodzie LLE (Lauwers et al. 2019b). Przed ekstrakcją zastosowano, podobnie jak w przypadku analizy moczu,

hydrolizę enzymatyczną w celu pośredniego oznaczenia glukuronidów mikotoksyn. Spośród dwóch opracowanych dotychczas metod wieloskładnikowych oznaczania mikotoksyn w surowicy świń (Devreese et al. 2012; Lauwers et al. 2019b), żadna nie uwzględniała hydrolizy enzymatycznej.

Oczyszczone ekstrakty analizowano z zastosowaniem techniki LC-MS/MS (Ryc.3.).



Kolumna analityczna	Luna Omega Polar (2 × 150 mm, 3 µm)		Temperatura źródła jonów	350 °C
Faza ruchoma	MeOH : 0.01M NH ₄ OAc A(95:5), B(5:95)		Ciśnienie gazu 1	60 psi
Przepływ	600 µL/min		Ciśnienie gazu 2	35 psi
Temperatura kolumny	35 °C		Energia jonizacji	+/- 4000 V
Nastrzyk	5 µL		Ciśnienie gazu kurtynowego	40 psi

AGILENT 1260 AB SCIEX QTRAP 6500

Ryc. 3. Schemat opracowanych procedur analitycznych dla analizy biomarkerów mikotoksyn w próbkach moczu i surowicy świń.

4.2 Walidacja procedur

Procedury poddano walidacji zgodnie z wytycznymi EMEA dla metod bioanalitycznych (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) 2011). Parametry walidacyjne wyznaczono dla czterech poziomów stężeń (szczegółowo opisane w pracach 1.1 (dla moczu) oraz 1.2 (dla surowicy)).

Uzyskano niskie wartości LLOQ w zakresie 0,1–8 ng/mL dla moczu oraz 0,02–4 ng/mL dla surowicy. Wartości te są porównywalne z innymi metodami wieloskładnikowymi bazującymi na ekstrakcji ciecz-ciecz (Lauwers et al. 2019b).

Analiza próbek moczu wzbogaconych mikotoksynami wykazała dokładność 74,0 – 112% (o obrębie jednego dnia) oraz 75,4 – 106% (między kolejnymi dniami) (praca 1.1, Table 1). Dla próbek surowicy uzyskano dokładność 83,1 – 112% (o obrębie jednego dnia) i 98,8 – 109% (między kolejnymi dniami). Wszystkie analizy oznaczono z odpowiednią precyzją, wartość CV było poniżej 20% (praca 1.2, Supplementary Material, Table S2).

Ponadto wyznaczono dokładność i precyzję dla dwóch różnych próbek moczu i surowicy (n=6). Uzyskano bardzo wysoki odzysk: 99,5 – 101% (mocz) i 97,4 – 115% (surowica) oraz precyzję: 5,3 – 17,9% (CV%, mocz) i 5,27 – 12,7% (CV%, surowica), co wskazuje na bardzo dobrą odtwarzalność opracowanych metod (praca 1.1, Table 1).

Należy podkreślić, że odzysk ekstrakcji, odzysk całkowity oraz efekt matrycy wyznaczono dla sześciu różnych próbek moczu i surowicy (najczęściej był on wyznaczany jedynie dla jednej próbki) (praca 1.1, Supplementary Material, Table S1a). Większość analitów wykazało odzysk ekstrakcji w zakresie 60–110% w przypadku obydwu matryc. Podobne wartości uzyskano w ostatnio opublikowanej metodzie wieloskładnikowej (Lauwers et al. 2019b).

Podczas analizy próbek moczu znaczną supresję sygnału (SSE<80%) zaobserwowano dla: CIT, α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL, β -ZAL, ZAN, STC, AOH, ATX-I, OT α a znaczne wzmocnienie sygnału (SSE>120%) zaobserwowano dla: NIV, FUS-X, DOM-1, DON, AFG₁, ENA, T-2 triol, HFB₁. W przypadku analizy próbek surowicy znaczna supresja sygnału występowała dla: AFB₂, AFG₁, AFG₂, 15-AcDON, DH-CIT, T-2 triol i FB₁ a znaczne wzmocnienie sygnału dla: CIT, DOM-1, DON, AFB₁, 3-AcDON, DAS, HT-2, ENB₁, ENA₁, ENA, BEA i AOH. Niezbędne więc było użycie standardów wewnętrznych oraz przygotowywanie krzywych kalibracyjnych z matrycy, by kompensować efekt matrycy. W dotychczasowych metodach wieloskładnikowych

oznaczania mikotoksyn w moczu świń efekt matrycy przedstawiono tylko w jednej pracy i zauważono znaczną supresję sygnału dla mikotoksyn tj. AOH, AME, DON, DOM-1, 3-/15-AcDON, AFB₁ and AFM₁ (Lauwers et al. 2019b). W moczu ludzkim w metodach wieloskładnikowych efekt matrycy był wyznaczany bardzo często (Solfrizzo et al. 2011; Shephard et al. 2013; Ezekiel et al. 2018).

Bardzo ważnym krokiem w trakcie walidacji było wyznaczenie CV współczynnika IS-normalised-SSE – po raz pierwszy dla sześciu różnych próbek moczu (praca 1.1, Supplementary Material, Table S4) i surowicy (praca 1.2, Supplementary Material, Table S3). Był on niższy niż 15% dla większości analitów dla obydwu matryc, co wskazuje na bardzo dobrą odtwarzalność metod.

Dla ZAN, α -ZAL, β -ZAL i β -ZEL w moczu wyznaczono dodatkowo poprawność metody poprzez analizę materiału referencyjnego (mocz bydłęcy), który zawierał ZAN, α -ZAL, β -ZAL and β -ZEL. Wyznaczone eksperymentalnie wartości stężeń były zgodne z wartościami certyfikowanymi, co potwierdza poprawność opracowanej metody (praca 1.1, Table 2).

Wyniki te spełniają kryteria walidacji dla wszystkich mikotoksyn, co potwierdza wiarygodność opracowanych metod analitycznych.

W opracowanych metodach uwzględniono mikotoksyny, które nie były wcześniej oznaczane w moczu świń: NIV, CIT, DH-CIT, FUS-X, ALTX-I, TEN i HFB₁. Zostały one wykorzystane w badaniach próbek moczu i surowicy pochodzących z doświadczenia na świniach.

4.3 Poziomy mikotoksyn w paszach doświadczalnych

Dzięki nowatorskiemu przygotowaniu paszy doświadczalnej możliwe było przeprowadzenie po raz pierwszy doświadczenia z wykorzystaniem pełnowartościowej naturalnie skażonej paszy dla świń zawierającej 4 mikotoksyny (DON, ZEN, OTA, CIT). W przypadku DON poziom skażenia paszy był zbliżony do poziomu rekomendowanego przez UE. Pozwoliło to na bardzo dobre odzwierciedlenie rzeczywistego narażenia świń na mikotoksyny.

Uwzględniono dwie najczęściej występujące w zbożach w Europie mikotoksyny: DON i ZEN. Dodatkowo kukurydza wykorzystana do przygotowania paszy była naturalnie zanieczyszczona CIT i OTA. Jest to bardzo istotne, ponieważ biomarkery tych mikotoksyn były bardzo rzadko analizowane u świń (paragraf 1.3). Ze względu na fakt, że pasza była skażona w sposób naturalny, nie było możliwe zawarcie w niej wszystkich

mikotoksyn regulowanych prawnie, ponieważ niektóre z nich np. AFB₁ bardzo rzadko występują w naszym klimacie.

Skażone materiały paszowe (kukurydzę, żyto) oraz wytworzoną z nich paszę analizowano na zawartość mikotoksyn przy użyciu wcześniej opracowanej metody LC-MS/MS (Jedziniak et al. 2019) (Tabela 3.).

Parametry przygotowanej paszy spełniały wymagania dla żywienia świń (praca 1.2, Supplementary Material, Table S4-S5).

Tabela 3. Średnie poziomy mikotoksyn ± odchylenie standardowe w kukurydzy, życie oraz paszy [$\mu\text{g}/\text{kg}$] wraz z wartościami współczynnika zmienności (CV) dla paszy wraz z wartościami rekomendowanymi przez Unię Europejską (UE) (European Commission 2006).

Mikotoksyna	Kukurydza	Żyto	Poziom UE*	Pasza dla grupy K	CV [%]	Pasza dla grupy D1	CV [%]	Pasza dla grupy D2	CV [%]
DON	1200 ± 103	4200 ± 234	900	<225	-	559 ± 23,0	4,11	1126 ± 91,4	8,12
ZEN	76,4 ± 11,2	6,34 ± 3,24	100**	<25	-	15,8 ± 2,11	13,3	34,7 ± 4,34	12,5
OTA	535 ± 32,4	n.d.	50	4,46 ± 0,48	10,8	114 ± 8,38	7,33	226 ± 21,8	9,68
CIT	207 ± 24,8	n.d.	-	7,50 ± 1,05	14,1	35,7 ± 5,02	14,1	71,3 ± 8,28	11,6

* Poziom rekomendowany UE

** Mieszanki paszowe uzupełniające i pełnoporcjowe dla prosiąt i loszek (młodych macior)

4.4 Poziomy biomarkerów mikotoksyn w płynach ustrojowych po spożyciu paszy doświadczalnej

Dotychczasowe badania *in vivo* na świniami podsumowano w pracy 2.1. Pobieranie próbek biologicznych od świń jest znacznie trudniejsze niż od ludzi, dlatego w trakcie ostatnich dwudziestu lat przeprowadzono kilka doświadczeń z ich udziałem (praca 2.1, Table 2-4) - dotyczyły one głównie DON i ZEN (Döll et al. 2003; Dänicke et al. 2004; Gambacorta et al. 2013; Brezina et al. 2014; Thanner et al. 2016).

Szczegółowe wyniki doświadczenia na świniami przeprowadzonego w ramach pracy doktorskiej przedstawione są w pracy 1.2.

4.4.1 Poziomy biomarkerów mikotoksyn w moczu świń

W trakcie doświadczenia świnię umieszczone były w klatkach metabolicznych, co pozwoliło na pobieranie moczu całodobowego, w odróżnieniu do większości doświadczeń, w których mocz pobierano 3-4 godziny przed ubojem świń (Döll et al. 2003; Dänicke et al. 2005a; Brezina et al. 2014). Biorąc pod uwagę różny czas wydalania mikotoksyn (zazwyczaj dłuższy niż 4 h) mocz całodobowy dostarcza bardziej wiarygodnych danych.

W każdej próbce moczu oznaczono poziom kreatyniny. Stężenia kreatyniny w moczu całodobowym były znacznie niższe niż oznaczone w próbkach moczu świń, które pobierano bezpośrednio przed ubojem (Tkaczyk and Jedziniak 2020). Może być to spowodowane znacznie większą zawartością wody w moczu całodobowym, a także innymi czynnikami np. inną masą mięśniową świń.

W moczu świń grup eksperymentalnych oznaczono w znacznych stężeniach biomarkery: DON (DON, DOM-1), ZEN (ZEN, α -ZEL), OTA (OTA, OT α) i CIT (CIT, DH-CIT) (Tabela 4.). Stężenia wszystkich mikotoksyn oznaczonych w moczu były bardzo dobrze skorelowane ($r > 0,978$; $P < 0,001$) z ich zawartością w paszy, co potwierdza, że są odpowiednimi biomarkerami mikotoksyn w moczu świń. Dodatkowo oznaczono jedynie ślady DON i ZEN w moczu grupy kontrolnej, co potwierdza, że pasza była wolna od istotnych zanieczyszczeń mikotoksynami dla tej grupy.

Stężenia biomarkerów DON (DON i DOM-1) w moczu były znacznie wyższe niż oznaczone w moczu we wcześniejszych doświadczeniach z wykorzystaniem świń (praca 1.2, Supplementary Material, Table S1). Może być to spowodowane innym układem doświadczenia (mocz całodobowy, a mocz pobierany przed ubojem; pasza naturalnie skażona, a pasza wzbogacona wzorcem mikotoksyn). W dwóch pracach do oznaczania biomarkerów w moczu zastosowano mniej selektywną metodę HPLC-DAD (Döll et al. 2003; Dänicke et al. 2005a), co również mogło mieć wpływ na wyniki oznaczeń.

W przypadku biomarkerów ZEN (ZEN i α -ZEL), ich stężenia oznaczone w moczu były podobne do stężeń oznaczonych w innych doświadczeniach, jednak występowały znaczne rozbieżności w wynikach oznaczeń w obrębie grup eksperymentalnych, jak i pomiędzy grupami (podobnie jak w przypadku biomarkerów DON) (praca 1.2, Supplementary Material, Table S1). Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej, wyróżnia od pozostałych wartość $CV < 20\%$, co umożliwiło wyznaczenie

wiarygodnej relacji pomiędzy poziomem mikotoksyn w paszy, a ich biomarkerów w moczu. W moczu nie oznaczono (<LLOQ) pozostałych biomarkerów ZEN: β -ZEL, α -ZAL, β -ZAL i ZAN. Jest to spowodowane prawdopodobnie małą zawartością ZEN w paszy dla grup eksperymentalnych (16-35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ paszy). Śladowe ilości tych biomarkerów (<1 ng/mL) udało się oznaczyć w moczu, gdy świniom podawano paszę skażoną ZEN w stężeniu ponad 2-krotnie wyższym niż w opisywanym doświadczeniu (Brezina et al. 2014).

Bardzo mało jest danych dotyczących biomarkerów OTA w moczu świń. Do tej pory oznaczano tylko związek macierzysty jako jedyny biomarker OTA, którego stężenie było znacznie niższe niż w opisywanym doświadczeniu (Gambacorta et al. 2013; Pleadin et al. 2016). Przyczyną różnic może być fakt, że w obydwu wcześniejszych doświadczeniach podawano świniom paszę wzbogaconą wzorcem mikotoksyn, w przeciwieństwie do paszy naturalnie skażonej mikotoksynami użytej w doświadczeniu przeprowadzonym w ramach tej pracy doktorskiej.

Po raz pierwszy oznaczono w moczu świń metabolit OTA – $\text{OTA}\alpha$. Stężenie $\text{OTA}\alpha$ było około 3-krotnie niższe niż OTA, co pokazuje, że jest istotnym biomarkerem OTA w moczu i powinien być również oznaczany w moczu. Nie był on uwzględniony również w niedawno przeprowadzonym monitoringu mikotoksyn u świń (Gambacorta et al. 2019), co mogło prowadzić do niekompletnych wyników.

Warto podkreślić, że uzyskane wyniki są pierwszym doniesieniem na temat biomarkerów CIT (mikotoksyna stosunkowo często występująca w paszy, nie regulowana przez prawo UE) w moczu świń. CIT i jej metabolit DH-CIT (oznaczony na podobnym poziomie jak CIT) są odpowiednimi biomarkerami w moczu świń, ponieważ podobnie jak w przypadku pozostałych analizowanych mikotoksyn ich stężenie w moczu było bardzo dobrze skorelowane z odpowiadającymi im poziomami CIT w paszy.

OTA i CIT to mikotoksyny wytwarzane przez grzyby z gatunku *Penicillium* i *Aspergillus* (Wang et al. 2016), które stosunkowo często współwystępują w żywności (Doughari 2015). Ostatnio biomarkery OTA i CIT w moczu posłużyły do oceny narażenia ludzi w Bangladeszu na te mikotoksyny (Gerding et al. 2015). Jednak u świń, współwystępowanie biomarkerów OTA i CIT zostało przedstawione po raz pierwszy w przeprowadzonych badaniach opisanych w publikacji 1.2 stanowiącej część niniejszej pracy doktorskiej.

Tabela 4. Stężenia biomarkerów mikotoksyn (średnie \pm odchylenie standardowe (SD)) oznaczone w moczu świń grupy kontrolnej (K), D1 i D2 w trakcie pierwszych dwóch tygodni doświadczenia.

Biomarker	LLOQ	Grupa K		Grupa D1		Grupa D2	
		Średnie stężenie	Zakres stężeń	Średnie stężenie	Zakres stężeń	Średnie stężenie	Zakres stężeń
[ng/mL]							
DON	2,0	4,05 \pm 0,83	2,11-7,27	45,3 \pm 9,58	16,6-87,8	92,4 \pm 11,6	51,5-127
DOM-1	6,0	<LLOQ	-	9,50 \pm 2,51	2,06-20,1	24,2 \pm 4,47	8,96-42,3
ZEN	0,1	0,38 \pm 0,12	0,15-1,66	1,63 \pm 0,29	0,49-2,96	2,63 \pm 0,71	0,55-6,51
α -ZEL	0,4	<LLOQ	-	1,29 \pm 0,31	0,43-2,46	2,10 \pm 0,55	0,68-4,42
OTA	1,5	<LLOQ	-	18,8 \pm 6,40	2,38-39,1	36,5 \pm 11,6	5,76-77,2
OT α	4,0	<LLOQ	-	9,48 \pm 2,62	3,87-17,8	16,2 \pm 5,49	4,04-28,5
CIT	1,5	<LLOQ	-	30,6 \pm 4,17	20,1-44,9	64,9 \pm 6,45	44,7-89,5
DH-CIT	4,0	<LLOQ	-	31 \pm 6,63	13,9-59,9	61,1 \pm 5,94	40,5-81,3

4.4.2 Poziomy biomarkerów mikotoksyn w surowicy świń

W przypadku biomonitoringu w surowicy powinno się uwzględnić dane toksykokinetyczne, aby prawidłowo dobrać czas pobrania próbek. DON i ZEN, w przeciwieństwie do CIT i OTA, są szybko uwalniane z krwi, a ich stężenie we krwi maleje bardzo szybko. Ważną informacją jest zatem czas, kiedy osiągają one maksymalne stężenie w krwi.

Dla DON wartość ta to 3-4 h (Eriksen et al. 2003; Lauwers et al. 2019a), dlatego w doświadczeniu krew była pobierana 3-4 h po spożyciu paszy przez świnię. Maksymalne stężenie ZEN i jego metabolitów jest osiągnięte już po 15-120 min (Fleck et al. 2017; Catteuw et al. 2019), i prawdopodobnie dlatego nie oznaczono ich w pochodzących z doświadczenia próbkach surowicy powyżej wartości LLOQ (0,05 ng/mL). Z kolei, OTA i CIT mają bardzo długi czas eliminacji z krwi – 72-120 h (Dietrich et al. 2005) i 17-26 h (Meerpoel et al. 2020), dlatego zostały oznaczone w surowicy świń.

Biomarkery ZEN oznaczono w surowicy świń przy użyciu metody LC-MS/MS (LLOQ dla ZEN wynosiło 0,08 ng/mL) tylko w jednym doświadczeniu z wykorzystaniem świń (Brezina et al. 2014). Stężenia ZEN tylko u niektórych świń nieznacznie wzrosło od 0,1 do 0,5 ng/mL po podaniu paszy zawierającej od 10 do 290 µg ZEN/kg paszy. Oprócz ZEN oznaczono także jego metabolit α -ZEL, jednak jedynie u niektórych świń w grupie, której podawano pasze o większych zawartościach ZEN (170-290 µg/kg paszy). Surowica nie jest zatem odpowiednią matrycą do oznaczeń biomarkerów ZEN. Ich stężenia były bardzo małe i niepowtarzalne nawet, gdy świniom karmiono paszą o stężeniu ZEN trzykrotnie większym niż poziom rekomendowany. W surowicy świń grup eksperymentalnych oznaczono głównie formy macierzyste mikotoksyn (Tabela 5.) – w przeciwieństwie do moczu, w którym oprócz form macierzystych oznaczono znaczne stężenia metabolitów mikotoksyn (Tabela 4.). W surowicy oznaczono następujące biomarkery: DON (DON), CIT (CIT, DH-CIT - w grupie D2) oraz OTA (OTA, OT α – w grupie D2). Stężenia wszystkich biomarkerów w surowicy były znacznie niższe niż ich stężenia w moczu. Wyjątkiem była OTA, której stężenie było 8-krotnie wyższe od stężenia oznaczonego w moczu.

Stężenia wszystkich mikotoksyn oznaczonych w surowicy (podobnie jak w moczu) były bardzo dobrze skorelowane ($r > 0,999$; $P < 0,001$) z ich zawartością w paszy, co potwierdza, że są odpowiednimi biomarkerami mikotoksyn w surowicy świń. Dodatkowo oznaczono jedynie ślady OTA i CIT w surowicy grupy kontrolnej, co potwierdza, że pasza była wolna od istotnych zanieczyszczeń mikotoksynami dla tej grupy.

DON jest jedynym biomarkerem DON oznaczonym w surowicy świń. Jego stężenia były podobne do stężeń oznaczonych w poprzednich doświadczeniach (praca 1.2, Supplementary Material, Table S1). Gdy świniom podawano paszę o większej zawartości DON (>2010 µg DON/kg paszy) niż w naszym doświadczeniu (1126 µg DON/kg paszy), w niektórych próbkach surowicy świń oznaczono także metabolit DON - DOM-1 (Brezina et al. 2014).

W próbkach surowicy jednym oznaczanym dotychczas biomarkerem OTA był jej związek macierzysty OTA. Jej stężenie w surowicy było porównywalne w przeprowadzonym doświadczeniu do stężeniu uzyskanego w innych badaniach, w których świniom podawano paszę naturalnie skażoną mikotoksynami (Stoev et al. 2002; Aoudia et al. 2009). Jednak w doświadczeniach, w których świniom karmiono paszą wzbogaconą wzorcem mikotoksyn uzyskano znacznie niższe stężenia OTA w surowicy

niż w doświadczeniu przeprowadzonym w ramach tej pracy doktorskiej (podobnie jak w przypadku moczu) (Pleadin et al. 2016; Altafini et al. 2017).

Tabela 5. Stężenia mikotoksyn (średnie \pm odchylenie standardowe (SD)) oznaczone w surowicy świń grupy kontrolnej (K), D1 i D2 w trakcie pierwszych dwóch tygodni doświadczenia.

Biomarker	LLOQ	Grupa K		Grupa D1		Grupa D2	
		Średnie stężenie	Zakres stężeń	Średnie stężenie	Zakres stężeń	Średnie stężenie	Zakres stężeń
[ng/mL]							
DON	2	<LLOQ	-	7,13 \pm 1,26	5,42-8,42	14,3 \pm 1,06	12,8-15,3
OTA	2	<LLOQ	-	141 \pm 47,9	71,5-177	278 \pm 106	129-368
OT α	0,5	<LLOQ	-	<LLOQ	-	0,69 \pm 0,10	0,51-1,10
CIT	0,5	<LLOQ	-	5,77 \pm 1,07	4,50-6,78	13,03 \pm 1,20	12,3-14,8
DH-CIT	0,1	<LLOQ	-	<LLOQ	-	2,76 \pm 0,55	2,02 – 3,83

4.5 Kinetyka biomarkerów mikotoksyn w płynach ustrojowych świń

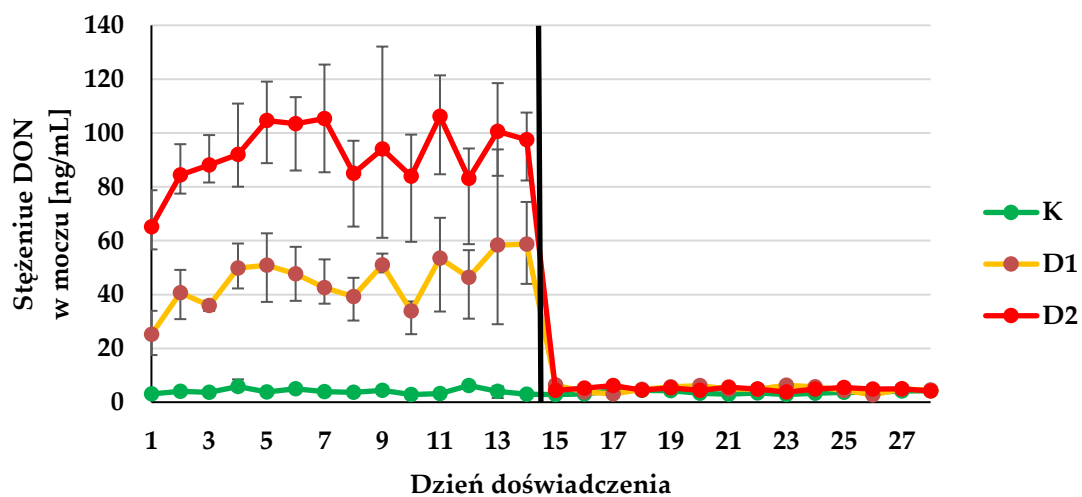
Przedłużony eksperyment (14 dni podawania pasz eksperymentalnych i 14 kolejnych dni podawania paszy wolnej od mikotoksyn) przeprowadzony w ramach niniejszej pracy doktorskiej pozwolił nie tylko wybrać najważniejsze biomarkery DON, ZEN, CIT i OTA, ale także określić kinetykę biomarkerów mikotoksyn (praca 1.2), co nie było uwzględnione we wcześniejszych doświadczeniach *in vivo*.

Biomarkery wszystkich analizowanych mikotoksyn (DON, ZEN, OTA i CIT) oznaczono w moczu i surowicy świń już w pierwszym dniu po podaniu paszy skażonej mikotoksynami.

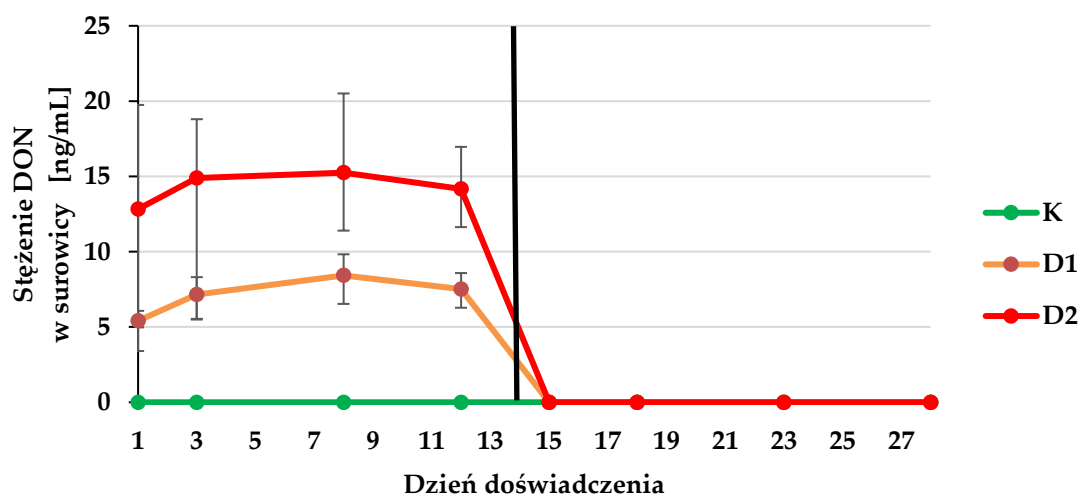
Średnie poziomy biomarkerów DON i CIT w obydwu matrycach oraz ZEN w moczu utrzymywały się na stałym poziomie w trakcie dwutygodniowej ekspozycji świń na paszę skażoną mikotoksynami, co przedstawiono na przykładzie DON w moczu i surowicy na Ryc. 4-5.

Średni poziom biomarkerów OTA (OTA i OT α) w moczu i surowicy z trzech pierwszych dni podawania paszy skażonej mikotoksynami był znacznie niższy niż średni poziom biomarkerów z kolejnych 11 dni (Ryc. 6-7). Biomarkery OTA osiągają więc stały poziom w moczu i surowicy po 4 dniach podawania paszy skażonej mikotoksynami.

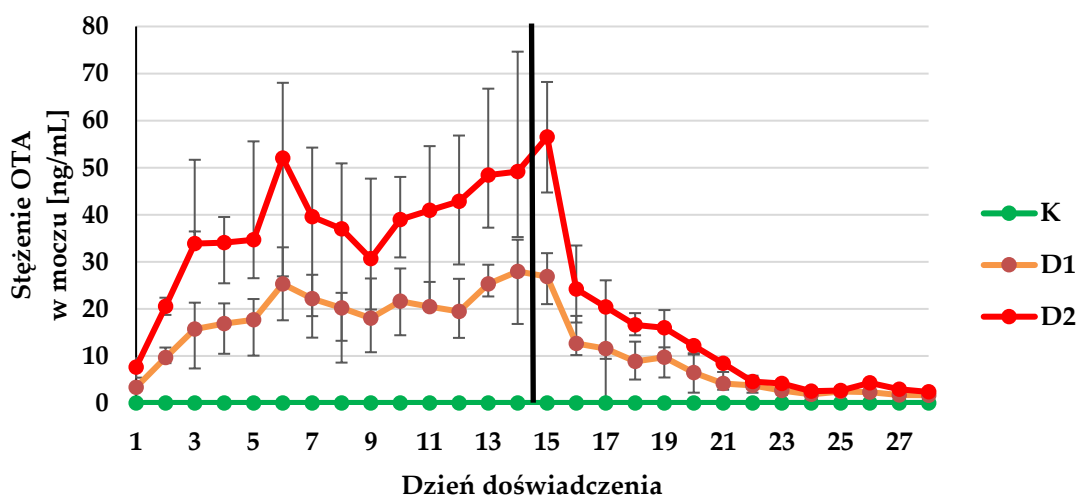
Jest to bardzo istotna obserwacja, która wskazuje na potrzebę prowadzenia biomonitoringu OTA przez dłuższy czas – minimum czterech dni w trakcie podawania paszy skażonej tą mikotoksyną, aby zaobserwować ewentualne zmiany poziomu biomarkerów OTA.



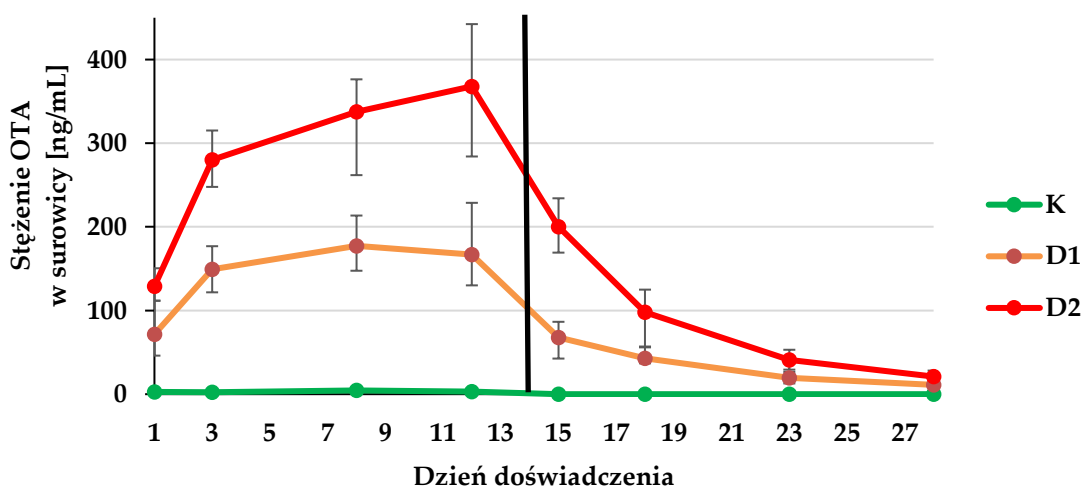
Ryc. 4. Średnie stężenia DON (+/- SD) oznaczone w moczu. Dzień 1-14 – okres narażenia, dzień 15-28 – okres wymywania.



Ryc. 5. Średnie stężenia DON (+/- SD) oznaczone w surowicy. Dzień 1-14 – okres narażenia, dzień 15-28 – okres wymywania.



Ryc. 6. Średnie stężenia OTA (+/- SD) oznaczone w moczu.
Dzień 1-14 – okres narażenia, dzień 15-28 – okres wmywania.



Ryc. 7. Średnie stężenia OTA (+/- SD) oznaczone w surowicy.
Dzień 1-14 – okres narażenia, dzień 15-28 – okres wmywania.

Po zamianie paszy skażonej mikotoksynami na paszę o minimalnym skażeniu mikotoksynami (dzień 15.) już pierwszego dnia oznaczono jedynie ślady DON i ZEN w moczu i surowicy świń pobranych od obydwu grup eksperymentalnych jak i grupy kontrolnej. Spośród metabolitów w grupie D2 oznaczono jedynie: DOM-1 w dniu 15. i α -ZEL w dniu 15. i 16. w malejących stężeniach. Biomarkery DON i ZEN szybko się pojawiają w moczu i szybko z niego znikają, co dowodzi również niskiej kumulacji DON i ZEN w organizmie. Powyższa obserwacja jest zgodna

z poprzednimi wynikami doświadczeń na świniaach, które wskazują, że największa część ZEN i jego metabolitów ($20 \pm 11\%$ dawki ZEN przyjętej wraz z paszą) (Binder et al. 2017) oraz DON i jego metabolitów ($84.8 \pm 9.7\%$) (Nagl et al. 2014) wydalana jest z moczem w ciągu pierwszych 24 godzin po podaniu paszy skażonej mikotoksynami.

W przeciwieństwie do DON i ZEN, biomarkery OTA i CIT oznaczane były w moczu i surowicy nawet w ostatnich dniach podawania świniom paszy wolnej od mikotoksyn. Jest to pierwsze doniesienie na temat kinetyki zanikania OTA i CIT w moczu świń. Wskazuje ono na fakt bardzo długiego okresu zanikania biomarkerów tych mikotoksyn oraz długotrwałego narażenia świń na te mikotoksyny.

W Tabeli 6. zebrano informacje na temat biomarkerów mikotoksyn, a także ich kinetyki uzyskane w przeprowadzonym doświadczeniu.

Tabela 6. Biomarkery mikotoksyn oznaczone w moczu i surowicy świń, czas ich zanikania (pogrubione zostały biomarkery, których stężenie było najwyższe).

Mikotoksyna w paszy	Biomarker w moczu		Biomarker w surowicy		Dzień osiągnięcia stałej wartości biomarkera
	Mediana stężenia grupa D1 – D2 [ng/mL]	Czas zanikania	Mediana stężenia grupa D1 – D2 [ng/mL]	Czas zanikania	
DON	DON (45-92) DOM-1 (8-24)	< 48 h	DON (7-14)	< 48 h	1
ZEN	ZEN (1,5-2,3) α -ZEL (1,2-1,9)	< 72 h	ZEN (<LLOQ)	-	1
OTA	OTA (20-35) OTα (9-17)	> 14 dni > 6 dni	OTA (152-296)	> 14 dni	4
CIT	CIT (31-65) DH-CIT (31-63)	> 2 dni > 9 dni	CIT (6-13)	> 14 dni	1

W moczu całodobowym oznaczono znacznie wyższe stężenia biomarkerów mikotoksyn tj. DON, ZEN i CIT niż w surowicy świń. Dlatego wydaje się on preferowano matrycą do oznaczeń biomarkerów tych mikotoksyn. Jednak pobieranie moczu całodobowego wymaga specjalnych warunków – klatki metaboliczne, które są trudne do spełnienia w warunkach hodowlanych. Dlatego w przypadku biomarkerów DON i CIT,

a także OTA (których stężenie było znacznie większe w surowicy niż w moczu), surowica jest również odpowiednim materiałem do ich oznaczeń.

W przypadku biomarkerów DON należy jednak pamiętać o odpowiednim czasie pobierania próbek surowicy – aby był on zbliżony do czasu maksymalnego stężenia DON w surowicy (3-4 h po podaniu paszy), ponieważ po tym czasie jego stężenie w krwi szybko spada.

Biomarkerów ZEN, przy użyciu dotychczasowych metod analitycznych, nie można oznaczyć w surowicy po podaniu paszy zawierającej ZEN na poziomie zbliżonym do rekomendowanego. Surowica, na dzień dzisiejszy nie jest więc właściwą matrycą do oznaczeń biomarkerów ZEN, wymaga ona prawdopodobnie zastosowania spektrometru mas umożliwiającego osiągnięcie niższej granicy oznaczalności.

5. Wnioski

1. Opracowana, zwalidowana i zweryfikowana metoda oznaczania trzydziestu siedmiu mikotoksyn i ich metabolitów w moczu i surowicy techniką LC-MS/MS stanowi wiarygodne narzędzie diagnostyczne i może być wykorzystywana do kompleksowego monitorowania narażenia świń na mikotoksyny.
2. Potwierdzono, że odpowiednimi biomarkerami: DON w moczu są DON i DOM-1, DON w surowicy jest DON, ZEN w moczu świń są ZEN i α -ZEL, OTA w surowicy jest OTA oraz CIT w surowicy jest CIT. Po raz pierwszy oznaczono w moczu poziomy istotnych metabolitów: OT α (biomarker OTA) oraz DH-CIT (biomarker CIT). Wyniki tych analiz mogą się przyczynić do lepszej oceny narażenia świń na mikotoksyny często występujące w paszy.
3. Zarówno mocz jak i surowica są odpowiednimi matrycami do oznaczeń biomarkerów mikotoksyn tj. DON, OTA i CIT. Należy jednak uwzględnić problemy techniczne występujące podczas ich pobierania. Przy niskim skażeniu pasz ZEN (<50 μ g/kg) biomarkery ZEN należy analizować w moczu z uwagi na zbyt niskie stężenia w surowicy.
4. Stężenia mikotoksyn oznaczonych w moczu i surowicy były bardzo dobrze skorelowane ($r > 0,9$; $P < 0,001$) z ich poziomami w paszy (zbliżonymi do poziomów rekomendowanych). Może być to bardzo pomocne w wyznaczeniu poziomów rekomendowanych dla biomarkerów mikotoksyn w matrycach biologicznych, co przyczyni się do lepszej oceny narażenia świń na mikotoksyny.
5. Próbkę moczu oraz surowicy świń po spożyciu paszy skażonej OTA powinny być pobierane codziennie, aby uwzględnić ewentualne zmiany poziomów biomarkerów OTA w moczu i surowicy. W przypadku analizy biomarkerów DON, ZEN i CIT możliwe jest pobieranie próbek raz na dwa tygodnie.
6. Biomarkery OTA i CIT w przeciwieństwie do biomarkerów mikotoksyn tj. DON i ZEN utrzymują się w moczu i surowicy nawet dwa tygodnie po zamianie paszy skażonej mikotoksynami na paszę o minimalnym skażeniu mikotoksynami, co świadczy o kumulacji i długiej eliminacji tych mikotoksyn u świń, a jednocześnie o konieczności ich monitorowania w matrycach biologicznych oprócz ich analizy w paszy.

6. Streszczenie

Mikotoksyny występują powszechnie w paszach, a świnie są szczególnie wrażliwe na ich toksyczne działanie. Mogą one negatywnie wpływać na ich zdrowie, a także zmniejszać produktywność. Analiza odpowiednich biomarkerów w płynach ustrojowych (biomonitoring) może pomóc w całościowej ocenie narażenia zwierząt. Dotychczasowe badania *in vivo* na świniami ograniczały się głównie do oznaczania biomarkerów deoksyniwalenolu (DON) i zearalenonu (ZEN) w moczu oraz surowicy. Pasza najczęściej była wzbogacana wzorcami mikotoksyn, co nie odzwierciedlało rzeczywistej sytuacji. Ponadto brakowało danych dotyczących biomarkerów innych mikotoksyn np. ochratoksyny A (OTA) czy cytryniny (CIT) oraz informacji o kinetyce mikotoksyn.

Celem pracy było opracowanie metod oznaczania 37 toksyn w moczu i surowicy świń techniką chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS) ich zastosowanie do analizy próbek rzeczywistych pochodzących z doświadczenia na świniami. Przez dwa tygodnie otrzymywały one paszę naturalnie skażoną mikotoksynami (DON – stężenia zbliżone do wartości wskaźnikowych UE, ZEN, OTA i CIT), a przez kolejne dwa tygodnie paszę o minimalnym skażeniu mikotoksynami.

Spośród wielu testowanych metod przygotowania próbek moczu, ekstrakcja ciecz-ciecz umożliwiła stosunkowo niedrogi i wystarczający (niskie wartości granicy oznaczalności) sposób oczyszczenia próbki. Uwzględniono pomijane we wcześniejszych metodach kroki: hydrolizę enzymatyczną, a także oznaczenia kreatyniny. Przygotowanie surowicy bazowało na ekstrakcji rozpuszczalnikiem organicznym. Obydwie metody zostały zwalidowane zgodnie z wytycznymi Europejskiej Agencji Leków (EMA) oraz są dobrym narzędziem do biomonitoringu mikotoksyn u świń.

W przeprowadzonym doświadczeniu stężenia biomarkerów wszystkich analizowanych mikotoksyn (DON, ZEN, CIT i OTA) w matrycach biologicznych były ściśle skorelowane z poziomami mikotoksyn w paszy. Pokazuje to, że są odpowiednimi biomarkerami oraz ich stężenie można wyliczyć z ich zawartości w paszy. Biomarkery DON, ZEN i CIT już w pierwszym dniu po podaniu skażonej paszy osiągnęły poziom. Nie akumulują się one u świń i już po 2 dniach po zamianie paszy skażonej na wolną od mikotoksyn nie można było ich oznaczyć ani w moczu ani w surowicy. Natomiast biomarkery OTA (w tym po raz pierwszy oznaczony w moczu świń metabolit ochratoksyna alfa (OT α)) stały poziom osiągają po 4 dniach i zostały oznaczone w znacznych stężeniach nawet dwa tygodnie po zamianie paszy skażonej mikotoksynami na paszę zerową. Biomonitoring OTA może być więc bardzo ważnym narzędziem w ocenie długotrwałego wpływu OTA na zdrowie świń.

7. Summary

Mycotoxins are common in feed and pigs are susceptible to their toxic effects. They can negatively affect their health as well as reduce their productivity. Analysis of relevant biomarkers in body fluids (biomonitoring) can be beneficial in the overall exposure of animals. *In vivo* studies in pigs to date have been limited mainly to the determination of deoxynivalenol (DON) and zearlenone (ZEN) biomarkers in the urine and serum. The feed was often artificially contaminated with mycotoxin standards, which does not reflect the real situation. In addition, there is limited data on biomarkers of other mycotoxins, e.g. ochratoxin A (OTA) and information on the kinetics of mycotoxins.

The aim of the study was to develop methods for the determination of 37 toxins in the urine and serum of pigs based on liquid chromatography coupled with a tandem mass spectrometer (LC-MS/MS) and their application to the analysis of samples collected from pigs. They received feed naturally contaminated with mycotoxins (DON - concentrations similar to the UE guidance values, ZEN, OTA and CIT) for two weeks and the mycotoxin-free feed for the next two weeks. Of the many methods tested for preparing urine samples, liquid-liquid extraction made it possible to clean the sample relatively inexpensively and sufficiently (low limits of quantification). Steps omitted in the previous methods were included: enzymatic hydrolysis as well as creatinine determinations. Serum preparation was based on extraction with an organic solvent. Both methods have been validated according to the guidelines of the European Medicines Agency (EMA), and they are an excellent tool for the biomonitoring of mycotoxins in pigs.

In the animal trial, levels of biomarkers of all analysed mycotoxins (DON, ZEN, CIT and OTA) in biological matrices were well correlated with the levels of mycotoxins in the feed. This shows that they are suitable biomarkers and their concentration can be calculated from their content in the feed. DON, ZEN and CIT biomarkers reach a constant level already on the first day after the administration of contaminated feed. They do not accumulate in pigs and already two days after conversion from contaminated feed to mycotoxin-free feed, they could not be determined in urine or serum. On the other hand, OTA biomarkers (including the metabolite ochratoxin alfa (OT α) for the first time in pigs' urine) reached a constant level after four days and were determined in significant concentrations even two weeks after replacing the feed contaminated with mycotoxins with mycotoxin-free feed. OTA biomonitoring can therefore be an essential tool in assessing the long-term impact of OTA on pig health.

8. Bibliografia

- Alassane-Kpembé I, Kolf-Clauw M, Gauthier T, Abrami R, Abiola FA, Oswald IP, Puel O (2013) New insights into mycotoxin mixtures: The toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicol Appl Pharmacol* 272:191–198. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.05.023>
- Ali N, Blaszkewicz M, Degen GH (2015) Occurrence of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone in urines of German adults. *Arch Toxicol* 89:573–578. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1363-y>
- Altafini A, Armorini S, Zaghini A, Sardi L, Roncada P (2017) Tissue distribution of ochratoxin A in pigs after administration of two-levels contaminated diets. *World Mycotoxin J* 10:263–272. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2152>
- Aoudia N, Callu P, Grosjean F, Larondelle Y (2009) Effectiveness of mycotoxin sequestration activity of micronized wheat fibres on distribution of ochratoxin A in plasma, liver and kidney of piglets fed a naturally contaminated diet. *Food Chem Toxicol* 47:1485–1489. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.03.033>
- Arndt T (2009) Urine-creatinine concentration as a marker of urine dilution: Reflections using a cohort of 45,000 samples. *Forensic Sci Int* 186:48–51. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.01.010>
- Arroyo-Manzanares N, Rodríguez-Estévez V, Arenas-Fernández P, García-Campaña AM, Gámiz-Gracia L (2019) Occurrence of mycotoxins in swine feeding from Spain. *Toxins (Basel)* 11:1–13. <https://doi.org/10.3390/toxins11060342>
- Battilani P, Palumbo R, Giorni P, Dall'Asta C, Dellafiora L, Gkrillas A, Toscano P, Crisci A, Brera C, De Santis B, Rosanna Cammarano R, Della Seta M, Campbell K, Elliot C, Venancio A, Lima N, Gonçalves A, Terciolo C, Oswald IP (2020) Mycotoxin mixtures in food and feed: holistic, innovative, flexible risk assessment modelling approach: EFSA Support Publ 17:. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2020.en-1757>
- Berthiller F, Dall'asta C, Corradini R, Marchelli R, Sulyok M, Krska R, Adam G, Schuhmacher R (2009) Food Additives & Contaminants: Part A Occurrence of deoxynivalenol and its 3- β -D- glucoside in wheat and maize Occurrence of deoxynivalenol and its 3-b-D-glucoside in wheat and maize. *Food Addit Contam* 26:507–511. <https://doi.org/10.1080/02652030802555668>
- Binder SB, Schwartz-Zimmermann HE, Varga E, Bichl G, Michlmayr H, Adam G, Berthiller F (2017) Metabolism of zearalenone and its major modified forms in pigs. *Toxins (Basel)* 9:56. <https://doi.org/10.3390/toxins9020056>
- Brezina U, Rempe I, Kersten S, Valenta H, Humpf HU, Dänicke S (2014) Diagnosis of intoxications of piglets fed with *Fusarium* toxin-contaminated maize by the analysis of mycotoxin residues in serum, liquor and urine with LC-MS/MS. *Arch Anim Nutr* 68:425–447. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2014.973227>
- Bryden WL (2012) Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Anim Feed Sci Technol* 173:134–158. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014>
- Catteuw A, Broekaert N, De Baere S, Lauwers M, Gasthuys E, Huybrechts B, Callebaut A, Ivanova L, Uhlig S, De Boevre M, De Saeger S, Gehring R, Devreese M, Croubels S (2019) Insights into in Vivo Absolute Oral Bioavailability, Biotransformation, and Toxicokinetics of Zearalenone, α -Zearalenol, β -Zearalenol,

- Zearalenone-14-glucoside, and Zearalenone-14-sulfate in Pigs. *J Agric Food Chem* 67:3448–3458. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05838>
- Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) (2011) Guideline on bioanalytical method validation. Eur Med Agency 1–23
- Dänicke S, Brüßow K-P, Valenta H, Ueberschär K-H, Tiemann U, Schollenberger M (2005a) On the effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated wheat in diets for gilts on feed intake, growth performance and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone. *Mol Nutr Food Res* 49:932–943. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500050>
- Dänicke S, Swiech E, Buraczewska L, Ueberschär KH (2005b) Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 89:268–276. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2005.00516.x>
- Dänicke S, Valenta H, Döll S, Ganter M, Flachowsky G (2004) On the effectiveness of a detoxifying agent in preventing fusario-toxicosis in fattening pigs. *Anim Feed Sci Technol* 114:141–157. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.11.012>
- De Baere S, Osselaere A, Devreese M, Vanhaecke L, De Backer P, Croubels S (2012) Development of a liquid-chromatography tandem mass spectrometry and ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry method for the quantitative determination of zearalenone and its major metabolites in chicken and pig plasma. *Anal Chim Acta* 756:37–48. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.10.027>
- Devreese M, De Baere S, De Backer P, Croubels S (2012) Quantitative determination of several toxicological important mycotoxins in pig plasma using multi-mycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric methods. *J Chromatogr A* 1257:74–80. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.008>
- Dietrich DR, Heussner AH, O'Brien E (2005) Ochratoxin A: Comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). *Food Addit Contam* 22:45–52. <https://doi.org/10.1080/02652030500309327>
- Döll S, Dänicke S, Ueberschär KH, Valenta H, Schnurrbusch U, Ganter M, Klobasa F, Flachowsky G (2003) Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets. *Arch Anim Nutr* 57:311–334. <https://doi.org/10.1080/00039420310001607680>
- Doughari JH (2015) The Occurrence, Properties and Significance of Citrinin Mycotoxin. *J Plant Pathol Microbiol* 6:. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000321>
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. (2006) Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request From the Commission Related To Ochratoxin A in Food. *EFSA J* 365:1–56
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (2005a) Opinion of the CONTAM Panel related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. *Eur Food Saf Auth J* 180:1–35
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (2005b) Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed

- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (2017a) Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA J* 15:4851. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4851>
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (2017b) Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA J* 15:1–345. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (2011) Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA J* 9:1–187. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2481>
- Eriksen GS, Pettersson H, Lindberg JE (2003) Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl don in pigs. *Arch Anim Nutr* 57:335–345. <https://doi.org/10.1080/00039420310001607699>
- European Commission (2006) Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off J Eur Union* 299:7–9
- European Food Safety Authority (EFSA) (2014) Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA J* 12:3916. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3916>
- European Parliament and the Council of the EU (2002) Directive of The European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed 2002/32. *Off J Eur Communities* 1–15. <https://doi.org/2004R0726> - v.7 of 05.06.2013
- Ezekiel CN, Turner PC, Abia WA, Rychlik M, Krska R, Sulyok M, Warth B (2018) Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers. *Anal Chim Acta J* 1019:84–92. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.036>
- Fleck SC, Churchwell MI, Doerge DR (2017) Metabolism and pharmacokinetics of zearalenone following oral and intravenous administration in juvenile female pigs. *Food Chem Toxicol* 106:193–201. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.048>
- Franco LT, Petta T, Rottinghaus GE, Bordin K, Gomes GA, Alvito P, Assunção R, Oliveira CAF (2019) Assessment of mycotoxin exposure and risk characterization using occurrence data in foods and urinary biomarkers in Brazil. *Food Chem Toxicol* 128:21–34. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.046>
- Gambacorta L, Olsen M, Solfrizzo M (2019) Pig urinary concentration of mycotoxins and metabolites reflects regional differences, mycotoxin intake and feed contaminations. *Toxins (Basel)* 11:378. <https://doi.org/10.3390/toxins11070378>
- Gambacorta S, Solfrizzo H, Visconti A, Powers S, Cossalter AM, Pinton P, Oswald IP (2013) Validation study on urinary biomarkers of exposure for aflatoxin B₁, ochratoxin A, fumonisin B₁, deoxynivalenol and zearalenone in piglets. *World Mycotoxin J* 6:299–308. <https://doi.org/10.3920/WMJ2013.1549>
- Gerding J, Ali N, Schwartzbord J, Cramer B, Brown DL, Degen GH, Humpf HU (2015) A comparative study of the human urinary mycotoxin excretion patterns in Bangladesh, Germany, and Haiti using a rapid and sensitive LC-MS/MS approach. *Mycotoxin Res* 31:127–136. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0223-9>

- Goyarts T, Dänicke S, Valenta H, Ueberschär KH (2007) Carry-over of Fusarium toxins (deoxynivalenol and zearalenone) from naturally contaminated wheat to pigs. *Food Addit Contam* 24:369–380. <https://doi.org/10.1080/02652030600988038>
- Guerre P (2016) Worldwide Mycotoxins Exposure in Pig and Poultry Feed Formulations. *Toxins (Basel)* 8:350. <https://doi.org/10.3390/toxins8120350>
- Jedziniak P, Panasiuk Ł, Pietruszka K, Posyniak A (2019) Multiple mycotoxins analysis in animal feed with LC-MS/MS: Comparison of extract dilution and immunoaffinity clean-up. *J Sep Sci* 42:1240–1247. <https://doi.org/10.1002/jssc.201801113>
- Kanora A, Maes D (2009) The role of mycotoxins in pig reproduction: A review. *Vet Med (Praha)* 54:565–576. <https://doi.org/10.17221/156/2009-VETMED>
- Kovalsky P, Kos G, Nährer K, Schwab C, Jenkins T, Schatzmayr G, Sulyok M, Krska R (2016) Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins and secondary metabolites in finished feed and maize—An extensive survey. *Toxins (Basel)* 8:363. <https://doi.org/10.3390/toxins8120363>
- Lauwers M, Croubels S, Letor B, Gougoulis C, Devreese M (2019a) Biomarkers for Exposure as A Tool for Efficacy Testing of A Mycotoxin Detoxifier in Broiler Chickens and Pigs. *Toxins (Basel)* 11:187. <https://doi.org/10.3390/toxins11040187>
- Lauwers M, De Baere S, Letor B, Rychlik M, Croubels S, Devreese M (2019b) Multi LC-MS/MS and LC-HRMS methods for determination of 24 mycotoxins including major phase I and II biomarker metabolites in biological matrices from pigs and broiler chickens. *Toxins (Basel)* 11:171. <https://doi.org/10.3390/toxins11030171>
- Lo SC, Tsai KS (1994) Glucose interference in Jaffe creatinine method: Effect of calcium from peritoneal dialysate. *Clin. Chem.* 40:2326–2327
- Meerpoel C, Vidal A, Huybrechts B, Tangni EK, De Saeger S, Croubels S, Devreese M (2020) Comprehensive toxicokinetic analysis reveals major interspecies differences in absorption, distribution and elimination of citrinin in pigs and broiler chickens. *Food Chem Toxicol* 141:111365. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111365>
- Minervini F, Aquila MED (2008) Zearalenone and reproductive function in farm animals. *Int J Mol Sci* 9:2570–2584. <https://doi.org/10.3390/ijms9122570>
- Nagl V, Woechtl B, Schwartz-Zimmermann HE, Hennig-Pauka I, Moll WD, Adam G, Berthiller F (2014) Metabolism of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-glucoside in pigs. *Toxicol Lett* 229:190–197. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.06.032>
- Ostry V, Malir F, Toman J, Grosse Y (2017) Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Res* 33:65–73. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>
- Pierron A, Alassane-Kpembé I, Oswald IP (2016) Impact of mycotoxin on immune response and consequences for pig health. *Anim. Nutr.* 2:63–68
- Pinotti L, Ottoboni M, Giromini C, Dell’Orto V, Cheli F (2016) Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: A focus on Cereal Byproducts. *Toxins (Basel)* 8:45. <https://doi.org/10.3390/TOXINS8020045>
- Pleadin J, Kudumija N, Kovačević D, Scortichini G, Milone S, Kmetič I (2016) Comparison of ochratoxin A levels in edible pig tissues and in biological fluids after exposure to a contaminated diet. *Mycotoxin Res* 32:145–151.

- <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0249-7>
- Rui Guo W, Xiao Ou S (2015) Simultaneous Detection Method for Mycotoxins and their Metabolites in Animal Urine by Using Impurity Adsorption Purification followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Detection. *J Chromatogr Sep Tech* 6:308. <https://doi.org/10.4172/2157-7064.1000308>
- Shephard GS, Burger HM, Gambacorta L, Gong YY, Krska R, Rheeder JP, Solfrizzo M, Srey C, Sulyok M, Visconti A, Warth B, van der Westhuizen L (2013) Multiple mycotoxin exposure determined by urinary biomarkers in rural subsistence farmers in the former Transkei, South Africa. *Food Chem Toxicol* 62:217–225. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.040>
- Solfrizzo M, Gambacorta L, Lattanzio VMT, Powers S, Visconti A (2011) Simultaneous LC–MS/MS determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, deoxynivalenol, deoxydeoxynivalenol, α and β -zearalenols and fumonisin B1 in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. *Anal Bioanal Chem* 401:2831–2841. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5354-z>
- Solfrizzo M, Gambacorta L, Visconti A (2014) Assessment of multi-mycotoxin exposure in southern Italy by urinary multi-biomarker determination. *Toxins (Basel)* 6:523–538. <https://doi.org/10.3390/toxins6020523>
- Song S, Ediage EN, Wu A, De Saeger S (2013) Development and application of salting-out assisted liquid/liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1292:111–120. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.071>
- Stoev SD, Paskalev M, MacDonald S, Mantle PG (2002) Experimental one year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Exp Toxicol Pathol* 53:481–487. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00213>
- Sun Y, Zhang G, Zhao H, Zheng J, Hu F, Fang B (2014) Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for toxicokinetics, tissue distribution, and excretion studies of T-2 toxin and its major metabolites in pigs. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 958:75–82. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.03.010>
- Takemura H, Shim JY, Sayama K, Tsubura A, Zhu BT, Shimoi K (2007) Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zearanol in vivo and in vitro. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103:170–177. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.08.008>
- Thanner S, Czeglédi L, Schwartz-Zimmermann HE, Berthiller F, Gutzwiller A (2016) Urinary deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEA) as biomarkers of DON and ZEA exposure of pigs. *Mycotoxin Res* 32:69–75. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0241-2>
- Tiemann U, Dänicke S (2007) In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: A review. *Food Addit. Contam.* 24:306–314
- Tkaczyk A, Jedziniak P (2020) Dilute-and-Shoot HPLC-UV Method for Determination of Urinary Creatinine as a Normalization Tool in Mycotoxin Biomonitoring in Pigs. *Molecules* 25:2445. <https://doi.org/10.3390/molecules25102445>
- van der Fels-Klerx HJ, Klemsdal S, Hietaniemi V, Lindblad M, Ioannou-Kakouri E, van Asselt ED (2012) Mycotoxin contamination of cereal grain commodities in relation to climate in North West Europe. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control*

- Expo Risk Assess 29:1581–1592. <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.689996>
- Wallin S, Gambacorta L, Kotova N, Warensjö Lemming E, Nälsén C, Solfrizzo M, Olsen M (2015) Biomonitoring of concurrent mycotoxin exposure among adults in Sweden through urinary multi-biomarker analysis. *Food Chem Toxicol* 83:133–139. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.05.023>
- Wang Y, Wang L, Liu F, Wang Q, Selvaraj JN, Xing F, Zhao Y, Liu Y (2016) Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms. *Toxins (Basel)* 8:1–15. <https://doi.org/10.3390/toxins8030083>
- Warth B, Sulyok M, Krska R (2013) LC-MS/MS-based multibiomarker approaches for the assessment of human exposure to mycotoxins. *Anal Bioanal Chem* 405:5687–5695. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7011-1>

**PUBLIKACJE SKŁADAJĄCE SIĘ NA
ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ**

PRACA 1.1

*Development of a multi-mycotoxin LC-MS/MS method for the
determination of biomarkers in pig urine.*

Tkaczyk A., Jedziniak P.

Mycotoxin Research 37, 169-181

2021

PRACA 1.2

Biomarkers of deoxynivalenol, citrinin, ochratoxin A and zearalenone in pigs after exposure to naturally contaminated feed close to guidance values.

**Tkaczyk A., Jedziniak P., Zielonka Ł., Dąbrowski M.,
Ochodzki P., Rudawska A.
Toxins 13(11), 750
2021**

PRACA 2.1

Mycotoxin biomarkers in pigs – current state of knowledge and analytics.

Tkaczyk A., Jedziniak P.

Toxins 13(8), 586

2021