



prof. dr hab. n. farm. **Łukasz Komsta**
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Chemii Leków
ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin, tel. 81 4487387, fax 81 4487381

KANCLARIA Państwowego Instytutu Weterynaryjnego- Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach	
Wpłynęło dnia	2022 -06- 14
Nr	7003 zał.
Akta	

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Tkaczyk

„Oznaczenie biomarkerów mikotoksyn u trzody chlewnej jako nowoczesne narzędzie do oceny narażenia świń na mikotoksyny”

OBECNOŚĆ mikotoksyn w paszach dla zwierząt jest bardzo kompleksowym i interdyscyplinarnym problemem. Zwierzęta narażone są najczęściej na całą mieszaninę mikotoksyn w zepsutej paszy, co owocuje możliwymi interakcjami i nierzadko nietypowymi konsekwencjami.

Analityczna kontrola pasz musi być zorientowana na jednoczesne wykrywanie wielu potencjalnych składników, a metoda musi dla każdej potencjalnej toksyny wykazywać zadowalającą selektywność, czułość, precyzję i dokładność. Ponadto nie zawsze możliwa jest analiza paszy zatrutego zwierzęcia, dlatego metodą z wyboru jest wtedy analiza płynów ustrojowych i wydaliny pod kątem obecności toksyn i ich metabolitów, zwanych ogólnie biomarkerami.

Zakład Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego — Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach ma wieloletnie doświadczenie w opracowywaniu i wdrażaniu do rutynowej analizy wiodących metod analitycznych będących odpowiedzią na aktualne zapotrzebowanie prawne, rynkowe i konsumenckie.

Przedłożona do recenzji praca, wykonana pod kierunkiem dr hab. PIOTRA JEDZINIAKA, prof. instytutu i dr ARKADIUSZA DORSA jako promotora pomocniczego, jest kontynuacją tej linii działalności naukowej i doskonałym dowodem na to, że puławski instytut jest miejscem, w którym nikt nie boi się ryzykownych wyzwań i wkraczania w trudne obszary badawcze.

Rozprawa składa się z 3 publikacji o łącznym IF równym 12.26, wypełniających nieco ponad jeden slot publikacyjny. Jedna z publikacji jest pracą poglądową. Polskojęzyczny komentarz liczy 42 strony i zawiera ponad 60 starannie dobranych pozycji literaturowych. Publikacja przeglądowa i jedna z doświadczalnych zawiera dwóch autorów (Doktorantka i Promotor), trzecia z nich jest

pracą wieloautorską. Stosowne oświadczenia współautorów znajdują się w dokumentacji przewodu doktorskiego.

Doktorantka postawiła sobie za cel opracowanie metody jednoczesnego oznaczania wielu mikotoksyn w moczu i surowicy świń. Dodatkowo podjęła ambitne zadanie zbadania korelacji pomiędzy poziomem mikotoksyn w paszy, a stężeniem ich biomarkerów w badanym materiale biologicznym. Badania obejmowały również porównanie matryc celem wskazania optymalnej strategii monitoringu biomarkerów narażenia, jak również ustalenie kinetyki biomarkerów w płynach ustrojowych świń po podaniu naturalnie skażonej paszy doświadczalnej.



W pierwszej publikacji Doktorantka przedstawiła metodę LC-MS/MS do oznaczania biomarkerów ekspozycji na 35 mikotoksyn w moczu świń. Ze względu na duże rozbieżności w ilości wody, próbki standaryzowano względem zawartości kreatyniny. Procedura standaryzacyjna pochodzi również z badań Doktorantki i została opublikowana rok wcześniej (nie wchodzi w cykl doktoratu). Ze względu na znaczne wahania stosunku sygnału do szumu, po oznaczeniu kreatyniny próbki były rozcieńczane do jednolitego stężenia przed właściwym oznaczaniem biomarkerów.

Potwierdzono jednocześnie użyteczność hydrolizy enzymatycznej metabolitów sprzężonych z kwasem glukuronowym, a — co istotne — nad optymalizacją tego procesu nikt wcześniej się nie poryczył. Zasluguje to na podkreślenie, ponieważ w zależności od użytego enzymu odzyski mogą być nieprzewidywalne. Zoptymalizowano również proces ekstrakcji celem dodatkowego zwiększenia odzysku. Przypuszczam, że zastosowanie kilkuczynnikowego planu eksperymentu wraz z analizą powierzchni odpowiedzi doprowadziłoby do jeszcze lepszych parametrów, jednakże i bez tego metoda została zwalidowana i bezspornie udowodniono jej przydatność.

Wyczerpujący suplement do publikacji zawiera chromatogramy, dane widm masowych, odzyski przy różnych parametrach ekstrakcji, uzyskane stosunki sygnału do szumu. W pełni potwierdza to, że problem został rozwiązany wyczerpująco i wielowątkowo.



W drugiej publikacji Doktorantka rozszerzyła metodę LC-MS/MS do oceny biomarkerów mikotok-

syn na próbki krwi świń, odpowiednio modyfikując i optymalizując procedury ekstrakcyjne. Dodatkowo oceniono zawartość biomarkerów we krwi w funkcji czasu i okres potrzebny do eliminacji biomarkera z ustroju.

Ilość jednocześnie oznaczanych analitów (powyżej 30!) robi duże wrażenie, jednocześnie wyniki zwracają uwagę na znaczne różnice czasów eliminacji biomarkerów poszczególnych toksyn (głównie na wykresach ich obecności w moczu). Jednocześnie kinetyka jest spójna w obrębie metabolitów tej samej toksyny, co wcale nie jest oczywiste, gdyż metabolity ksenobiotyków mogą znacznie różnić się czasem półtrwania w ustroju.

Ciekawym aspektem do dyskusji byłoby, na ile dane otrzymane w tej publikacji mogłyby posłużyć do określenia typu procesu eliminacji poszczególnych analitów. Rzędowość eliminacji i liniowość farmakokinetyki uzupełniłyby wiedzę na temat zachowania się tych substancji w organizmie zwierzęcym, nawet jeśli tego typu badania częściowo zawierały już publikacje wcześniejsze (np. te cytowane w 3 rozdziale pracy poglądowej).



Trzecia publikacja jest wyczerpującym *review* na temat mikotoksyn, zarówno w aspekcie toksykologicznym jak i analitycznym. Doktorantka omówiła w pracy podział mikotoksyn, skutki zatrucia i znane metabolity będące biomarkerami. Praca zawiera przegląd wszystkich dotychczasowych badań mikotoksyn i biomarkerów w płynach ustrojowych, zarówno zorientowanych głównie na analizę, jak i na zależność dawka-stężenie i farmakokinetykę. Oddzielny i obszerny rozdział zawiera przegląd i omówienie technik przygotowania próbek krwi i moczu.

Kwerenda literaturowa tak obszernego tematu wymagała przejrzania setek prac i wyboru blisko stu z nich, wraz z opracowaniem koncepcji pogrupowania i porównania odnalezionych doniesień. Widać tutaj znaczny wysiłek, który przyczynił się również do jak najlepszego umiejscowienia własnych doświadczeń w kontekście dokonań wcześniejszych.

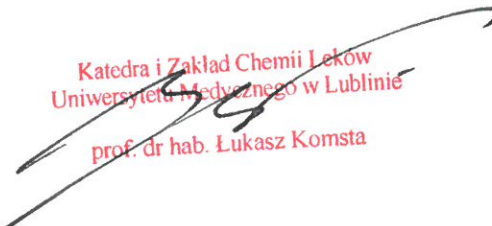
Rozprawa stanowi całościowy i dobrze wyodrębniony projekt badawczy. Dwie publikacje mają wyłącznie dwóch autorów — Doktorantkę i Promotora, co potwierdza ogromną samodzielność i interdyscyplinarne podejście Autorki dysertacji, cechy charakterystyczne dla *Puławskiej Szkoły Toksykologicznej*.

Warte podkreślenia jest również oparcie swojej dysertacji na wcześniejszych wstępnych badaniach, które zostały opublikowane, a nie weszły w skład cyklu.

Dostrzegam w opublikowanych wynikach znaczny potencjał i przewiduję istotne zainteresowanie publikacjami przez inne grupy badawcze. Jest to widoczne już w chwili opracowywania recenzji, ponieważ publikacje z dysertacji w tak krótkim czasie zdążyły uzyskać cytowania.

Podsumowując, praca doktorska mgr inż. Agnieszki Tkaczyk spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, zawiera istotne elementy nowości naukowej i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo ze względu na samodzielność opublikowanych prac, interdyscyplinarność tematyki badawczej, wskaźniki bibliometryczne, a przede wszystkim aplikacyjność opracowanych metod wnioskuję o wyróżnienie przedłożonej mi do recenzji pracy.



Katedra i Zakład Chemii Leków
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
prof. dr hab. Łukasz Komsta

Lublin, 8 czerwca 2022.