

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Tkaczyk pt. „Oznaczenie biomarkerów mikotoksyn u trzody chlewnej jako nowoczesne narzędzie do oceny narażenia świń na mikotoksyny” wykonanej w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach pod kierunkiem promotora dr hab. Piotra Jedziniaka, prof. instytutu i promotora pomocniczego dr Arkadiusza Dorsa

Recenzję opracowano w oparciu o Uchwałę nr 20/2022 z dnia 29 kwietnia 2022 r. Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach w sprawie wyznaczenia recenzentów w postępowaniu o nadanie stopnia doktora mgr inż. Agnieszce Tkaczyk.

1. Ogólna charakterystyka rozprawy

Oceniana rozprawa doktorska stanowi kompilację spójnych tematycznie trzech prac; dwóch prac oryginalnych (1.1 i 1.2) i jednej przeglądowej (2.1). Wszystkie prace zostały opublikowane w 2021 r. w czasopiśmie z listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Łączna liczba punktów wg. klasyfikacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi 270, a współczynnik wpływu (*Impact Factor*) według Journal of Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 12,26.

W przedstawionej do oceny dokumentacji znajduje się oświadczenie kandydatki do stopnia doktora, że rozprawa doktorska nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami oraz że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni lub innej uprawnionej instytucji naukowej. W ocenianej dokumentacji nie ma oświadczenia określającego indywidualny udział mgr inż. Agnieszki Tkaczyk oraz pozostałych współautorów w przygotowanie publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Jednakże w jednej pracy oryginalnej (1.2) oraz pracy przeglądowej (2.1) znajduje się informacja wskazująca na udział kandydatki do stopnia doktora we wszystkich etapach przygotowania tych prac. Ponadto we wszystkich pracach mgr inż. Agnieszka Tkaczyk jest pierwszym autorem i

jednocześnie autorem korespondencyjnym, co potwierdza Jej pierwszoplanową rolę w przygotowaniu publikacji. Dlatego uważam, że zarówno liczba publikacji jak również ich treść merytoryczna spełniają kryteria rozprawy na stopień doktora nauk. Na uwagę zasługuje również fakt, że wszystkie badania opisane w publikacjach wchodzących w skład dysertacji zostały sfinansowane z budżetu projektu “Biomarkers of mycotoxins in pigs“ nr 2016/22/E/NZ7/00640 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu SONATA-BIS 6, którego kierownikiem był promotor dr hab. Piotr Jedziniak, prof. instytutu.

Integralną część rozprawy stanowi skondensowany komentarz cyklu publikacji będących przedmiotem dysertacji, w którym można wyróżnić wstęp, cel i zakres pracy, metodykę badań, wyniki badań i dyskusję, wnioski, streszczenia polskie i angielskie oraz bibliografię (nie wymienioną w spisie treści). Prace stanowiące rozprawę doktorską przeszły proces recenzencki i zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, co potwierdza, że tematyka prezentowanej rozprawy doktorskiej jest istotna i aktualna. Z kolei skondensowany komentarz ujmuje najważniejsze zagadnienia będące przedmiotem rozprawy i potwierdza nowatorski charakter badań oraz dobre przygotowanie merytoryczne i analityczne mgr inż. Agnieszki Tkaczyk do realizacji zaplanowanych badań.

Podjęty przez kandydatkę do stopnia doktora temat związany z opracowaniem i walidacją wieloskładnikowej metody oznaczania mikotoksyn i ich metabolitów w moczu i surowicy świni opartej na wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią (LC-MS/MS) ma istotne znaczenie użytkowe, gdyż pozwala na precyzyjne i wiarygodne oznaczanie szeregu związków macierzystych i ich metabolitów w dwóch matrycach biologicznych (mocz i surowica). Ponadto opracowana metoda analityczna została wykorzystana w badaniach kinetyki biomarkerów czterech mikotoksyn (deoksyniwalenolu, zearalenonu, ochratoksyny A i cytryniny) a uzyskane wyniki wniosły istotny wkład do dotychczasowej wiedzy w tym zakresie.

2. Ocena merytoryczna pracy

2.1. Sformułowanie problemu naukowego i aktualność tematyki badań

Mikotoksyny stanowią liczną grupę związków, które mogą mieć negatywny wpływ na zdrowie ludzi i zwierząt. Z uwagi na zagrożenia wynikające z ich spożycia w przypadku ośmiu mikotoksyn (aflatoksyny B1, deoksyniwalenolu, fumonizyny B1 i B2, ochratoksyny A, toksyny T2 i HT2 oraz zearalenonu) w Unii Europejskiej wprowadzono regulacje prawne określające ich dopuszczalne lub zalecane poziomy w żywności i paszach. Gatunkiem zwierząt szczególnie podatnym na działanie mikotoksyn są świni, u których w zależności od stopnia narażenia mogą wystąpić takie efekty niepożądane jak.: spadek apetytu a nawet całkowite zaprzestanie

przyjmowania paszy, biegunka, zaleganie, zmiany skórne, uszkodzenia wątroby i płuc, zaburzenia w rozrodzie, działanie mutagenne i teratogenne czy immunosupresja; w skrajnych przypadkach może dochodzić do padnięć zwierząt. Bardzo często zwierzęta są narażone na działanie kilku mikotoksyn (w tym ich metabolitów) dlatego w ostatnich latach, poza oznaczaniem ich poziomu w paszy, coraz większego znaczenia nabiera biomonitoring tj. oznaczanie biomarkerów (związków macierzystych i ich metabolitów) w płynach ustrojowych i wydalinach zwierząt. Aby było to możliwe konieczne jest opracowanie wiarygodnych i czułych metod pozwalających na jednoczesne oznaczenie wielu związków macierzystych oraz ich metabolitów. Ma to kluczowe znaczenie przy narażeniu świń na kilka mikotoksyn występujących w paszy jednocześnie. Z uwagi na to, że dotychczasowa wiedza w tym zakresie jest niewystarczająca oceniana rozprawa doktorska wychodzi naprzeciw tym oczekiwaniom, ponieważ efektem jej realizacji jest opracowanie czulej i wiarygodnej metody jednoczesnego oznaczania 37 mikotoksyn i ich metabolitów w moczu i surowicy świń. Opracowana metoda stanowi doskonałe narzędzie do badania mieszanego narażenia na mikotoksyny oraz badania kinetyki tych związków u świń. Reasumując uważam, że podjęta tematyka jest bardzo interesująca, aktualna i w istotnym stopniu wzbogaca stan wiedzy w zakresie metod analitycznych oraz znajomości kinetyki mikotoksyn u świń.

2.2. Cel rozprawy

W komentarzu do cyklu publikacji (str. 15) sformułowano pięć celów badawczych, które pokrywają się z celami badań określonymi w dwóch pracach oryginalnych wchodzących w skład kompilacji stanowiącej rozprawę doktorską. Wszystkie cele badawcze zostały jasno zdefiniowane i w pełni zrealizowane.

2.3. Poprawność i oryginalność metodyczna

Metodyka badań wykorzystana do realizacji postawionych celów badawczych nie budzi zastrzeżeń i jest adekwatna ze standardami międzynarodowymi w tym zakresie. Opracowana metoda analityczna spełniła wszystkie kryteria walidacyjne, co potwierdza jej wiarygodność i powtarzalność przy oznaczaniu zawartości 37 biomarkerów mikotoksyn w moczu i surowicy. Z kolei badania za zakresu kinetyki deoksynivalenolu, zearalenonu, ochratoksyny A i cytryniny mają charakter nowatorski i mogą służyć do planowania doświadczeń dotyczących innych ksenobiotyków.

2.4. Znaczenie uzyskanych wyników badań

Realizacja zaplanowanych badań pozwoliła na opracowanie metody analitycznej, która umożliwiła jednoczesne oznaczanie 37 mikotoksyn i ich metabolitów w moczu i surowicy świń za pomocą LC-MS/MS. Celem uzyskania powtarzalnej i wiarygodnej metody określono m.in. warunki przygotowania próbek oraz pracy spektrometru mas i chromatografu cieczowego; dobrano również kolumnę analityczną i fazy ruchome zapewniające uzyskanie optymalnej detekcji badanych analitów. Opracowanie metody pozwalającej na oznaczanie tak szerokiej gamy związków o odmiennych właściwościach fizykochemicznych i występujących w matrycach biologicznych w bardzo małych ilościach wymaga bardzo dobrego opanowania warsztatu badawczego. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w opracowanej metodzie oznaczania zastosowano po raz pierwszy hydrolizę enzymatyczną (z użyciem beta-glukuronidazy) pozwalającą na oznaczanie deoksyniwalenolu i zearalenonu, które wcześniej uległy sprzęgnięciu z kwasem glukuronowym. Ponadto w oznaczeniach wykorzystano sposób normalizacji moczu o różnej zawartości wody wykorzystując wcześniej opisaną metodę oznaczania kreatyniny w moczu świń (Tkaczyk A, Jedziniak P. Dilute-and-shoot HPLC-UV method for determination of urinary creatinine as a normalization tool in mycotoxin biomonitoring in pigs. *Molecules*, 2020, 25:2445.). Szkoda, że praca ta nie została włączona w cykl publikacji stanowiących rozprawę doktorską, gdyż stanowiłaby istotne jej wzbogacenie tym bardziej, że kandydatka do stopnia doktora jest jednocześnie pierwszym i korespondencyjnym autorem. Podkreślenia wymaga również fakt, że opracowana metoda pozwala na oznaczanie mikotoksyn (niwalenolu, cytryniny, dihydrocytryniny, fusarenonu-X, albertoksyny I, tentoksyny i hydrolizowanej fumonizyny B₁), które wcześniej nie były oznaczane w moczu świń. Bardzo ważnym elementem ocenianej rozprawy doktorskiej jest układ doświadczalny, w którym po raz pierwszy do karmienia świń wykorzystano paszę (na bazie kukurydzy i żyta inokulowanego *Fusarium culmorum*) naturalnie skażoną mikotoksynami (deoksyniwalenolem, zearalenonem, ochratoksyną A i cytryniną). Wykonanie tego doświadczenia pozwoliło na wykazanie, że w moczu świń karmionych paszą skażoną mikotoksynami stężenia biomarkerów: deoksyniwalenolu (deoksyniwalenol, deepoksydeoksyniwalenol), zearalenonu (zearalenon, α -zearalenol), ochratoksyny A (ochratoksyna A, ochratoksyna α) i cytryniny (cytrynina, dihydrocytrynina) były istotnie wyższe niż w grupie kontrolnej i były one skorelowane z ich zawartością w paszy. Warto podkreślić, że współwystępowanie biomarkerów ochratoksyny A i cytryniny w moczu świń opisano po raz pierwszy. Z kolei w surowicy oznaczono następujące biomarkery: deoksyniwalenol (deoksyniwalenol), cytryninę (cytrynina, dihydrocytrynina) oraz ochratoksynę A (ochratoksyna A, ochratoksyna α). Stężenia deoksyniwalenolu i cytryniny w

surowicy były znacznie niższe niż ich stężenia w moczu, natomiast stężenie ochratoksyny A było wielokrotnie wyższe od stężenia oznaczonego w moczu. W przypadku zearalenonu wykazano, że surowica nie jest odpowiednią matrycą do oznaczania biomarkerów tej mykotoksyny. Wykazano również, że w przypadku oznaczania biomarkerów deoksyniwalenolu próbki krwi należy pobierać 3-4 godz. po podaniu paszy skażonej mikotoksynami, ponieważ po tym czasie dochodzi do szybkiego obniżenia stężenia tej mikotoksyny we krwi. Ponadto analiza kinetyki biomarkerów wskazuje między innymi, że pierwszego dnia po odstawieniu paszy skażonej mikotoksynami stwierdza się jedynie śladowe ilości deoksyniwalenolu i zearalenonu, co potwierdza brak kumulacji tych związków w organizmie świń. Z kolei ochratoksyna A i cytrynina oznaczane były w moczu i surowicy nawet po dwóch tygodniach od odstawienia skażonej paszy, co wskazuje na bardzo długi okres zanikania biomarkerów tych mikotoksyn i jednocześnie długotrwałe narażenie świń na ich działanie. W tym miejscu należy podkreślić pionierski charakter przeprowadzonych badań.

2.5. Znajomość literatury związanej z tematyką pracy

Analiza dysertacji wskazuje, że mgr inż. Agnieszka Tkaczyk doskonale orientuje się w aktualnym piśmiennictwie związanym z podjętą tematyką badań i potrafi je trafnie skonfrontować z wynikami badań własnych. W pierwszej pracy oryginalnej (1.1) autorzy pracy powołali się na 40 pozycji a w drugiej na 52 pozycje piśmiennictwa, które obejmuje adekwatnie dobrane wyniki badań innych autorów oraz obowiązujące akty prawne oraz wytyczne dotyczące badania mikotoksyn. Z kolei do przygotowania pracy przeglądowej wyselekcjonowano 91 pozycji oddających aktualny stan wiedzy w zakresie badania biomarkerów mikotoksyn u świń oraz stosowanych metod analitycznych do ich oznaczania. Taki gruntowny przegląd dostępnej literatury światowej pozwolił na skonstruowane oryginalnych założeń do badań własnych, które istotnie uzupełniły stan wiedzy w tym zakresie.

2.6. Uwagi polemiczne

Oceniana praca doktorska wnosi wiele nowych elementów do dotychczasowej wiedzy na temat biomarkerów mikotoksyn u świń. Szkoda, że w ramach badania kinetyki tych związków w surowicy nie pobierano próbek krwi w 14 dniu w miejsce dnia 12. Pobranie próbek w dniu 12 i następnie 15 skutkuje tym, że na wykresach obrazujących zależność stężenie-czas istotne zmniejszenie stężenia deoksyniwalenolu, cytryniny i ochratoksyny A (praca 1.2) jest już widoczne po 12 dniu. W związku z tym nie odzwierciedla ono informacji prezentowanej na stronie 30, że „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.” By uniknąć tego problemu należało na wykresach zachować odstęp pomiędzy 12 a 15 dniem próbkowania.

Pod względem językowym recenzowaną dysertację doktorską generalnie oceniam dobrze zarówno w zakresie stosowanego specjalistycznego nazewnictwa jak i sposobu opisu wyników badań. Świadczy to o dobrym opanowaniu przez mgr inż. Agnieszkę Tkaczyk fachowego piśmiennictwa z zakresu realizowanych badań. Wprawdzie w komentarzu poprzedzającym cykl publikacji będących przedmiotem dysertacji znajdują się nieliczne „niezgrabności” stylistyczne [np. str. 11: *„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).”*; str. 14: *„Konieczna jest również hydroliza enzymatyczna, ponieważ DON wydalanany jest w surowicy świń w ponad 30% w postaci glukuronidów (Dänicke et al. 2005a).”*; str. 28: *„DON i ZEN, w przeciwieństwie do CIT i OTA, są szybko uwalniane z krwi, a ich stężenie we krwi maleje bardzo szybko.”*] ale nie wpływa to negatywnie na jednoznacznie pozytywną ocenę całości pracy.

3. Wniosek końcowy

W mojej opinii oceniana rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Tkaczyk pt. *„Oznaczanie biomarkerów mikotoksyn u trzody chlewnej jako nowoczesne narzędzie do oceny narażenia świń na mikotoksyny”* spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk. Cel pracy został jasno sformułowany i w pełni osiągnięty. Opracowana i poddana walidacji metoda oznaczania mikotoksyn i ich metabolitów w moczu i surowicy pozwoliła na skuteczną realizację pozostałych celów pracy doktorskiej. Było to możliwe dzięki opanowaniu przez mgr inż. Agnieszkę Tkaczyk wiedzy teoretycznej z zakresu prowadzonych badań ale także umiejętności praktycznych niezbędnych do pracy analitycznej z użyciem chromatografii ciekłowej połączonej ze spektrometrią mas, która aktualnie jest wykorzystywana w tego typu badaniach w najlepszych ośrodkach badawczych na świecie. Kandydatka do stopnia doktora umiejętnie sformułowała cele badawcze, które konsekwentnie zrealizowała i wyciągnęła prawidłowe wnioski, co świadczy o dobrym przygotowaniu do pracy badawczej. Dlatego uważam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Tkaczyk w pełni odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.). Biorąc powyższe pod uwagę przedkładam Radzie Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego

Instytutu Badawczego w Puławach wniosek o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Tkaczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Jerzy Jaroszewski