Puławy, 2020.07.01

Prof. dr hab. Andrzej Posyniak
Zakład Farmakologii i Toksykologii
Państwowy Instytut Weterynaryjny-
Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. wet. Anny Rykaczewskiej „Biotransformacja zearalenonu podawanego w niskich dawkach oraz jego wpływ na wybrane wskaźniki endokrynologiczne i profil metaboliczny loszek"

Podstawą wykonania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 15.05.2020 roku i pismo Zastępcy Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria prof. dr hab. Andrzeja Koncickiego, które otrzymano w dniu 16.06.2020 r.

Otrzymana do recenzji rozprawa na stopień doktora napisana przez lek. wet. Annę Rykaczewską składa się z autoreferatu, który przygotowano w oparciu o wyniki badań przedstawione w 2 publikacjach:

1. Anna Rykaczewska, Magdalena Gajęcka, Michał Dąbrowski, Anita Wiśniewska, Justyna Szcześniewska, Maciej T. Gajęcki, Łukasz Zielonka. Growth performance, selected blood biochemical parameters and body weights of pre-pubertal gilts fed diets supplemented with different doses of zearalenone (ZEN). Toxicon 2018, 152, 84-94; (IF 2.352 2017/2018; 30 pkt. MNiSW);

2. Anna Rykaczewska, Magdalena Gajęcka, Ewa Onyszek, Katarzyna Cieplińska, Michał Dąbrowski, Sylwia Lisieska-Żołnierczyk, Maria Bulińska, Andrzej Babuchowski, Maciej T. Gajęcki, Łukasz Zielonka. Imbalance in the blood concentrations of selected steroids in pre-pubertal gilts depending on the time of exposure to low doses of zearalenone. Toxins 2019, 11(10), 561; (IF: 3.895 2018/2019; 100 pkt MNiSW).

Autoreferat składa się z 83 stron druku komputerowego, łącznie ze streszczeniami: polskim i angielskim, spisem treści, podsumowaniem i piśmiennictwem, które pozwoliło Doktorantce na przeprowadzenie dyskusji z wynikami badań prowadzonych przez innych autorów. Zebrane

w tabelach oraz na zilustrowane rycinami wyniki dokumentują zakres badań wykonanych nad biotransformacją niskich dawek zearalenonu oraz jego wpływ na wybrane wskaźniki endokrynne i profil metaboliczny loszek.

We wprowadzeniu Doktorantka omówiła problem występowania mikotoksyn w paszach z uwzględnieniem zearalenonu (ZEN) i jego wpływu na organizm żywy, a w szczególności na estrogenne działanie poprzez wiązanie z receptorami estrogenowymi w układzie rozrodczym, błonie śluzowej jelit, jak również w podwzgórzu, przysadce mózgowej oraz w gruczole mlekowym. Ponadto wskazano na procesy metaboliczne, które prowadzą do powstania α-zearalenolu (α-ZEL) posiadającego 3–4-krotnie wyższą aktywnością w porównaniu do związku macierzystego, β-zearalenolu (β–ZEL) i kilku innych metabolitów. Zgodnie z przyjętą koncepcją pracy w dalszej części wprowadzenia Doktorantka skupia się na zależnościach zachodzących pomiędzy zastosowaną dawką a uzyskanym efektem wyjaśniając przy tym pojęcie najniższej mierzalnej dawki (MABEL), którą należy rozumieć jako wartość wywołującą odwrotny efekt do wcześniej stwierdzanego.

Następnie przedstawiono cel badań, które miały doprowadzić do weryfikacji hipotezy, czy dawki zearalenonu na poziomie MABEL, NOAEL i LOAEL podawane drogą pokarmową przez określony przedział czasowy mogą wywoływać następujące zmiany:

- jakościowo/ilościowe w procesach biotransformacji zearalenonu;
- stężeń we krwi obwodowej wybranych hormonów steroidowych;
- profilu metabolicznego;
- przyrostów masy ciała - u niedojrzałych płciowo loszek.

W części „Materiał i metody" przedstawiono układ doświadczenia na zwierzętach (w tym badanie paszy na obecność mikotoksyn), badanie biotransformacji ZEN (biodostępność ZEN i jego metabolitów), ocenę wskaźników endokrynnych (stężenia estradiolu, progesteronu i testosteronu), ocenę profilu metabolicznego we krwi obwodowej (wskaźniki biochemiczne: stężenie glukozy, stężenie białka całkowitego aktywność aminotransferazy asparaginowej (AST), aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT), aktywność fosfatazy alkalicznej (AP), stężenie cholesterolu całkowitego, stężenie P-in, stężenie Fe, stężenie bilirubiny całkowitej, stężenie mocznika, BUN) oraz ocenę masy ciała loszek. Opisano sposób pobierania i przygotowania próbek do badań oraz warunki wykonania poszczególnych analiz. Każdy z wyznaczanych parametrów poddawany był stosownej analizie statystycznej.

W rozdziale „Wyniki" omówiono rezultaty wykonanych badań, które zestawiono w tabelach i zilustrowano na rycinach. W trakcie wykonywania badań nie obserwowano klinicznych objawów mikotoksykozy ZEN, natomiast stwierdzono występowanie ilościowych i jakościowych różnic w procesie przemian metabolicznych mikotoksyny. Z tym, że po najniższej dawce w początkowym etapie doświadczenia nie wykryto obecności produktów metabolizmu ZEN w stężeniach wyższych od granicy oznaczalności stosowanej metody, natomiast w środkowym i końcowym - głównym metabolitem był β-ZEL. Z ryciny 1 jednoznacznie wynika, że najwyższe stężenia ZEN w surowicy loszek występowały w 21 dniu (D2) narażenia, zaś w 42 dniu (D3) były niższe, ale występujące różnice nie były istotne statystycznie. Z przedstawionych na tej rycinie danych można też wywnioskować, że kinetyka przemian metabolicznych w dużej mierze mogła być zależna od zastosowanej dawki i czasu, w którym monitorowano zachodzące przemiany. Przy najwyższej dawce 15 mg/kg (ZEN 15) po 21 dniach (D2) narażenia zawartość obu metabolitów była mniejsza niż przy pozostałych dawkach i innych dniach pobrania krwi.

W grupach zwierząt doświadczalnych następował wzrost stężenia estrogenu, któremu towarzyszyło obniżenie zawartości progesteronu i testosteronu. Ponadto uzyskane wyniki wskazują na niewielkie, lecz statystycznie istotne zmiany wybranych wskaźnikach profilu metabolicznego krwi (ALT, AST, ALP, cholesterol, bilirubina, glukoza, białko całkowite, żelazo, BUN i mocznik) u badanych zwierząt. Poczynając od 4 ważenia, przyrosty masy ciała loszek były wyższe w grupach narażonych na ZEN w porównaniu do grupy kontrolnej.

Rozdział „Dyskusja" został podzielony na pięć podrozdziałów, w których omawiane są poszczególne elementy badań składających się dysertację. W pierwszym „Zearalenon i jego metabolity" dyskutowane są procesy biotransformacji mikotoksyny w organizmie niedojrzałych płciowo loszek. Doktorantka wskazuje, że przy najniższej dawce w początkowym okresie narażenia nie stwierdzano obecności metabolitów ZEN przypisując to niskiej podaży endogennych hormonów sterydowych przy równoczesnym wysyceniu zapotrzebowania młodych loszek.

Wbrew niektórym, wcześniejszym badaniom stwierdzano, że konsekwencją trwającego narażenia ZEN była obecność nie tylko substancji macierzystej, ale i obu metabolitów ZEN z tym, że β-ZEL występował w badanej surowicy w wyższych stężeniach, co zostało wytłumaczone między innymi jako zwiększony popyt na związki o wysokiej aktywności estrogennej, którymi są α-ZEL i ZEN. Analizując uzyskane wyniki Doktorantka wskazuje też na fakt, że procesy biotransformacji przy zastosowanych dawkach nie przebiegały identycznie, a substancja

macierzysta (ZEN) i powstałe metabolity mogły być wykorzystywane w mniejszym lub większym stopniu przez organizm loszek (jak np. przy dawce MABEL).

W części „Hormony sterydowe" Doktorantka podkreśla zasadność doboru dawek ZEN, które miały istoty wpływ na wysokość stężeń estradiolu, progesteronu i testosteronu w surowicy loszek, co wydaje być bardzo istotne w czasie dłuższego narażenia na tę mikotoksynę. Dyskutowany jest wpływ zmian stężeń testowanych hormonów na prawidłowe funkcjonowanie organizmu młodych niedojrzałych płciowo loszek. Między innymi przedwczesny wzrost stężenia progesteronu może skutkować podwyższoną receptywnością endometrium. W przypadku testosteronu zauważono wprost proporcjonalną zależność pomiędzy występującymi w surowicy stężeniami tego hormonu a przyrostem masy ciała zwierząt. Zastanawiające są natomiast wysokie stężenia testosteronu oznaczone w końcowym etapie doświadczenia.

Z części „Profil metaboliczny" wynika, że badane podczas niskodawkowej mikotoksykozy wskaźniki biochemiczne krwi mają tendencję spadkową, co może być efektem kompensacji polegającej na pobudzeniu lub wyhamowaniu ich aktywności. Na stonowanie przebiegu procesów przemiany materii mają również wpływ zwiększone przyrosty masy ciała.

W ostatnim podrozdziale „Przyrosty masy ciała" Doktorantka dyskutuje kwestię rozbieżnych wyników, z których z jednej strony wynika, że ZEN nie wpływa na masę ciała, średni dzienny przyrost, czy też żerność, a z drugiej, że ZEN ma wpływ na przyrosty masy ciała zwierząt pobierających paszę zawierającą tę mikotoksynę. Wskazując przy tym, że efektem narażania loszek niskimi dawkami ZEN jest jego bezpośredni kontakt z błoną śluzową jelit po pobraniu pasz przez zwierzęta, dlatego też wzrost masy ciała zwierząt doświadczalnych był większy w porównaniu grupy zwierząt kontrolnych.

Część eksperymentalną pracy zamyka podsumowanie, w którym Doktorantka wskazuje na specyfikę interakcji zachodzących pomiędzy małymi dawkami ZEN a organizmem młodych loszek. Podkreślana jest przy tym odmienność reakcji, w tym ilościowe różnice pomiędzy głównymi metabolitami, a mianowicie α-ZEL i β-ZEL, w tych badaniach okazało się, że głównym metabolitem jest β-ZEL, co może przyczyniać się do nieznacznego zwiększania przyrostów masy ciała i spowalniania dojrzewania płciowego loszek. Początkowe niskie stężenia ZEN i brak metabolitów w surowicy sugeruje fizjologiczne zapotrzebowanie organizmu loszek na egzogenne substancje estrogenopodobne. Natomiast wyższe dawki ZEN prowadzą do występowania tzw. "wolnego ZEN", który może powodować między innymi zanik jajnika czy pozorną ruję. Wyniki

badań mogą sugerować zastosowanie β-ZEL jako biomarkera niskodawkowej długotrwałej mikotoksykozy zearalenonowej u niedojrzałych płciowo loszek.

Przestawiona do recenzji uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, praca doktorska lek. wet. Anny Rykaczewskiej wychodzi naprzeciw aktualnym potrzebom współczesnej medycyny weterynaryjnej, które związane są z potrzebą diagnozowania skutków długotrwałego narażenia młodych zwierząt na aktywne substancje skażające materiały paszowe i pasze w małych, pozornie obojętnych dawkach.

Do badań zastosowano właściwe postępowanie metodyczne, które wykonano zgodnie z ogólnie przyjętymi wymaganiami. Dobór piśmiennictwa i przeprowadzona dyskusja wskazują na znajomość problematyki związanej ze środowiskowym narażeniem na substancje obce, a w szczególności oddziaływania małych dawek na organizm młodych zwierząt. Przebieg dyskusji wskazuje, że Doktorantka właściwie posługuje się piśmiennictwem z zakresu badań prowadzonych w ramach recenzowanej pracy.

W trakcie wykonywania recenzji nie znalazłem uchybień, które mogłyby mieć istotny wpływ na jakość wykonywanych badań. Tym nie mniej znalazłem kilka niedociągnięć, które można zaliczyć do redakcyjnych, a nie merytorycznych, miedzy innymi zamienne stosowanie słowa „osocze" w miejsce „surowica", czy „endokrynologiczny" zamiast „endokrynny".

Na podstawie dokonanej analizy przedstawionej do zaopiniowania pracy doktorskiej lek. wet. Anny Rykaczewskiej stwierdzam, że odpowiada ona warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 ze zm., Dz. U. z 2015 r. poz. 249) i może być przyjęta, jako rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauki rolnicze dyscyplina weterynaria.

Jednocześnie mając na uwadze zakres i oryginalność wykonanych badań, zastosowanie nowoczesnych technik analitycznych oraz układ doświadczeń gwarantujący uzyskanie wiarygodnych wyników wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej lek. wet. Anny Rykaczewskiej.

prof. dr hab. Andrzej Posyniak