Prof. dr hab. Bożena Obmińska-Mrukowicz

Katedra Farmakologii i Toksykologii

Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Wrocław, 1.08. 2020

RECENZJA

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

Podstawa formalna: recenzja została wykonana na podstawie uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 15 maja 2020 roku.

Zearalenon (ZEN) jest jedną spośród najczęściej spotykanych w tkankach roślin i zwierząt mykotoksyną czyli metabolitem wtórnym, wytwarzanym przez liczne grzyby pleśniowe z rodzaju *Fusarium*, głównie: *F. graminearum, F. culmorum, F. semitectum, F. equiseti, F. cerealis, F. crookwellense*. Grzyby z rodzaju *Fusarium* należą do najczęściej izolowanych patogenów upraw rolniczych na świecie. Są one przyczyną olbrzymich strat gospodarczych, które wynikają z wysokiej ich patogenności i toksynotwórczości, dlatego też uznano je za jedne z najgroźniejszych grzybów toksynotwórczych. Fusaria infekują uprawy roślinne o podstawowym znaczeniu gospodarczym dla człowieka, które często wykorzystywane w żywieniu zwierząt gospodarskich. Mykotoksyny produkowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium* do których należą m.in. zearalenon, deoksyniwalenol, fumonizyny, bowercyna czy też monilinoformina często określane są mianem mykotoksyn fuzaryjnych, które charakteryzują się wysoką zootoksycznością i fitotoksycznością. Dlatego obecność mykotoksyn fuzaryjnych w paszy może powodować wystąpienie stanów chorobowych zwanych mykotoksykozami, których przebieg oraz charakter może zależeć od wielu czynników. Kliniczne objawy mykotoksykozy wywołanej przez jedną z mykotoksyn fuzaryjnych jaką jest zearalenon są bardzo zróżnicowane i zależą przede wszystkim od wielkości dawki ale też od docelowego gatunku zwierzęcia, jego płci, wieku i stanu fizjologicznego. Ze zwierząt gospodarskich gatunkiem najbardziej wrażliwym na działanie tej toksyny jest trzoda chlewna zwłaszcza niedojrzałe płciowo loszki.

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Dziekanat Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Wpł. dnia 10-08-2020
L.dz. 14/2020
podpis osoby przyjmującej B. Chosia

Pod względem chemicznym zearalenon jest β-rezorcyno-laktonem, który w swojej strukturze obok pierścienia rezorcynowego zawiera makrocykliczny pierścień laktonowy, którego układ przestrzenny podobny jest do układu hormonów sterydowych. Dlatego też zearalenon jest jedną z najsilniej działających, niesteroidowych substancji o charakterze estrogennym występujących w przyrodzie. Po wchłonięciu z przewodu pokarmowego zearalenon ulega biotransformacji do czynnych metabolitów z których alfa-zearalenol wykazuje znacznie wyższą aktywność niż związek macierzysty. Dzięki obecności w swojej budowie chemicznej makrocyklicznego pierścienia laktonowego zearalenon i niektóre z jego metabolitów wykazują wysokie powinowactwo do obu receptorów estrogenowych ER-alfa i ER-beta, które występują w tkankach (układzie rozrodczym, błonie śluzowej jelit, gruczole mlekowym oraz strukturach ośrodkowego układu nerwowego jakimi są przysadka mózgowa czy też podwzgórze). ZEN i jego metabolity konkurując z endogennym estradiolem naśladują aktywność hormonów płciowych (estrogenów) prowadząc nawet przy długotrwałej ekspozycji do hyperestrogenizmu czy też zwiększonej śmiertelności trzody chlewnej. Ponadto zearalenon podobnie jak inne mykotoksyny charakteryzują się immunotoksycznością w stosunku do struktury narządów limfatycznych jak również funkcji wielu komórek immunologicznych co manifestować się może zwiększoną zapadalnością na infekcje wywołane przez różne czynniki patogenne, występowaniem chorób o podłożu autoimmunologicznym lub alergicznym, zaburzeń w układzie krwiotwórczym czy też obniżeniem odporności przeciwnowotworowej.

Dlatego też wybrany przez Doktorantkę problem naukowy dotyczący oceny wpływu przewlekłej ekspozycji niskich dawek zearalenonu podawanego doustnie niedojrzałym płciowo loszkom na biotransformację tej mykotoksyny oraz wydzielanie hormonów jajnikowych a także profil metaboliczny zwierząt eksperymentalnych, który stanowi rozprawę doktorską, należy uznać za ważny, aktualny, oryginalny, a także w istotny sposób uzupełniający wiedzę o oddziaływaniu tej mykotoksyny na organizm trzody chlewnej, gatunku zwierzęcia gospodarskiego charakteryzującego się wysoką wrażliwością na jej działanie.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. wet Anny Rykaczewskiej została wykonana w Katedrze Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. nauk wet. Magdaleny Gajęckiej oraz przy współudziale promotora pomocniczego dr nauk wet. Michała Dąbrowskiego. Badania zostały sfinansowane ze środków dotacji Konsorcjum

Naukowego KNOW „Zdrowe Zwierzę-Bezpieczna Żywność" uzyskanych zgodnie z decyzją Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 05-1/KNOW2/2015.

Cykl dwóch oryginalnych, współautorskich prac twórczych opublikowanych w latach 2018 oraz 2019 w języku angielskim w renomowanych czasopismach naukowych będących w bazie *Journal Citation Reports* składa się na rozprawę doktorską lek. wet. Anny Rykaczewskiej pt" *Biotransformacja zearalenonu podawanego w niskich dawkach oraz jego wpływ na wybrane wskaźniki endokrynologiczne i profil metaboliczny loszek*" .

Całość dokumentu przedstawionego jako praca doktorska zawiera w kolejności: stronę tytułową, streszczenie pracy w języku polskim, streszczenie pracy w języku angielskim, spis treści opracowany w sposób bardzo szczegółowy z podanymi odpowiednimi stronami, następnie dane bibliograficzne oraz kserokopie opublikowanych dwóch prac oryginalnych z załączonymi po każdej oświadczeniami Doktorantki oraz pozostałych Współautorów o Ich indywidualnym wkładzie i procentowym udziale w powstaniu każdej publikacji, opracowanie w języku polskim opisu wykonanych badań, które zawiera rozdziały typowe dla prac doktorskich o charakterze eksperymentalnym a więc wprowadzenie stanowiące wstęp, w którym naświetlony jest podjęty problem badawczy, cel pracy, materiał i metody, wyniki badań, dyskusję, podsumowanie badań oraz piśmiennictwo. Rozdziały takie jak wstęp, materiał i metody oraz wyniki badań zawierają odpowiednie podrozdziały.

Pierwszy artykuł wchodzący w skład rozprawy doktorskiej lek.wet. Anny Rykaczewskiej zatytułowany „*Growth performance, selected blond biochemical parameters and body" weights of pre-pubertal gilts fed diets supplemented with different doses of zearalenone (ZEN)* został opublikowany w 2018 roku w czasopiśmie Toxicon, którego IF wynosił w roku opublikowania 2.352 a liczba punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego 30, z kolei artykuł drugi zatytułowany „*Imbalance in the blond concentrations of selected steroids in pre-pubertal gilts depending on the time of exposure to low doses of zearalenone*" został opublikowany w 2019 roku w czasopiśmie Toxins, którego IF w roku opublikowania wyniósł 3.895 a liczba punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego 100. W obu artykułach Doktorantka jest pierwszym Autorem, a Jej wkład pracy w powstaniu w/w publikacji wyniósł odpowiednio 54 i 55% i polegał, zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami, na wykonaniu eksperymentu, analiz laboratoryjnych i współudziale w opracowaniu manuskryptów. Na podstawie załączonych oświadczeń licznych Współautorów, bo w pierwszym artykule oprócz Doktorantki Współautorami jest 6 pracowników naukowo-dydaktycznych, natomiast w

drugim 9 osób, przy czym wysoce istotny wkład w powstaniu obu manuskryptów bo po 25 % ma Promotor recenzowanej rozprawy doktorskiej, która jest jednocześnie autorem korespondencyjnym a indywidualny wkład pracy w powstanie obu manuskryptów polegał na opracowaniu koncepcji badawczej, przeglądu piśmiennictwa oraz również współudziale w opracowaniu artykułu. Z kolei wkład Promotora pomocniczego był minimalny i wynosił odpowiedni 5 i 2% i polegał na wykonaniu eksperymentu. Według mojej opinii jako Recenzenta przedstawione oświadczenia Współautorów, które stanowią integralną część wybranej formy pracy doktorskiej, zostały przygotowane w sposób trudny do zaakceptowania, ponieważ zgodnie z wymogami stawianymi rozprawom doktorskim, praca doktorska powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, przedstawić wiedzę teoretyczną Kandydata do stopnia naukowego doktora w danej dyscyplinie naukowej, znajomość literatury przedmiotu oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Zatem bardzo trudno sobie wyobrazić i zaakceptować, że Doktorantka nie miała istotnego udziału w opracowaniu koncepcji badawczej, wyborze cytowanych pozycji piśmiennictwa co warunkuje odpowiednie przygotowanie merytoryczne Doktoranta do podjętego tematu badawczego, jak również nie miała istotnego udziału w odpowiedzi na przesłane przez redakcje recenzje obu manuskryptów. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska obejmuje badania, które stanowią kontynuację tematu badawczego realizowanego od wielu lat przez zespół naukowy Katedry Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie to pomimo wymagane jest, żeby wkład twórczy Doktorantki w koncepcyjnym przygotowaniu postawionych zadań badawczych był istotny.

Celem przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej było zweryfikowanie hipotezy, czy dawki zearalenonu typu MABEL, NOAEL i LOAEL, podawane doustnie niedojrzałym płciowo loszkom przez sześć tygodni, mogą indukować zmiany: 1) jakościowo/ilościowe w procesach biotransformacji zearalenonu; 2) stężeń we krwi obwodowej wybranych hormonów steroidowych; 3) profilu metabolicznego i 4) przyrostów masy ciała loszek eksperymentalnych.

Z analizy danych przedstawionych w rozdziale Materiały i Metody wynika, że Doktorantka przyjęła 5 μg /kg masy ciała/dobę jako wielkość dawki MABEL *(minimal anticipated biological effect level)*, nie podając żadnego uzasadnienia ani danych doświadczalnych wskazujących na zasadność przyjętej wartości badanej mykotoksyny jako dawki MABEL. W roku 2007 Europejska Agencja Leków (EMEA) przyjęła projekt wytycznych w sprawie

wykonywania pierwszych badań klinicznych na ludziach ochotnikach (badania kliniczne I fazy) produktów medycznych potencjalnie wysokiego ryzyka. EMEA zaleciło, aby przy produktach wysokiego ryzyka stosować system najniższej przewidywanej dawki wywołującej skutki biologiczne czyli MABEL, która stanowi przewidywaną wielkość dawki powodującej najmniejsze biologiczne oddziaływanie na ludzi; EMEA zauważa, że przy jej określaniu należy uwzględnić takie czynniki bezpieczeństwa, jak nowatorski charakter substancji aktywnej, jej stężenie biologiczne i sposób działania. Co więcej, badane leki powinny być podawane powoli, jeśli to możliwe jako powolne infuzje w okresie kilku godzin, a pacjenci powinni być pod staranną obserwacją. Oczywiście oznaczenie wartości MABEL dla zearalenonu jest możliwe, ale wymaga wykonania odpowiednich eksperymentów na docelowym gatunku zwierząt. Kolejna wielkość dawki w przedstawionym układzie doświadczalnym do dawka NOAEL (*no observed adverse effect*) a więc najwyższa wielkość dawki danej substancji podanej systemowo, która nie wywołuje objawów niepożądanych. Doktorantka za wartość NOEL zearalenonu dla niedojrzałych płciowo loszek przyjęła dawkę 10 μg /kg /dobę co należy uznać za poprawne biorąc pod uwagę badania Bauera i wsp. opublikowane w *Tierarztliche Praxis*, 1987, 15, 33-36, pomimo, że Komitet ekspertów ds. dodatków do żywności (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA) przyjął, że dla układu rozrodczego świń najwyższa dawka zearalenonu, która nie powoduje występowania szkodliwego efektu zdrowotnego (NOAEL) wynosi 40 μg /kg/dobę. W obu opublikowanych manuskryptach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej dawka 10 μg/kg/dobę jest podana jako dawka NOAEL, natomiast w przedstawionym w języku polskim opracowaniu (str 43) jest podana nieprawidłowa informacja, że dawka NOAEL wynosi 15 μg /kg/dobę, a dawka LOAEL (*lowest adverse effects level*) najniższa dawka zearalenonu wywołująca działanie niepożądane u świń wynosi 10 μg/kg/dobę co byłoby nielogiczne dlatego traktuję to jako artefakt a nie błąd merytoryczny. Przyjęcie wielkości dawki LOAEL zearalenonu dla niedojrzałych płciowo loszek w wysokości 15 μg/kg/dobę powinno być przez Doktorantkę wyjaśnione i udokumentowane, ponieważ w dokumencie zatytułowanym *Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium Toxins part 2: Zearalenone (ZEA)* opublikowanym 22 czerwca 2000 roku podano informację że wielkość dawki LOAEL zearelononu dla prosiąt wynosi 200 μg/kg/dobę. Wybór wielkości dawek zearalenonu w wysokości 5, 10 i 15 μg /kg/dobę, uważam za prawidłowy, lecz bezpiecznej byłoby określić, że zastosowano dawkę NOAEL badanej mykotoksyny (bo to zostało udokumentowane) oraz dwie inne dawki stanowiące o 50% dawkę niższą (5 μg /kg/dobę) oraz o 50% dawkę wyższą (15 μg /kg/dobę) niż ustalona dawka NOAEL zearalenonu.

Maszynopis polskiej wersji rozprawy doktorskiej obejmuje 46 stron, w których zawarte jest 5 zestawień tabelarycznych i 18 rycin, a właściwie 22 ryciny ponieważ rycina 5, 6, 7 i 8 podzielone zostały na osobne część A i B oraz 107 pozycji piśmiennictwa. Zarówno zestawienia tabelaryczne jak również ryciny odpowiednio ponumerowane i opisane zostały umieszczone w kolejnych rozdziałach dysertacji co istotnie ułatwia czytelnikowi zrozumienie trudnych i wielowątkowych zagadnień przedstawionych w powyższej dysertacji. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że wykorzystane przez Doktorantkę przy pisaniu dysertacji piśmiennictwo obejmuje jedynie pozycje anglojęzyczne stanowiące oryginalne prace twórcze, które są bardzo aktualne bo opublikowane zostały w ostatnim dziesięcioleciu a więc w latach 2010-2020, jedynie 4 pozycje zostały opublikowane w latach 2003-2008. Powyższe świadczy o bardzo rzetelnym przygotowaniu do podjętego tematu badawczego.

Należy stwierdzić, że zakres badań podjętych przez Doktorantkę jest stosunkowo szeroki, o wysokim znaczeniu przede wszystkim poznawczym jak również aplikacyjnym co w przyszłości może zostać wykorzystane w procesie monitorowania stanu zdrowotnego trzody chlewnej. Przedstawione przez Doktorantkę wielokierunkowe cele badawcze, wymagały opracowania licznych układów doświadczalnych, które zostały zrealizowane w formie dynamicznej polegającej na kilkukrotnym oznaczeniu zaprojektowanych wskaźników w czasie 6 tygodniowego narażenia niedojrzałych płciowo loszek na niskie dawki badanej mykotoksyny fuzaryjnej. Dobór metod badawczych w zaplanowanych układach doświadczalnych został wykonany prawidłowo.

Rozdział Wprowadzenie do wykonanych badań został opracowany przez Doktorantkę w sposób poprawny, a jego treść świadczy o właściwym teoretycznym przygotowaniu Doktorantki do podjęcia powyższego tematu badawczego. Opracowany przez Doktorantkę rozdział „Materiał i metody" oraz 'Wyniki badań" jest opracowany w sposób logiczny i zwięzły, ale nie pozbawiony pewnych zastrzeżeń. Przedstawienie zaprojektowanych testów służących do oznaczenia wybranych wskaźników nie budzi zastrzeżeń, chociaż zgodnie z przekazaną informację większość z nich zostało wykonane poza macierzystą jednostką Doktorantki tj. w Instytucie Innowacji Przemysłu Mleczarskiego w Mrągowie gdzie oznaczane zostały stężenia zearalenonu i jego dwóch metabolitów alfa-zearalenolu oraz beta-zearalenolu oraz w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie gdzie zostało oznaczone stężenie estradiolu w osoczu krwi loszek eksperymentalnych oraz w Laboratorium Analitycznym Szpitala Miejskiego w Olsztynie gdzie zostało oznaczone stężenie progesteronu i testosteronu w osoczu krwi loszek

eksperymentalnych poddanych działaniu badanej mykotoksyny przez okres 6 tygodni w 3 dawkach. Mam nadzieję, że Doktorantka brała czynny udział w ich wykonaniu. Dla mnie jako Recenzenta będącego farmakologiem weterynaryjnym kontrowersyjne są określenia podane w rozdziale Materiał i Metody : 3.2.2 Ocena bioaktywności ZEN i jego metabolitów (str 44) oraz w rozdziale Wyniki 4.3 Biodostępność zearalenonu i jego metabolitów we krwi obwodowej (str 48), ponieważ Doktorantka oznaczała stężenia we krwi obwodowej zearalenonu i jego dwóch metabolitów alfa-zearalenolu oraz beta-zearalenolu po 7, 21 oraz 42 dniach po codziennym podaniu badanej mykotoksyny w dawkach 5, 10 i 15 μg /kg/dobę. Zatem Doktorantka nie oznaczała aktywności biologicznej substancji macierzystej i jej dwóch metabolitów ani też biodostępności substancji macierzystej, bo biodostępności metabolitów nie można oznaczyć znając definicję biodostępności. Biodostępność leku czy w tym przypadku badanej mykotoksyny określa jaka część dawki badanego związku (z danej postaci farmaceutycznej podanej pozanaczyniowo) ulega wchłanianiu i z jaką to następuje szybkością. Oznacza to, że do poznania biodostępności badanej substancji należałoby oznaczyć jej podstawowe wskaźniki farmakokinetyczne u danego gatunku zwierzęcia a więc u niedojrzałych płciowo loszek tj. 1) C max – maksymalne stężenie zearalenonu w osoczu; 2) T max – czas po jakim maksymalne stężenie wystąpi; oraz AUC (*Area Under Curve*) czyli pole pod krzywą zależności stężenia badanego związku we krwi od czasu, a parametr ten informuje o całkowitej ilości danego związku, jaka została wchłonięta do organizmu. Zwykle oznacza się te wskaźniki po wprowadzeniu pojedynczej dawki leku, rzadziej po wielokrotnym podaniu.

Rozdział Dyskusja jest napisany bardzo poprawnie, w sposób rzeczowy i rzetelny Doktorantka podejmuje w tym rozdziale polemikę z danymi naukowymi na powyższy temat, które zostały opublikowane przez innych autorów z innych ośrodków naukowych zarówno macierzystego jak i obcych polskich i zagranicznych. Szkoda, ze poprawnie udokumentowane wyniki badań nie doprowadziły do skonstruowania wniosków, które zwyczajowe stanowią odpowiedź na założone cele badawcze. Doktorantka dołączyła tekst zawierający opisowe podsumowanie przeprowadzonych badań, którego analiza może stanowić pozytywną odpowiedź, że zaprojektowane cele badawcze zostały osiągnięte.

Uważam, że praca lek. wet. Anny Rykaczewskiej zatytułowana : ***„Biotransformacja zearalenonu podawanego w niskich dawkach oraz jego wpływ na wybrane wskaźniki endokrynologiczne i profil metaboliczny loszek."*** odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim zawartym w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o

stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz 1789). Na podstawie przeprowadzonej oceny dysertacji doktorskiej wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie lek. wet. Anny Rykaczewskiej do dalszych etapów postępowania kwalifikacyjnego dla uzyskania stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie weterynaria.

Prof. dr hab. Bożena Obmińska-Mrukowicz