

Rzeszów, 20.01.2023

Prof. dr hab. Marek Koziorowski, dr h.c.
Instytut Biologii i Biotechnologii
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Rzeszowski

OCENA

rozprawy doktorskiej
mgr Karoliny Ropejko

pt. Ochratoksyna A w mleku, moczu i surowicy krwi oraz zearalenon
w moczu kobiet będących w okresie laktacji

**Recenzja została wykonana na wniosek Rady Dziedziny Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy z dnia 23.11.2022 r.**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana została w Katedra Fizjologii i Toksykologii Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy, pod opieką naukową Promotora dr. hab. Magdaleny Twarużek, profesora uczelni.

Do oceny dołączony został napisany w języku polskim stanowiący opracowanie-maszynopis będący podstawą do ubiegania się o stopień doktora nauk.

Przedstawiony do oceny manuskrypt, wraz z piśmiennictwem liczy 125 stron oraz 5 załączników. Wyniki przedstawione zostały graficznie w postaci 39 tabel, 20 fotografii, 8 rysunków i 17 wykresów.

Zawiera następujące rozdziały :Wykaz skrótów, Wstęp, Grzyby pleśniowe i mikotoksyny, Ochratoksyna A, Zearalenon, Aktualne możliwości wykrywania OTA i ZEN w żywności, Mleko kobiece, Banki mleka, Mikotoksyny w mleku, Cel badań, Materiał i metody, Metody statystyczne i wyniki, Dyskusja i wnioski oraz liczne pozycje piśmiennictwa w większości

anglojęzyczne z ostatniej dekady, co świadczy o znajomości najnowszych osiągnięć światowych z zakresu toksykologii mikotoksyn. Dodatkowo Doktorantka cytuje prace Katedry Fizjologii i Toksykologii, co świadczy o Jej znajomości tematyki badawczej w jednostce prowadzącej. W bazie bibliometrycznej Scopus jest 3 razy indeksowana z współautorami z Katedry (jako pierwszy autor) z 66 cytowaniami.

W 4 pierwszych rozdziałach Doktorantka wprowadza nas w tematykę dwóch mikotoksyn zearalenonu i ochratoksyny A, dość powszechnie występujących w środowisku. Omawia między innymi ich występowanie, toksokinetykę, wpływ na zdrowie ludzi i zwierząt. Następnie przedstawia wyniki prowadzonych badań, które skupiały się na występowaniu ochratoksyny A w mleku, moczu i surowicy krwi, a także zearalenonu w moczu kobiet będących w okresie laktacji, w tym dawczyń z Banku Mleka Kobiecego. Zdaniem recenzenta dobór badań nad ochratoksyną A i zearalenonem jest godny podkreślenia, albowiem ich działanie, karcenogenność, nefrotoksyczność, genotoksyczność, mutagenność i neurotoksyczność wraz z immunopresyjnym działaniem oraz silne działanie estrogenowe zearalenonu obecnego w organizmach kobiet w okresie laktacji może być zaczątkiem dysfunkcji układu rozrodczego u noworodków. W rozdziałach 3 i 4 Autorka szczegółowo opisuje absorpcję, wydalanie i metabolizm obu mikotoksyn oraz mechanizmy ich działania.

W rozdziale 5 Doktorantka opisuje aktualne możliwości wykrywania mikotoksyn w żywności. Współcześnie w laboratoriach, wraz z rozwojem technologii dominującą metodą detekcji jest chromatografia. Do wykrywania Ochratoksyny A stosowana jest głównie technika HPLC z wykorzystaniem detektorów z fluorescencją, które charakteryzują się wysoką czułością. Metoda ta może być również wykorzystana do analiz zearalenonu.

W rozdziale 6 pt. Mleko kobiece Autorka szeroko opisuje mleko kobiece jako najzdrowszą formę żywienia nowo narodzonych dzieci, które zawiera pełen skład białka, tłuszczy, oligisacharydów, długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, gangliozydów, witamin rozpuszczalnych w tłuszczach i innych biologicznie aktywnych składników niezbędnych do rozwoju noworodka. W rozdziale 7 przedstawia historię banków i wymienia głównych beneficjentów korzystających z kobiecego mleka z banków mleka.

Badania prowadzone przez Doktorantkę zostały wykonane przy współpracy z Regionalnym Bankiem Mleka Kobiecego w Toruniu. Bank Mleka Kobiecego został otworzony 28 maja 2013 roku z inicjatywy Samorządu Województwa Kujawsko-Pomorskiego, Wojewódzkiego Szpitala Zespołonego im. L. Rydygiera w Toruniu oraz Fundacji Bank Mleka Kobiecego w ramach realizacji Programu Promocji Karmienia Piersią pt.: „Mamy mleko dla wcześniaka w województwie kujawsko-pomorskim”. Zdaniem recenzenta na szczególną

uwagę zasługują badania mikotoksyn w mleku opisane w rozdziale 8. Autorka opisała, że szczególne niebezpieczeństwo może stwarzać mleko dostarczane noworodkom (szczególnie wcześniakom lub w przypadku bezmleczności u mam) z banków mleka. Każda karmiąca kobieta na zasadzie dobrowolności może przekazać nadmiar swojego mleka do banku. Dawczyńie przechodzą podczas procesu rekrutacyjnego badania krwi w kierunku chorób zakaźnych. Mleko poddawane jest badaniom mikrobiologicznym.

Doktorantka w swojej pracy za główny cel (rozdział 9) postawiła sobie określenie częstości i ilości występowania ochratoksyny A w płynach ustrojowych (mleko, mocz, surowica) kobiet w okresie laktacji, które zgłosiły się do badania, oraz określenie częstości występowania i ilości zearalenonu w moczu tej samej grupy badawczej.

Jako cele dodatkowe Autorka wymienia:

- zbadanie zależności pomiędzy występowaniem ochratoksyny A w płynach ustrojowych (mleko, mocz, surowica) a rodzajem diety przestrzeganej przez badane kobiety,
- zbadanie korelacji występowania ochratoksyny A w przypadku tandemowego karmienia dzieci (karmienie w tym samym czasie dzieci w różnym wieku) oraz w zależności od podstawowych informacji okołoporodowych, które dotyczą długości ciąży, wagi nowonarodzonego dziecka i wieku matki czy rodzaju karmienia dziecka (pokarmem z piersi lub pokarmem odciągniętym), (ten punkt jest nie do końca zrozumiały. Proszę o bliższe informacje i wyjaśnienie takiej celowości analiz.)
- zbadanie czystości mikrobiologicznej mleka (niepasteryzowanego) kobiecego dawczyń z banku mleka kobiecego w Toruniu,
- zbadanie składu mleka kobiecego, a także jego korelacji z występowaniem w nim ochratoksyny A,
- zbadanie wpływu pasteryzacji mleka kobiecego na występowanie w nim ochratoksyny A.

Wszystkie badania zostały przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu, Collegium Medicum w Bydgoszczy, o numerze KB323/2018. Materiał badawczy stanowiło z 60 próbek mleka kobiecego, 60 próbek moczu oraz 60 próbek krwi.

W pracy doktorskiej Doktorantka opisała metodykę oznaczania ochratoksyny A w mleku, moczu i surowicy oraz oznaczania zearalenonu i jego metabolitów w moczu. Dodatkowo wykonała ocenę czystości mikrobiologicznej mleka oraz badania pod kątem występowania drobnoustrojów – skażenia drobnoustrojami. Ochratoksynę A w mleku i moczu oznaczono metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną, natomiast ochratoksynę A w surowicy

krwi i zearalenon w moczu metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrem masowym. Skład mleka kobiecego analizowano w Banku mleka za pomocą analizatora składu mleka.

Zależności stochastyczne pomiędzy zawartością ochratoksyny A, a zawartością tłuszczu, białka całkowitego, białka odżywczego, węglowodanów, suchej masy i wartością energetyczną opracowano w oparciu o współczynnik rang Spearmana. Związki uznano za istotne statystycznie na poziomie $p = 0,05$. Istotną i pozytywną korelację wykazano pomiędzy zawartością ochratoksyny A i białka całkowitego oraz pomiędzy ochratoksyną A i białkiem odżywczym. Ochratoksynę A wykryto w mleku tylko u 4 kobiet będących w laktacji (liczba próbek mleka – 30), natomiast w moczu u 24. U wszystkich kobiet poddanych badaniom wykryto ochratoksynę A we krwi.

Doktorantka w pracy badała również zależność występowania ochratoksyny A w płynach ustrojowych od podstawowych parametrów opisujących badane kobiety i ich dzieci karmione piersią – wiek badanej kobiety, tydzień ciąży, kiedy nastąpił poród, masa urodzeniowa dziecka. W tym celu Doktorantka przeprowadziła serię analiz korelacji liniowej Pearsona. Wykazała istotne korelacje jedynie w przypadku zmiennej „zawartość ochratoksyny A w surowicy matki”. Wraz ze wzrostem poziomu zmiennej „tydzień, w którym nastąpił poród” dochodziło do istotnego wzrostu poziomu zawartości ochratoksyny A w surowicy matki. Wykazała również, że karmienie odciągniętym pokarmem (w porównaniu do karmienie piersią) związane jest z istotnym obniżeniem poziomu ochratoksyny A w surowicy matki. (Prosiłbym również o interpretację wyniku, że karmienie odciągniętym pokarmem (w porównaniu do karmienie piersią) związane jest z istotnym obniżeniem poziomu ochratoksyny A w surowicy matki. Co może być przyczyną mniejszego poziomu ochratoksyny A w surowicy przy karmieniu odciągniętym pokarmem?)

W celu weryfikacji hipotezy zakładającej, że tydzień, w którym nastąpił poród, oraz karmienie odciągniętym pokarmem (versus karmienie piersią) są istotnymi prognostykami poziomu zawartości ochratoksyny A w surowicy matki, przeprowadzono wielozmienną analizę regresji liniowej. Analiza statystyk poszczególnych prognostyków w modelu wykazała następujące rezultaty: Wzrost wyników zmiennej „tydzień, w którym nastąpił poród” wiązał się ze wzrostem poziomu zawartości ochratoksyny A w surowicy matki, aczkolwiek uzyskany wynik był nieistotny statystycznie. Wzrost wyników zmiennej „karmienie odciągniętym pokarmem” wiązał się ze spadkiem poziomu ochratoksyny w surowicy matki, aczkolwiek uzyskany wynik był nieistotny statystycznie.

Doktorantka dokonała też analizy zależności pomiędzy występowaniem w moczu badanych kobiet zearalenonu (ZEN) i jego metabolitów: α zearalenolu (α -ZEL), β zearalenolu

(β -ZEL), α zearalanolu (α -ZAL) oraz zearalanonu (ZAN). Zależności stochastyczne pomiędzy zawartością zearalenonu (ZEN), a jego metabolitami obliczone zostały z wykorzystaniem współczynnika korelacji prostej r – Pearsona. Doktorantka wykazała istotne i pozytywne zależności pomiędzy zawartością zearalenonu i: β -ZEL, α -ZEL, α -ZAL oraz ZAN. Zearalenon (ZEN) i jego metabolity były obecne we wszystkich badanych próbkach moczu.

Autorka wykazała również wpływ odpowiednio dobranej diety na obecność lub brak ochratoksyny A w mleku kobiecym. Nie wykazała zależności pomiędzy dietą, a obecnością ochratoksyny A w moczu i surowicy krwi.

Zaprezentowane wyniki nabierają szczególnego znaczenia w ostatnich czasach w związku z globalizacją upraw roślinnych, dość długim przechowywaniem zbóż, niekoniecznie w najlepszych warunkach. Wszystko to składa się na wzmożenie aktywności grzybów mikotoksynotwórczych, a tym samym coraz większe zanieczyszczenie produktów roślinnych – szczególnie kukurydzy, a następnie przetworów nabiałowych i mięsnych od zwierząt karmionych taką paszą. Można przewidzieć, że w najbliższym czasie problem ten wystąpi na Ukrainie, która produkuje 20 % światowej produkcji zbóż, a zarówno przechowywanie, jak i transport produktów rolnych jest obecnie wydłużony i upośledzony.

Ochratoksyny są absorbowane we wszystkich odcinkach układu pokarmowego i pojawiają się bardzo szybko w układzie krwionośnym, następnie transportowane przez żyłę wrotną w końcu trafiają do kanalików nerkowych, gdzie podlegają filtracji i wydalane są z moczem. Część ochratoksyny A w obszarze dwunastnicy jest trawiona przez karboksypeptydazę. Szkodliwy dla organizmu jest bardzo długi okres półtrwania u człowieka, wynoszący około 35 dni.

Druga mikotoksyna, która stanowiła obiekt Doktorantki to zearalenon. Jest to niesterydowa estrogenowa mikotoksyna produkowana przez grzyby z rodziny *Fusarium*. Jej charakterystyczną cechą jest mechanizm działania poprzez receptory estrogenowe, co z jednej strony może stanowić substytut estrogenowy, a z drugiej wywoływać hiperestrogenemię i całkowite rozregulowanie rozrodu zwierząt i ludzi. Pojawiające się coraz częściej sygnały o występowaniu tej mikotoksyny na niezebranych kolbach kukurydzy i kłosach zbóż potwierdzają przypuszczenia o rozchwianiu sezonowości rozrodu, między innymi u dzików. Dodatkowo spożywanie takiego pokarmu przez karmiące matki – od ludzi po zwierzęta – może skutkować wzbudzeniem molekularnych funkcji układu rozrodczego, jak i również poprzez aktywację receptorów estrogenowych wzbudzać hormonozależne nowotworzenie. Zdaniem recenzenta oprócz przedstawienia słusznych i udowodnionych wniosków, należałoby

wzbogacić o jeszcze jeden wniosek, że mleka używane do karmienia noworodków i dzieci powinno być szczegółowo badane w kierunku obecności zearalenonu.

Jednocześnie z obowiązku recenzenta prosiłbym o uszczegółowienie, a jednocześnie wyjaśnienie jaki był cel badania zależności występowania ochratoksyny A w płynach ustrojowych od podstawowych parametrów opisujących badane kobiety i ich dzieci karmione piersią – wiek badanej kobiety, tydzień ciąży, kiedy nastąpił poród, masa urodzeniowa dziecka. Według recenzenta ten cel badawczy jest niezbyt jasny. Należałoby to wyjaśnić i połączyć z metabolizmem ochratoksyny A, tym bardziej, że producentem ochratoksyny są szczepy grzybów, a nie czynna synteza w organizmie ludzkim.

Czy ochratoksyna ma dłuższy czas przetrwania w gruczole mlekowym? Autorka użyła sformułowania: *Ustalono również, że karmienie odciągniętym pokarmem (versus karmienie piersią) związane jest z istotnym obniżeniem poziomu OTA w surowicy matki.* Co może być przyczyną mniejszego poziomu ochratoksyny A w surowicy? Karmienie odciągniętym mlekiem dotyczy noworodka, a nie matki. Jaki ma to związek z poziomem ochratoksyny w surowicy matki?

Reasumując, przedstawione do recenzji opracowanie stanowi istotny i oryginalny wkład do nauki i poznania zagrożeń włączonych w produkcję pasz jak i żywności dla ludzi i zwierząt. Czyni to zaprezentowany cykl badań niezwykle wartościowym i wiele wnoszącym nie tylko w zakresie aplikacyjnym ale i prozdrowotnym.

W ocenianym opracowaniu Doktorantka wykazała się dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje moim zdaniem doskonały wybór tematyki będący szeroko pojętą problematyką badawczej jednostki prowadzącej, w szczególności Pani Profesor Promotorki oraz Kierownika Katedry Fizjologii i Toksykologii Pana Profesora Jana Grajewskiego. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka posiada ważne w pracy badawczej cechy, takie jak pracowitość, solidność i dociekliwość.

WNIOSEK KOŃCOWY

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Ropejko pt. **Ochratoksyna A w mleku, moczu i surowicy krwi oraz zearalenon w moczu kobiet będących w okresie laktacji** w opinii recenzenta spełnia wszystkie wymagania – określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst

jednolity: Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.) – stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dziedziny Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy o dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Kwizny', is centered on the page.