



Dr hab. Marcin Bryła, prof. IBPRS-PIB
Zakład Bezpieczeństwa i Analizy
Chemicznej Żywności

Warszawa, 22.01.2023 r.

RECENZJA

Rozprawa doktorska Pana mgr Roberta Kosickiego, pt.: „Ocena współwystępowania mikotoksyn w surowcach roślinnych, produktach spożywczych i paszowych oraz ludzkim materiale biologicznym” wykonanej pod kierunkiem Pani dr hab. Magdaleny Twarużek, prof. Uczelni (UKW) w Katedrze Fizjologii i Toksykologii Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego w Bydgoszczy

Mykotoksyny stanowią poważny problem na całym świecie. Pomimo ogromnego postępu poczynionego w rolnictwie w ostatnich latach, wciąż dużym wyzwaniem jest zapobieganie infekcjom roślin patogenicznymi grzybami, ponieważ nie ma możliwości kontrolowania czynników środowiskowych w czasie wegetacji roślin. Dodatkowego znaczenia problemom nadają zmiany klimatyczne, które cechują się anomaliami w zakresie temperatury otoczenia, zanikiem ciągłych opadów i wzrostem częstości okresowej suszy, przeplatanej nawałnymi i ulewnymi opadami. Zjawiska te w różnym stopniu mogą przyczynić się do wystąpienia infekcji roślin oraz stymulować biosyntezę mykotoksyn przez te grzyby.

Mając na uwadze bezpieczeństwo żywności i pasz, Doktorant w swojej dysertacji przedstawił zagadnienie dotyczące szerokiej tematyki badań związanych z analityką mykotoksyn, oceną bezpieczeństwa wybranych surowców/produktów żywnościowych i paszowych pod względem obecności tych substancji, a także oceny narażenia człowieka na ochratoksynę A na podstawie jej analizy w surowicy krwi pobranej od dwóch grup ludzi. Uzyskane przez Doktoranta wyniki badań doświadczalnych zostały scharakteryzowane i stanowią podstawę cyklu sześciu opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. Rozprawa doktorska zawiera wstęp teoretyczny, scharakteryzowane cele pracy, charakterystykę materiałów i metod badawczych, jednolity rozdział dotyczący wyników i dyskusji, wnioski oraz cytowane piśmiennictwo. Na końcu pracy zamieszczono sześć artykułów badawczych wchodzących w skład cyklu oraz odrębnie popisanymi oświadczeniami współautorów poszczególnych prac o procentowym udziale w powstaniu artykułu naukowego.



Ponadto do pracy doktorskiej dołączono streszczenie w języku polskim oraz w języku angielskim oraz wykaz wykorzystywanych skrótów.

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w latach 2016 – 2021. Wszystkie artykuły pochodzą z czasopism wymienionych na liście *Journal Citation Reports: Animal Feed Science and Technology* (2016 r.), *Toxins* (2 artykuły z 2019 i 2020 r.), *Toxicon* (2 artykuły z 2020 i 2021 r.) oraz *Annals of Animal Science* (2021 r.). Łączna wartość współczynnika oddziaływania *Impact Factor* dla tych prac wg roku opublikowania wynosi 18,567. Suma punktów wg wykazu MNiSW/MEiN czasopism z roku opublikowania wynosi 700. Łączna liczba cytowań tych artykułów wg bazy Scopus w momencie złożenia pracy przez Doktoranta wynosiła 77. W czterech artykułach naukowych stanowiących rozprawę doktorską Doktorant jest pierwszym autorem, a w pozostałych dwóch – drugim. Wszystkie artykuły są pracami wieloautorskimi (od trzech do pięciu autorów). Wkład Doktoranta w powstanie omawianych prac jest znaczący (we wszystkich pracach wkład ten wynosi co najmniej 50%). Doktorant w pracach tych brał udział m. in. w opracowaniu koncepcji doświadczeń, dokonał przeglądu literatury, realizował eksperymenty walidacyjne, przygotowywał próbki do analizy, wykonywał analizy, przeprowadzał interpretacje uzyskanych wyników, brał udział w pisaniu manuskryptu, w przypadku niektórych prac korespondował z redaktorem czasopisma i dokonywał redakcji całości pracy.

Tematyka artykułów składających się na rozprawę doktorską koncentruje się wokół występowania i współwystępowania mykotoksyn w różnych matrycach paszowych, żywnościowych, a także dotyczy charakterystyki narażenia dwóch grup ludności na ochratoksyny A na podstawie jej analizy w surowicy krwi. Od strony metodycznej przedstawione w pracy doktorskiej badania były poparte technikami analitycznymi bazującymi na zestawach chromatografu ciekłego sprzężonego z detektorem fluorescencyjnym oraz spektrometrem mas z analizatorem typu potrójny kwadrupol. Zastosowane techniki w wymienionych badaniach uważam za jak najbardziej właściwe. W rezultacie przeprowadzonych badań uzyskano ogromną liczbę wyników. Mają one charakter poznawczy i uwiarygadniają problem związany z powszechnym występowaniem mykotoksyn na przestrzeni pewnego okresu. Ponadto, Doktorant w pracy doktorskiej zwrócił uwagę na zagadnienie związane ze współwystępowaniem mykotoksyn w badanych próbkach. Współwystępowanie mykotoksyn w żywności i paszach ma istotne znaczenie dla badań toksykologicznych. Efekt synergizmu toksycznego działania niektórych toksyn względem



różnych komórek jest aktualnie na świecie intensywnie badany. Charakter poznawczy i wartościowy mają również wyniki dotyczące narażenia ludności na ochratoksynę A na podstawie jej analizy w surowicy krwi różnych grup ludności. Nefrotoksyczne działanie ochratoksyny A skłoniło Doktoranta do przeprowadzenia badań w zakresie porównania jej obecności i zawartości w surowicy krwi u dializowanych pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek z grupą kontrolną (osoby zdrowe).

Reasumując, przedstawiona do oceny dysertacja Pana mgr. Roberta Kosickiego zawiera interesujące zagadnienia mające charakter oryginalny i poznawczy. Została przygotowana z wykorzystaniem właściwego warsztatu metodycznego. Nie mniej jednak Doktorant w wielu miejscach pracy nie zachował staranności językowej i jasności formułowanych stwierdzeń. Część tekstu uważam za niepotrzebną, niestanowiącą syntetycznego podsumowania badań przedstawianych w artykułach naukowych.

Spośród tych uwag należy wspomnieć o Streszczeniu. Streszczenie w mojej opinii jest za długie. Zawiera wprowadzenie do problemu, ale brakuje w nim jasno sformułowanego celu badań, czy też hipotez badawczych oraz zakresu badań. Doktorant pomijając te aspekty bezpośrednio kieruje czytelnika z ogólnego wprowadzenia do wybranych wyników badań, pozbawiając dysertacji jej celowości. Przez to, zaskakująca dla czytelnika wydaje się informacja, że pomiędzy próbkami ziarna zbóż i pasz pojawiają się próbki żołądki, piw, suplementów diety, kawy, czy też surowicy krwi, a nawet ocena ryzyka narażenia ludzi na wybrane mykotoksyny. Taka konstrukcja wprowadza chaos i brak zrozumienia celowości badań.

Część teoretyczna pracy w mojej opinii jest również za długa. Zawiera wiele niepotrzebnych historycznych odniesień jak również czysto podręcznikowych informacji dotyczących charakterystyki budowy poszczególnych grup mykotoksyn. Doktorant w jednym z celów badań zawarł opracowanie metod badawczych oznaczanych mykotoksyn w różnych próbkach materiału roślinnego, paszowego, żywności i surowicy krwi. Uważam, że ten aspekt nie powinien być celem głównym ale pobocznym, ponieważ w znacznym stopniu nie ma charakteru oryginalnego. Doktorant, wykorzystywał procedury aplikacyjne załączone do materiałów wykorzystywanych przy oczyszczaniu badanych analitów (kolumny powinowactwa immunologicznego, czy kolumny SPE MultiSep i Bond Elut Mycotoxin). Oczywiście niektóre metody i ich modyfikacje były dostosowywane do badanych matryc co może sprawiać, że część opisów metodycznych ma charakter oryginalny.



W części eksperymentalnej, w rozdziale „Materiały i metody” Doktorant dużo miejsca poświęcił charakterystyce stosowanych metod badawczych. Z racji poprzedniego komentarza uważam tę część za bardzo rozbudowaną. Żaden z artykułów będących przedmiotem rozprawy nie obierał za cel opracowania metod badawczych. Opracowanie metod badawczych oznaczania mykotoksyn jest procesem trudnym, wymagającym i żmudnym, które Doktorant opanował doskonale. Stosowane metody stanowią fundament, a ich wiarygodność jest konieczna do prawidłowej interpretacji wyników. Metody te jednak, choć są częścią pracy, nie stanowiły problemu naukowego. Niemniej jednak należy podkreślić, że Doktorant opanował warsztat analityczny i potrafi go wykorzystywać w realizacji badań naukowych. Ponadto, zastosował w badaniach wzorce znakowane izotopowo, co jest pożądane dla uzyskania wysokiej wiarygodności wyników i usprawnienia pracy.

W rozdziale „Wyniki i dyskusja”, Doktorant dużo miejsca poświęcił stosowanym metodom badawczym. Rozwlekłość charakterystyki tego zagadnienia przysłania pozostałe najważniejsze wątki badawcze. W dalszej części pracy przedstawiono omówienie i dyskusję wyników badań w zakresie zagrożenia związanego z występowaniem niektórych mykotoksyn w paszach i wybranych materiałach paszowych na znacznej liczbie różnych próbek (kiszonki kukurydziane, ziarno zbóż, żołądzie). Choć wyniki mają szczególne znaczenie dla bezpieczeństwa pasz i wnoszą wiele informacji w tym zakresie, w mojej ocenie podstawowym zarzutem do tej części jest brak przedstawionej tabeli zbiorczej z zawartościami poszczególnych mykotoksyn i liczbą próbek do badań. Z kolei dane te są wymienione w tekście, ale nie przy wszystkich omawianych pracach. Pełne informacje w tym zakresie można odnaleźć dopiero w publikacjach. Brak tych informacji sprawia, że recenzowana praca nie jest do końca jasna i przejrzysta. Również dyskusja wyników w dużej części opiera się „suchym” porównaniu wyników uzyskanych w badaniach Doktoranta z badaniami innych autorów.

Podobne uwagi dotyczące dyskusji wyników można odnaleźć w przypadku rozdziałów opisujących ocenę zagrożenia związanego z występowaniem mykotoksyn w żywności, czy też oceną narażenia dwóch grup ludności na ochratoksynę A na podstawie jej analizy w surowicy krwi u dwóch grup ludności. Spośród próbek żywności, Doktorant analizował dość nietypowe produkty spożywcze w skład których wchodziły piwo, zielona kawa oraz suplementy diety na bazie tego surowca. Ponadto, na podstawie uzyskanych średnich wyników zawartości badanych mykotoksyn w piwie oraz poziomu jego spożycia w



różnych krajach Europy, Doktorant dokonał oceny szacunkowego pobrania tych substancji z piwa i dokonał porównania tych wartości z dziennym tolerowanym pobraniem dla poszczególnych toksyn (TDI). Również zielona kawa, a także produkty na jej bazie (w tym suplementy diety) charakteryzowały się obecnością ochratoksyny A – toksyny, która po aflatoksynach uznawana jest za najniebezpieczniejszą z mykotoksyn ze względu na jej długi okres półtrwania we krwi i głównie silne właściwości nefrotoksyczne. Uzyskane wyniki, mają zatem istotną wartość dla konsumentów i dla szeroko rozumianego bezpieczeństwa żywności.

Całość pracy została zwieńczona wnioskami, które w mojej opinii w niektórych przypadkach mają charakter opisowy i spekulacyjny poprzez posługiwanie się fraz: „może budzić...”, „może prowadzić...”, „co sugeruje...”, „mogło wystąpić...”, „mogą być...”.

Uwagi i pytania do Doktoranta

1. W metodzie oznaczania mykotoksyn przy zastosowaniu techniki LC-MS/MS, w fazach stosowanych do rozdziału analitów wykorzystywano 1% dodatek kwasu octowego. W mojej opinii jest to wysokie stężenie. Czy Doktorant może wskazać powody takiego zabiegu?
2. Str. 12 Doktorant wspomina o wykonaniu 8000 oznaczeń w próbkach surowców roślinnych i pasz. Co należy rozumieć przez to stwierdzenie?
3. Str. 41. W procedurze oznaczania trichotecen i zearalenonu w badanych próbkach dodawano wzorce znakowane izotopem węgla na różnych etapach. Wzorzec ^{13}C -ZEN dodawano do ekstraktu przed naniesieniem na kolumnkę Elut Bond Mycotoxin, natomiast pozostałe do oczyszczonego ekstraktu (po oczyszczeniu ekstraktu). Jaka była przyczyna takiego postępowania? Czemu ostatecznie odparowaną próbkę w strumieniu azotu rozpuszczano akurat w 495 μL ? Proszę o wyjaśnienie.
4. W opisach metod nie doprecyzowano na ilu poziomach wzmocnienia próbek badanymi analitami przeprowadzono ocenę odzysku i powtarzalności metody. Jaka była liczba powtórzeń niezależnych?
5. Tabela 14 zawiera wyróżnik „Efekty matrycy [%]”. Brakuje wyjaśnienia jak ta wartość została wyliczona.
6. Str. 63. „W okresie 2011-2014 przeanalizowano łącznie 1384 surowców roślinnych i pasz (295 próbek kukurydzy, 143 próbki kiszonek z kukurydzy, 466 próbek zbóż drobnoziarnistych oraz 480 próbek pasz pełnoporcjowych dla trzody chlewnej, drobiu i bydła) pod kątem obecności DON, NIW, toksyny T-2, toksyny HT-2, ZEN, FB, OTA i AF (publikacja D1).” Natomiast cztery zdania dalej Doktorant pisze: „Fumonizyny, mikotoksyny,



które często zanieczyszczają kukurydzę, wykryto w 58% z 83 analizowanych próbek (mediana 15,0 µg/kg; maksymalna zawartość 1885 µg/kg).”; „... a aflatoksyny tylko w 1 z 45 próbek”. Bardzo proszę Doktoranta o wyjaśnienie ile próbek było przedmiotem badań i które mykotoksyny analizowano w poszczególnych grupach próbek.

8. Przedmiotem badań Doktoranta była ocena występowania mykotoksyn w żołądziach pozyskanych z wielkopolskich lasów. Na stronie 74 Autor sugeruje, że może to być cenny surowiec wykorzystywany w żywieniu trzody chlewnej wspominając, że żołądzie dębu korkowego rosnącego na Południu Europy są podawane trzodzie chlewnej specjalnej rasy, w celu pozyskania najwyższej klasy szynki. Czy możliwe jest wykorzystanie żołądzi dębu szypułkowego rozpowszechnionego w Europie w żywieniu zwierząt? Czy jest to na świecie praktykowane? Skąd wzięło się przypuszczenie, że żołądzie mogą być zainfekowane grzybami z rodzaju *Fusarium*?

9. Doktorant w wielokrotnie wspomina w swojej dysertacji o współwystępowaniu mykotoksyn w badanych próbkach. Wielu wskazuje na możliwy synergistyczny efekt oddziaływania mykotoksyn na organizm człowieka i zwierząt. Czy znane są Doktorantowi wyniki badań opisanych w literaturze wskazujące na synergistyczny efekt toksycznego oddziaływania więcej niż jednej toksyny na komórki w warunkach *in vitro* lub *in vivo* w wyniku ich narażenia?

10. Jak Doktorant słusznie zauważył w większości próbek ziarna zbóż i pasz, obecności deoksyniwalenolu towarzyszyła obecność zearalenonu. Należałoby by oczekiwać, że w przypadku próbek piw powinna być podobna zależność, a tak nie jest ani w przypadku badanych próbek, ani większości opublikowanych wyników tego rodzaju badań. Czy Doktorant może wskazać przyczyny wyjaśniające generalnie niższą częstość występowania zearalenonu w próbkach piw niż deoksyniwalenolu?

11. Doktorant w badaniach dotyczących oceny występowania ochratoksyny A i cytryniny w zielonej kawie oraz suplementach diety nie wykrył cytryniny. W dyskusji nie nawiązał do potencjalnej obecności tej toksyny w tych produktach. Czy w literaturze naukowej istnieją dane wskazujące, że kawa zielona i jej produkty mogą być źródłem cytryniny?

Przykłady niezrozumiałych i niedopracowanych zwrotów i stwierdzeń

Str. 13 „Stwierdzono występowanie wyższych poziomów mikotoksyn w piwach rzemieślniczych, co sugeruje że powinny one być częściej badane, aby chronić zdrowie „pasjonatów piwa”.



Str. 26 „W ciągu ostatnich kilkunastu lat zidentyfikowano związki będące wynikiem biochemicznej modyfikacji mikotoksyn, zachodzącej podczas procesów metabolizmu w organizmach roślinnych. Przemiany te wynikają głównie z mechanizmów obronnych roślin lub procesów termicznych.”

Str. 29 „Wykorzystanie podczas ekstrakcji zakwaszonych roztworów rozpuszczalników pomaga rozerwać silne wiązania między analitem a składnikami żywności (białkami i cukrami) i jest często stosowane w celu uzyskania lepszej wydajności procesu.”
Przypuszczam, że Doktorantowi chodziło o supramolekularne oddziaływania pomiędzy analitami a składnikami matrycy.

Str. 29 „Stwierdzono również, że dodanie wody do rozpuszczalników organicznych zwiększa polarność ekstrahenta i poprawia jego przenikanie do żywności czy paszy (Alshannaq i Yu, 2017).”

Str. 33 „Fumonizyny i aflatoksyny ulegają degradacji podczas nixtamalizacji – tradycyjnej obróbki termicznej kukurydzy popiołem lub wapnem.” Proces nixtamalizacji jest procesem przygotowania masy kukurydzianej opartym na gotowaniu ziarna kukurydzy w alkalicznych roztworach wodnych.

Str. 34 „Niestety wielu konsumentów stawia sobie dziś z tychże powodów ze strachem pytanie...”

Str. 41. „Następnie 1 ml przefiltrowanego ekstraktu rozcieńczono przez dodanie 49 ml 0,01 M roztworu kwasu fosforowego o pH=7,5.”

Str. 48 „...Należy również zwrócić uwagę na możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych, z wartościami 44% dla ochratoksyny C i 14% dla ochratoksyny B.”

Str. 58 Wartość współczynnika R^2 jest wartością współczynnika determinacji, a nie korelacji.

Str. 70 „Spożywanie żyta staje się niebezpieczne, gdy jest ono zanieczyszczone m.in. mikotoksynami.”

Str. 70 „Narażenie na niższe temperatury często wiąże się z wyższą wilgotnością (większą aktywnością wody) oraz późniejszym zbiorem i może prowadzić do występowania wyższych stężeń deoksyniwalenolu (Bernhoft i in., 2012; Parikka i in., 2012).”

Str. 84 Ostatnie lata w dziedzinie toksykologii i mikologii to intensywne badania dotyczących poziomów ochratoksyny A nie tylko w produktach pochodzenia roślinnego, ale także w organach zwierząt i ludzi, ich surowicy, mleku i moczu. Przeprowadzone w ramach pracy badania dotyczące stężenia OTA w surowicy pacjentów leczonych dializami są



uaktualnieniem prac naukowych prowadzonych w Polsce ponad trzydzieści lat temu (Goliński i Grabarkiewicz-Szczęсна, 1985; 1989) i uzupełniają wiedzę w tym temacie.

Podsumowanie

Jest faktem, że zaprezentowana recenzja zawiera pewne uwagi krytyczne. Taka jest moja rola jako recenzenta. Występujące w pracy nieścisłości nie umniejszają jej końcowemu naukowemu charakterowi i liczę na ich wyjaśnienie w trakcie publicznej obrony pracy. Doktorant, znakomicie opanował warsztat analityczny, wykorzystując go w realizowanych badaniach. Wykonał ogromną pracę, która skutkowałą ilością opublikowanych artykułów w czasopismach o istotnych wskaźnikach prestiżu. Praca ta posiada wartość naukową i wpływa na obecny stan wiedzy w dziedzinie.

W mojej opinii rozprawa doktorska pt. *Ocena współwystępowania mikotoksyn w surowcach roślinnych, produktach spożywczych i paszowych oraz ludzkim materiale biologicznym* spełnia wymagania Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.) - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wnioskuje zatem do Wysokiej Rady Dziedziny Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego, o dopuszczenie Pana mgr Roberta Kosickiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

*Z wyprzedzeniem
Ogustin Różycki*