

## AUTOREFERAT

dotyczący osiągnięć w pracy naukowo-badawczej,  
organizacyjnej i dydaktycznej

dr inż. Maciej Woźny

Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska  
Wydział Nauk o Środowisku  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 2019



**1. Imię i Nazwisko.**

Maciej Woźny

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.**

6 czerwca 2006 r.	Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa Tytuł pracy magisterskiej: „Możliwości wykorzystania techniki SCGE ( <i>Single Cell Gel Electrophoresis; Comet Assay</i> ) w badaniach nad genotoksycznością cyklopenta[c]fenantrenu”	Tytuł zawodowy: magister inżynier  kierunek: ochrona środowiska specjalność: inżynieria ekologiczna
14 grudnia 2010 r.	Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie Wydział Biologii Tytuł pracy doktorskiej: „Zmiany profilu transkrypcji wybranych genów w komórkach jajnika i wątroby narybku pstrąga tęczowego <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1792) pod wpływem zearalenonu”	Stopień naukowy: doktor nauk biologicznych  dyscyplina: biologia specjalność: biologia molekularna

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.**

od grudnia 2010 r. do sierpnia 2011 r.	Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa (obecnie Wydział Nauk o Środowisku)	stanowisko: asystent
od września 2011 r.	Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie Wydział Nauk o Środowisku	stanowisko: adiunkt

**4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):****a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,**

Cykl publikacji powiązanych tematycznie pod zbiorczym tytułem: „Implikacje dla akwakultury pstrąga tęczowego związane z obecnością zearalenonu w paszy”.

**b) wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu (autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),**

- 1) **Woźny, M.**, Obremski, K., Jakimiuk, E., Gusiatin, M., Brzuzan, P. 2013. Zearalenone contamination in rainbow trout farms in north-eastern Poland. *Aquaculture* 416-417: 209-211, [doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.09.030](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.030).

MNiSW = 40 pkt.; IF<sub>2013</sub> = 1,828; WoS<sub>cc</sub> = 17 cytowań.

*Jestem pierwszym i jednocześnie korespondencyjnym autorem publikacji. Mój udział polegał na współpracy w przygotowaniu koncepcji pracy, koordynacji realizacji badań, zestawieniu i interpretacji wyników, przygotowaniu i poprawieniu maszynopisu oraz odpowiedzi na recenzje. Swój udział szacuję na 60%. Badania zostały sfinansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu własnego (Nr N N308 628938), którego byłem wykonawcą.*

- 2) **Woźny, M.**, Dobosz, S., Obremski, K., Hliwa, P., Gomułka, P., Łakomiak, A., Różyński, R., Zalewski, T., Brzuzan, P. 2015. Feed-borne exposure to zearalenone leads to advanced ovarian development and limited histopathological changes in the liver of premarket size rainbow trout. *Aquaculture* 448: 71-81, [doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.05.032](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.032).

MNiSW = 35 pkt.; IF<sub>2015</sub> = 1,893; WoS<sub>cc</sub> = 8 cytowań.

*Jestem pierwszym i jednocześnie korespondencyjnym autorem publikacji. Mój udział polegał na przygotowaniu koncepcji pracy i koordynacji realizacji badań, wykonaniu części prac doświadczalnych, tzn. przygotowaniu paszy, zebraniu danych biometrycznych, poborze tkanek, wykonania analizy ekspresji genów i analizy statystycznej danych, a także współpracy w interpretacji wyników, przygotowaniu i poprawieniu maszynopisu wraz z oprawką graficzną oraz odpowiedzi na recenzje. Swój udział szacuję na 60%. Badania zostały sfinansowane ze środków statutowych Wydziału Nauk o Środowisku Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.*

- 3) **Woźny, M.**, Obremski, K., Zalewski, T., Mommens, M., Łakomiak, A., Brzuzan, P. 2017. Transfer of zearalenone to the reproductive system of female rainbow trout spawners: a potential risk for aquaculture and fish consumers? *Food and Chemical Toxicology* 107, Part A: 386-394, [doi: 10.1016/j.fct.2017.07.010](https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.010).

MNiSW = 40 pkt.; IF<sub>2017</sub> = 3,977; WoS<sub>cc</sub> = 1 cytowanie.

*Jestem pierwszym i jednocześnie korespondencyjnym autorem publikacji. Mój udział polegał na współpracy w przygotowaniu koncepcji pracy, koordynacji realizacji badań,*

wykonaniu części prac doświadczalnych, tzn. przeprowadzeniu ekspozycji ryb, poborze tkanek, wykonania analizy statystycznej, a także współpracy w interpretacji wyników, przygotowaniu i poprawieniu maszynopisu wraz z oprawą graficzną oraz odpowiedzi na recenzje. Swój udział szacuję na 60%. Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu SONATA 7 (Nr 2014/13/D/NZ9/04762), którego byłem kierownikiem, a także ze środków statutowych Wydziału Nauk o Środowisku Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

- 4) **Woźny, M.**, Obremski, K., Hliwa, P., Gomułka, P., Różyński, R., Wojtacha, P., Florczyk, M., Segner, H., Brzuzan, P. 2019. Feed contamination with zearalenone promotes growth but affects the immune system of rainbow trout. 2019. *Fish & Shellfish Immunology* 84: 680-694, [doi: 10.1016/j.fsi.2018.10.032](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.032).

MNiSW = 40 pkt.; IF<sub>2017</sub> = 3,185; WoS<sub>CC</sub> = 0 cytowań.

Jestem pierwszym i jednocześnie korespondencyjnym autorem publikacji. Mój udział polegał na przygotowaniu koncepcji pracy i koordynacji realizacji badań, wykonaniu części prac doświadczalnych, tzn. przygotowaniu paszy, zebraniu danych biometrycznych, poborze tkanek, diagnostyce molekularnej podłoża infekcji ryb, analizie statystycznej danych, a także współpracy w interpretacji wyników, przygotowaniu i poprawieniu maszynopisu wraz z oprawą graficzną oraz odpowiedzi na jego recenzje. Swój udział szacuję na 60%. Badania zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu SONATA 7 (Nr 2014/13/D/NZ9/04762), którego byłem kierownikiem.

Wszystkie prace wchodzących w skład cyklu publikacji powiązanych tematycznie zostały opublikowane w czasopismach z listy *Journal Citation Reports* (JCR; Clarivate Analytics).

Sumaryczna ocena wymienionych publikacji wynosi:

- według wykazu czasopism naukowych Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) = 155 pkt.;
- według *Journal Citation Reports* wartość wskaźnika *Impact Factor* (IF) = 10,883;
- według bazy *Web of Science Core Collection* (WoS<sub>CC</sub>) liczba cytowań = 26.

**c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

## Wstęp

Zearalenon (ZEN) jest mikotoksyną produkowaną przez grzyby pleśniowe należące do rodzaju *Fusarium*. Globalne występowanie pleśni w materiałach roślinnych przyczynia się do powszechnego zanieczyszczenia mikotoksynami pasz dla zwierząt, a także produktów spożywczych. Ze względu na niekorzystne oddziaływanie, ZEN uznaje się za substancję niepożądaną, której obecność w paszy budzi zaniepokojenie, a także stanowi przedmiot częstych ocen ryzyka (Eskola i in. 2018, Kuiper-Goodman i in. 1987).

Najlepiej przebadaną właściwością ZENU jest jego zdolność do wywoływania dysfunkcji i zmian patologicznych w obrębie układu rozrodczego zwierząt gospodarskich, głównie u trzody chlewnej, ale również u bydła czy drobiu (Zinedine i in. 2007, Minervini i Aquila 2008). ZEN naśladuje działanie naturalnych hormonów – estrogenów, przez co zaburza funkcjonowanie układu rozrodczego, skutkując obniżonym libido, brakiem owulacji, czy utrudnieniami w zapłodnieniu (Kuiper-Goodman i in. 1987, Fink-Gremmels i Malekinejad 2007, Metzler i in. 2010). Podobne oddziaływanie ZENU zaobserwowano u ryb. Na przykład, ekspozycja danio pręgowanego (*Danio rerio*) na zawieszony w wodzie ZEN obniża częstotliwość przystąpienia ryb do tarła i skutkuje obniżeniem ich płodności. Co ważne, ten niekorzystny efekt może być przekazywany z jednego pokolenia ryb na drugie (Schwartz i in. 2010, 2013). Chociaż nieustannie przybywa nowych danych na temat szkodliwego oddziaływania ZENU u modelowych gatunków ryb, takich jak danio pręgowany czy ryżanka japońska (medaka), to wpływ tego związku na wzrost i kondycję ważnych z ekonomicznego punktu widzenia gatunków ryb nie został jeszcze określony.

U zwierząt hodowlanych (a zwłaszcza świni domowej) toksykokinetyka ZENU została szczegółowo opisana. Tuż po spożyciu zanieczyszczonej paszy, ZEN szybko wchłania się do przewodu pokarmowego. Następnie, związek ten jest metabolizowany głównie w jelicie i wątrobie, gdzie podczas I fazy metabolizmu ksenobiotyków przekształcany jest przez izoenzymy dehydrogenazy hydroksysteroidowej do  $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenolu ( $\alpha$ - and  $\beta$ -ZELu). Ponadto, metabolity te mogą podlegać dalszej redukcji do  $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalanolu ( $\alpha$ - and  $\beta$ -ZALu, znanych również jako zeranol i taleranol), a ich konwersja może zachodzić również w tkankach poza układem pokarmowym. Podczas II fazy metabolizmu, zredukowane metabolity ZENU ulegają reakcji sprzęgania, głównie z kwasem glukuronowym z udziałem UDP-glukuronylotransferazy. Uzyskane w wyniku biotransformacji metabolity ZENU są następnie wydalane z żółcią i moczem (Fink-Gremmels i Malekinejad 2007, Dänicke i Winkler 2015).

W przypadku ryb, podobne badania opisujące toksykokinetykę ZENU należą do rzadkości. Poza badaniami własnymi, ówczesna literatura ograniczała się jedynie do informacji na temat występowania zredukowanych form ZENU w wątrobie i mięśniach ryb (Laganà i in. 2004, Pietsch i in. 2015), natomiast rola glukuronidacji i innych szlaków metabolicznych ZENU u ryb pozostawała niejasna (Pietsch i in. 2014). Ponadto, brakowało szczegółowych informacji na temat możliwego przenikania ZENU do innych narządów spoza układu pokarmowego, a także ich udziału w ogólnym metabolizmie ZENU.

Uważa się, że profil metaboliczny ZENU odpowiada za różnice w wrażliwości na ZEN wśród zwierząt hodowlanych (Dänicke i Winkler 2015). Uzasadnieniem tego stwierdzenia jest fakt, że ZEN i jego metabolity różnią się sposobem w jaki oddziałują z receptorami estrogenowymi, co przekłada się na zróżnicowaną zdolność tych związków do naśladowania hormonów. Porównawcze badania nad powinowactwem do receptora estrogenowego wykazały następujący potencjał związków:  $\alpha$ -ZEL > ZEN >  $\beta$ -ZEL (Arukwe i in. 1999, Celius i in. 1999), co pokazuje, że redukcja ZENU do  $\alpha$ -ZELu jest główną ścieżką prowadzącą do bioaktywacji związku, podczas gdy redukcję ZENU do  $\beta$ -ZELu można raczej uznać za ścieżkę detoksykacji. Niedawno wykazano również, że estrogenność glukuronidowanych metabolitów ZENU jest jeszcze niższa niż ich nieskoniugowanych odpowiedników (Frizzell i in. 2015). Pokazuje to, iż szczegółowe badania kinetyki i metabolizmu ZENU u ryb są kluczowe dla zrozumienia potencjalnych konsekwencji wynikających z obecności tego związku w paszy dla ryb.

Znaczący wzrost produkcji ryb hodowlanych w ostatnich dekadach przyczynił się do uznania akwakultury za ważne źródło zaopatrzenia rynków żywności. Jednak narastające zapotrzebowanie na pasze, przy jednocześnie ograniczonej dostępności naturalnych zasobów (tj. mączki rybnej i oleju rybnego) sprawia, że producenci poszukują nowych, tańszych, alternatywnych materiałów paszowych. Stąd, materiał roślinny w paszach stanowi drugie największe źródło białka i tłuszczu dla ryb łososiowatych, takich jak pstrąg, łosoś, czy sieja. Szacuje się, że nawet 40% końcowego produktu (paszy) przeznaczonego do tuczu tych gatunków ryb może stanowić dodatek roślinny (Tacon i in. 2011). Powszechne użycie roślinnych dodatków paszowych wzbudza jednak zaniepokojenie społeczeństwa odnośnie możliwych konsekwencji dla akwakultury, związanych z występowaniem w paszy dla ryb substancji niepożądanych, w tym mikotoksyn. Prace z ostatnich lat faktycznie potwierdzają obecność różnych mikotoksyn w materiałach paszowych i paszach dla ryb. Na przykład, ZEN odnaleziono we wszystkich próbkach komercyjnej paszy dla karpia, pochodzącej z ośrodków Europy Środkowej, a najwyższa odnotowana zawartość tej mikotoksyny wynosiła

0,511 mg/kg paszy (Pietsch i in. 2013). Obecność ZENU stwierdzono również w próbkach paszy z Azji Południowo-Wschodniej, a najwyższa jego zawartość wynosiła 0.153 mg/kg (Gonçalves i in. 2018). Co ważne, oczekuje się, że w przyszłości problem związany z obecnością mikotoksyn w paszy będzie narastać z powodu postępujących zmian klimatycznych (Miraglia i in. 2009, Paterson i Lima 2010).

Zanieczyszczenie pleśnią pasz lub materiałów paszowych może przyczyniać się do obniżenia produkcji ryb, a w konsekwencji do utraty części zysków z ich hodowli. Ponadto, w sytuacji zanieczyszczenia krzyżowego mięsa lub ikry ryb hodowlanych, mikotoksyny mogą stwarzać dodatkowe zagrożenie dla zdrowia konsumentów tych produktów. Dlatego szczegółowa wiedza dotycząca toksykokinetyki i efektów biologicznych ZENU i innych mikotoksyn jest niezbędna w celu zrozumienia potencjalnych zagrożeń wynikających ze stosowania w zrównoważonej akwakulturze alternatywnych rozwiązań paszowych, opartych na materiałach pochodzenia roślinnego.

Według zaleceń Komisji Europejskiej, zawartość ZENU w materiałach paszowych nie powinna przekraczać 2 mg/kg (Zalecenie Komisji 2006/576/WE). Co ważne, dopuszczalna zawartość tej mikotoksyny w paszy dla ryb została określona w głównej mierze na podstawie opinii Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) z 2004 roku, która nie zawiera żadnych informacji na temat obecności tej mikotoksyny w akwakulturze, ani jej wpływie na ryby (EFSA 2004). Brak takich danych, szczególnie odnośnie długotrwałych efektów ekspozycji ryb na dopuszczalne w paszy dawki mikotoksyn do niedawna pozostawiał lukę w naszej wiedzy na temat możliwych zagrożeń dla akwakultury. Co więcej, Unia Europejska określiła dopuszczalne poziomy dla ZENU w niektórych produktach spożywczych pochodzenia roślinnego, jednak ustalone limity w ogóle nie dotyczą żywności pochodzenia zwierzęcego, takiej jak mięso czy ikra ryb (2005/856/WE).

Zakładając, że optymalna procedura hodowli pstrąga tęczowego wymaga karmienia ryb na poziomie 1% ich masy ciała (na przykład według From i Rasmussen 1984), obecność ZENU w paszy na poziomie dopuszczalnej wartości (2 mg/kg) będzie skutkować dzienną dawką w wysokości 20 µg/kg masy ciała ryb. Przy takim dziennym podaniu ZENU, związku o oddziaływaniu naśladującym naturalne hormony, jest tylko kwestią odpowiedniej długości okresu ekspozycji lub wrażliwego stadium rozwojowego, nim u ryb nastąpi obserwowalny efekt. I nawet jeśli publikacje z ostatnich lat wskazują na zawartość ZENU w komercyjnie dostępnych paszach na poziomie niższym niż ten dopuszczalny przez Komisję Europejską (Pietsch i in. 2013, Gonçalves i in. 2018), to przebadanie maksymalnej dawki ZENU z zaleceń



pod kątem właściwości biologicznych u ryb stanowiłoby mocną podstawę do przyszłych prac legislacyjnych dotyczących jej bezpieczeństwa (2006/576/WE).

W dostępnej literaturze, poza badaniami własnymi, nie przeprowadzono do tej pory kompleksowych badań dotyczących możliwych skutków ekspozycji ryb hodowlanych na ZEN, a do niedawna prace identyfikujące problem mikotoksyn w akwakulturze były nieliczne. Dlatego moje pionierskie badania w tym obszarze stanowią odpowiedź na pilną potrzebę ewaluacji aktualnie obowiązujących limitów na zawartość ZENU w paszy i produktach paszowych, przeznaczonych do tuczu ryb.

### *Cel naukowy i zakres badawczy*

Głównym celem naukowym moich badań było opracowanie kompleksowego obrazu możliwych konsekwencji obecności mikotoksyny ZENU w paszy dla ryb dla akwakultury pstrąga tęczowego. Szczegółowo, osiągnięcie wyznaczonego celu naukowego obejmowało realizację następujących zadań badawczych:

- 1) Identyfikacja potencjalnego zagrożenia związanego z obecnością mikotoksyn w akwakulturze poprzez określenie zawartości ZENU i jego metabolitów w paszy dla ryb i tkankach ryb pochodzących z wybranych ośrodków hodowlanych, a także określenie poziomu zanieczyszczenia tymi związkami mięsa i ikry przeznaczonej do konsumpcji. Osiągnięcia tego zadania opublikowano w pracach Woźny i in. 2013, 2017 (**I.B.1, I.B.3**).
- 2) Uzyskanie szczegółowej charakterystyki procesów absorpcji, dystrybucji, oraz eliminacji (tzw. toksykokinetyki) ZENU i jego metabolitów w różnych tkankach ryb poddanych ekspozycji drogą pokarmową w krótkim i długim okresie. Osiągnięcia tego zadania opublikowano w pracach Woźny i in. 2017, 2019 (**I.B.3, I.B.4**).
- 3) Określenie użyteczności zastosowania jajnika ryb do analiz bioindykacyjnych w monitoringu zanieczyszczenia ZENem w ośrodkach hodowlanych. Osiągnięcia tego zadania opublikowano w pracach Woźny i in. 2013, 2017 (**I.B.1, I.B.3**).
- 4) Przygotowanie charakterystyki rozwoju płciowego dojrzewających ryb, które karmiono zanieczyszczoną paszą w krótkim terminie. Wskazanie stadium rozwoju osobniczego wrażliwego na obecność ZENU w paszy w kontekście wzrostu i rozrodu ryb. Osiągnięcia tego zadania opublikowano w pracy Woźny i in. 2015 (**I.B.2**).
- 5) Uzyskanie szczegółowego obrazu oddziaływania ZENU w paszy na śmiertelność, efektywność karmienia i wzrost, oraz dobrostan ryb, na przykładzie pełnego cyklu

hodowlanego pstrąga tęczowego (2 lata ciągłej ekspozycji). Osiągnięcia tego zadania opublikowano w pracy Woźny i in. 2019 (**I.B.4**).

- 6) Sformułowanie wniosków dotyczących ryzyka dla zdrowia konsumentów związanego ze spożyciem mięsa i ikry ryb karmionych paszą zanieczyszczoną ZENem.

Osiągnięcia tego zadania opublikowano w pracach Woźny i in. 2013, 2015, 2017, 2019 (**I.B.1-4**).

#### *Obecność zanieczyszczenia zearalenonem w polskich ośrodkach hodowli ryb łososiowatych*

Pomimo obszernej wiedzy na temat powszechnego zanieczyszczenia materiałów roślinnych mikotoksynami fuzaryjnymi, prace identyfikujące problem związany z obecnością mikotoksyn w akwakulturze do niedawna były nieliczne. Ponadto, poza doniesieniami własnymi, w literaturze nie stwierdzono opracowania, w którym podjęto by próbę określenia poziomu zanieczyszczenia mikotoksynami ryb pochodzących z polskich ośrodków hodowlanych. Dlatego, celem szczegółowym doświadczenia opisanego w pracy Woźny i in. 2013 (**I.B.1**) było wstępne określenie zawartości ZENU w paszy dla ryb i tkankach ryb pochodzących z polskich ośrodków hodowlanych ryb łososiowatych.

Doświadczenie obejmowało zakup pstrąga tęczowego z wybranych ośrodków hodowlanych zlokalizowanych w Polsce północno-wschodniej, a następnie pobranie od zakupionych ryb próbek białych mięśni, jajników z ikrą, wątroby z woreczkiem żółciowym, oraz tylnego odcinka przewodu pokarmowego z treścią. W celu określenia potencjalnego źródła zanieczyszczenia, dodatkowo pobrano próbki paszy oraz wody z ośrodków w których zakupiono ryby. Pobrane próbki poddano ekstrakcji i oczyszczaniu wykorzystując kolumnienki powinowactwa immunologicznego, a następnie analizie zawartości ZENU za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną (HPLC-FLD).

Istotnie, wyniki moich badań po raz pierwszy wykazały obecność ZENU w próbach pochodzących z polskich ośrodków hodowlanych, a zanieczyszczenie stwierdzono we wszystkich przebadanych hodowlach. W próbkach jajników odnotowano najwyższą zawartość ZENU (do 7 µg/kg), natomiast w wątrobie i jelicie ryb stwierdzono jedynie śladowe zanieczyszczenie tego związku (< 2 µg/kg). Co ważne, w mięśniach ryb przeznaczonych do konsumpcji nie stwierdzono obecności ZENU (w granicach czułości detekcji wykorzystanej metody). Ponadto, wyniki badania dodatkowych próbek wskazały na paszę jako prawdopodobny wektor zanieczyszczenia ZENem, gdyż zawartość tej mikotoksyny w paszy

sięgała 81 µg/kg, natomiast nie stwierdzono tej substancji w wodzie, która zasilala baseny z rybami.

Podsumowując, chociaż badania przeprowadzono na ograniczonej liczbie obiektów hodowlanych, wyniki nie wykazały obecności ZENU w mięśniach ryb, tym samym sugerując raczej niewielkie zagrożenie bezpieczeństwa zdrowotnego dla konsumentów ryb zakupionych z przebadanych hodowli. Jednak z drugiej strony, wyniki potwierdziły obecność mikotoksyny w paszy dla ryb, a także pokazały zdolność przenikania tej substancji do układu rozrodczego ryb, sugerując możliwy problem dla akwakultury oraz wskazując konieczność dalszych badań w tym kierunku.

*Krótkookresowa ekspozycja pstrąga na zearalenon skutkuje łagodnymi zmianami histopatologicznymi w wątrobie ale może przyspieszać rozwój płciowy ryb*

W celu weryfikacji moich przypuszczeń odnośnie negatywnych skutków ZENU dla akwakultury, już w 2013 r. rozpocząłem prace nad określeniem wpływu tej mikotoksyny na dobrostan pstrąga tęczowego – gatunku o ważnym znaczeniu dla akwakultury w Polsce i na świecie. Celem doświadczenia opisanego w pracy Woźny i in. 2015 (**I.B.2**) było określenie możliwych konsekwencji krótkookresowego karmienia ryb o masie handlowej paszą z dodatkiem ZENU w dawce zbliżonej do wartości orientacyjnej z zaleceń Komisji Europejskiej (2006/576/WE).

Doświadczenie obejmowało przygotowanie paszy z dodatkiem ZENU w dawce 1,8 mg/kg paszy, która stanowiła 90% wartości orientacyjnej z zaleceń KE. Ekspozycja ryb drogą pokarmową trwała ponad 2 miesiące w optymalnych warunkach hodowlanych. W trakcie doświadczenia monitorowano spożycie paszy i przyrost masy karmionych ryb. Po 37 i 71 dniach doświadczenia od ryb pobrano krew na podstawowe badania biochemiczne (tj. glukoza, białko całkowite, albumina/globulina, trójglicerydy, enzymy wątrobowe), a także fragmenty wątroby i gonad, które utrwalono, a następnie wybarwiono metodą histochemiczną w celu określenia zmian histopatologicznych oraz stopnia rozwoju płciowego. Dodatkowo, w celu zbadania molekularnego podłoża możliwego wpływu ZENU na rozród tych zwierząt, pobraną wątrobę poddano ekstrakcji całkowitego RNA, a następnie analizie poziomu ekspresji genu witellogeniny (*vfg*) metodą RT-qPCR. Ponadto, tkanki ryb poddano również ekstrakcji i oczyszczaniu wykorzystując kolumnienki powinowactwa immunologicznego, a następnie analizie zawartości ZENU i jego głównych metabolitów ( $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenolu) za pomocą metody HPLC-FLD.

Uzyskane wyniki pokazały, że krótkookresowa ekspozycja pstrąga o masie handlowej na ZEN w dawce 90% wartości orientacyjnej (2006/576/WE) nie wpływa znacząco na wzrost ryb. Analiza HPLC nie wykazała obecności ZENU i jego głównych metabolitów w mięśniach pstrągów, tym samym wskazując na brak zagrożenia dla konsumentów ryb karmionych zanieczyszczoną paszą w krótkim okresie ekspozycji. Pomimo tego, pozostałości mikotoksyny i jej metabolitów wykryto w układzie pokarmowym i rozrodczym ryb, a zawartość tych związków rosła w czasie doświadczenia, sugerując ich zdolność do akumulacji w tych tkankach.

Analiza histologiczna skrawków wątroby wykazała zmiany w strukturze tego narządu u eksponowanych ryb, takie jak ogniska martwicze, zaburzenia kształtu hepatocytów, wakuolizacja cytoplazmy, skupiska makrofagów. Jednak tym zmianom histopatologicznym nie towarzyszyły istotne zmiany biochemiczne we krwi, co wskazuje, że zaobserwowane nieprawidłowości w strukturze wątroby wywołane przez ZEN miały łagodny przebieg (tzn. najprawdopodobniej były odwracalne). Ponadto, nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie ekspresji mRNA witellogeniny pomiędzy grupą kontrolną ryb a grupą karmioną paszą z dodatkiem ZENU. Pomimo tego, zaobserwowano, iż samice pstrąga tęczowego narażone na działanie ZENU charakteryzowały się bardziej zaawansowanym rozwojem jajników niż samice kontrolne, sugerując możliwe problemy z ich rozrodem w przyszłości.

Uzyskane wyniki pokazały, że karmienie ryb paszą zanieczyszczoną ZENem może nieść za sobą konsekwencje dla akwakultury, która jest oparta na tuczu paszą z dodatkami roślinnymi.

#### *Zearalenon przenika do układu rozrodczego ryb, stanowiąc potencjalne zagrożenie dla akwakultury*

Moje wstępne badania z 2013 r. potwierdziły obecność ZENU w układzie rozrodczym ryb pochodzących z ośrodków hodowlanych. Mimo tego, nadal nie było wiadomo w jakim stopniu mikotoksyna ta może przenikać do komórek rozrodczych a w jakim stopniu do komórek somatycznych jajnika ryb. Ponadto, byłem również ciekawy czy zaobserwowana zdolność tej substancji może realnie przekładać się na zanieczyszczenie jajników i ikry różnych ryb hodowlanych oraz rybnych wyrobów delikatesowych dostępnych dla konsumentów. W celu uszczegółowienia danych toksykokinetycznych ZENU u ryb, w pracy Woźny i in. 2017 (**I.B.3**) przedstawiłem wyniki badań na dojrzałych rybach poddanych ekspozycji na ZEN w kontrolowanych warunkach. Ważną częścią tej pracy były również

badania przesiewowe próbek ikry i jajników pozyskanych z ośrodków hodowlanych, oraz solonej ikry i kawioru zakupionych w latach 2013 – 2015 w sklepach spożywczych na terenie Polski i Norwegii.

Główna część doświadczenia obejmowała selekcję dojrzałych płciowo samic pstrąga tęczowego (tzw. tarlaków), a następnie przeprowadzenie ich ekspozycji drogą pokarmową na ZEN w dawce 1 mg/kg masy ciała. Po 2, 6, 12, 24, oraz 48 godzinach ekspozycji, od ryb pobrano dojrzałą ikrę i próbki krwi, a także fragmenty tkanek stałych: jajnika bez ikry, tylnego odcinka jelita z treścią, wątroby, oraz mięśni białych. Wszystkie próbki poddano ekstrakcji i oczyszczaniu wykorzystując kolumnienki powinowactwa immunologicznego, a następnie analizie zawartości ZENU i jego głównych metabolitów ( $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenolu) za pomocą metody HPLC-FLD. Dodatkowo, ekstrakty wyizolowane z wątroby i jajników eksponowanych ryb inkubowano z glukuronidazą w celu uzyskania informacji o zawartości skoniugowanych form tych związków.

Zgodnie z oczekiwaniami, najwyższą zawartość ZENU i jego metabolitów stwierdzono w układzie pokarmowym ryb, przy czym w jelicie maksymalna zawartość badanych substancji oraz tempo wchłaniania były znacznie wyższe niż w wątrobie. Spośród przebadanych metabolitów I fazy,  $\alpha$ -ZEL przeważał nad  $\beta$ -ZELem. Ponadto, wraz z czasem ekspozycji ilość związku macierzystego i metabolitów w formie wolnej ustępowała na rzecz związków skoniugowanych z kwasem glukuronowym, osiągając na koniec doświadczenia >80% wszystkich analizowanych związków. Z kolei w jajniku eksponowanych ryb, wchłanianie ZENU było niższe i wolniejsze niż w układzie pokarmowym, a w ikrze maksymalna zawartość badanych związków była 10-krotnie niższa niż w jajniku bez ikry. W przeciwieństwie do wątroby, zawartość związków skoniugowanych z kwasem glukuronowym pozostała niezmienna przez całą ekspozycję, wynosząc około 60% wszystkich analizowanych związków. Co najważniejsze, najniższą zawartość ZENU i jego metabolitów stwierdzono w mięśniach i krwi ryb, gdzie pomimo wysokiej wyjściowej dawki odnotowane wartości oscylowały wokół poziomu czułości metody.

Dodatkowa analiza próbek jajników i ikry z ośrodków hodowlanych oraz solonej ikry i kawioru ze sklepów spożywczych nie wykazała obecności badanych związków w prawie połowie (20 z 41) próbek, natomiast w pozostałej części próbek stwierdzono jedynie śladowe ilości związków, wskazując na znikome zanieczyszczenie.

Uzyskane wyniki nie tylko potwierdziły zaobserwowaną wcześniej możliwość przenikania ZENU do układu rozrodczego ryb, ale również wskazały na komórki somatyczne jajnika jako miejsce koncentracji tego związku. Ponadto, znaczące przenikanie tych

związków do jajnika wskazuje na możliwą przyczynę zaburzeń rozrodczych eksponowanych ryb, a także pozwala na wykorzystanie tego narządu, tuż po resekcji, jako bioindykatora zanieczyszczenia paszy ZENem. Co ważne, wykazałem, że ZEN i jego metabolity przenikają do mięsa i ikry ryb tylko w niewielkim stopniu, co wskazuje, że zagrożenie dla konsumentów produktów spożywczych z ryb jest zanedbywalnie małe. Dodatkowa analiza próbek uzyskanych z różnych ośrodków hodowlanych i sklepów w Polsce i Norwegii wykazała jedynie śladowe ilości związków ZENU, co odzwierciedla dobre warunki higieniczne w przebadanych hodowlach.

Podsumowując, chociaż uzyskane przeze mnie wyniki wykazały, że ryzyko dla zdrowia związane z konsumpcją mięsa i ikry ryb karmionych paszą zanieczyszczoną ZENem jest znikome, to zaobserwowany potencjał tej mikotoksyny do akumulacji w komórkach somatycznych eksponowanych ryb może stanowić poważny problem dla hodowców ryb.

*W dłuższym okresie hodowlanym zanieczyszczenie paszy zearalenonem przyspiesza wzrost ryb ale również niekorzystnie wpływa na ich układ odpornościowy*

Wyniki uzyskane w ramach wstępnych badań pozwoliły na sformułowanie założeń do mojego wniosku o projekt badawczy pt. „Implikacje dla akwakultury pstrąga tęczowego związane z dopuszczalną zawartością ZENU w paszy dla ryb”, a następnie uzyskania jego finansowania przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu SONATA 7 (projekt nr 2014/13/D/NZ9/04762). Realizacja projektu obejmowała oryginalne i ambitne podejście badawcze, polegające na ekspozycji pstrąga tęczowego przez cały okres hodowlany (2 lata) na ZEN w paszy zanieczyszczonej maksymalną dopuszczalną zawartością, tj. wartością orientacyjną z zaleceń KE (2 mg/kg paszy). W celu kompleksowego zbadania wpływu obecności tej mikotoksyny w paszy na kondycję ryb, w projekcie zaplanowano pobór prób na wszystkich etapach rozwoju osobniczego ryb, a także uwzględniono szeroki zestaw różnych metod badawczych, pozwalających na zgłębienie zagadnienia na różnych poziomach organizacji biologicznej. Celem pracy Woźny i in. 2019 (**I.B.4**) przygotowanej w ramach tego projektu było określenie wpływu ZENU na wzrost i stan zdrowotny ryb.

Doświadczenie obejmowało przygotowanie paszy z dodatkiem ZENU w dawce 2,0 mg/kg paszy, która stanowiła 100% wartości orientacyjnej z zaleceń KE. Ekspozycja drogą pokarmową rozpoczęła się z początkiem samodzielnego odżywiania się larw, a następnie była kontynuowana przez 96 tygodni, aż do osiągnięcia przez ryby masy handlowej. Równoległe do ryb eksponowanych, negatywna kontrolna grupa ryb otrzymywała

paszę bez dodatku mikotoksyny. W celu zwiększenia wiarygodności badań, doświadczenie przeprowadzono w optymalnych warunkach pokarmowych na grupach ryb płci mieszanej (samce i samice) w powtórzeniach (4 oddzielne zbiorniki na każdą grupę). W trakcie doświadczenia konsekwentnie i szczegółowo monitorowano spożycie paszy, a także przyrost masy karmionych ryb. W celu określenia potencjalnych skutków zdrowotnych, po 72 tygodniach ekspozycji na ZEN, od ryb pobrano krew do badań biochemicznych (glukoza, białko całkowite, albumina/globulina, trójglicerydy, cholesterol, enzymy wątrobowe, amoniak) i hematologicznych (m.in. hematokryt, hemoglobina, leukogram), a także fragmenty wątroby i śledziony oraz nerki główowej, które utrwalono, a następnie wybarwiono metodą histochemiczną w celu określenia ewentualnych zmian na poziomie histologicznym i cytologicznym. Dodatkowo, w celu zbadania molekularnego podłoża możliwego wpływu ZENU na układ odpornościowy tych zwierząt, z tkanek izolowano białko, a następnie analizowano ekspresję wybranych cytokin (interleukiny 4, 12, 17, oraz interferon  $\gamma$ ) metodą ELISA. Ponadto, tkanki ryb poddano również ekstrakcji i oczyszczaniu wykorzystując kolumnienki powinowactwa immunologicznego, a następnie analizie zawartości ZENU i jego głównych metabolitów za pomocą metody HPLC-FLD. Ekstrakty wyizolowane z układu pokarmowego eksponowanych ryb inkubowano z glukuronidazą w celu uzyskania informacji o zawartości skoniugowanych form tych związków.

Zgodnie z oczekiwaniami, wyniki pokazały, że ZEN przeniknął z paszy do układu pokarmowego ryb, gdzie w większości został zmetabolizowany do form skoniugowanych z kwasem glukuronowym. Co ważne, związków tych nie wykryto z mięśniami eksponowanych ryb, ostatecznie potwierdzając bezpieczeństwo żywnościowe wartości orientacyjnej dla ZENU w paszy (tj. 2 mg/kg) w długim okresie karmienia ryb (tzn. całym cyklu hodowlanym). Zaskakująco wbrew wcześniejszym oczekiwaniom, ryby karmione paszą z dodatkiem ZENU charakteryzowały się wyższym tempem wzrostu i korzystniejszym współczynnikiem pokarmowym, co na koniec okresu karmienia przekładało się na istotnie wyższą masę ryb w porównaniu do ryb kontrolnych. Pomimo tego, wyniki pokazały również, że ten pozytywny efekt może nieść za sobą negatywne skutki dla zdrowia ryb. Chociaż nie stwierdzono różnic w śmiertelności pomiędzy grupami ryb, a także nie zaobserwowano wyraźnych zmian w ich budowie histologicznej wątroby i śledziony, to jednak wykazano istotny wpływ ZENU na poszczególne elementy układu odpornościowego tych zwierząt. Szczegółowo, u ryb karmionych paszą z dodatkiem mikotoksyny zaobserwowano znaczące zmiany w ilości elementów morfotycznych krwi, tj. 4-krotny spadek liczby limfocytów B i 2-krotny wzrost liczby trombocytów w porównaniu do kontroli. Zaburzeniom wskaźników

hematologicznych u eksponowanych ryb towarzyszyły istotne zmiany w poziomie badanych cytokin w wątrobie, śledzionie i nerce głowowej. Ponadto, w nerce tułowiowej części ryb pochodzących z grupy karmionej paszą z dodatkiem ZENU zaobserwowano wyraźne zmiany makroskopowe w postaci plam i guzów, które w obrazie histologicznym opisano jako ostry stan zapalny, noszący znamiona infekcji pasożytniczej. Dalsza diagnostyka molekularna zmienionych tkanek potwierdziła obecność mikrosporidiowca *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Występowanie tych zmian wyłącznie u eksponowanych ryb sugeruje, iż to właśnie zaobserwowana zdolność ZENU do modulacji układu immunologicznego ryb była możliwą przyczyną obniżonej odporności tych zwierząt, co w konsekwencji doprowadziło do wystąpienia objawów infekcji pasożytniczej.

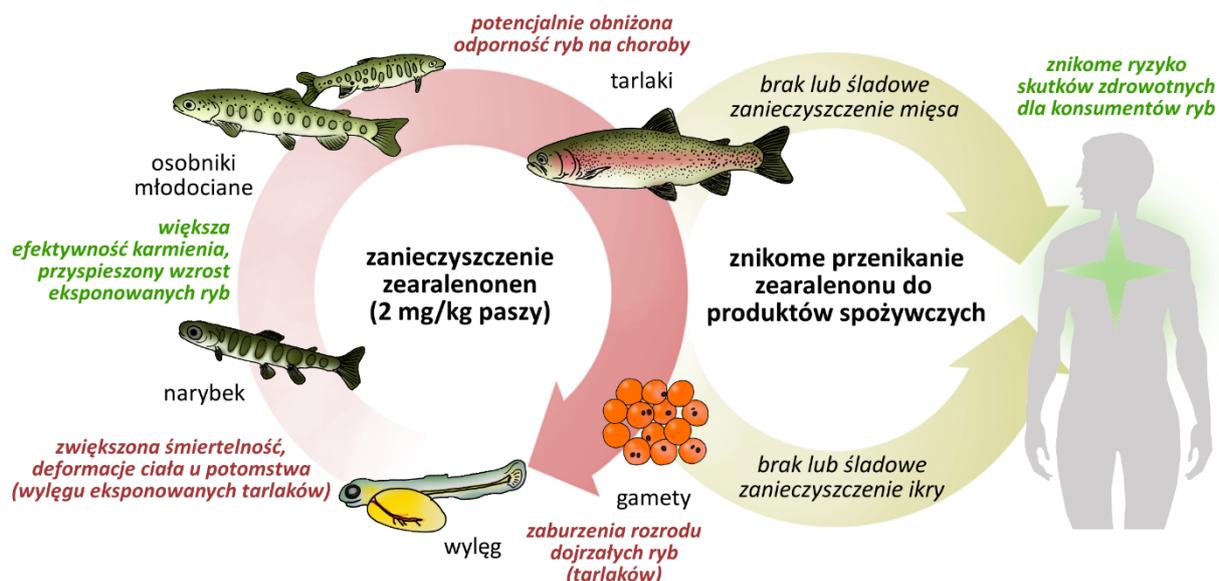
Wyniki uzyskane w ramach tej pracy demonstrują po raz pierwszy, że długookresowa ekspozycja pstrąga tęczowego na ZEN w paszy przyspiesza wzrost ryb i zwiększa efektywność ich karmienia. Jednak pomimo tego pozytywnego efektu, wyniki wskazują również, iż szybszy wzrost ryb karmionych zanieczyszczoną paszą może odbywać się kosztem ich kondycji, gdyż długoterminowa ekspozycja na tę mikotoksynę skutkuje zaburzeniami w układzie odpornościowym, prawdopodobnie prowadząc do zwiększonej podatności tych zwierząt na choroby. Ponadto wykazano, że pomimo, iż ZEN łatwo wchłania się z przewodu pokarmowego, gdzie szybko ulega biotransformacji, to związki te nie przenikają w znaczący sposób do mięśni ryb karmionych zanieczyszczoną paszą przez tak długi okres. Podsumowując, choć wyniki wskazują na znikome ryzyko dla zdrowia konsumentów ryb karmionych paszą z ZENem, to pokazują również, iż aktualnie obowiązujące regulacje prawne dotyczące poziomu zanieczyszczenia pasz tą mikotoksyną mogą mieć negatywny wpływ na kondycję ryb hodowlanych, a tym samym sugerują potrzebę obniżenia aktualnej wartości orientacyjnej ZENU w paszach i materiałach paszowych stosowanych w akwakulturze.

#### *Praktyczne wykorzystanie wyników*

Ze względu na ogromny potencjał rozwojowy akwakultury, moje badania związane z poprawą efektywności hodowli ryb i bezpieczeństwa żywności pochodzącej z ośrodków hodowlanych mają znaczenie nie tylko dla polskiej ale również globalnej gospodarki. Pionierskie wyniki moich badań identyfikują problem związany z obecnością mikotoksyn w paszy dla ryb hodowlanych, a także dostarczają nowych informacji na temat biologicznych właściwości ZENU, w szczególności jego wpływu na wzrost i kondycję pstrąga tęczowego,



wypełniając dotychczasową lukę w wiedzy na temat możliwych zagrożeń wynikających ze stosowania dodatków roślinnych w tuczu ryb (Rys. 1).



Rysunek 1. Obraz możliwych implikacji dla akwakultury pstrąga tęczowego i konsumentów ryb związanych z obecnością mikotoksyny ZENU w paszy (Woźny i in., w przygotowaniu).

Przekonywujące dowody odnośnie negatywnych efektów zanieczyszczenia pasz mikotoksynami mogą pomóc zainicjować zmiany dostosowujące aktualnie obowiązujące przepisy prawne Unii Europejskiej. Część moich prac została już uwzględniona w opinii naukowej Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) na temat zagrożeń dla zdrowia zwierząt związanych z obecnością ZENU i jego modyfikowanych form w paszy (EFSA, 2017). Opinia urzędu EFSA może w przyszłości stanowić podstawę do rozpatrzenia aktualnie obowiązujących zaleceń dotyczących ZENU i innych mikotoksyn (2006/576/WE). Z kolei zwiększona świadomość organów ustawodawczych i służb weterynaryjnych, a także hodowców odnośnie szkodliwości mikotoksyn powinna skłonić przemysł do poszukania nowoczesnych rozwiązań produkcyjnych pasz, jednocześnie odwołując branżę od niekorzystnych rozwiązań, tj. stosowanie roślinnych materiałów paszowych niskiej jakości, które mogą okazać się kosztowne w kontekście obniżonej kondycji ryb.

### Odniesienia do literatury

2005/856/WE. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 856/2005 z dnia 6 czerwca 2005 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 466/2001 w odniesieniu do toksyn *Fusarium*. *Dz.U. UE* 48: 2005, L 143/3.

- 2006/576/WE. Zalecenie Komisji z dnia 17 sierpnia 2006 r. w sprawie obecności deoksyniwalenolu, ZENU, ochratoksyny A, T-2 i HT-2 oraz fumonizyn w produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt. *Dz.U. UE* 23(8): 2006, L 229/7–9.
- Arukwe, A., Grotmol, T., Haugen, T.B., Knudsen, F.R., Goksøyr, A. 1999. Fish model for assessing the in vivo estrogenic potency of the mycotoxin zearalenone and its metabolites. *Sci. Total Environ.* 236: 1-3, [doi:10.1016/S0048-9697\(99\)00275-2](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00275-2).
- Celius, T., Haugen, T.B., Grotmol, T., Walther, B.T. 1999. A sensitive zonal genetic assay for rapid in vitro assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins. *Environ. Health Perspect.* 107: 63-68, [doi:10.1289/ehp.9910763](https://doi.org/10.1289/ehp.9910763).
- Dänicke, S., Winkler, J. 2015. Invited review: diagnosis of zearalenone (ZEN) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues (carry over). *Food Chem. Toxicol.* 84: 225-249, [doi:10.1016/j.fct.2015.08.009](https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.009).
- EFSA (European Food Safety Authority; Panel on Contaminants in the Food Chain) 2004. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. *EFSA J.* 89: 1-35, [doi:10.2903/j.efsa.2004.89](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2004.89).
- EFSA (European Food Safety Authority; Panel on Contaminants in the Food Chain) 2017. Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA J.* 15(7):4851, [doi:10.2903/j.efsa.2017.4851](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4851).
- Eskola, M., Altieri, A., Galobart, J. 2018. Overview of the activities of the European food safety authority on mycotoxins in food and feed. *World Mycotoxin J.* 11: 277-289, [doi:10.3920/WMJ2017.2270](https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2270).
- Fink-Gremmels, J., Malekinejad, H. 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Anim. Feed Sci. Technol.* 137: 326-341, [doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.06.008](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.008).
- Frizzell, C., Uhlig, S., Miles, C.O., Verhaegen, S., Elliott, C.T., Eriksen, G.S., Sørlie, M., Ropstad, E., Connolly, L. 2015. Biotransformation of zearalenone and zearalenols to their major glucuronide metabolites reduces estrogenic activity. *Toxicol. Vitro* 29: 575-581, [doi:10.1016/j.tiv.2015.01.006](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.01.006).
- From, J., Rasmussen, G. 1984. A growth model, gastric evacuation, and body composition in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, 1836. *Dana* 3: 61-139.
- Gonçalves, R.A., Hofstetter, U., Schatzmayr, D., Jenkins, T. 2018. Mycotoxins in Southeast Asian aquaculture: plant-based meals and finished feeds. *World Mycotoxin J.*: 265-275, [doi:10.3920/WMJ2017.2239](https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2239).
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 7: 253-306, [doi:10.1016/0273-2300\(87\)90037-7](https://doi.org/10.1016/0273-2300(87)90037-7).

- Laganà, A., Faberi, A., Fago, G., Marino, A., Pastorini, E., Samperi, R. 2004. Application of an innovative matrix solid-phase dispersion-solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical methodology to the study of the metabolism of the estrogenic mycotoxin zearalenone in rainbow trout liver and muscular tissue. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 84: 1009-1016, [doi:10.1080/03067310410001730646](https://doi.org/10.1080/03067310410001730646).
- Metzler, M., Pfeiffer, E., Hildebrand, A.A. 2010. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin J.* 3: 385-401. [doi:10.3920/WMJ2010.1244](https://doi.org/10.3920/WMJ2010.1244).
- Minervini, F., Aquila, M.E.D. 2008. Zearalenone and reproductive function in farm animals. *Int. J. Mol. Sci.* 9: 2570-2584, [doi:10.3390/ijms9122570](https://doi.org/10.3390/ijms9122570).
- Miraglia, M., Marvin, H.J.P., Kleter, G.A., Battilani, P., Brera, C., Coni, E., Cubadda, F., Croci, L., De Santis, B., Dekkers, S., Filippi, L., Hutjes, R.W.A., Noordam, M.Y., Pisante, M., Piva, G., Prandini, A., Toti, L., van den Born, G.J., Vespermann, A. 2009. Climate change and food safety: an emerging issue with special focus on Europe. *Food Chem. Tox.* 47: 1009-1021, [doi:10.1016/j.fct.2009.02.005](https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.005).
- Paterson, R.R.M., Lima, N. 2010. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Res. Int.* 43: 1902-1914, [doi:10.1016/j.foodres.2009.07.010](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.010).
- Pietsch, C., Kersten, S., Burkhardt-Holm, P., Valenta, H., Dänicke, S. 2013. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in commercial fish feed: an initial study. *Toxins* 5: 184-192, [doi:10.3390/toxins5010184](https://doi.org/10.3390/toxins5010184).
- Pietsch, C., Noser, J., Wettstein, F.E., Burkhardt-Holm, P. 2014. Unraveling the mechanisms involved in zearalenone-mediated toxicity in permanent fish cell cultures. *Toxicon* 88: 44-61, [doi:10.1016/j.toxicon.2014.06.005](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.005).
- Pietsch, C., Kersten, S., Valenta, H., Dänicke, S., Schulz, C., Burkhardt-Holm, P., Junge, R. 2015. Effects of dietary exposure to zearalenone (ZEN) on carp (*Cyprinus carpio* L.). *Toxins* 7: 3465-3480, [doi:10.3390/toxins7093465](https://doi.org/10.3390/toxins7093465).
- Schwartz, P., Thorpe, K.L., Bucheli, T.D., Wettstein, F.E., Burkhardt-Holm, P. 2010. Short-term exposure to the environmentally relevant estrogenic mycotoxin zearalenone impairs reproduction in fish. *Sci. Total Environ.* 409: 326-333, [doi:10.1016/j.scitotenv.2010.10.017](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.017).
- Schwartz, P., Bucheli, T.D., Wettstein, F.E., Burkhardt-Holm, P. 2013. Life-cycle exposure to the estrogenic mycotoxin zearalenone affects zebrafish (*Danio rerio*) development and reproduction. *Environ. Toxicol.* 28: 276-289, [doi:10.1002/tox.20718](https://doi.org/10.1002/tox.20718).
- Tacon, A.G.J., Hasan, M.R., Metian, M. 2011. Demand and supply of feed ingredients for farmed fish and crustaceans: trends and prospects. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Papers* 564: 61-62, <http://www.fao.org/docrep/015/ba0002e/ba0002e00.htm>
- Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C., Mañes, J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* 45: 1-18, [doi:10.1016/j.fct.2006.07.030](https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030).

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych z informacją o odbytych stażach krajowych lub zagranicznych ośrodkach naukowych lub akademickich.

Działalność naukową w Katedrze Biotechnologii w Ochronie Środowiska rozpocząłem jeszcze jako student czwartego roku studiów magisterskich w 2005 roku, którą kontynuowałem na studiach doktoranckich. Dołączyłem wtedy do interdyscyplinarnego zespołu badawczego, którego pracami kierował prof. dr hab. Paweł Brzuzan, prof. zw. W skład zespołu wchodziły naukowcy z różnych jednostek (m.in. Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie, czy Uniwersytetu Jagiellońskiego). Olbrzymią zaletą zespołu była umiejętność łączenia wiedzy z różnych obszarów nauki, w tym biologii molekularnej, chemii organicznej, ichtiologii, genetyki zwierząt, toksykologii środowiska, czy weterynarii. Od początku działalności biorę aktywny udział w licznych projektach naukowych własnych i innych, dotyczących przede wszystkim odkrywania nowych właściwości biologicznych oraz określania skutków narażenia zwierząt i ludzi na substancje chemiczne, które powszechnie uznaje się za zanieczyszczenia środowiska. Chociaż moje obecne badania w głównej mierze dotyczą toksyn naturalnych, produkowanych przez grzyby lub cyjanobakterie (sinice), to jednak ważną część mojego dorobku skupia się również na związkach pochodzenia antropogenicznego, takich jak wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) czy farmaceutyki.

Piśmiennictwo dotyczące molekularnego podłoża toksyczności poszczególnych WWA wobec organizmów wodnych jest nieliczne i dostarcza głównie informacji o działaniu dioksyn i benzo[*a*]pirenu. Do niedawna, układ podstawionego cyklopenta[*c*]fenantrenu (CP[*c*]F) pozostawał niezbadany pod kątem potencjalnych zagrożeń, co skłoniło nasz zespół do nawiązania współpracy z dr. Maciejem Górą z Wydziału Chemii (Uniwersytet Jagielloński) i rozpoczęcia prac badawczych nad właściwościami biologicznymi właśnie tej grupy związków organicznych. Realizację badań rozpoczęto od syntezy 2,3-dihydro-1H-cyklopenta[*c*]fenantrenu oraz jego pochodnych, co do których mieliśmy oczekiwania o zróżnicowanej aktywności biologicznej. Najbardziej interesującą cechą strukturalną CP[*c*]F i jego pochodnych wydawała się obecność tzw. „*pseudo fjord*” regionu tworzonego przez pierścień cyklopentanu. Do stwierdzenia w jaki sposób obecność tych związków wpływa na metabolizm i aktywność biologiczną zastosowano różne metody *in vitro* i *in vivo*, m.in. test Ames, test kometowy, czy pomiar stopnia indukcji genów w różnych tkankach eksponowanych ryb. Uzyskane wyniki naszych badań pozwoliły stwierdzić, że w wątrobie eksponowanych ryb CP[*c*]F posiada zdolność do modulacji ekspresji mRNA cytochromu

P450 (*cyp1a*) i białka supresorowego *p53* (tzw. „strażnika genomu”) – transkryptów genów, pełniących ważne role w procesie detoksykacji organizmu oraz kontroli cyklu komórkowego. Ponadto, wyniki pokazały również, że w erytrocytach pstrąga tęczowego CP[c]F może wywoływać efekty klastogenne, a jego pochodne wykazują własności genotoksyczne i mutagenne. Pomimo tego, brak wyraźnych zmian w ekspresji genów – receptora estrogenowego (*era*) i witellogeniny (*vlg*) w wątrobie ryb pod wpływem CP[c]F sugeruje, że związek ten prawdopodobnie nie ma zdolności do wywoływania zaburzeń funkcjonowania układu endokrynnego. Nowatorskie wyniki z zakresu syntezy, geometrii cząsteczki i właściwości biologicznych CP[c]F oraz jego pochodnych u pstrąga tęczowego przedstawiono w serii oryginalnych artykułów naukowych, pracy przeglądowej, a także rozdziałów w monografiach (**II.A.1, 3, 5, 11** oraz **II.D.1-2, 7, 11, 15**).

Zainteresowania naukowe i doświadczenie naszego zespołu w zakresie właściwości biologicznych WWA pozwoliło na nawiązanie kontaktu z Politechniką Gdańską, a następnie uwzględnienie naszego zespołu w projekcie rozwojowym prof. dra hab. Jacka Namieśnika, prof. zw. z Wydziału Chemicznego (**II.I.1**). Zadaniem zespołu było określenie toksyczności oraz aktywności biologicznej fenantrenu i jego pochodnych o różnych konfiguracjach metylowych i fenylowych grup funkcyjnych. W ramach badań przeprowadzono statyczny test toksyczności ostrej na larwach ryb danio pręgowanego (*Danio rerio*), który wykazał istotne różnice w aktywności badanych związków. Na przykład, 4-metylofenantren okazał się bardziej toksyczny niż benzo[*a*]piren oraz fenantren, z kolei 1-metylofenantren był 10-krotnie mniej toksyczny niż 4-metylofenantren, natomiast 4- i 1-fenyłowe pochodne fenantrenu charakteryzowały się podobną, niską toksycznością. Obserwacje larw ryb eksponowanych na metylowe pochodne fenantrenu ukazały liczne nieprawidłowości rozwojowe, potwierdzając teratogenne oddziaływanie tych związków. Co ciekawe, dalsze badania molekularne, również z udziałem innych gatunków ryb, nie wykazały zdolności badanych pochodnych fenantrenu do indukcji ekspresji *Cyp1a*, tym samym sugerując odmienny od pozostałych WWA mechanizm oddziaływania, który mógł być niezależny od receptora AhR (**II.A.12, II.D.6**).

W wyniku realizacji zadań naukowych dotyczących aktywności biologicznej węglowodorów aromatycznych powstała również publikacja dokumentująca niepublikowane do tej pory właściwości dibenzotiofenu (DBT), heterocyklicznego związku powszechnie występującego na terenach zanieczyszczonych ropą naftową lub jej produktami. W pracy obejmującej ekspozycję pstrąga tęczowego na DBT wykazano zdolność tej do supresji poziomu mRNA i białka genu *cyp1a* w wątrobie ryb, co stanowi ważny dowód

w rozważaniach na temat niekompetycyjnej inhibicji hemoproteidu CYP450 przez ten związek (**II.A.6**).

Wśród moich zainteresowań badawczych znalazły się również substancje toksyczne pochodzenia naturalnego. Chociaż problemowi zatrucia mikotoksyną zearalenonem (ZENem) poświęcono wiele uwagi w piśmiennictwie naukowym, to jednak w przeważającej większości publikacje te poruszają problematykę wpływu tej niepożądanego substancji na zaburzenia rozrodu u zwierząt hodowlanych w powiązaniu z towarzyszącymi im zmianami histopatologicznymi i anatomopatologicznymi oraz ścieżkami detoksykacji. Natomiast wiedza na temat molekularnego podłoża ZENU, a także wpływu tej mikotoksyny na organizm ryb pozostawała ograniczona, co skłoniło mnie do rozpoczęcia badań w tym obszarze.

Jeszcze jako doktorant, wiosną 2009 r. otrzymałem grant naukowy MNiSW własny (**II.I.2**), finansujący badania molekularnego mechanizmu oddziaływania ZENU w wybranych tkankach pstrąga tęczowego. Uzyskane wyniki badań wykazały istotne oddziaływanie ZENU na różne szlaki komórkowe, w tym także na takie, które nie są bezpośrednio zależne od dobrze poznanych, estrogennych właściwości tej mikotoksyny (**II.A.10** oraz **II.D.4**). Na przykład, identyfikacja cDNA genów wyizolowanych z wątroby i jajnika ryb eksponowanych na ZEN wykazała ich wysokie podobieństwo do transkryptów różnych genów, m.in. *acty*, kodujący element strukturalny cytoszkieletu komórki, *bccip*, odpowiedzialny za naprawę DNA i kontrolę cyklu komórkowego, *eno1*, kodujący enzym glikolityczny, czy *proc*, uczestniczący w stanie zapalnym (**II.A.10**). Ponadto, prace zrealizowane w ramach grantu wskazały również na potencjalne skutki ekspozycji ryb na ZEN, sugerując zdolność tej mikotoksyny do zaburzania ważnych procesów fizjologicznych, tj. krzepnięcie krwi czy gospodarka żelazem (**II.A.8**). Zagadnieniom związanym z molekularnym podłożem oddziaływania ZENU poświęcona została także moja rozprawa doktorska, którą obroniłem w grudniu 2010 r. Naturalnym następstwem było również podsumowanie dokonań w tym obszarze w postaci rozdziału w monografii (**II.D.13**).

Za ważną część moich osiągnięć naukowo-badawczych uważam nawiązanie i rozwinięcie międzynarodowej współpracy z prof. Helmutem Segnerem (Universität Bern, Szwajcaria), światowej klasy specjalistą z zakresu ekotoksykologii i histopatologii ryb (9199 cytowań, *h-index*: 53). Moje ówczesne osiągnięcia pozwoliły mi na zdobycie stypendium START Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej dla wybitnych młodych naukowców (**II.J.1-2**), w ramach którego mogłem odbyć zagraniczny staż w renomowanym ośrodku badawczym Zentrum für Fish und Wildtiermedizin na Uniwersytecie w Bernie (**III.L.1**). Dwutygodniowy staż w Szwajcarii pozwolił mi nie tylko na zapoznanie się z zespołem prof. Segnera

i organizacją pracy w jego ośrodku, ale przede wszystkim na odbycie szkolenia z metod izolacji komórek wątroby oraz układu odpornościowego ryb. Efektem stażu było rozwinięcie własnego warsztatu badawczego, a także nawiązanie dobrej znajomości, która (jak się później okazało) pozwoliła również na skuteczną współpracę w przyszłości (**I.B.4**).

Obiecujące wyniki prac nad podłożem oddziaływania ZENU skłoniły nasz zespół do poszerzenia obszaru badań i nawiązania kontaktu z zespołem prof. dra hab. Macieja Gajęckiego, prof. zw. z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie). Pierwszym sukcesem współpracy było uzyskanie wiosną 2010 r. przez dr wet. Ewę Jakimiuk grantu MNiSW własnego (**II.I.3**), w którym byłem wykonawcą. Wspólne badania polegały na określeniu potencjalnych skutków ekspozycji młodocianych loszek na powszechnie występujące w paszy dla zwierząt substancje niepożądane – ZEN i dichlorodifenylodichloroetylen (DDE). Uzyskane wyniki pokazały, że obecność tych zanieczyszczeń w paszy, nawet w niskich dawkach, może mieć negatywne skutki dla kondycji trzody chlewnej, a także nieść za sobą potencjalne ryzyko dla zdrowia konsumentów produktów spożywczych pochodzenia zwierzęcego, tj. smalec (**II.A.17, II.D.10**).

Kontynuacją współpracy z Wydziałem Medycyny Weterynaryjnej było uwzględnienie naszego zespołu w projekcie rozwojowym prof. Gajęckiego (**II.I.4**). Zadaniem zespołu było określenie profilu ekspresji genów dla białek odpowiadających za metaboliczne, endokrynne i obronne reakcje komórek oraz wybranych mikroRNA w układzie pokarmowym świń podczas eksperymentalnej mikotoksykozy fuzaryjnej – mieszanej ekspozycji na mikotoksyny ZEN i deoksyniwalenol (DON). Wielokierunkowa analiza ekspresji genów wykazała modulujący, czasowo zależny wpływ mieszaniny mikotoksyn na profil mRNA kluczowych genów metabolizmu ksenobiotyków (*cyp1a1* i *gstp1*) oraz mikroRNA (miR-15a i miR-34a) zaangażowanych w regulację obronnych procesów komórkowych, tj. zatrzymanie cyklu komórkowego czy apoptozy (zaprogramowanej śmierci komórki). Uzyskane wyniki umożliwiają opracowanie wzorców ekspresji genów w zależności od rodzaju tkanki i czasu ekspozycji, oraz określenie ich przydatności jako biomarkerów narażenia na mikotoksyny, co ma znaczenie w aspekcie diagnostyki wczesnej mikotoksykozy u ludzi i zwierząt. Ważnym aspektem badań było również opracowanie i zastosowanie metody analizy chromatograficznej ekstraktów z tkanek w powiązaniu z metodami wykorzystującymi syntetyczne wzorce chromatograficzne w celu określenia ciągu przemian jakim ZEN i DON ulegają w przewodzie pokarmowym eksponowanych świń. Efekty współpracy opublikowano w czasopiśmie z listy JCR (**II.A.15**), a także przedstawiono podczas konferencji (**III.B.7**).

Wiedza i doświadczenie w zakresie higieny pasz, zdobyte podczas współpracy z zespołem prof. Gajęckiego umożliwiły mi zmianę myślenia o mojej dotychczasowej pracy badawczej, a następnie rozpoczęcie poszukiwania nowych obszarów badawczych. Eksploracja istniejącej literatury i obowiązującego stanu prawnego pozwoliły mi dostrzec lukę w ówczesnej wiedzy na temat potencjalnych skutków dla akwakultury związanych z obecnością mikotoksyn w paszy dla ryb, a następnie zainicjować pierwsze badania w tym zakresie. Wstępne wyniki pozwoliły na sformułowanie założeń do mojego kolejnego wniosku o projekt badawczy, a następnie uzyskania jego finansowania przez Narodowe Centrum Nauki w konkursie SONATA 7 (II.I.6). Konsekwencją prac badawczych w tym właśnie zakresie było przygotowanie cyklu powiązanych tematycznie publikacji do mojego wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego (I.B.1-4).

Mój warsztat badawczy oraz zainteresowania naukowe związane z akwakulturą doprowadziły również do współpracy z dr Katarzyną Palińską-Żarską z mojego macierzystego wydziału. Wynikiem współpracy było uzyskanie w 2017 r. przez dr Palińską-Żarską finansowania przez Narodowe Centrum Nauki projektu naukowego w ramach konkursu SONATA 11, w którym jestem wykonawcą (II.I.7). Moje obecne zaangażowanie w tym projekcie dotyczy określenia wpływu procesu udomowienia na zmiany w ekspresji wybranych genów w układzie pokarmowym okonia (*Perca fluviatilis*).

W obszarze moich zainteresowań badawczych pozostają także inne zagadnienia, w tym związane z ekotoksykologią wód. Od ponad dekady, zespół badawczy, którego jestem członkiem, pogłębia wiedzę na temat wykorzystania siei (*Coregonus lavaretus*) jako potencjalnego bioindykatora zmian w środowisku naturalnym. Sieja jest rybą łososiowatą o wysokich wymaganiach bytowych, a przez to niezwykle czułą nawet na niewielkie zmiany wskaźników jakości wody. W warunkach pogarszającego się stanu środowiska naturalnego, ryba ta coraz rzadziej występuje w wodach naszego kontynentu. Za ważne osiągnięcie uważam badania przeprowadzone na wylęgu siei wykazującej symptomy wodniaka, choroby, której występowanie coraz częściej łączy się z obecnością zanieczyszczeń w środowisku. W naszych badaniach stwierdziliśmy podwyższony poziom ekspresji *p53*, co może sugerować udział tego genu w rozwoju choroby (II.A.2).

Jednym z głównych efektów globalnego pogorszenia stanu wód są zakwity glonów i cyjanobakterii, mające wpływ na stan populacji różnych gatunków ryb, w tym siei. Tymczasem wiedza o toksynach produkowanych przez sinice (tzw. cyjanotoksynach) jako czynnikach wywołujących zatrucia u ludzi i zwierząt jest w dalszym ciągu niewystarczająca. Badania naszego zespołu nad wpływem mikrocystyny-LR (MC-LR) na poziom ekspresji



genów oraz parametrów fizjologicznych u siei ukazały zdolność tej cyjanotoksyny do modulacji ekspresji genów związanych z procesami naprawy uszkodzeń DNA i przebiegu apoptozy, a także mikro RNA zaangażowanych w regulację procesów obronnych komórek. Efektem zatrucia tym związkiem mogą być liczne patologiczne zmiany w organizmie ryb, występowanie uszkodzeń tkanek, a nawet utrata funkcji organów (**II.A.4, 9** oraz **II.D.5**). Wyniki prac zespołu opublikowane w zakresie właściwości biologicznych MC-LR pozwoliły na zdobycie grantu naukowego, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu OPUS 4 (**II.I.5**).

W związku z realizacją tego projektu, w ostatnim czasie moje prace dotyczyły opracowania szczegółowego obrazu przebiegu zmian patologicznych w wątrobie siei podczas długoterminowej ekspozycji na MC-LR. Wykonanie tego zadania było możliwe dzięki nawiązaniu ścisłej współpracy z prof. drem hab. Bogdanem Lewczukiem, prof. zw. z Wydziału Medycyny Weterynaryjnej (Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie). Wstępna hipoteza zakładała, że ekspozycja ryb na MC-LR, powtarzana co tydzień przez 28 dni, wywoła trwałe uszkodzenie i postępującą niewydolność wątroby. Tymczasem wbrew naszym oczekiwaniom, wyniki pokazały tolerancję ryb na zatrucie MC-LR. W pierwszych dobach ekspozycji, MC-LR wywołała ciężkie uszkodzenie wątroby, a jej głównym celem w komórkach były: siateczka śródplazmatyczna, cytoszkielet i chromatyna. Co ważne, wyraźnemu uszkodzeniu wątroby towarzyszyło zwiększone wchłanianie toksyny przez hepatocyty. Zaskakująco jednak, począwszy od pierwszego tygodnia ekspozycji, w wątrobie zaobserwowano procesy regeneracyjne, które doprowadziły do odbudowy struktury wątroby na zakończenie doświadczenia (28 dni). Barwienia na obecność MC-LR w tkankach wykazały, że pomimo powtarzanej ekspozycji, toksyna nie akumulowała się w wątrobie, wskazując na jej ograniczone wchłanianie w trakcie regeneracji narządu. Dodatkowa analiza wykazała znaczną inhibicję ekspresji transportera OATP (ang. *organic anion-transporting polypeptide*), białka które ma kluczowe znaczenie w procesie aktywnego transportu MC-LR do wnętrza komórki. Wyniki prowadzonych przez nas prac pokazały, że negatywna regulacja ekspresji OATP w hepatocytach po pierwszej dawce MC-LR może stanowić mechanizm obronny przed dalszym zatruciem organizmu, jednocześnie pozwalając na regenerację uszkodzonej wątroby. W celu usystematyzowania tego zjawiska zaproponowałem definicję „autokleza” (gr. *auto* – samo, *kleisis* – zamknięcie), która oznacza zamknięcie aktywnego transportu komórki jako mechanizmu obronnego przed dalszą intoksykacją. Wyniki prac opublikowano w zagranicznym czasopiśmie (**II.A.21**) oraz przedstawiono na konferencjach naukowych (**II.K.6** oraz **III.B.10,11,13**). Obecnie, moja praca w tym obszarze skupia się na

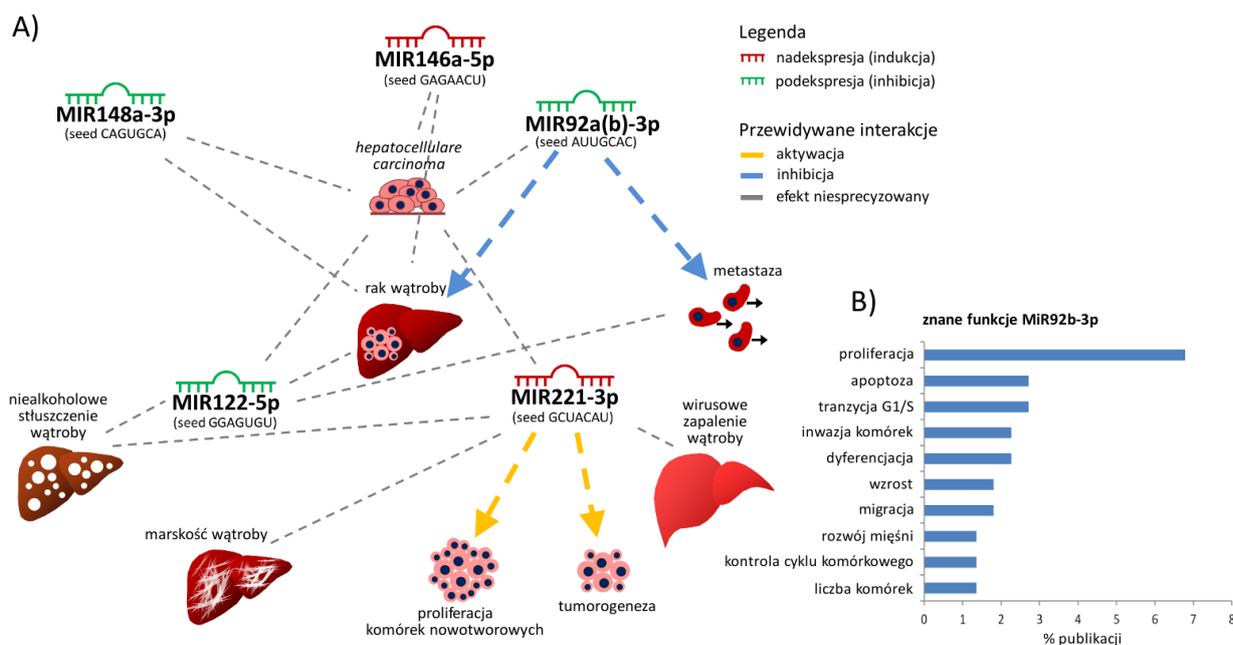
poznaniu szczegółów regulacji autoklezy w hepatocytach pod wpływem MC-LR, co pozwoli nie tylko na lepsze zrozumienie przebiegu toksycznego uszkodzenia wątroby ale również niesie nadzieję na opracowanie innowacyjnej terapii lub prewencji zatrucia związkami o podobnym oddziaływaniu. W tym zakresie mojej aktywności badawczej, niedawno odbyłem wyjazd do ośrodka RECETOX na Uniwersytecie Masaryka w Czechach (**III.L.4**). Zagraniczna wizyta miała na celu nawiązanie kontaktu z zespołem prof. Ludka Bláhy (4078 cytowań, *h-index*: 32) oraz opracowanie szczegółów dalszej współpracy w kierunku upowszechnienia i rozwinięcia idei prowadzonych przeze mnie badań.

W kontekście odkrywania molekularnych podstaw przebiegu toksycznego uszkodzenia i regeneracji wątroby, funkcjonalna rola mikro RNA stanowi ważny obszar tematyczny mojej pracy (**II.D.14**). Mikro RNA (miRNA) stanowią najlepiej scharakteryzowaną grupę niekodujących odcinków RNA, które odgrywają kluczową rolę w potranskrypcyjnej regulacji rozwoju i funkcjonowania komórek. Ponieważ krótkie, niekodujące fragmenty RNA uczestniczą w zjawisku wyciszania lub nawet wyłączenia (interferencji) ekspresji genów, cząsteczki te szybko skupiły na sobie uwagę toksykologów, ze względu na ich możliwość zaangażowania w odpowiedź komórki na obecność ksenobiotyków. Doniesienia naukowe na temat roli transkryptomu miRNA ryb w procesach molekularnych w następstwie zatrucia substancjami toksycznymi są nieliczne. W przypadku MC-LR, przeprowadzone do tej pory badania naszego zespołu i innych, skupiały się jedynie na identyfikowaniu i opisywaniu funkcji wybranych, pojedynczych czynników biorących udział w zatruciu (**II.A.9** oraz **II.D.5**), a do niedawna nie było kompletnego profilu miRNA w narządach ryb eksponowanych na toksyny środowiskowe, takie jak MC-LR. Jednak nadzieję na taką możliwość dawała w tamtym czasie metoda wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA (RNA-Seq).

W celu zdobycia doświadczenia w zakresie stosowania metody RNA-Seq, w maju 2014 r. odbyłem krótki wyjazd zagraniczny do ośrodka badawczego prof. Igora Babiaka (1511 cytowań, *h-index*: 24) na Uniwersytecie w Nordland w Norwegii, wybitnym specjalistą z zakresu badania sieci funkcjonalnych zależności mikroRNA u ryb (**III.L.3**). Wyjazd zagraniczny pozwolił mi nawiązać nowe kontakty, a także pomógł rozwinąć dotychczasowy warsztat badawczy i skutecznie kontynuować zaawansowane prace badawcze.

Łączone wykorzystanie wysokoprzepustowej metody RNA-Seq wraz z bioinformatyczną analizą danych pozwoliło na odkrycie, że w czasie ekspozycji na MC-LR, dziesiątki miRNA wątroby ulegały wzbudzeniu, podczas gdy inne były tłumione. Co ważne, temu dogłębnemu przebudowaniu transkryptomu miRNA towarzyszyły wyraźne

zmiany histopatologiczne w wątrobie, co wskazało na zaangażowanie miRNA w zaobserwowanym przebiegu uszkodzenia i regeneracji tego narządu. W tym kontekście ważnym było wykazanie jakościowych i ilościowych zmian profilu ekspresji licznych miRNA, które były powiązane z patologicznymi stanami wątroby ludzi (Rys. 2). Geny docelowe tych miRNA kodują białka kierujące procesami przebudowy cytoszkieletu, metabolizm komórkowego, regulacji cyklu komórkowego, czy apoptozy.



Rysunek 2. Rola mikroRNA w stanach chorobowych wątroby (Brzuzan i in. 2016). (A) Uproszczona sieć powiązań pomiędzy miRNA, których ekspresja była zmieniona w chorej wątrobie u ludzi i uszkodzonej wątrobie siei po ekspozycji na MC-LR. (B) Funkcjonalna analiza MiR92b-3p.

Interesująco, wśród najbardziej tłumionych (wyciszonych) miRNA u siei znalazł się MiR92b-3p, który jest głównym podmiotem szczegółowych badań zespołu, w którym pracuję nad patogenezą uszkodzeń wątroby i mechanizmem interferencji RNA u ryb narażonych na działanie MC-LR. U ludzi, MiR92b-3p należy do grupy genów, która pełni istotną rolę w szeregu procesów komórkowych, a także ma istotne znaczenie w patogenezie chorób wątroby. Dowody naukowe wskazują, że MiR92b-3p może tłumić ekspresję genów o własnościach supresorów nowotworowych, takich jak białko p53, co może prowadzić do zatrzymania apoptozy i inicjacji niekontrolowanej proliferacji. W zdrowej wątrobie kręgowców MiR92b-3p jest liczny (tysiące molekuł w komórce), jednak w stanach patologicznych jego liczebność istotnie się zmienia (Rys. 2). Wyniki dotychczasowych prac naszego zespołu pozwala nam przypuszczać, że zmniejszona ekspresja MiR92b-3p w wątrobie siei jest również związana ze szlakiem obronnym komórek uruchamianym po

wniknięciu MC-LR (**II.A.20**). Ponadto, istnieją dowody, że miRNA przedostające się do krwioobrotu z uszkodzonych narządów mogą być przydatne w diagnostyce uszkodzenia wątroby, a także rokowaniu przebiegu choroby. W tym kontekście warto podkreślić również wykazanie przez nasz zespół, że inny, specyficzny dla wątroby kręgowców mikro RNA MiR122 jest czułym biomarkerem toksycznego uszkodzenia wątroby u ryb, a tym samym może być wykorzystywany jako skuteczna alternatywa do standardowych testów z użyciem tzw. prób wątrobowych (**II.A.19**). Ważnym osiągnięciem było również pogłębienie i usystematyzowanie dotychczasowej wiedzy na temat molekularnych podstaw neurotoksycznego oddziaływania MC-LR u ryb (**II.A.22, II.D.9**).

Efektorem powyższych prac naszego zespołu było przygotowanie kolejnego projektu badawczego, który w konkursie OPUS 11 uzyskał finansowanie przez Narodowe Centrum Nauki (**II.I.8**). Jestem głównym wykonawcą tego projektu, a mój udział w projekcie dotyczy identyfikacji i opisu funkcji biologicznych MiR92b-3p, co pozwoli zrozumieć na jakiej zasadzie ta cząsteczka RNA działa w wątrobie. Najnowszym osiągnięciem badań w tym obszarze było opracowanie skutecznej metody dostarczenia syntetycznych analogów MiR92b-3p *in vivo* (**II.A.23**). W chwili obecnej, badania mają na celu wyłonienie konkretnych genów kontrolowanych przez MiR92b-3p, które biorą udział w szlakach sygnałowych uaktywnianych przy uszkodzeniach wątroby. Uzyskane wyniki stanowią punkt wyjścia do opisu tzw. „interaktomu” wątroby wobec MC-LR, czyli złożonej mapy wszystkich interakcji pomiędzy genami, RNA, czy metabolitami. Takie mapy, podające relacje i reakcje pomiędzy interaktomami różnych gatunków, umożliwią w przyszłości modelowanie toksyczności nie tylko MC-LR ale i innych substancji, co z kolei pozwoli znacznie ograniczyć testy laboratoryjne na zwierzętach. Ponadto, w związku z szybkim rozwojem w ostatnich latach tzw. metod „reverse genetics”, wyciszanie genów nabrało także znaczenia praktycznego. Dzięki wprowadzeniu do organizmu odpowiedniej konstrukcji genowej, miRNA mogą skutecznie wzbudzać lub hamować ekspresję konkretnych genów, osiągając zamierzony cel. Na podstawie opracowanej przez nas metodyki wprowadzania *in vivo* trwałych biologicznie, syntetycznych miRNA do wzbudzenia lub wyciszenia ekspresji genów u ryb eksponowanych na MC-LR, chcę odpowiedzieć na pytania: czy nadmiar lub brak MiR92b-3p wywoła określony efekt w uszkodzonej wątrobie i czy możliwe jest ograniczenie toksycznego uszkodzenia za pomocą kontrolowania ilości tego miRNA. W ten sposób pragnę ocenić czy MiR92b-3p może sprawdzić się jako innowacyjny czynnik terapeutyczny w leczeniu, a nawet zapobieganiu uszkodzenia wątroby.

Cyjanobakterie stanowią bogate źródło biologicznie czynnych i strukturalnie zróżnicowanych związków chemicznych, a literatura pokazuje, iż wiele z nich posiada zdolność wiązania się z ważnymi efektorami molekularnymi (tj. RNA, białko) i regulowania procesów komórkowych. Dlatego, naturalną konsekwencją dotychczasowych badań zespołu było rozpoczęcie prac nad poszukiwaniem metabolitów cyjanobakterii zdolnych do modulacji funkcji różnych miRNA. W ramach konkursu OPUS 13 Narodowego Centrum Nauki, w 2017 r. prof. Brzuzan uzyskał finansowanie projektu naukowego, w którym jestem wykonawcą (**II.I.9**). Na potrzeby realizacji tego projektu, ustanowiono naukowe konsorcjum trzech niezależnych ośrodków badawczych, grupujące specjalistów z zakresu biologii molekularnej (prof. dr hab. Paweł Brzuzan, prof. zw.; Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie), chemii analitycznej (prof. dr hab. Hanna Mazur-Marzec; Uniwersytet Gdański) i bioinformatyki (dr Filip Stefaniak; Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie). Moje zaangażowanie w tym projekcie jest aktualnie związane z opracowaniem komórkowego systemu reporterowego *in vitro* do rozpoznawania zdolności małowcząsteczkowych metabolitów wyizolowanych z cyjanobakterii Morza Bałtyckiego, które mogłyby pełnić rolę potencjalnych modulatorów funkcji MiR92b-3p. Wyłonione w wyniku badań przesiewowych małowcząsteczkowe związki zdolne do modulacji (obniżania lub podwyższania) poziomu miRNA byłyby nie tylko substancjami pomocnymi w odkrywaniu funkcji biologicznych miR genów, ale miałyby również znaczenie w opracowywaniu nowych metod leczenia chorób.

Poza głównym nurtem badań, brałem również udział w innych pracach zespołu, w tym dotyczących udoskonalania warsztatu technik biologii molekularnej (**II.D.3, 11**) czy możliwości wykorzystania różnych zwierząt jako modeli badawczych (**II.A.7, 14** oraz **II D.2, 8**). Na przykład, ważnym osiągnięciem było opracowanie metody detekcji mutacji 5382insC genu BRCA1 u ludzi, opartej na działaniu sond fluorescencyjnych w metodzie Real-Time PCR. Zoptymalizowaną metodę wykorzystaliśmy do zweryfikowania danych przesiewowych z 2007 r., uzyskanych od pacjentów województwa warmińsko-mazurskiego zdiagnozowanych wcześniej na nosicielstwo mutacji (**II.D.3**). Innym przykładem może być opracowanie szczegółowej charakterystyki mutacji miejsca akceptorowego genu *p53* w laboratoryjnej linii ryb hu888 danio pręgowanego, wykorzystywanej jako model w badaniach nad rozwojem embrionalnym, procesami nowotworzenia, czy starzenia (**II.A.14**).

Podsumowując, oprócz prac wchodzących w skład ww. osiągnięcia naukowego, jestem autorem lub współautorem 33 publikacji (23 w czasopismach z listy JCR oraz 10 w czasopismach punktowanych z części B listy MNiSW), w tym 32 prac oryginalnych

i 1 artykułu przeglądowego. Mój pozostały dorobek stanowi 4 rozdziały w monografiach w języku polskim (3) i angielskim (1), a także 30 komunikatów/doniesień w materiałach konferencyjnych, w tym 2 indeksowanych w bazie Web of Science. Uczestniczyłem lub uczestniczę w pracach 9 projektów naukowych krajowych, w których pełniłem funkcję kierownika (2) lub wykonawcy (7). Za moje osiągnięcia naukowe, w grudniu 2016 r. otrzymałem nagrodę I stopnia od Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie **(II.J.3)**.

## **6. Działalność w zakresie popularyzowania nauki.**

Moja działalność w zakresie popularyzowania nauki dotyczy głównie czynnego udziału w licznych konferencjach zagranicznych i krajowych, podczas których wygłosiłem osobiście 9 referatów **(II.K.1-9)**. Ponadto, jako członek komitetu organizacyjnego, brałem aktywny udział w zorganizowaniu konferencji naukowo-szkoleniowej pt. „Człowiek, żywność, środowisko - problemy współczesnej toksykologii”, która odbyła się w Olsztynie w ramach XI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego **(III.C.1)**.

Do osiągnięć w zakresie popularyzowania nauki zaliczam również publikacje zawierające przystępne dla szerszej grupy odbiorców opisy projektów naukowych, w których uczestniczę, a także artykuł popularno-naukowy opublikowany w literaturze branżowej. W celu promowania nauki i badań własnych, niejednokrotnie udzielałem wywiadów i przygotowywałem materiały dla dziennikarzy z lokalnej prasy, czego efektem artykuły pojawiające się w periodyku Wiadomości Uniwersyteckie. Za ważną uważam również moją aktywność w Internecie, która polega na promocji badań w formie postów publikowanych na bieżąco w mediach społecznościowych **(III.I.3)**.

W ramach popularyzacji nauki podczas Dni Otwartych na Wydziale Nauk o Środowisku UWM w Olsztynie, prowadziłem warsztaty dla uczniów szkół licealnych, a także zorganizowałem zajęcia pokazowe dla olsztyńskich przedszkolaków **(III.I.3)**.

## **7. Działalność organizacyjna (z opisem współpracy z instytucjami lub organizacjami naukowymi).**

W trakcie pracy zawodowej realizowałem i nadal realizuję wiele działań organizacyjnych na rzecz Wydziału Nauk o Środowisku oraz Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. W latach 2014-2016 pełniłem funkcję Pełnomocnika Dziekana ds. Informacji Naukowej, a w latach 2016-2017 zostałem powołany w skład Kierunkowego

Zespołu ds. Jakości Kształcenia na kierunku Ochrona środowiska. W kadencji 2016-2020 zostałem wybrany spośród pracowników niesamodzielných na członka Rady Wydziału Nauk o Środowisku, gdzie również powierzono mi funkcję członka Komisji Skrutacyjnej (III.Q). Dwukrotnie uczestniczyłem w posiedzeniach Komisji Rekrutacyjnej powołanej przez Prorektora ds. nauki UWM w Olsztynie dotyczących konkursu zatrudnienia na stanowiskach w projektach badawczych finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki (III.N).

Moja działalność organizacyjna wykracza również poza miejsce mojego zatrudnienia. W 2008 r. przyjęto mnie w poczet Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego, gdzie obecnie pełnię rolę członka Zarządu Warmińsko-Mazurskiego Oddziału PTTox (III.H.1 oraz III.Q). W 2012 r. zostałem również powołany do komitetu redakcyjnego czasopisma naukowego *Environmental Biotechnology* z listy MNiSW, część B (III.G.1). Jestem również aktywnym recenzentem licznych czasopism naukowych z listy JCR, dla których przygotowałem łącznie 23 recenzje w języku angielskim (III.P).

Od początku zatrudnienia sprawuję opiekę nad salą dydaktyczną i laboratorium biologii molekularnej w Katedrze Biotechnologii w Ochronie Środowiska, w których odpowiadam za bezpieczeństwo metod i procedur wykonywanych na sprzęcie będącym na ich wyposażeniu, a także za utrzymanie stanu zgodnego z zapisem inwentaryzacyjnym. Jestem również odpowiedzialny za stan i konserwację instalacji do uzdatniania wody, zapewniając budynkowi Katedry ciągłość dostawy wody destylowanej. Ponadto, od 2015 r. pełnię rolę administratora internetowej strony Katedry (III.Q).

#### **8. Działalność dydaktyczna (osiągnięcia dydaktyczne i sprawowana opieka naukowa nad studentami lub doktorantami w charakterze opiekuna naukowego lub promotora pomocniczego).**

W 2006 r. ukończyłem kurs pedagogiczny, zorganizowany przez Centrum Edukacji Nauczycielskiej i Doradztwa Zawodowego w Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskiego (UWM) w Olsztynie, co pozwoliło mi uzyskać kwalifikacje do zajmowania stanowiska nauczyciela. Działalność dydaktyczną rozpocząłem jeszcze na studiach doktoranckich od współprowadzenia ćwiczeń z przedmiotu *Ekotoksykologia* studiach magisterskich kierunku Ochrona środowiska na Wydziale Ochrony Środowiska i Rybactwa (później Wydziale Nauk o Środowisku, UWM w Olsztynie). Kiedy w 2010 r. zostałem zatrudniony na stanowisku pracownika naukowo-dydaktycznego, w dużej mierze kontynuowałem prowadzenie dotychczasowych zajęć, ale uczestniczyłem również w opracowywaniu nowych treści, w tym

ćwiczeń z przedmiotów *Toksykologia molekularna* oraz *Elementy diagnostyki molekularnej*, które realizowałem dla kierunku Biotechnologia na potrzeby Wydziału Biologii i Biotechnologii (UWM w Olsztynie). Ponadto, ze względu na moje wykształcenie zawodowe, prowadziłem również ćwiczenia z przedmiotów technicznych, tj. *Gospodarowanie osadami ściekowymi, Oczyszczanie ścieków i przeróbka osadów, czy Technologia wody i ścieków*, realizowanych w mojej macierzystej jednostce dla studentów kierunku Ochrona środowiska, oraz Inżynieria środowiska. Również na tych kierunkach kształcenia, jestem głównym autorem treści i koordynatorem przedmiotów *Biomarkery zanieczyszczenia środowiska, Język angielski w inżynierii środowiska*, oraz *Odnowa wód*.

Za szczególnie istotne osiągnięcie w zakresie swoich obowiązków dydaktycznych uważam udział w kształceniu na studiach międzynarodowych na specjalności Process Engineering, Environmental Protection and Biotechnology, które są z powodzeniem realizowane w naszej Katedrze od 2008 roku we współpracy z Wydziałem Mechaniki i Inżynierii Uniwersytetu Nauk Stosowanych w Offenburgu (Niemcy). W ramach tego wspólnego programu kształcenia realizuję zajęcia z przedmiotów *Toxicology, Techniques of genetic engineering, czy English terminology in biotechnology*, które prowadzone są w języku angielskim w międzynarodowej grupie studentów. Pomimo mojego zaangażowania w realizację licznych projektów badawczych, łączny wymiar pensum zrealizowanego od 2010 r. w ramach obowiązków dydaktycznych wyniósł ponad 1500 godzin (**III.I.1**).

W celu wzmocnienia potencjału dydaktycznego i podniesienia umiejętności językowych, w 2012 r. odbyłem 3-tygodniowy staż zagraniczny do Uniwersytetu Helsińskiego w Finlandii (**III.L.2**). Podczas pobytu w Helsinkach miałem osobisty kontakt z pracownikami różnych wydziałów i uczestniczyłem w zajęciach z ich studentami, co pozwoliło mi zapoznać się z systemem kształcenia w Finlandii oraz poznać nowe metody nauczania.

W latach 2014-2015 pełniłem funkcję koordynatora specjalności Biotechnologia środowiskowa, przez co czynnie uczestniczyłem w pracach dotyczących szczegółów programu kształcenia na kierunku Biotechnologia Wydziału Biologii i Biotechnologii (**III.I.2**).

Ponadto, byłem promotorem 1 pracy magisterskiej i 1 inżynierskiej, a także recenzentem 6 prac dyplomowych (**III.J.1-2**). Aktualnie pod moją opieką znajdują się 3 osoby na studiach I i II stopnia kształcenia. Wielokrotnie uczestniczyłem w pracach komisji na egzaminach inżynierskich i magisterskich, w tym na egzaminach w języku angielskim dla studentów specjalności Process Engineering, Environmental Protection and Biotechnology.



Co ważne, w 2013 i 2014 r. Rada Wydziału Nauk o Środowisku UWM w Olsztynie powierzyła mi funkcję promotora pomocniczego w dwóch otwartych przewodach doktorskich **(III.K.1)**.

28.01.2018  
