Prof. dr hab. Renata Urban-Chmiel
Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Chorób Ptaków
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 16.02.2024r.

Recenzja
pracy doktorskiej Pana lek. wet. Wojciecha Trybowskiego
pt.:"Wpływ jednoczesnego podawania toksyny T-2 i zearalenonu na kształtowanie się odsetka wybranych subpopulacji limfocytów B i T oraz wydzielanie cytokin w ścianie jelita biodrowego świń"."

Podstawą formalną jest pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko Mazurskiego w Olsztynie Nr WMW-DZ.5201.2.2023 z dnia 18 stycznia 2024r, informujące o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy zgodnie z Ustawą z dn. 20 lipca 2018r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz. U. z 2023r poz. 742 ze zm.

Mikotoksyny zaliczane są do toksycznych metabolitów wtórnych o niskiej masie cząsteczkowej wytwarzanych przez grzyby strzępkowe najczęściej z rodzaju *Aspergillus, Penicillium* oraz *Fusarium*. Wykrywane są na całym świecie jako naturalne zanieczyszczenia w produktach rolnych pochodzenia roślinnego. Bardzo często występują zwłaszcza w ziarnach zbóż, które stanowią 50–70% masy paszy. Ich wysokie stężenia wykazywano w paszach dla zwierząt zawierających kukurydzę, soję i pszenicę, ale mogą również występować w kiszonkach, sianokiszonkach oraz runi pastwiskowej. Mikotoksyny w różnym stężeniu można również znaleźć w produktach pochodzenia zwierzęcego, takich jak jaja, mięso, mleko i produkty pochodne mleka, jako pozostałości w wyniku przeniesienia zanieczyszczeń ze zwierząt, które spożywały skażoną paszę.

Zanieczyszczenia pasz dla zwierząt przez mikotoksyny zaliczane są do najważniejszych czynników ryzyka w branży paszowej i bezpieczeństwa łańcucha dostaw pasz. Stanowią również poważny problem dla branży hodowlanej oraz zdrowia zwierząt hodowlanych, a także konsumentów żywności. Mikotoksyny zakłócając homeostazę procesów metabolicznych, fizjologicznych oraz immunologicznych mogą wywoływać hepatotoksyczność, immunotoksyczność, neurotoksyczność oraz nefrotoksyczność, a w konsekwencji powodować niekorzystne skutki dla zdrowia i wydajności zwierząt. Spożycie paszy skażonej mikotoksynami przez zwierzęta może powodować zarówno ostrą, jak i przewlekłą toksyczność, obniżając wskaźniki produkcyjne zwierząt, m.in. poprzez ograniczenie przyrostów wagowych, wskaźników rozrodowych, a także immunosupresję.

Do najczęściej występujących mikotoksyn grzybiczych obecnych w paszach należą aflatoksyny (AF), deoksyniwalenol (DON), fumonizyny (FUM) i ochratoksyna A (OTA) oraz zearalenon (ZEN),

Zearalenon należy do mikotoksyn wytwarzanych przez gatunki pleśni *Fusarium* spp., które są wszechobecnym gatunkiem grzybów, występującym na całym świecie, zwłaszcza w ziarnach zbóż i

produktach pochodnych. Zearalenon jest związkiem stabilnym podczas przechowywania i wytrzymuje wysoką temperaturę w procesie przetwarzania żywności. Stwierdzono, że oddziałuje z receptorami estrogenowymi wywołując m.in. zmniejszoną płodność, wzrost resorpcji zarodków, zmniejszenie wielkości miotu, zmianę poziomu progesteronu w surowicy oraz działanie teratogenne u świń i owiec. W wyższych dawkach zearalenon zakłóca proces zapłodnienia, owulacji, a także implantację zarodka, prawidłowy rozwój płodu oraz żywotność noworodków. Wśród zwierząt hodowlanych najbardziej wrażliwe na zearalenon są świnie, u których obserwuje się obrzęk sromu i gruczołów sutkowych, przedłużone okresy międzyrujowe, rodzenie martwych prosiąt, zapalenia dróg rodnych w połączeniu z wypadnięciami końcowych odcinków dróg rodnych oraz przewodu pokarmowego. U knurów m.in. poprzez obniżanie poziomu testosteronu zearalenon hamuje spermatogenezę, wpływa na zmniejszenie masy jąder oraz zmniejsza libido.

Z kolei toksyna T-2 zaliczona została do najbardziej śmiercionośnych mikotoksyn trichotecenowych, a jej toksyczność u zwierząt różni się w zależności od wieku, dawki i gatunku zwierzęcia. Wytwarzana jest głównie przez *Fusarium tricinctum*, a jej mechanizm działania polega na hamowaniu syntezy białek i DNA oraz supresji komórkowej odpowiedzi immunologicznej u zwierząt. Wykazuje ponadto powinowactwo do komórek szybko dzielących się, dlatego właśnie układ odpornościowy i przewód pokarmowy stanowią dwa główne cele jej działania. Efektem działania toksyny T-2 są zaburzenia w pobieraniu pokarmu przez zwierzęta, uszkodzenia błony śluzowej jamy ustnej, biegunki, zaburzenia funkcjonowania przewodu pokarmowego, w tym krwotoki jelitowe, oraz upadki śmiertelne szczególne u bydła mlecznego. Objawami przewlekłego zatrucia jest immunosupresja, utrata masy ciała, zaburzenia transferu neuroprzekaźników, opóźnienie wzrostu oraz indukowanie procesów nowotworowych.

Obserwowane globalne zjawiska zmian klimatycznych stanowią istotny czynnik wpływający na rozwój grzybów chorobotwórczych i pleśni wywarzających mikotoksyny. Co więcej, bezpieczeństwo żywności jest obecnie zagrożone w zakresie trwałości systemów produkcji żywności ze względu na rosnące zapotrzebowanie na produkty konsumpcyjne. Dlatego opracowywane są działania z wykorzystaniem metod fizycznych, chemicznych, biologicznych i żywieniowych jako podstawowych strategii służących do eliminacji mikotoksyn w przemyśle paszowym.

Szybko rosnąca populacja świata oraz coraz wyższe standardy życia w wielu krajach powodują wzrost zapotrzebowania na żywność wysokiej jakości. Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO) szacuje, że popyt na żywność do 2050 r wzrośnie o 60%, a produkcja białka zwierzęcego będzie rosła o 1,7% rocznie, przy czym produkcja mięsa ma wzrosnąć o prawie 70%, nabiału o 55%, a akwakultury nawet o 90% (FAO, 2009; ONZ, 2013). W ramach podejmowanych strategii w ograniczaniu i kontroli zanieczyszczeń roślin, pasz i żywności toksynami produkowanymi przez grzyby Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności w ramach art. 23 i 33 rozporządzenia (WE) nr 178/2002 otrzymał od Komisji

Europejskiej wytyczne na zebranie wszelkich dostępnych danych na temat występowania zanieczyszczeń w żywności i paszy wywoływanych przez mikotoksyny.

W świetle powszechnego zagrożenia zanieczyszczeń wywoływanych przez mikotoksyny oraz globalnego problemu dostępności żywności zarówno pochodzenia roślinnego jak również zwierzęcego dla ludzi i zwierząt, podjęcie przez Doktoranta badań z zakresu charakterystyki i oddziaływania toksyny T-2 i zearalenonu na parametry immunologiczne i zdrowotne świń, należy uznać za w pełni aktualne i uzasadnione, zarówno z poznawczego jak też aplikacyjnego punktu widzenia.

Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska Pana lek. wet. Wojciecha Trybowskiego została przygotowana w postaci monografii i liczy 74 strony tekstu wydruku komputerowego. Należy podkreślić, że badania będące przedmiotem zrealizowanej pracy doktorskiej były prowadzone w ramach Grantu NCN nr NN308237936 pt.:"Badania nad oddziaływaniem toksyny T-2 i zearalenonu na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej jelita świń".

Dysertacja doktorska została podzielona na stosowne rozdziały oraz podrozdziały tj.: Wstęp, Cel pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Podsumowanie oraz Dyskusja, w obrębie których Doktorant zamieścił 21 rycin oraz 6 tabel. Ponadto Autor w prezentowanej pracy doktorskiej zawarł streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz 154 pozycji w większości anglojęzycznego piśmiennictwa. W celu usystematyzowania i ułatwienia czytelności dzieła w części początkowej pracy Doktorant zamieścił również spis treści oraz wykaz skrótów. Pracę kończy cztery wnioski, które Kandydat sformułował na podstawie otrzymanych wyników oraz w oparciu o wiedzę zawartą w cytowanej literaturze.

Układ pracy jest zgodny z wymogami stawianymi pracom naukowym wykonywanym na stopień doktora. Obejmuje on przegląd piśmiennictwa, w którym Doktorant przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczącej występowania problemu zanieczyszczeń pasz zróżnicowanymi mikotoksynami oraz zagrożeń jakie stanowią zarówno dla zwierząt oraz ludzi.

Przedstawiony na 16 stronach maszynopisu wstęp pracy obejmuje kompleksową charakterystykę wybranych mikotoksyn ze szczególnym uwzględnieniem toksyny T-2 oraz zearalenonu. Autor w części opisowej skupił się na przedstawieniu zagrożeń dla ludzi i zwierząt wynikających z występowania mikotoksyn w paszach oraz materiałach paszowych. Uzupełnieniem tej analizy jest zaprezentowany w postaci tabeli przez Doktoranta wykaz mykotoksynogennych gatunków grzybów z rodzaju *Fusarium* spp. powiązanych ze zbożami wraz z wytwarzanymi przez nie toksynami. W dalszej kolejności Autor prezentuje kompleksową charakterystykę wybranych mikotoksyn w zakresie ich budowy strukturalnej oraz efektów oddziaływania, ze szczególnym uwzględnieniem immunotoksyczności oraz wpływu immunomodulacyjnego na wybrane obszary i układy immunologiczne organizmu, a także barierę jelitową. W mojej ocenie jest to poprawna analiza piśmiennictwa będącego inspiracją do podjęcia badań stanowiących temat zrealizowanej pracy doktorskiej, świadcząca o dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktoranta. W końcowym fragmencie wstępu

Kandydat precyzuje opisowe uzasadnienie wykorzystanych w badaniach będących przedmiotem prezentowanej pracy doktorskiej wskaźników referencyjnych dla ocenianych toksyn T-2 i zearalenonu. Przedstawione przez Doktoranta informacje zostały poparte aktualnym piśmiennictwem z zakresu zagrożeń wynikających z prewalencji mikotoksyn w paszach oraz dokumentacji legislacyjnej regulującej maksymalne normy skażenia żywności i pasz.

Rozdział „Cel i zakres pracy" został opracowany przez Pana lek. wet. Wojciecha Trybowskiego syntetycznie i bez powtarzania informacji zawartych we wstępie. Doktorant sformułował podstawowy cel badawczy, którym była ocena skutków jednoczesnego doustnego podawania niskich stężeń toksyn T-2 i ZEN przez okres 14, 28 i 42 dni na wybrane parametry układu immunologicznego obecnego w ścianie jelita biodrowego.
Autor w ramach realizowanych założeń zawarł również trzy cele szczegółowe, w postaci oceny przebiegu procesu kształtowania się u loszek tolerancji pokarmowej na podstawie analizy wybranych cytokin prozapalnych oraz przeciwzapalnych i regulatorowych oraz oceny odsetka wybranych subpopulacji limfocytów T, NK oraz B. Ponadto, Doktorant zaplanował również oznaczenie oddziaływania badanych mikotoksyn na wybrane mechanizmy odpowiedzi komórkowej związanej z limfocytami Tc (CD8+) i IFNγ oraz odpowiedź humoralną/regulatorową związaną z limfocytami B CD21+ (B2) i IL-4.

Oceniając metodykę badań wykorzystanych w dysertacji doktorskiej, którą Doktorant zamieścił na 5 stronach wydruku komputerowego, można przyjąć, że spełnia ona minimalne wymogi, umożliwiające powtórzenie zaplanowanych i opisanych przez Autora badań.
W pierwszej części Doktorant przedstawia szczegółowy opis schematu doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt, ich liczby, pochodzenia, a także zastosowane w eksperymencie procedury, w tym schemat ekspozycji loszek na testowane toksyny T-2 i ZEN. Należy zaznaczyć, że na przeprowadzenie eksperymentu lek. wet. Wojciech Trybowski uzyskał zgodę Lokalnej komisji Bioetycznej do spraw Badań nad Zwierzętami w 2008r.

W dalszej części rozdziału Kandydat prezentuje szczegółowy opis procedur pozyskiwania próbek od świń w postaci fragmentów ściany jelita biodrowego, a także opracowane na potrzeby realizacji pracy doktorskiej metody badań, w których zastosował m.in. techniki oznaczania poziomu białka całkowitego oraz wybranych cytokin przy użyciu testów ELISA, a także wybranych populacji limfocytów T i B z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.

Opis adekwatnej do zakresu prowadzonych badań metodyki utwierdza mnie w przekonaniu, że Doktorant opanował wykorzystywany w pracy warsztat badawczy, na co wskazuje opis technik pozyskiwania i analizy badanego materiału. Prezentacja zastosowanych technik nie budzi zastrzeżeń, a forma przedstawienia umożliwia ich powtórzenie oraz konfrontację z wynikami uzyskanymi przez innych autorów.

Rozdział „Wyniki" został opisany przez Doktoranta na 13,5 stronach wydruku komputerowego. W prezentowanych rezultatach Autor wykorzystał zarówno formę graficzną jak też opisową, co z pewnością przyczyniło się do podniesienia wartości merytorycznej i edycyjnej pracy.

W pierwszej części rozdziału Kandydat przedstawił wykazaną dynamikę w stężeniach badanych cytokin prozapalnych IFNγ, IL-1β, IL-2 oraz IL-12. Doktorant wykazał istotny wzrost określanych cytokin u loszek eksponowanych na stosowane mikotoksyny w poszczególnych dniach eksperymentu, co jest jak wskazuje potwierdzeniem prozapalnego oddziaływania toksyn grzybiczych na organizm zwierząt. Z kolei w przypadku oznaczania wpływu zastosowanych mikotoksyn na produkcję i uwalnianie cytokin przeciwzapalnych i regulatorowych (IL-4, IL-10, TGF-β) Kandydat obserwował niewielkie obniżanie stężeń, które pomimo różnic w wartościach bezwzględnych w większości nie były istotne statystycznie, w porównaniu do kontroli. Jedynie w przypadku TGF-β uzyskana w 42 doświadczenia koncentracja była istotna statystycznie w odniesieniu do wartości zmierzonej a grupie kontrolnej. W dalszej części pracy Doktorant prezentuje wyniki badań poszczególnych subpopulacji limfocytów T oraz B wykazując brak różnic istotnych statystycznie w kształtowaniu się średniego odsetka populacji limfocytów TCD2+ oraz istotne w porównaniu do kontroli obniżenie odsetka limfocytów ThCD4+ od 28 dnia eksperymentu. Podobny brak różnic istotnych statystycznie w porównaniu do kontroli w uzyskiwanym odsetku populacji komórek w poszczególnych dniach eksperymentu Doktorant uzyskiwał w przypadku limfocytów TCD4+CD8+, TCRγδ, a także limfocytów śródbłonkowych TCRαβ. W przypadku komórek NK uzyskane wartości odsetka populacji były istotnie wyższe w porównaniu do kontroli w 42 dniu ekspozycji loszek na działanie badanych toksyn. Celem zwiększenia atrakcyjności odbioru uzyskanych rezultatów, Doktorant w rozdziale wyniki poza wykresami słupkowymi przedstawił również rycinę prezentującą „reprezentatywne wykresy dot-plots badanych subpopulacji limfocytów".

Uzyskane w badaniach rezultaty cechuje nie tylko aspekt naukowy ale także aplikacyjny, polegający m.in. na możliwości potencjalnego wykorzystania uzyskanych wyników w kontroli zdrowotności loszek podczas odchowu. Przedstawiona do oceny dysertacja doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego jak również oryginalne uzasadnienie w zakresie możliwości zastosowania uzyskanych wyników badań w sektorze gospodarczym i społecznym. Potwierdza to przesłankę art. 187 Ustawy z dn. 20 lipca 2018r Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Oceniana dysertacja doktorska prezentuje również ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w reprezentowanej przez Niego dziedzinie nauk weterynaryjnych oraz wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i jest potwierdzeniem kolejnej przesłanki cytowanej powyżej ustawy.

W rozdziale „Dyskusja" przedstawionym na 9 stronach wydruku komputerowego Doktorant prezentuje poprawną analizę uzyskanych w badaniach wyników w konfrontacji z danymi cytowanego piśmiennictwa. Autor ustosunkowuje się do analizowanych wyników i w sposób czytelny komentuje własne osiągnięcia, przeprowadzając podsumowania i sugestie dotyczące aspektu zarówno naukowego, jak również aplikacyjnego prezentowanych wyników badań. Potwierdza to znajomość badanych zagadnień będących przedmiotem rozprawy doktorskiej oraz dojrzałość edytorską Pana lek. wet. Wojciecha Trybowskiego.

Doktorant na podstawie uzyskanych wyników sformułował 4 wnioski, w których wskazuje efekt oddziaływania zastosowanych dawek mikotoksyn zarówno na parametry immunologiczne związane z odpowiedzią komórkową oraz parametry prozapalne. Pierwszy wniosek jest trochę niezrozumiały i wymaga przeredagowania, zbyt dużo informacji o różnych dawkach w jednym bardzo długim zdaniu. W przypadku wniosku nr 4, Doktorant powinien się odnieść w jaki sposób zastosowane dawki wpływają negatywnie na układ immunologiczny końcowego odcinka jelita biodrowego u loszek. Brakuje również wniosku odnoszącego się do analizy cytokin pro i przeciwzapalnych oraz regulatorowych, które Doktorant oceniał.

Rozdział „Piśmiennictwo" został zaprezentowany na 13 stronach wydruku komputerowego i zawiera 154 pozycji piśmiennictwa zgodnego z obszarem naukowym będącym przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej.

Z obowiązku Recenzenta, w przedstawionej recenzji dodałam również inne komentarze, które przyczynią się do podniesienia wartości edytorskiej ocenianej dysertacji doktorskiej Pana lek. wet. Wojciecha Trybowskiego

- W rozdziale „Cel pracy" Doktorant prezentuje cel główny, w którym zaplanował ocenę skutków jednoczesnego doustnego podawania niskich stężeń badanych toksyn T-2 i ZEN w różnych okresach na cyt.:„…wybrane parametry układu immunologicznego obecnego w ścianie jelita biodrowego". W tym miejscu należałoby dodać, że chodzi o jelito biodrowe świni, ponieważ jest to cel podstawowy, a więc taka informacja dotycząca gatunku zwierzęcia jest niezbędna.
- Rozdział „Materiał i metody" pkt 4.1 Uzyskana zgoda komisji etycznej na przeprowadzenie doświadczenia została przyznana w 2008r. Proszę uzupełnić kiedy zostało przeprowadzone samo doświadczenie, uwzględniając fakt, że każda zgoda na przeprowadzenie doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt ma termin ważności do 5 lat. Ponadto sugeruję również uzupełnić w opisie doświadczenia warunki utrzymania loszek wg określonych przepisów prawnych, dlatego tak istotne jest również podanie terminu doświadczenia.
- Część rozdziału, w którym Doktorant prezentuje opis zastosowanych w badaniach metod w mojej ocenie powinna zostać częściowo przeredagowana. Na przykład dobrze byłoby połączyć podrozdział 4.2 i 4.3, ponieważ dotyczą one opracowania materiału pobranego od zwierząt celem dalszych analiz. Natomiast dobrze byłoby wyodrębnić podrozdział dotyczący opisu metody oznaczania białka całkowitego (np. 4.3 lub 4.2.1.) w badanych homogenatach próbek oraz podrozdział opisujący metody oznaczania stężeń badanych cytokin (4.4. lub 4.2.2.).
- W opisie metodyki oznaczania koncentracji badanych cytokin Doktorant nie przedstawił co było oznaczane metodą spektofotometryczną przy użyciu spektofotometru płytkowego TECAN. Jeśli chodzi o odczyt wyników uzyskanych w komercyjnych testach ELISA dla badanych cytokin to należałoby to zdanie przeredagować, tak aby zawierało powyższą informację.

- W przypadku Tabeli nr 4, 5 i 6- Doktorant pod każdą z tych tabel zamieszcza informację, że cyt.: ”Wszystkie odczynniki dostarczone pochodziły z Pharmingen, San Diego, CA, USA”. W mojej ocenie wystarczy napisać takie zdanie tylko raz na dole strony dodając jako odniesienie do wszystkich tabel.
- Rozdział „Wyniki” zawiera w wielu fragmentach krótkie opisy metodyczne w zakresie uzyskanych wyników, które w wielu miejscach są mało czytelne i wymagają przeredagowania dotyczy to m.in. podrozdziału 5.2.2., 5.3, 5.3.2, 5.33, 5.3.5, 5.3.7, 5.4 oraz 5.4.2.
- Ponadto sugeruję aby przy opracowywaniu pracy do druku Doktorant zamieścił odrębny suplement w postaci wszystkich wykresów dot-plot z poszczególnych dni dotyczących analizy cytometrycznej badanych populacji komórek. Z pewnością podniesie to wartość naukową ocenianej pracy.
- W rozdziale „Dyskusja” Autor odnosi się m.in. do wpływu badanych mikotoksyn na rozwój parametrów stresu oksydacyjnego (str.57), których to badań w przedstawionej dysertacji nie prowadził. Sugerowałabym skupić się bardziej na analizie parametrów immunologicznych, które były przez Doktoranta oceniane i poszerzyć ewentualnie o analizę wzajemnych korelacji pomiędzy badanymi wskaźnikami.
- W ocenianej pracy brakuje również części zawierającej spis tabel i rycin przedstawionych w dysertacji doktorskiej.

Przedstawione uwagi i sugestie mają głównie charakter redakcyjny i nie wpływają na wartość merytoryczną przedstawionej do oceny pracy doktorskiej.

Reasumując stwierdzam, że przedłożona do recenzji dysertacja doktorska Pana lek. wet. Wojciecha Trybowskiego odpowiada warunkom określonym w art. 187 Ustawy z dnia 3 lipca 2018r z późn. zm., co upoważnia mnie do przedłożenia wniosku Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Signed by /
Podpisano przez:

Renata Anna
Urban-Chmiel

Date / Data:
2024-03-01 10:49