Dr hab. Kazimierz Obremski prof. UWM
Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn 06.12.2023

Opinia o pracy doktorskiej 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"

Rozprawa doktorska lek. wet. Wojciecha Trybowskiego jest monografią naukową mającą układ zgodny z wymaganiami stawianymi tego rodzaju opracowaniom tj. stronę tytułową, streszczenie, spis treści, wstęp, rozdziały merytoryczne, zakończenie i bibliografię.

Głównym celem przeprowadzonych badań była ocena skutków jednoczesnego doustnego podawania niskich stężeń toksyny T-2 i zearalenonu (ZEN) przez okres 14, 28 i 42 dni na wybrane parametry układu immunologicznego obecnego w ścianie jelita biodrowego. Wysokość narażenia na toksynę T-2 ustalono na poziomie 14,5 μg/kg mc/dzień, co odpowiadało wartości 50 % dawki LOAEL, natomiast dla ZEN było to 10 μg/kg m.c./dzień, co było równe dawce NOAEL. Celami szczegółowymi badania była:

1) Ocena przebiegu procesu kształtowania się u loszek tolerancji pokarmowej poprzez pomiar stężenia wybranych cytokin prozapalnych (IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-12/23p40) oraz przeciwzapalnych i regulatorowych (IL-4, IL-10, TGFβ).
2) Ocena przebiegu procesu kształtowania się u loszek tolerancji pokarmowej poprzez określenie odsetka wybranych subpopulacji limfocytów: T CD2+, T CD4+, T CD8+, T CD4+CD8+, Tγδ, TCR αß+, NK oraz B CD5+(B1) i B CD21+(B2).
3) Ocena wpływu toksyny T-2 i ZEN na odpowiedź komórkową związaną z limfocytami T CD8+ (Tc) i IFN-γ i odpowiedź humoralną/regulatorową związaną z limfocytami B CD21+ (B2) oraz IL-4.

Mikotoksyny to niskocząsteczkowe produkty przemiany materii grzybów nitkowatych głównie z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*, określane również jako metabolity wtórne lub drugorzędowe przemiany materii pleśni. Mikotoksyny zasadniczo nie są niezbędne dla produkującej je pleśni, natomiast ich działanie toksyczne dotyka zarówno człowieka, zwierząt, roślin czy drobnoustrojów.

Toksyna T-2 należy do trichotecenów (TCH), które są jedną z najliczniejszych grup mikotoksyn wytwarzanych przez pleśnie *Fusarium* spp. Najważniejszą drogą narażenia zwierząt na toksynę T-2 jest przewód pokarmowy. Po wniknięciu do organizmu toksyna T-2 działa szczególnie destruktywnie na grupę komórek proliferujących, co jest szczególnie widoczne w nabłonku jelitowym, grasicy, śledzionie, węzłach chłonnych, czy szpiku kostnym. Najbardziej widocznym efektem narażenia zwierząt na TCH jest spadek apetytu i zaburzenie procesów wchłaniana jelitowego, pokarmu, czego skutkiem są obniżone przyrosty masy ciała.

Toksyna T-2 wywiera wpływ na makrofagi, które przy jednoczesnej stymulacji LPS obniżały produkcję takich cytokin, jak IL-6, TNFα, czy IL-1β. W zależności od wysokości narażenia na toksynę T-2 może dochodzić do hamowania wydzielania IL-1β, ale wzrostu syntezy i wydzielania IL-12 i TNFα. Obserwuje się wpływ toksyny T-2 na zdolności proliferacyjne limfocytów T i B.

ZEN jest fuzariotoksyną należącą do klasy ksenoestrogenów. Z powodu na jego strukturalne podobieństwo do 17ß-estradiolu, może łączyć się z receptorami estrogenowymi. Skutkiem takiej interakcji są u ssaków zaburzenia rozrodu, co szczególnie dotyczy samic świń. Biotransformacja ZEN odbywa się głównie w enterocytach błony śluzowej jelita i w wątrobie i prowadzi do powstania dwóch metabolitów, α-zearalenolu (α-ZEL) i ß-zearalenolu (ß-ZEL), które w dalszej kolejności mogą redukować się do α-zearalanolu (α-ZAL) i ß-zearalanolu (ß-ZAL). Powstałe metabolity, szczególnie α-ZEL, charakteryzują się wyższą estrogennością niż związek macierzysty. ZEN w zależności od gatunku zwierzęcia, płci, czy wysokości narażenia, może wpływać na prawidłową strukturę anatomiczną jelita tj. zmieniać grubość błony śluzowej, wysokość kosmków, czy liczbę komórek kubkowych. Ekspozycja na ZEN wiąże się z upośledzeniem żywotności komórek, apoptozą i martwicą różnych narządów, zmianą odsetka subpopulacji limfocytów T i B w jelicie cienkim oraz profilu wydzielanych cytokin m.in. podwyższeniem stężenia IL-12/23 40p i IL-1β w jelicie krętym oraz obniżeniu funkcji barierowych błony śluzowej jelita.

Lek. wet. Wojciech Trybowski słusznie zauważył, że prowadzone przez lata badania pozwoliły scharakteryzować skutki narażenia zwierząt gospodarskich na wysokie stężenia toksyny T-2 i ZEN. Jednak w literaturze w dalszym ciągu mamy niedosyt prac poświęconych skutkom oddziaływania tych mikotoksyn na zwierzęta na niskim poziomie. Jako lekarz praktyk obserwował występowanie szeregu objawów klinicznych u zwierząt, świadczących o narażeniu na toksynę T-2 i zearalenon przy jednoczesnym niskim ich stężeniu w skarmianej paszy. Mając to na uwadze podjął się oceny skutków jednoczesnego doustnego podawania niskich stężeń toksyny T-2 i ZEN na funkcjonowanie układu immunologicznego obejmującego jelito.

Materiałem do badań, które prowadził Doktorant w kierunku oceny przebiegu procesu kształtowania się u loszek tolerancji pokarmowej, odpowiedzi komórkowej związananej z limfocytami T CD8+ (Tc) i IFN-γ) oraz odpowiedzi humoralnej/regulatorowej związanej z limfocytami B CD21+ (B2) oraz IL-4 było jelito biodrowe świń pochodzące z realizowanego wcześniej w Katedrze Prewencji i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki nr N N308 237936 pt. „Badania nad oddziaływaniem toksyny T-2 i zearalenonu na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej jelita świni."

Wyniki badań przedstawionych przez lek. wet. Wojciecha Trybowskiego dostarczają dowodów na to, że toksyna T-2 w dawce 14,5 μg/kg mc/dzień, stanowiąca 50 % dawki LOAEL i ZEN w dawce 10 μg/kg m.c./dzień, równej dawce NOAEL, gdy podawane są loszkom jednocześnie przez okres co najmniej 14 dni wpływają modulująco na parametry układu immunologicznego jelita biodrowego świni.

Przedstawiona rozprawa doktorska lek. wet. Wojciecha Trybowskiego jest istotnym wkładem poznawczym w zakresie badań nad odpowiedzią zapalną przewodu pokarmowego w kontekście narażenia na toksynę T-2 i ZEN. Ocenia się, że te badania nadal są ograniczone. Nieprawidłowa odpowiedź immunologiczna będąca skutkiem narażenia na mikotoksyny od dawna jest uważana jest za jeden z czynników etiologicznych rozwoju przewlekłych chorób zapalnych, w tym nieswoistych zapaleń jelit u człowieka lub dalszego ch pogorszania.

Rozprawa doktorska lek. wet. Wojciecha Trybowskiego ma również aspekt praktyczny, ponieważ dostarcza przekonujących argumentów w toczącej się dyskusji nad obniżeniem dopuszczalnych dawek mikotoksyn w paszach.

W mojej ocenie praca doktorska lek. wet. Wojciecha Trybowskiego jest przygotowana poprawnie, w oparciu o prawidłowo zaplanowane i przeprowadzone doświadczenia, a uzyskane wyniki zostały dobrze opracowane bioinformatycznie, statystycznie i poprawnie zinterpretowane. Przedstawiona rozprawa doktorska w istotny sposób powiększa aktualny stan wiedzy na temat oddziaływania toksyny T-2 i zearalenonu szczególnie na układ immunologiczny związany z jelitem. Praca jest w pełni oryginalna i nie narusza praw osób trzecich.

Uważam, że przygotowana przez lek. wet. Wojciecha Trybowskiego praca doktorska jest wynikiem samodzielnej i rygorystycznej pracy i świadczy o jego umiejętnościach samodzielnego prowadzenia badań naukowych od konceptualizacji do przedstawienia wyników badań i dyskusji, spełniając tym samym wymogi stawiane osobom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorant nie jest pracownikiem naukowym.

Przedstawiona rozprawa doktorska potwierdza, że lek. wet. Wojciech Trybowski poosiada ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie weterynaria oraz posiada umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

We wniosku końcowym stwierdzam, że rozprawa doktorska 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” spełnia wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z dnia 16.04.2004 r. z późn. zm.) oraz Rozporządzenia Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz. U. Nr 204, poz. 1200).

Dr hab. Kazimierz Obremski prof. UWM