dr hab. Marianna Szczypka, prof. uczelni
Katedra Farmakologii i Toksykologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 26.02.2026 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Wróbel

pt. „Przeciwwirusowa i immunomodulująca aktywność bydlęcej laktoferyny wobec *Enterovirus eibovi* – badania *in vitro*".

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską wykonano w Katedrze Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, pod kierunkiem Pani promotor dr hab. Joanny Małaczewskiej, prof. UWM oraz Pani promotor pomocniczej dr inż. Edyty Kaczorek-Łukowskiej. Podstawę formalną wykonania niniejszej recenzji stanowi Uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 12 grudnia 2025 r.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma formę zbioru opublikowanych dwóch artykułów naukowych, spójnych tematycznie. W obydwu publikacjach mgr inż. Małgorzata Wróbel jest pierwszą autorką oraz autorką korespondencyjną. Sumaryczny *impact factor* (IF) publikacji wynosi 9, a suma punktów zgodnie z wykazem czasopism ministra właściwego ds. nauki wynosi 340.

Cykl publikacji:

1. Wróbel, M., Małaczewska, J., & Kaczorek-Łukowska, E. (2022). Antiviral effect of bovine lactoferrin against *Enterovirus E.* *Molecules,* *27*(17), 5569. https://doi.org/10.3390/molecules27175569. (IF: 4,6; punkty: 140)

Wkład merytoryczny Doktorantki wskazany w oświadczeniu obejmuje: opracowanie koncepcji badań, opracowanie metod, przeprowadzenie analiz laboratoryjnych, opracowanie i interpretację wyników i ich wizualizację, przygotowanie manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.

2. Wróbel, M., Kaczorek-Łukowska, E., Barański, W., & Małaczewska, J. (2025). Bovine lactoferrin modulates the in vitro activity of bovine peripheral blood leukocytes infected with

Enterovirus eibovi. *Journal of Dairy Science*. https://doi.org/10.3168/jds.2025- 27150 (IF: 4,4; punkty: 200)

Kopia tej publikacja zawarta w rozprawie doktorskiej opatrzona jest adnotacją „*Article in press-uncorrected proof*". Obecnie praca jest opublikowana, jej dane bibliograficzne: J Dairy Sci. 2026, 109(1), 671-689. doi: 10.3168/jds.2025-27150.

Wkład merytoryczny Doktorantki wskazany w oświadczeniu obejmuje: opracowanie koncepcji badań i przeprowadzenie eksperymentów, statystyczną i wizualną analizę wyników, przygotowanie manuskryptu oraz odpowiedzi na recenzje.

Do cyklu publikacji zostały dołączone streszczenia w języku polskim i angielskim, autoreferat, oświadczenia Pani promotor, Pani promotor pomocniczej oraz Doktorantki dotyczące rozprawy doktorskiej, a także oświadczenia Doktorantki i współautorów dotyczące publikacji, które uwzględniają opisowy udział poszczególnych osób w przeprowadzonych badaniach oraz w przygotowaniu artykułów.

Choroby wirusowe zwierząt stanowią aktualny i istotny problem terapeutyczny, z uwagi na ograniczenie lub brak możliwości stosowania leków przeciwwirusowych. Od 9 lutego 2023 r. obowiązuje Rozporządzenie Wykonawcze Komisji (UE) 2022/1255 z dnia 19 lipca 2022 r. określające środki przeciwdrobnoustrojowe lub grupy środków przeciwdrobnoustrojowych zarezerwowane do leczenia niektórych zakażeń u ludzi zgodnie z Rozporządzeniem Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/6. To rozporządzenie wprowadziło zakaz stosowania u zwierząt niektórych leków przeciwdrobnoustrojowych, w tym leków przeciwwirusowych, ze względu na interes zdrowia publicznego. W przypadku bydła i innych zwierząt, których tkanki lub produkty mogą być przeznaczone do spożycia przez ludzi, sytuacja jest jeszcze bardziej skomplikowana, ze względu na konieczność przestrzegania regulacji prawnych związanych z bezpieczeństwem człowieka jako konsumenta produktów pochodzenia zwierzęcego. Stąd potrzeba poszukiwania alternatywnych rozwiązań w tym zakresie. Laktoferyna, wielofunkcyjna glikoproteina z grupy transferyn, obecna w płynach ustrojowych, wydzielinach i wydalinach organizmu zwierząt, jest jednym z elementów obrony nieswoistej. Wykazuje m.in. działanie przeciwdrobnoustrojowe i immunomodulujące. Ze względu na swoje właściwości laktoferyna jest obiecującym celem badań w kontekście infekcji wirusowych. Zakażenia *Enterovirus eibovi* (EV-E) u bydła zwykle mają przebieg subkliniczny, jednak potencjał chorobotwórczy wirusa może mieć znaczenie u zwierząt młodych czy z obniżoną odpornością.

W tym kontekście, wybór tematu badań jest aktualny, uzasadniony i bardzo interesujący z naukowego punktu widzenia, równocześnie zawierając w sobie istotny potencjał praktyczny.

Rozprawę doktorską stanowi cykl dwóch publikacji. Pierwsza z nich dotyczy oceny przeciwwirusowego działania bydlęcej laktoferyny (bLF) przeciwko *Enterovirus eibovi*. Druga publikacja dotyczy oceny immunomodulującego działania bLF wobec jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) bydła zakażonych EV-E.

We wstępie, w obydwu publikacjach, Doktorantka umiejętnie wprowadza w temat badań, równocześnie uzasadniając ich podjęcie, a także wskazując cel badań. We wstępie pierwszej publikacji Doktorantka dokonuje charakterystyki badanego wirusa, w tym jego potencjału chorobotwórczego. Wskazuje również na ważny aspekt związany trudnościami terapeutycznymi infekcji wirusowych u zwierząt. Doktorantka syntetycznie charakteryzuje bLF, ze szczególnym uwzględnieniem jej działania przeciwwirusowego. We wstępie drugiej publikacji Doktorantka scharakteryzowała badany wirus, uwzględniając jego wpływ oraz innych enterowirusów na układ odpornościowy. W odniesieniu do bLF, Doktorantka skupiła się na aspektach związanych z wpływem immunomodulującym. Uwzględniła również aspekty działania przeciwwirusowego bLF.

Zatem, wstępy w ww. publikacjach to umiejętne, merytoryczne wprowadzenie w temat badań oraz ich uzasadnienie, zarówno od strony wyboru do badań laktoferyny, jak i wirusa. Podjęty przez Doktorantkę problem naukowy jest prawidłowo sformułowany i bardzo aktualny. Ta część w publikacjach świadczy o dogłębnym przemyśleniu tematu przez Doktorantkę oraz o jej bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym.

Do realizacji celów badań została dobrana odpowiednia metodyka (badania przeprowadzono w warunkach *in vitro*).

Oceny przeciwwirusowego działania bLF (pierwsza publikacja) dokonano poprzez: przeprowadzenie testu hamowania efektu cytopatycznego; określenie działania wirusobójczego (test neutralizacji wirusa); ustalenie etapu cyklu replikacyjnego, w którym działa bLF (test redukcji miana wirusa). W badaniach wykorzystano ustaloną linię komórkową nerki bydła Madin-Darby (MDBK). Oznaczono również wewnątrzkomórkowe wirusowe RNA metodą ilościowego PCR z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR).

Oceny immunomodulującego działania bLF wobec PBMC bydła zakażonych EV-E (druga publikacja) dokonano poprzez ocenę wpływu bLF na: żywotność komórek; aktywność proliferacyjną komórek niezakażonych oraz zakażonych EV-E stymulowanych mitogenami

(konkanawaliną A – ConA lub lipopolisacharydem z *E. coli* – LPS); aktywność komórek fagocytujących niezakażonych oraz zakażonych EV-E; skład i proporcje subpopulacji limfocytów ($CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+/CD8^+$, $WC1^+$, $CD21^+$); ekspresję genów cytokin (*IL2*, *IL10*, *IFNα*, *IFNβ*, *IFNγ*, *IL1β*, *TNFα*, *IL6*) i czynnika transkrypcyjnego *NFκB*. Do oceny żywotności PBMC, aktywności proliferacyjnej limfocytów oraz aktywności komórek fagocytujących użyto testów spektrofotometrycznych: testu redukcji MTT, testu potencjalnej aktywności bójczej – PKA, testu aktywności wybuchu tlenowego – RBA. Skład i proporcje subpopulacji limfocytów zostały oznaczone przy użyciu przeciwciał monoklonalnych metodą cytometrii przepływowej. Ekspresję genów cytokin oznaczono metodą RT-qPCR. Wpływ bLF na immunofenotypowanie limfocytów oraz na ekspresję genów był oznaczany zarówno dla komórek niestymulowanych, jak i stymulowanych mitogenami.

Przyjęty schemat doświadczeń został bardzo dobrze zaplanowany, a metodyka badań umiejętnie dobrana pod kątem realizacji założonych celów naukowych. Doktorantka wykorzystała w swoich badaniach szeroki wachlarz metod, w tym nowoczesnych. Tak szeroki zakres badań wymaga starannego zaplanowania i wykonania części eksperymentalnej, co potwierdza biegłość Doktorantki w posługiwaniu się różnymi metodami badawczymi, a także świadczy o przygotowaniu Doktorantki do samodzielnego prowadzenia badań naukowych również od strony organizacyjnej.

Odpowiednio zaplanowane i przeprowadzone doświadczenia pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych wyników badań. Wyniki zostały poddane odpowiedniej analizie statystycznej metodą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). W drugiej publikacji dodatkowo oceniono również korelacje między ekspresją genów a częstością występowania poszczególnych subpopulacji limfocytów, co jest bardzo interesującym uzupełnieniem analizy wyników. Wyniki badań zostały umiejętnie zinterpretowane i zaprezentowane w bardzo czytelny i staranny sposób, co nie jest łatwe przy tak dużej liczbie danych. W drugiej publikacji Doktorantka dodatkowo zamieściła tabelę (tab. 4), która jest podsumowaniem działania bLF na aktywność PBMC, co jest bardzo pomocne przy zapoznawaniu się z wynikami badań.

W częściach publikacji, które stanowią „Dyskusję" Doktorantka umiejętnie konfrontuje wyniki swoich badań z wynikami innych autorów. Temat badań, zarówno w aspekcie działania przeciwwirusowego, jak i immunomodulującego, jest skomplikowany i niełatwy do interpretacji. W takiej sytuacji prowadzenie dyskusji jest szczególnie trudnym

wyzwaniem, z którym Doktorantka poradziła sobie bardzo dobrze. Dyskusje prowadzone sa w sposób logiczny i dojrzały. Sposób ich prowadzenia świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki, jej dużej wiedzy teoretycznej.

Zarówno w dyskusjach, jak i we wstępach publikacji, Doktorantka odnosi się do obszernego, właściwie dobranego piśmiennictwa, związanego z problematyką badań. Doktorantka odnosi się do najnowszych publikacji, ale również do prac starszych. Przy publikowaniu badań czasem pojawia się nacisk na to, aby cytowane publikacje pochodziły z ostatnich kilku-kilkunastu lat. Prowadzi to do pomijania tekstów źródłowych, co według mnie, nie jest rzetelnym podejściem naukowym. Natomiast w recenzowanej pracy Doktorantka odnosi się nie tylko do najnowszych publikacji, ale również do starszych, źródłowych artykułów, co potwierdza jej rzetelność naukową.

W oparciu o uzyskane wyniki badań Doktorantka sformułowała uzasadnione wnioski. Najważniejsze z nich to stwierdzenie, że bLF hamuje replikację EV-E na wczesnym etapie (adsorbcja) jak i późniejszych etapach infekcji i może dawać pewien stopień ochrony przed EV-E (publikacja pierwsza) oraz wykazanie różnic w immunomodulującym działaniu pomiędzy niskimi a wyższymi stężeniami bLF (publikacja druga). Niskie stężenia, odpowiadające fizjologicznym, zwiększają ekspresję interferonów typu I i *IL2*, co sugeruje korzystną rolę bLF we wczesnej odpowiedzi przeciwwirusowej. Wyższe stężenia bLF zwiększają ekspresję *IL10*, chroniąc komórki immunologiczne przed nadmierną stymulacją. Zatem założone cele pracy zostały osiągnięte. Wnioski z przeprowadzonych badań niosą ze sobą nie tylko dużą wartość poznawczą, ale też znaczny potencjał praktyczny. Ponadto, badania te mogą stanowić punkt wyjścia do kolejnych planów naukowych, na co również Doktorantka zwraca uwagę w publikacjach.

Ze względu na to, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, którą stanowi cykl publikacji, została bardzo starannie opracowana oraz że manuskrypty podlegały już merytorycznym recenzjom, po zapoznaniu się z pracą przedstawiam jedynie następujące komentarze/pytania odnoszące się do drugiej publikacji.

- W opisie wyników oraz w tab. 4 odnotowano spadek odsetka limfocytów $WC1^+$ po stymulacji ConA dla bLF w stężeniach 1 oraz 25 μg/ml. Tymczasem Fig. 6B wskazuje spadek odsetka limfocytów $WC1^+$ dla bLF w stężeniach 1 oraz 10 μg/ml. Zatem, czy poza stężeniem 1 μg/ml, spadek odsetka limfocytów $WC1^+$ odnotowano dla stężenia 10 czy 25 μg/ml?

- Fig. 7A oraz tab. 4 wskazują, że bLF w stężeniu 10 i 25 µg/ml zwiększa ekspresję *IFNα* w komórkach stymulowanych ConA. Natomiast w opisie wyników jest mowa o wzroście ekspresji *IFNβ*.
- W tab. 4 w odniesieniu do niestymulowanych komórek, wzrost ekspresji *IFNα* i *IFNβ* powinien być zaznaczony dla stężeń 1 i 2,5 µg/ml, a zaznaczono dla stężeń 2,5 i 5 µg/ml.
- Brak informacji o serotypie *E. coli*, z której pochodził zastosowany lipopolisacharyd (LPS).

Wyżej wymienione uwagi nie wpływają na bardzo wysoką ocenę pracy.

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie aktualnego i interesującego problemu naukowego, potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie weterynaria oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Doktorantka wykonała bardzo interesującą pracę badawczą, o dużej wartości merytorycznej. Wykazała bardzo dobrą znajomość metodyki badań oraz umiejętność ich zaplanowania i przeprowadzenia. Sformułowane wnioski posiadają istotne znaczenie naukowe oraz potencjał praktyczny.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Małgorzaty Wróbel pt. „Przeciwwirusowa i immunomodulująca aktywność bydlęcej laktoferyny wobec *Enterovirus eibovi* – badania *in vitro*" spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1–4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2024 poz. 1571 z późn. zm.) i może stanowić podstawę do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk weterynaryjnych w dyscyplinie weterynaria. Zatem, zwracam się z wnioskiem do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria UWM w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. Małgorzaty Wróbel do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Ze względu na oryginalność i aktualność tematu badawczego, bardzo szeroki zakres przeprowadzonych badań o wysokiej wartości naukowej, potwierdzonej publikacjami w czasopismach naukowych o bardzo wysokich wskaźnikach bibliometrycznych, zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej.

Marianna Szczypka

dr hab. n. wet. Marianna Szczypka, prof. uczelni