Warszawa, 11 lutego 2026 r.

prof. dr hab. Michał Czopowicz
Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej
Instytut Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Małgorzaty Wróbel

pod tytułem

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska powstała w Katedrze Mikrobiologii i Immunologii Klinicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod opieką promotor dr hab. Joanny Małaczewskiej, prof. UWM oraz 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.

Pracę doktorską mgr inż. Małgorzaty Wróbel stanowi zbiór dwóch oryginalnych artykułów naukowych przyjętych do druku w 2022 r. i 2025 r. w czasopiśmie Molecules, wydawnictwa Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI) oraz czasopiśmie Journal of Dairy Science, wydawany przez American Dairy Science Association:

1. Wróbel M, Małaczewska J, Kaczorek-Łukowska E. Antiviral Effect of Bovine Lactoferrin against Enterovirus E. Molecules. 2022;27(17):5569. doi: 10.3390/molecules27175569.

2. Wróbel M, Kaczorek-Łukowska E, Barański W, Małaczewska J. Bovine lactoferrin modulates the *in vitro* activity of bovine peripheral blood leukocytes infected with *Enterovirus eibovi*. J Dairy Sci. 2026 Jan;109(1):671-689. doi: 10.3168/jds.2025-27150. Epub 2025 Nov 7.

Sumaryczna punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego artykułów naukowych wchodzących w skład zbioru wynosi 340, a sumaryczny Impact factor wynosi 9.

Wymienione powyżej artykuły naukowe tworzą, w mojej opinii, cykl powiązanych tematycznie prac. Pierwszy artykuł opisuje badania Doktorantki i współautorów nad bezpośrednim działaniem przeciwwirusowym laktoferyny bydlęcej w odniesieniu do bydlęcego enterowirusa E (*Enterovirus eibovi*). Drugi artykuł przedstawia badania Doktorantki i współautorów nad wpływem laktoferyny bydlęcej na aktywność leukocytów krowich narażonych na zakażenie enterowirusem E. Oba artykuły prezentują badania przeprowadzone w warunkach laboratoryjnych (badania *in vitro*). Istnieje logiczne i spójne powiązanie między tematyką obu artykułów i wspólnie przedstawiają one szeroki obraz wpływu laktoferyny bydlęcej na enterowirusa E i roli jaką odgrywać może laktoferyna bydlęca w przebiegu zakażenia enterowirusem E u bydła.

Do wspomnianego powyżej zbioru dwóch publikacji dołączone jest streszczenie w języku polskim i angielskim oraz autoreferat w języku polskim. Do pracy doktorskiej załączone są również oświadczenia wszystkich współautorów artykułów wchodzących w skład cyklu prac precyzujące ich wkład w przeprowadzenie badań i powstanie publikacji. W obu artykułach naukowych Doktorantka jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym. Zgodnie z oświadczeniami załączonymi do pracy doktorskiej jej rola w przeprowadzaniu badań i powstaniu obu publikacji była kluczowa i obejmowała opracowanie koncepcji badań, przeprowadzenie doświadczeń, analizy statystycznej wyników oraz przygotowanie manuskryptów i odpowiedzi na recenzje.

Obie publikacje stanowiące pracę doktorską rozpoczynają się obszernymi wstępami prezentującymi stan obecnej wiedzy naukowej w zakresie trzech podstawowych zagadnień, na których osadzona jest praca doktorska. Po pierwsze, jest to charakterystyka enterowirusa E (*Enterovirus eibovi*) z uwzględnieniem jego budowy, właściwości biologicznych, występowania i sposobów szerzenia się zakażeń tym wirusem

oraz jego roli w medycynie i weterynarii, w szczególności potencjalnego znaczenia enterowirusa E jako jednego z czynników etiologicznych zespołu oddechowego bydła. Następnie, Doktorantka w sposób syntetyczny opisuje mechanizmy oddziaływania wirusa z układem odpornościowym gospodarza, odnosząc się niejednokrotnie do wyników badań nad innymi, spokrewnionymi członkami rodziny *Piconaviridae*. Wynika to z ograniczeń naszej dotychczasowej wiedzy naukowej na temat mechanizmów odporności w przebiegu zakażenia enterowirusem E u bydła i jest w pełni uzasadnione. Wreszcie, Doktorantka przechodzi do scharakteryzowania białka będącego głównym obiektem zainteresowania w rozprawie doktorskiej, czyli laktoferyny bydlęcej. W opisie poruszone są aspekty związane z właściwościami chemicznymi i występowaniem tego białka w organizmie zwierząt i ludzi. Jednak największy nacisk położony jest na działanie ochronne tego białka przed patogenami. Omówione są zarówno mechanizmy bezpośredniego działania przeciwdrobnoustrojowego laktoferyny bydlęcej, jak również jej wpływu na działanie układu odpornościowego jako pośredniego sposobu zabezpieczania przed zakażeniami i zwalczania toczących się już zakażeń. Biorąc pod uwagę ograniczenia długości tekstu jakie narzucają czasopisma naukowe, Doktorantka wykazała się ogromną wprawą w tworzeniu tekstów naukowych, łącząc zwięzłą formę opisu z odpowiednią ilością podstaw teoretycznych wspartych należycie dobraną, w zdecydowanej większości najnowszą, literaturą. Co więcej, Doktorantka uniknęła powtórzeń tych samych treści w obu wstępach do artykułów, sprawiając że każdy z nich wprowadza do tych zagadnień, które są istotą opisanych w dalszej części badań. Dalsze informacje teoretyczne dotyczące tematyki prac omówione są już w świetle uzyskanych przez Doktorantkę wyników, w dyskusjach obu artykułów. Szczególnie dyskusja artykułu 2 (Journal of Dairy Science) niesie ze sobą ogromny zasób wiedzy, w sposób ciekawy zestawiony i skonfrontowany z wynikami badań własnych. Dzięki temu rozprawa doktorska stanowi źródło najnowszej wiedzy niezbędnej do pełnego zrozumienia przyczyn dla których podjęto się przeprowadzenia badań, jak również do właściwego umiejscowienia uzyskanych przez Doktorantkę wyników w szerszym kontekście. Powyższe obserwacje pozwalają stwierdzić bez żadnych wątpliwości, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Małgorzaty Wróbel w pełni prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki.

W dalszych częściach pracy doktorskiej, Doktorantka praktycznie wykorzystała wiedzę z zakresu mikrobiologii, immunologii, patofizjologii i diagnostyki molekularnej do

zaprojektowania i przeprowadzenia doświadczeń laboratoryjnych, pozwalających osiągnąć dwa postawione w pracy doktorskiej cele. Pierwszym była ocena bezpośredniej aktywności przeciwwirusowej laktoferyny bydlęcej wobec enterowirusa E. Drugim była ocena immunomodulującego działania laktoferyny bydlęcej wobec komórek układu odpornościowego (komórek jednojądrzastych) pozyskanych z krwi obwodowej krów. Badania zaprojektowane zostały przez Doktorantkę w logiczny sposób, analizując stopniowo kolejne etapy aktywności wirusa oraz mechanizmy za pomocą, których mogą być one przerywane lub modulowane przez laktoferynę bydlęcą. Doktorantka wykorzystała różnorodne metody laboratoryjne, takie jak test neutralizacji wirusa, test hamowania efektu cytopatycznego, test redukcji miana wirusa, pomiar jakościowy i ilościowy wirusowego RNA oraz ekspresji genów dla szerokiego panelu cytokin metodami biologii molekularnej, testy żywotności i aktywności proliferacyjnej limfocytów, testy aktywności fagocytarnej monocytów i cytometrię przepływową. Zastosowanie tak szerokiego wachlarza metod było w pełni uzasadnione i pozwoliło na uchwycenie różnych aspektów wpływu laktoferyny bydlęcej na enterowirusa E i komórki układu odpornościowego. Trafność i dokładność przedstawienia wykorzystanych układów doświadczalnych i zastosowanych metod laboratoryjnych, wskazują na ogromną biegłość i rozbudowany warsztat naukowy jakim dysponuje Doktorantka. Z drugiej strony, zwięzłość z jaką doświadczenia i metody opisane zostały w artykułach naukowych, przy zachowaniu wszystkich istotnych elementów i takiego poziomu szczegółowości, który pozwala na odtworzenie doświadczeń przez innych naukowców, dowodzą umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Panią mgr inż. Małgorzatę Wróbel.

Doświadczenia przeprowadzone w ramach realizacji rozprawy doktorskiej charakteryzowały się oryginalnym układem i rozbudowanym zestawem metod badawczych. W połączeniu z odpowiednią analizą statystyczną wyników, doprowadziły one do uzyskania kompleksowego obrazu wpływu laktoferyny bydlęcej na enterowirusa E i zakażone nim komórki w warunkach *in vitro*. Po raz pierwszy uchwycono wielokierunkowość i złożoność działania ochronnego laktoferyny bydlęcej, wykazując że jej działanie przeciwwirusowe realizowane jest poprzez różne mechanizmy w zależności od jej stężenia. W wysokich stężeniach hamuje ona replikację enterowirusa E na różnych etapach zakażenia komórki, nie wiążąc się jednak bezpośrednio z cząstkami samego wirusa ani z wykorzystywanymi przez niego receptorami komórkowymi. W

fizjologicznych stężeniach stymuluje komórki układu odpornościowego do aktywnej odpowiedzi immunologicznej, ale przy wzroście stężenia wywiera działanie immunomodulujące, ograniczając reakcję zapalną, chroniąc w ten sposób tkanki i narządy przed potencjalną reakcją autoimmunologiczną. Co ciekawe, to najmniej znana subpopulacja limfocytów T - limfocyty $WC1^+$ - okazała się być jednym z głównych efektorów działania laktoferyny bydlęcej. Docenienia wymaga również krytycyzm w ocenie uzyskanych wyników, wyrażający się zwróceniem uwagi na ograniczenia w możliwości ogólnoustrojowego zastosowania laktoferyny bydlęcej oraz duża dbałością o to, aby nie ekstrapolować nadmiernie obserwacji poczynionych w badaniach *in vitro* na procesy zachodzące wewnątrz organizmu krów, a tym bardziej innych gatunków zwierząt bądź ludzi. Tego rodzaju próby translacji wyników są obecnie w medycynie weterynaryjnej nierzadko spotykane, więc tym bardziej podkreślić należy rozsądny umiar Doktorantki w wyciąganiu wniosków. Problemy naukowe, z którymi Pani mgr inż. Małgorzata Wróbel zdecydowała się zmierzyć w swej pracy doktorskiej, zostały przez nią rozwiązane w sposób oryginalny, twórczy i bardzo praktyczny, dostarczając użytecznej wiedzy wypełniającej istniejące dotychczas luki.

Obie prace stanowiące rozprawę doktorską opublikowane zostały w czasopismach naukowych o wysokich wskaźnikach bibliometrycznych (140 i 200 punktów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, współczynnik wpływu obu powyżej 4). Co z tym związane, zostały one z pewnością poddane gruntownym recenzjom, które doprowadziły do wyeliminowania większości ewentualnych mankamentów. Stąd niewielka liczba czynionych w mojej recenzji uwag krytycznych. Z pewnością wadą przeprowadzonych badań jest mała liczebność analizowanych grup (liczba replikacji) wynosząca trzy w każdej grupie badanej. Moc analiz statystycznych przeprowadzonych na tak nielicznych grupach jest zwykle ograniczona. Moją uwagę zwróciło również zastosowanie średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego do opisu uzyskanych wyników oraz parametrycznych testów statystycznych (analiza wariancji) do ich analizy. W przypadku mało licznych grup, podejście takie powinno zostać poprzedzone badaniem normalności rozkładu analizowanych zmiennych. Co ciekawe, do analizy korelacji wybrana została, znacznie odporniejsza na odchylenia od normalności rozkładu zmiennych, metoda nieparametryczna (współczynnik korelacji rang Spearmana), chociaż liczebność analizowanej grupy była wyższa (n=7; artykuł 2). W opisie metod

statystycznych w artykule 1 powinien zostać podany poziom istotności statystycznej, który zastosowano w celu interpretacji wyników testów statystycznych.

W pierwszym akapicie dyskusji artykułu nr 1, Doktorantka wspomina o wstępnych badaniach nad lizozymem i naturalnym antybiotykiem – nizyną. Czy wiadomo, dlaczego to właśnie laktoferyna okazała się jedyną skuteczną substancją spośród trzech badanych?

Na podkreślenie zasługuje obszerny autoreferat sporządzony przez Doktorantkę. W przystępny i ciekawy sposób przeprowadza on czytelnika przez wszelkie meandry rozprawy doktorskiej. Bez wątpienia stanowi on użyteczne uzupełnienie rozprawy doktorskiej i sam jako taki może stanowić cenne źródło wiedzy.

Uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Małgorzaty Wróbel prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w zakresie nauk weterynaryjnych, wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę oraz stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a więc spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami). Wnioskuję zatem do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie do publicznej obrony rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Małgorzaty Wróbel. Jednocześnie zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej nagrodą określoną przepisami obowiązującymi na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie. Wniosek swój motywuję bardzo wysoką jakością artykułów naukowych tworzących rozprawę, co zostało potwierdzone ich opublikowaniem w szanowanych czasopismach mogących poszczycić się najwyższymi punktacjami ministerialnymi oraz bardzo wysokim współczynnikiem wpływu.

Michał Czopowicz