INSTYTUT BIOLOGII
UNIWERSYTETU SZCZECIŃSKIEGO

Dr hab. Beata Tokarz-Deptuła, prof. US
Instytut Biologii
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych
Uniwersytet Szczeciński

Szczecin, 28.02.2026r

Recenzja rozprawy doktorskiej
Pani mgr inż. Małgorzaty Wróbel
pt.: „Przeciwwirusowa i immunomodulująca aktywność laktoferyny wobec *Enterovirus eibovi* – badania *in vitro*"

Rozprawa doktorska, której autorką jest mgr inż. Małgorzata Wróbel, złożona została celem uzyskania stopnia doktora w dziedzinie Nauk weterynaryjnych, w dyscyplinie Weterynaria. Tematyka badań opisanych w tej dysertacji dotyczy aktywności bydlęcej laktoferyny (bLF) w badaniach *in vitro*, wobec wirusa będącego przedstawicielem rodziny *Picornaviridae*, którym jest *Enterovirus eibovi* (EV-E). Doktorantka zwróciła szczególna uwagę na aspekty dotyczące bezpośredniego wpływu bLF na wirus w warunkach *in vitro* oraz na ocenę immunologicznego działania bLF w tychże warunkach wobec jednojądrzastych komórek krwi obwodowej bydła zakażonego EV-E.

Oceniana rozprawa ma formę dwóch artykułów naukowych opublikowanych w języku angielskim w międzynarodowych czasopismach jakimi są: *Molecules* i *Journal of Dairy Science.* W tych artykułach mgr inż. Małgorzata Wróbel jest pierwszym autorem, a przygotowane na tą okoliczność oświadczenia nie pozostawiają wątpliwości, że odegrała Ona kluczową rolę w ich powstawaniu.

Oceniając merytoryczną wartość pracy doktorskiej, którą przedstawiła Pani mgr inż. Małgorzata Wróbel, należy wskazać na kilka najważniejszych osiągnięć naukowych opisanych w tej dysertacji, które były udokumentowane dwoma zasadniczymi doświadczeniami, które zostały przedstawione w artykułach będących podstawą Jej rozprawy. W pierwszym Doktorantka przeprowadziła analizę zarówno w fazie adsorpcji, jak i po wniknięciu wirusa do komórki w badaniach na linii komórek nerki bydlęcej (MDBK) wysokich stężeń bLF (0,125-1 mg/ml), hamujących replikacje EV-E w fazie adsorbcji, jak i po wniknięciu wirusa do komórki. Wskazała w tej analizie na możliwe trzy efekty działania przeciwwirusowego bLF wobec EV-E. Jako pierwszy wskazała bezpośrednią interakcję bLF z cząsteczkami wirusa powodujący działanie wirusobójcze. Drugi efekt działania dotyczył bezpośrednich interakcji z komórką, gdzie dochodzi do blokowania receptorów wirusa oraz wskazuje na możliwe działanie ochronne na komórkę. Jako trzeci efekt działania bLF przedstawia zdolność hamowania replikacji wirusa w komórce na różnych etapach tego procesu. W drugim doświadczeniu dokonała oceny immunomodulującego działania bLF, także w warunkach *in vitro,* wobec jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) bydła zakażonego EV-E. W zakresie tego eksperymentu ustaliła zakres stężeń tego białka, bezpiecznych dla bydlęcych PBMC sprawdzając żywotność komórek oraz wpływ bLF na podstawowe funkcje komórek fagocytujących i limfocytów. Oceniła także wpływ białka na podstawowe funkcje zakażonych komórek, w tym na proliferację limfocytów, wybuch tlenowy i aktywność bójczą komórek fagocytujących. Doktorantka oceniła też skład odsetkowy głównych populacji limfocytów o receptorze CD4+, CD8+, CD4+CD8+, CD21+ oraz WC1 – marker limfocytów Tγδ, niestymulowanych lub stymulowanych mitogenami (konkawalina – ConA, lipopolisacharyd – LPS *E. coli*), a także ekspresję genów kodujących wybrane cytokiny takie jak *IL1-β, IL-2, IL-6, IL-10, TNF-α, IFN- α, IFN- β, IFN-γ* i *NFκB* w komórkach niestymulowanych lub stymulowanych tymi mitogenami. Takie podejście eksperymentalne w zakresie zastosowania różnorodnych metod badawczych budzi szacunek do Jej pracy badawczej jaką doktorantka wykonała bardzo rzetelnie i precyzyjnie, co udokumentowała w przedstawionych w dysertacji artykułach.

Wskazując na opisane przez Doktorantkę wyniki warto wskazać, że jedynie najwyższe testowane stężenie bLF znacząco zmniejszało końcowe miano wirusa EV-E. Ponadto bLF wykazywała działanie ochronne na komórki na etapie adsorpcji wirusa i bezpośrednio po. Ciekawe wyniki dotyczyły testowanych stężeń bLF. W tych badaniach w zakresie wpływu bLF na żywotność PBMC wykazała Doktorantka ich zmienność. Natomiast wpływ bLF na proliferację limfocytów T wskazywał, że wysokie stężenia bLF hamowały ich proliferację, a najniższe stymulowały proliferację tych komórek. Natomiast w przypadku limfocytów B nie zarejestrowano takich wyników. Reasumując ten zakres doświadczenia Doktorantka wskazała, że maksymalne tolerowane najwyższe stężenie (MTC) bLF zostało określone jako 25 µg/ml. Natomiast do testowanych dalszych eksperymentów Doktorantka stosowała bLF w stężeniach od 1 do 25 µg/ml. W badaniu dotyczącym wpływu bLF na komórki zakażone EV-E Doktorantka stwierdziła, że w porównaniu z kontrolą tak ujemną jak i dodatnią, tylko jedno z testowanych stężeń bLF – 10 µg/ml zwiększało proliferację komórek T w odpowiedzi na stymulację zastosowanym w doświadczeniu mitogenem jakim była ConA. Natomiast żadne z testowanych stężeń bLF w tym eksperymencie nie wpływało na proliferacje komórek B w tym przypadku w odpowiedzi na stymulację mitogenu w postaci LPS z *E.coli*. Natomiast w eksperymencie dotyczącym wpływu bLF na aktywność fagocytów krwi obwodowej zakażonych EV- E, Doktorantka wskazała, że najwyższe stosowane stężenie bLF - 25 µg/ml zmniejszyło potencjalną aktywność bójczą komórek, a głównie stężenie 10 µg/ml obniżyło aktywność wybuchu tlenowego. Wpływ bLF na rozkład populacji, w tym subpopulacji limfocytów krwi obwodowej w obecności EV-E nie wykazał różnic tak w przypadku komórek niestymulowanych jak i stymulowanych LPS, natomiast w przypadku komórek stymulowanych ConA tak najniższe -1 µg/ml, jak i najwyższe - 25 µg/ml stężenia bLF spowodowały spadek komórek WC1+ w porównaniu do komórek niezakażonych. W przypadku wpływu bLF na ekspresję genów cytokin w PBMC zakażonych EV-E Doktorantka wykazała zwiększoną ekspresję *IFN* α i β przy dwóch najniższych stężeniach bLF 1 i 2,5 µg/ml w komórkach niestymulowanych mitogenem w porównaniu do komórek niezakażonych EV-E. Natomiast odwrotną zależność zaobserwowała w komórkach stymulowanych mitogenem przy dwóch

najwyższych stężeniach bLF 10 i 25 µg/ml, co powodowało zwiększoną ekspresję *IFNβ* w porównaniu do kontroli ujemnej i dodatniej. W przypadku *IFNγ* istotny wpływ bLF zaobserwowano jedynie w komórkach stymulowanych ConA i dotyczył on obniżenia ekspresji *IFNγ* w stosunku do komórek zakażonych EV-E. Także zaobserwowano istotny wzrost ekspresji *IL2* w przypadku PBMC zakażonych wirusem i niestymulowanych mitogenem w porównaniu do kontroli ujemnej, podobnie jak i zastosowane niskie stężenia bLF – 1-5 µg/ml. Natomiast PBMC stymulowane ConA wykazywały zwiększona ekspresję *IL2* tylko w przypadku stężenia 1 µg/ml. W przypadku *IL10* tylko wysokie stężenia bLF – 10 i 25 µg/ml zwiększały ekspresję tej cytokiny przeciwzapalnej w komórkach niestymulowanych i stymulowanych - 25 µg/ml, w porównaniu do kontroli niezakażonej. Ciekawym jest, że żadne z testowanych stężeń bLF nie wpłynęło na poziomy ekspresji genów cytokin takich jak: *TNFα, IL1β* i *IL6* w komórkach niestymulowanych i stymulowanych LPS. W przypadku wpływu bLF na ekspresję genu *NFκB*, zakażenie EV-E zwiększało ekspresję tego czynnika transkrypcyjnego w komórkach niestymulowanych mitogenem, a w komórkach stymulowanych ConA, jedynie stężenie bLF 25 µg/ml powodowało zwiększenie ekspresji genu *NFκB*, w porównaniu do kontroli ujemnej.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki pozwalają – jak wskazuje Ona - na pewne zweryfikowanie opinii dotyczącej *Enterovirus eibovi*, że jest on czynnikiem infekcyjnym o ograniczonym znaczeniu chorobotwórczym. Co jest interesujące, to to, że wykluczyła Ona bezpośrednie działanie wirusobójcze bLF wobec cząstek EV-E oraz działanie ochronne wobec komórek MDBK – tak jak to wskazywane jest w przypadku prac dotyczących ludzkich enterowirusów, a co jest wyjątkowe, że stwierdziła iż silne działanie przeciwwirusowe bLF wobec EV-E jest rejestrowane po adsorpcji tego wirusa. Natomiast wskazała, że bLF hamowało replikacje wirusa w komórce głównie we wczesnych etapach zakażenia. Przeprowadzone eksperymenty dotyczące przeciwwirusowego działania bLF wobec EV-E uwzględniały wartość temperatury kontaktu zgodnie z polska normą, opisującą określenie wirusobójczego działania środków dezynfekcyjnych i antyseptycznych stosowanych w weterynarii, ale nie można jednak wykluczyć bezpośredniej interakcji bLF z cząsteczkami EV-E w środowisku kwaśnym.

Ponadto zaobserwowana w modelu komórkowym MDBK aktywność przeciwwirusowa bLF wobec EV-E dała możliwość wskazania, że może odzwierciedlać fizjologiczną funkcję bLF w organizmie młodych ssaków w tym cieląt. Ponadto zastosowany w badaniach szeroki zakres badanych stężeń bLF obejmował wartości zbliżone do fizjologicznych, jak i wysokie, które w warunkach in vitro hamowały replikację wirusa w komórkach MDBK. Także ciekawym efektem badań jest wskazany wpływ bLF na żywotność komórek. Ciekawe były też wyniki badań immunologicznych, a dotyczące zmian zaobserwowanych po zakażeniu PBMC przez EV-E w dawce MOI=1, w zakresie podwyższenia jedynie poziomu ekspresji genów *IL2* oraz *NFκB* w komórkach niestymulowanych mitogenami takimi jak ConA i LPS, a nie wpływało na aktywność komórek nimi stymulowanych. Zapewne efekt immunomodulującego wpływu bLF na -ogólnie nazywając- makroorganizm w tym przypadku zwierząt, wymagałby rozszerzenia cech, czy większej ilości analizowanych danych. Natomiast analizowany wpływ bLF na aktywność PBMC bydła zakażonych EV-E wykazał wyraźną zależność od stężenia białka. Nasilenie w komórkach niestymulowanych mitogenami ekspresji *IFN α* i *β*, *IL2* i czynnika *NFκB*. Wskazuje to na wczesną aktywację odpowiedzi przeciwwirusowej, co zapewne ma znaczenie przy we wczesnym etapie zakażenia tym wirusem. Także zwiększona ekspresja *IFN* typu I (*IFNα i IFNβ*) w komórkach zakażonych EV-E i inkubowanych z niskimi stężeniami bLF wskazuje, że zdolność tego białka do indukcji interferonów ma charakter konserwatywny gatunkowo i jest elementem jej aktywności przeciwwirusowej, jak i powoduje kształtowanie pamięci immunologicznej. Doktorantka wskazała też na aspekt praktyczny przeprowadzonych badań podając, że otwierają one możliwość zastosowania bLF jako naturalnego składnika preparatów o działaniu przeciwwirusowych i immunomodulującym w profilaktyce zakażeń enterowirusowych u bydła, a szczególnie u cieląt. Ponadto zaobserwowane dwufazowe działanie bLF wskazuje, że białko to może wspierać równowagę immunologiczną zwierząt i ograniczać nadmierną odpowiedź zapalną. Te właściwości tego białka stanowią, że może ono być także dodatkiem paszowym, jak i preparatów poprawiających kondycję zdrowotną i dobrostan zwierząt, bez stosowania osłonowej antybiotykoterapii w zakażeniach wirusowych. Ponadto model interakcji bLF z EV-E może stanowić wzorca do badań nad mechanizmami

odporności przeciwwirusowej u innych niż bydło gatunków zwierząt, będąc naturalnym czynnikiem profilaktyki i terapii zakażeń wirusowych.
Doktorantka finalnie wnioskuje w 9 punktach, które potwierdzają przedstawione cele pracy i podają uzasadnienie hipotez wytypowanych w dysertacji. W tym miejscu chciałabym poprosić Doktorantkę o zaproponowanie optymalnego – według Jej oceny – schematu postepowania metodycznego w zakresie stosowania bLF w profilaktyce zakażenia bydła wirusem EV-E.

W podsumowaniu mojej oceny stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki określone w art.187 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 poz.1571 ze zm.). Autorka wykazała ogólną wiedzę teoretyczną, umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a także rozwiązała problem naukowy.
Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. Małgorzaty Wróbel do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

PODPIS ZAUFANY
BEATA
TOKARZ-DEPTUŁA
28.02.2026 15:07:23 GMT+1
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym