Puławy, 14.05.2021

dr hab. Jacek Żmudzki, prof. instytutu
Zakład Chorób Świń
Państwowy Instytut Weterynaryjny
– Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

RECENZJA

dysertacji doktorskiej Pani lek. wet. Katarzyny Barbary Cieplińskiej pt. *„Ocena gentoksyczności i mikrobiomu jelitowego u niedojrzałych płciowo loszek narażonych na niskie dawki zearalenonu"* wykonanej w Katedrze Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Magdaleny Gajęckiej oraz: dr n. wet. Michała Dąbrowskiego

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z dnia 25 marca 2021 r. (WMW-DZ.6312.5.2021) zgodne z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie podjętą w dniu 19 marca 2021 r.

Mikotoksyny od lat są uważane za istotny problem w toksykologii. Pomimo tego, że rzadko dochodzi do ostrych zatruć mikotoksynami, to ich obecność w żywności i paszach może mieć negatywny wpływ na status zdrowotny zarówno ludzi jak i zwierząt. Dotychczas odkryto ponad 450 różnych związków określonych wspólnym mianem mikotoksyn, czyli substancji trujących wytwarzanych przez grzyby. Jednak z tak dużej liczby poważną rolę w codziennym życiu roślin, zwierząt i ludzi odgrywa jedynie kilka. Do najbardziej niebezpiecznych z toksykologicznego punktu widzenia należą aflatoksyny, ochratoksyny, trichoteceny (deoksyniwalenol (DON), niwalenol (NIV), toksyna T-2 oraz toksyna HT-2), fumonizyny i zearalenon (ZEN). Warto w tym miejscu podkreślić, że regulacje prawne chroniące przed szkodliwym działaniem tych mikotoksyn są mocno zróżnicowane dla ludzi i zwierząt. Maksymalne dopuszczalne poziomy mikotoksyn w żywności czy dopuszczalne dzienne pobrania dla ludzi są wystarczająco udokumentowane. Natomiast w przypadku u zwierząt są tylko tymczasowe orientacyjne zalecenia Komisji Europejskiej (2016 r.).

Bardzo poważny problem, szczególnie w warunkach klimatu chłodnego i umiarkowanego, stanowią mikotoksyny wytwarzane przez grzyby pleśniowe należące do rodzaju *Fusarium*, a wśród nich zearalenon. Związek ten wykazuje działanie estrogenne wywołując zaburzenia w cyklu rozrodczym. Może on prowadzić do zmniejszenia masy ciała płodów, poronień, bezpłodności, a nawet uszkodzeń organów płciowych. Odziaływanie zearalenonu na stan zdrowia zwierząt a w szczególności najbardziej wrażliwej na jego działanie trzody chlewnej jest obszarem wiedzy umiarkowanie rozpoznanym i przebadanym. Jednym z wiodących

światowych ośrodków naukowych w tym zakresie jest Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska omawia mało znane zagadnienia wpływu niskich dawek zearalenonu na układ pokarmowy loszek w aspekcie jego genotoksyczności w poszczególnych odcinkach jelit oraz określeniu czasowej zmienności w jakościowym i ilościowym składzie mikroflory jelitowej (flory bakteryjnej i mykologicznej) prowadzącej często do dysbiozy jelitowej, stąd wybór tematu oceniam jako bardzo trafny i nowatorski.

Oceniana rozprawa doktorska składa się z 2 jednotematycznych oryginalnych artykułów naukowych opublikowanych w międzynarodowym czasopiśmie w latach 2018 – 2019.

1. Cieplińska K, Gajęcka M, Nowak A, Dąbrowski M, Zielonka Ł, Gajęcki MT. The gentoxicity of caecal water in gilts exposed to low doses of zearalenone. Toxins 2018, 10(9):350; doi: 10.3390/toxins10090350. IF = 3.273; pkt MNiSW = 35.
2. Cieplińska K , Gajęcka M, Dąbrowski M, Rykaczewska A, Lisieska-Żołnierczyk S, Bulińska M, Zielonka Ł, Gajęcki MT. Time-Dependent Changes in the Intestinal Microbiome of Gilts Exposed to Low Zearalenone Doses. Toxins 2019, 11(5):296. doi: 10.3390/toxins11050296. IF = 3.895; pkt MNiSW = 100.

Włączone do cyklu publikacyjnego prace są opracowaniami wieloautorskimi w których Doktorantka jest pierwszym autorem, a jej wkład w przygotowaniu prac oceniono na 55%. Artykuły zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie ujętym na liście *Journal Citation Reports* (JCR). Sumaryczny czynnik wpływu (IF) wynosi 7.168, a łączna liczba punktów dla czasopisma z bazy MNiSW wynosi 135. Załączone prace są artykułami doświadczalnymi zawierającymi wyniki badań własnych. Należy wyraźnie podkreślić, że stanowi to dodatkową bardzo pozytywną recenzję zarówno tematyki jak i przeprowadzonych badań. Warto zaznaczyć, że spełniający wymóg jednotematyczności cykl 2 prac obejmujący w sumie 38 stron maszynopisu komputerowego jest zdecydowanie wystarczający, ponieważ uwzględnia zagadnienia poświęcone tematyce bioaktywnośći ZEN u niedojrzałych płciowo loszek i wyczerpuje wszystkie postawione w dysertacji doktorskiej cele. Koncepcja pracy doktorskiej jest dobrze przemyślana obejmując aspekty poznawcze jaki i pośrednie zastosowanie praktyczne we wczesnym wyrywaniu czynników ryzyka w postaci raka wybranych odcinków jelit, piersi lub macicy.

Rozprawa na stopień doktora nauk weterynaryjnych została napisana przez lek. wet. Katarzynę Cieplińską na 54 stronach maszynopisu komputerowego wliczając w to streszczenie w języku polskim i angielskim i wykaz 99 pozycji piśmiennictwa. W tekście pracy w rozdziale materiał i metody znajduje się 1 tabela, a wynikach badań występuje także 1 tabela oraz 11 rycin. Ponadto w pracy zamieszczono 2 prace oryginalne opublikowane w renomowanym międzynarodowym czasopiśmie naukowym „Toxins" z wysokim Impact Factor sięgającym blisko 4 (IF – 3.895). Jest to zwięźle i logicznie ujęta rozprawa. Strona graficzna i edytorska została wykonana starannie. Praca ma charakter interdyscyplinarny z uwagi na fakt, że dotyka zarówno zagadnień toksykologicznych, badań bakteriologicznych i molekularnych jak i biocenozy przewodu pokarmowego, wykorzystując przy tym różnorodne techniki badawcze.

We wstępie pracy Doktorantka przedstawia zagadnienia dotyczące narażenia niskimi dawkami zearalenonu w jej niezmodyfikowanej formie. Opisuje zmienność fizjologiczną poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego zwracając szczególną uwagę na procesy wchłaniania, kumulacji i biotransformacji mikotoksyn. Autorka zgłębia temat związany z niepewnością wynikającą z narażenia małymi dawkami ZEN, które bezpośrednio zależną od wielkości dawki i czasu narażenia. Trudne do przewidzenia reakcje oboczne są wynikiem tzw. efektu kompensacji czyli przedłużającego się narażenia substancją macierzystą ZEN. Zagadnienie opisujące współzależność miedzy dawką i czasem narażenia oraz reakcją organizmu na utrzymującą się kumulację ZEN są mało poznane. Z tego powodu Doktorantka postanawia przeprowadzić badania których celem jest ocena bioaktywności ZEN polegającym na określeniu zależności pomiędzy wielkością dawki zearalenonu podawanej *per os* w trzech terminach narażenia do potencjału niszczenia DNA czyli tzw. czasowej zmienności gentoksyczności caecal water oraz oceny mikrobiologicznej wybranych odcinków układu pokarmowego niedojrzałych płciowo loszek.

W podrozdziale *„Genotoksyczność CW"* Doktorantka wyraźnie podkreśla, że badania nad gentoksycznością w obrębie przewodu pokarmowego świń mają duże znaczenie poznawcze w aspekcie wczesnego wykrywania uszkodzeń DNA, które mogą wywoływać mutacje w komórkach somatycznych, często prowadząc do transformacji złośliwej w tym wystąpieniu zmian nowotworowych. Autorka pracy do oceny gentoksyczności wybrała test kometowy, który jest najczęściej stosowaną techniką do wczesnego wykrywania uszkodzeń DNA i potencjalnych skutków mutagennych w próbkach treści jelit z określonego odcinka przewodu pokarmowego.

W kolejnym podrozdziale dotyczącym *„Mikrobioty jelitowej"* doktorantka opisuje zależności pomiędzy prawidłową dietą u loszek a obecnością substancji niepożądanych jaką jest ZEN, wskazując, że obecność zearalenonu może być przyczyną dysbiozy jelitowej prowadząc do zmian składu flory saprofitycznej i pojawienie się niekorzystnych drobnoustrojów chorobotwórczych.

Te ostanie zagadnienia były zasadniczym celem badań doktorantki. Część eksperymentalna pracy wykonana została na 60 klinicznie zdrowych niedojrzałych płciowo loszkach o początkowej masie ciała (m.c.) około 14 -16 kg (w wieku około 6-7 tygodni). Zwierzęta podzielono na 3 grupy doświadczalne po 15 loszek na każdą grupę eksperymentalną. Loszki otrzymywały *per os* paszę zawierającą po 5, 10 i 15 μg ZEN/kg m.c., a samicom kontrolnym podawano kapsułki żelowe wypełnione paszą bez mikotoksyny. Doktorantka przeprowadziła analizę toksykologiczną pasz przed rozpoczęciem doświadczenia, badania sekcyjne polegające na pobraniu podwiązanych wycinków jelit w 7, 21 i 42 dniu narażenia ZEN oraz badania genotoksyczności treści jelit z wykorzystaniem linii komórkowej nabłonka nerki świnki i testu kometowego. Ponadto autorka pracy wykonała badanie bakteriologiczne mikroflory jelitowej (bakterii i grzybów) wykorzystując do identyfikacji biochemicznej system VITEK 2. Dokładne opisywanie przebiegu doświadczeń jest w recenzji zbędnym balastem. Wyrażam opinie, że zostały one dobrze zaplanowane i wykonane.

W wyniku przeprowadzenia testu kometowego autorka pracy potwierdziła ogólny trend polegający na procentowym wzroście uszkodzeń DNA we wszystkich terminach narażenia, ze

szczególnym uwzględnieniem grupy ZEN 10 (40% ± 7,5%) i ZEN 15 (45,6% ± 7,4%) w porównaniu do grupy kontrolnej C i grupy ZEN5 (odpowiednio 19,8% i 24,1%) w 7 dniu narażenia. Doktorantka stwierdziła wyraźne odstępstwo w grupie ZEN 10 w 42 dniu narażenia, gdzie wartości gentoksyczności znacznie odbiegały od pozostałych terminów czasowych. W pozostałych terminach narażenia tj. 21 i 42 dzień wartości gentoksyczności dla wspomnianych grup ZEN również miały miejsce choć w mniejszym nasileniu. Analizując poszczególne grupy doświadczalne Doktorantka wyraziła pogląd o istotnym wzroście gentoksyczności w treści jelit w różnych terminach narażenia, co w praktyce może oznaczać, że tego typu badania są niezwykle istotne z punktu widzenia człowieka, wiążąc się z ryzykiem wystąpienia raka wybranych odcinków jelit, piersi, macicy i innych docelowych narządów estrogenno-wrażliwych. Obecność zearelanonu w organizmie człowieka zwiększa prawdopodobieństwo hiperestrogenizmu, a w konsekwencji inicjacji wzrostu nowotworów złośliwych i łagodnych. U zwierząt, a w szczególności u trzody chlewnej ocena zmienności mikrobioty jelitowej podczas narażenia niskimi dawkami ZEN według Doktorantki umożliwia śledzenie zmian w składzie jakościowym i ilościowym bakterii i grzybów. Szczególnie interesujący jest fakt, na co autorka pracy kilkukrotnie zwraca uwagę, że utrzymująca się mikotoksykoza zearalenonowa jest stanem sprzyjającym namnażaniu się drobnoustrojów z gatunku *Clostridium difficile*. Według Doktorantki z racji zmian dysbiotycznych wywołanych przez wspomniany szczep bakteryjny oraz w wyniku narażenia niskimi dawkami ZEN w jelicie ślepym może dochodzić do stanu zapalnego jelit ujawniających się w stanach subklinicznych, co w konsekwencji prowadzi do znacznych strat ekonomicznych w hodowli świń.

Otrzymane w pracy doktorskiej wyniki badań mają niezaprzeczalną wartość naukową. Stanowią istotny wkład w toksykologię weterynaryjną, znacząco rozszerzając naszą wiedzę nt. stymulującego i prewencyjnego wpływu niskich dawek ZEN na młode rozwijające się loszki. Doktorantka wykazała, że podawanie ZEN w niskich dawkach ułatwia młodym loszkom w procesie dojrzewania płciowego z racji występującego u nich fizjologicznego hypoestrogenizmu, a także mają działanie podobne do zakazanych obecnie antybiotykowych stymulatorów wzrostu, co z kolei korzystnie wpływa na produkcję trzody chlewnej.

Doktorantka trafnie dobrała literaturę zarówno światową jak i krajową a jej dobór pod względem tematycznym i merytorycznym uważam za trafiony. Podsumowanie rozprawy doktorskiej i ostrożne wnioskowanie dobrze świadczy o dojrzałości badawczej Doktorantki.

Zauważone w trakcie czytania drobne potknięcia językowe oraz nie fortunne sformułowania zostały zaznaczone w tekście pracy i nie umniejszają jej wartości. Na pochwałę zasługuje imponująca ilość rycin które w znaczący sposób ułatwiają czytającemu interpretacje wyników badań. W polskiej wersji językowej rozprawy doktorskiej na stronie 24 wymienione w tekście ryc. 3A i 3B omyłkowo nie zostały zamieszczone w opracowaniu. Brakuje również wykazu skrótów, który w znaczący sposób ułatwiają czytającemu zrozumienie tekstu. W podrozdziale 4.2. dotyczącego „Zmienności mikrobioty jelitowej rozdziału „*Dyskusja*" na stronie 41 brakuje opisu do skrótu „SPCA".

Oceniając przeprowadzone badania, rzeczową interpretacje wyników, końcowe wnioski w formie podsumowania uważam, że stanowią one logiczną całość. Wymienione w recenzji uwagi nie umniejszają wartości pracy, która oceniam wysoko. Otrzymane w pracy doktorskiej

wyniki badań mają dużą wartość poznawczą i praktyczną. Autorka pracy doktorskiej lek. wet. Katarzyna Cieplińska dobrze opanowała różne techniki laboratoryjne i umiejętnie realizowała badania określone w temacie.

Podsumowując wyrażam opinię, że recenzowana rozprawa doktorska lek. wet. Katarzyny Cieplińskiej pt. „Ocena gentoksyczności i mikrobiomu jelitowego u niedojrzałych płciowo loszek narażonych na niskie dawki zearalenonu" w pełni odpowiada warunkom określanym wg przepisów ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki. (Dz.U. z 2017 r., poz. 1789), w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r., poz. 1669 ze zm.)

Z pełną odpowiedzialnością przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie lek. wet. Katarzyny Barbary Cieplińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na fakt, że przedstawiona do oceny praca stanowi istotny wkład w mało poznany obszar wiedzy toksykologicznej wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie o wyróżnienie pracy doktorskiej lek. wet. Katarzyny Barbary Cieplińskiej stosowną nagrodą.

Puławy, dnia 14.05.2021 r.

dr hab. Jacek Żmudzki, prof. instytutu