Prof. dr hab. Chandra S. Pareek

Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń
email: pareekcs@umk.pl
Kom: +48-605161800

Recenzja pracy doktorskiej lek. wet. Katarzyny Barbary Cieplińskiej, pt.: "Ocena genotoksyczności i mikrobiomu jelitowego u niedojrzałych płciowo loszek narażonych na niskie dawki zearalenonu"

Wykonanej na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

pod kierunkiem prof. dr hab. n. wet. Magdaleny Gajęckiej –promotora

oraz

dr n. wet. Michała Dąbrowskiego –promotora pomocniczego

1. Podstawa formalna recenzji (uchwala Rady Dyscypliny): Przedstawiona do oceny rozprawa lek. wet. Katarzyny Barbary Cieplińskiej dotyczy badań, opisujących genotoksyczności i mikrobiomu jelitowego u niedojrzałych płciowo loszek narażonych na niskie dawki zearalenonu, która składa się jednotematycznego cyklu 2 publikacji:

[1]. Cieplińska, K., Gajęcka, M., Nowak, A., Dąbrowski, M., Zielonka, Ł., Gajęcki, M.T. The gentoxicity of caecal water in gilts exposed to low doses of zearalenone. Toxins 2018, 10(9), 350; https://doi.org/10.3390/toxins10090350 (IF - 3.273; pkt MNiSW - 35.000)

[2]. Cieplińska, K., Gajęcka, M., Dąbrowski, M., Rykaczewska, A., Zielonka, Ł., Lisieska-Żołnierczyk, S., Bulińska, M., Gajęcki, M.T. Time-dependent changes in the intestinal microbiome of gilts exposed to low zearalenone doses. Toxins 2019, 11, 296; http://doi:10.3390/toxins11050296 (IF - 3.895; pkt MNiSW - 100.000).

Sumaryczny Impact Factor (IF) za jednolity cykl publikacji wg bazy Journal Citation Reports (JCR) wynosi 7,168. Rozprawa została przedstawiona w formie monotematycznego cyklu

dwóch publikacji (Jez. Ang: 38 stron), w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Praca zawiera również komentarz Doktorantki w języku polskim (47 stron) z wprowadzeniem i celami (7 stron), materiał i metody (4 stron), opis najważniejszych wyników uzyskanych w trakcie badań (18 stron), dyskusja (11 stron), bibliografia (8 stron) a także streszczenie wyników w języku polskim i angielskim (2 stron). Łącznie rozprawa liczy 92 strony, z czego dwie strony przypadają na oświadczenia wszystkich współautorów prac.

Wymienione publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe opisują ocenę genotoksyczności CW (Cieplinska et al. 2018) i mikrobiomu jelitowego (Cieplinska et al. 2019) u niedojrzałych płciowo loszek narażonych na niskie dawki zearalenonu. Doktorantka oświadczyła, że jej zaangażowanie w powstanie wszystkich publikacji polegało na udziale w opracowaniu koncepcji pracy, realizacji badań, analizie bazy danych i interpretacji wyników W przygotowaniu manuskryptów i ich korekty, szacunkowy udział Doktorantki wynosił 55% (Cieplińska et al. 2018) i 52% (Cieplińska et al. 2019). Wszyscy współautorzy wyżej wymienionych publikacji oświadczyli też, że udział Doktorantki był „wiodący i pierwszoplanowy" oraz wyrażają zgodę na ich wykorzystanie w postępowaniu doktorskim. Stwierdzam, że cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe lek. wet. Katarzyny Barbary Cieplińskiej pod względem formalnym i merytorycznym, spełnia wymagania zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami) oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 1 września 2011 roku stawiane osobom ubiegającym się o stopień doktora nauk weterynarii.

2. Ogólna charakterystyka rozprawy, problem naukowy, jego sformułowanie i aktualność podjętego zagadnienia naukowego: Zearalenon (ZEN), znany również jako mikotoksyna RAL i F-2, jest zaliczany do fitoestrogenów wytwarzanym przez niektóre gatunki grzybów z rodzaju Fusarium i Gibberella. Substancje toksyczne wytwarzane przez niektóre grzyby z rodzaju Fusarium stanowią poważny problem w hodowli zwierząt gospodarskich, są wśród nich oprócz zearalenonu, deoksyniwalenol, toksyna T-2, toksyna HT-2, oraz diacetoksyscirpenol (DAS). Zearalenon, którego działanie jest kilka razy silniejsze niż w przypadku naturalnego estrogenu jest główną toksyną powodującą bezpłodność, aborcję lub inne problemy hodowlane u świń. Aktualność podjętego zagadnienia naukowego w pełni uzasadnia podjęcie badań, wartość naukowa rozprawy doktorskiej nie budzi zastrzeżeń natury merytorycznej. Autorka opublikował obydwa artykuły w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym

Chand

posiadających tzw. współczynnik wpływu (impact factor). Prace badawcze dotyczące zearalenonu miały duże znaczenie w ostatnich latach, co pokazują publikacje w PubMed z ostatniego roku, na przykład, oryginalne prace naukowe publikowane przez Zielonka et al. 2020, Obremski i in. 2020, Stewart i in. 2020, Wu i in. 2021. Tematyka badań przestawiona w obu opublikowanych pracach przez Doktorantkę jest oryginalna i nowatorska, jest też na wysokim poziomie merytorycznym. Hipoteza badawcza jest dobrze skonstruowana i sformułowana, aby osiągnąć cele badawcze.

3. Cel rozprawy: Celem pracy było wykonanie badań bioaktywności ZEN polegających na określeniu, czasowej zmienności genotoksyczności CW (caecal water) oraz mikrobioty i mykobioty jelitowej niedojrzałych płciowo loszek w trzech terminach narażenia w 7, 21, i 42 dniu narażenia niskimi dawkami zearalenonu (MABEL [5 µg ZEN / kg mc.], NOAEL [10 µg ZEN / kg mc]) i niską dawką LOAEL [15 µg ZEN / kg mc]). W prezentowanej rozprawie doktorskiej, Doktorantka w sposób właściwy precyzyjnie zdefiniowała i określiła cele naukowe dla osiągnięcia założonych wyników.

4. Ocena znajomości literatury dotyczącej problematyki badań: W pierwszym manuskrypcie, cytowano 42 pozycje piśmiennictwa, z których większość cytowań została opublikowana w latach 2014-2020. W drugim manuskrypcie również zacytowano łącznie 37 pozycji piśmiennictwa, w których większość cytowań została opublikowana w latach 2014-2020. Cytowane pozycje literaturowe uwzględnione w publikacjach były zgodne z problemem badawczym podjętym w niniejszej rozprawie doktorskiej.

5. Poprawność i oryginalność metodyczna oraz zakres wyjaśnienia zagadnienia naukowego: Materiałem do badań w prezentowanej przez Doktorantkę pracy było łącznie 60 niedojrzałych płciowo loszek. Na przeprowadzenie badań Doktorantka uzyskała zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie. Pierwszą z prac przedstawionych przez Doktorantkę (Cieplińska et al. 2018) napisano w oparciu o przeprowadzony eksperyment toksykologiczny in vivo i in vitro z wykorzystaniem testu hodowli komórek Comet (SCGE: Single Cell Gel Electrophoresis Assay). Uzyskane wyniki potwierdzono odpowiednimi testami statystycznymi m.in.: przez zastosowanie dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) przy użyciu oprogramowania OriginPro 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) a szczegółowe zależności między dawkami ZEN zostały określone przez korelację Pearsona. W drugiej pracy przedstawionej przez Doktorantkę (Cieplińska et al. 2019), cel badawczy został zrealizowany również w

eksperymencie żywieniowym in vivo i in vitro. Eksperyment żywieniowy in vivo przeprowadzono na 60 loszkach, a badanie toksykologiczne ZEN i DON wykonano metodą chromatograficzną: Eksperyment in vivo przeprowadzono na 20 loszkach na 300 próbkach (20 loszek × 5 odcinków jelita × 3 terminy pobierania próbek) oraz badania mikrobiologiczne zostały wykonane przy użyciu testów bakteriologicznych oraz testu grzybiczego przy użyciu systemu VITEK 2 do identyfikacji drobnoustrojów i badania wrażliwości na antybiotyki (Biomerieux®, bioMérieux, Craponne, Francja). Wyniki metodologiczne zostały potwierdzone testami statystycznymi przy użyciu jednoczynnikowej dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA, w tym testu wielokrotnych porównań Tukeya. Należy stwierdzić, że uzyskane wyniki zostały prawidłowo opracowane z wykorzystaniem odpowiednich modeli statystycznych przy wykorzystaniu pakietu statystycznego STATISTICA v. 13 (TIBCO Software Inc., 2017 , Warszawa, Polska).

7. Przydatność uzyskanych wyników w praktyce: w pierwszej z prac przedstawionych przez Doktorantkę (Cieplińska et al. 2018) genotoksyczność wody z jelita ślepego (CW) została zidentyfikowana szczególnie w grupach ZEN10 i ZEN15 z tendencją spadkową. Wyniki badań genotoksycznych wykazały rosnącą siłę korelacji w pierwszym dniu analizy w grupie C i grupie ZEN5 jednak z silnym trendem spadkowym oraz brakiem korelacji liniowej w grupie ZEN5 w dwóch kolejnych terminach. Podsumowując, analiza genotoksyczności wody z jelita ślepego podczas ekspozycji na bardzo małe dawki ZEN Doktorantka wykazała u loszek obecność odpowiedzi przeciwnej i efekt kompensacyjny. W drugiej pracy przedstawionej przez Doktorantkę (Cieplińska et al. 2019) analiza mikroflory jelitowej, pozwoliła zidentyfikować statyczne i dynamiczne zmiany w liczbie drobnoustrojów między proksymalnym i dystalnym segmentem jelita, głównie w odniesieniu do Escherichia coli i Enterococcus faecalis. Uzyskane wyniki wykazały, że zearalenon wpływał przede wszystkim na liczbę kolonii bakterii jelitowych niż na różnorodność mikroflory, a jego wpływ był największy w grupach ZEN10 i ZEN15.

Uzyskane nowe wyniki, opublikowane w obu artykułach, będą miały istotny wpływ i wartość naukową i aplikacyjną w kontekście kontroli niepłodności, aborcji i innych problemów reprodukcyjnych spowodowanych toksycznością ZEN w populacji świń hodowlanych w Polsce i na świecie.

8. Uwagi polemiczne i dyskusyjne: Przedstawione prace od strony merytorycznej nie budzą istotnych uwag. Przede wszystkim bardzo wysoko oceniam zaangażowanie Doktorantki w realizację szeroko zakrojonych pracochłonnych badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje kompleksowe podejście do prezentowanej w rozprawie tematyki.

9. Podsumowanie wyników Wniosek końcowy

Podsumowując, należy stwierdzić, że rozprawa doktorska lek. wet. Katarzyny Barbary Cieplińskiej zasługuje na bardzo wysoką ocenę. Doktorantka wykazała się w niej dobrze ugruntowaną wiedzą w podejmowanym temacie, potwierdzając to znajomością literatury przy wyborze podjętej tematyki badawczej. Na wyróżnienie zasługuje zastosowanie modeli eksperymentalnych do testowania założonych hipotez, jak i zastosowanie zaawansowanych technik badawczych oraz właściwych metod analizy statystycznej. Wobec powyższego uważam, że rozprawa doktorska lek. wet. Katarzyny Barbary Cieplińskiej spełnia wymogi stawiane przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym (Dz. U. Nr. 65/03 poz. 595, z późniejszymi zmianami). Wnioskuję do Rady Naukowej w dyscyplinie nauki weterynaryjne Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie o dopuszczenie lek. wet. Katarzyny Barbary Cieplińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Chandra Shekhar Pareek

Prof. dr hab. Chandra S. Pareek