Prof. zw. dr hab. Tadeusz Kuder
Zakład Anatomii, Instytut Nauk Medycznych
Collegium Medicum
Uniwersytet Jana Kochanowskiego
w Kielcach

Kielce 03-04-2025

O C E N A

rozprawy doktorskiej lek. wet. Ismeny Gałęckiej pt."Ocena wpływu niskiej i wysokiej dawki mikroplastiku na kodowanie chemiczne jelitowego układu nerwowego i układ immunulogiczny jelita cienkiego świni domowej", wykonanej w Katedrze Fizjologii, Klinicznej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, UWM w Olsztynie, pod kierunkiem prof. dr hab. Jarosława Całki

Podstawa:

Zgodnie z Uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dn. 07.02.2025r., zostałem powołany na recenzenta w/w rozprawy doktorskiej.

Wstęp:

Powszechne używanie w obecnym czasie tworzyw sztucznych, praktycznie w każdej sferze życia człowieka powoduje, że jego drobne cząsteczki (mikroplastik) obecne są w wodzie, powietrzu, glebie, pokarmach czy paszach dla zwierząt. Opakowania plastikowe stosowane są w zasadzie wszędzie, przyczyniając się do uwalniania mikrocząsteczek plastiku i ich osadzania się w układzie pokarmowym i oddechowym. Tworzywa sztuczne są szeroko stosowane właśnie w sektorze rolno-spożywczym, przyczyniając się do obecności mikroplastiku w przewodzie pokarmowym zwierząt gospodarskich. W związku z powyższym coraz częściej prowadzone są badania na temat wpływu mikroplastiku na zwierzęta. Dotyczy to głównie zwierząt wodnych – skorupiaków i ryb. Prowadzone są sporadyczne badania u ptaków (kurczęta) i ssaków (głownie myszy). W odniesieniu do świń badania dotyczą głównie obecności mikroplastiku w odchodach. W ten sposób podjęte przez doktorantkę badania są jednymi z pierwszych, dotyczących wpływu mikrocząsteczek plastiku na jelito cienkie świni domowej. Wpisują się one również w aktualny trend badań nad tym ważnym zagadnieniem, zarówno w ochronie środowiska jak i gospodarce hodowlanej oraz zdrowiu człowieka. Uzyskane wyniki mają potencjalne znaczenie kliniczne i to zarówno w weterynarii, jak i medycynie ludzkiej, bowiem jak wiadomo, świnia jest modelowym zwierzęciem w odniesieniu do człowieka.

Charakterystyka rozprawy:

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wykonana została w Katedrze Fizjologii Klinicznej, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie, ośrodku naukowym o bogatym dorobku w zakresie układu nerwowego autonomicznego, w tym także części jelitowej tego układu.

Tekst rozprawy doktorskiej powstał na bazie trzech artykułów o sumarycznym IF 16,9 i liczbie punktów MEiN 420.

1. Gałęcka I., Szyryńska N., Całka J. Influence of polyethylene terephthalate (PET) icroplastic on selective substances in the intramural neurons of the porcine duodenum . **Particle and Fibre Toxicology** 2024, 21, 1
2. Gałęcka I., Całka J.: Oral exposure to Microplastics Affects the Neurochemical Plasticity of Reactive Neurons in the Porcine Jejunum. **Nutrients** 2024, 16(24)
3. Gałecka I., Całka J.: Microplastic and the Enteric Nerve System: Effect of PET Microparticles on Selected Neurotransmitters and Cytokines in the Porcine Ileum. **International Journal of Molecular Sciences** 2024, 25(21)

Jak wynika z załączonych oświadczeń wkład doktorantki w publikacje wynosił 80% i polegał na zaprojektowaniu doświadczenia, jego przeprowadzeniu, wykonaniu pracy laboratoryjnej, opracowaniu i interpretacji wyników, pozyskiwaniu finansowania i przygotowania manuskryptów. Dysertacja posiada w sumie 57 stron plus 63 strony z kserokopiami w/w prac źródłowych.

W moim przekonaniu doktorantka podjęła się opracowania istotnego problemu, dotyczącego wpływu mikroplastiku na kodowanie chemiczne neuronów jelitowego układu nerwowego, który odpowiedzialny jest za motorykę, aktywność wydzielniczą i przepływ krwi w układzie pokarmowym i stanowi pierwszą barierę ochronną, przeciwko mikroplastikowi. W ten sposób zrealizowała zarówno swój cel badawczy, jak i wpisała się w ogólną strategię badawczą, dotyczącą mikroplastiku. Wykonując to zadanie postawiła sobie następującą hipotezę badawczą: „Mikroplastik politeraftalanu etylenu może powodować zmiany w kodowaniu chemicznym (CART, GAL, nNOS, SP, VAChT i VIP) układu nerwowego jelitowego, jelita cienkiego oraz zmiany stężenia cytokinin (IL-1ß, IL-6, IL-8, IL-10 oraz TNF-α) w jelicie krętym świni domowej (*Sus scrofa domesticus*)".

We wstępie autorka przedstawiła ogólną charakterystykę układu nerwowego jelitowego i tkanki limfatycznej związanej z jelitami (GALT), a także ich potencjalną rolę w kontakcie z mikroplastikiem. Zwróciła również uwagę, że w odpowiednim piśmiennictwie brak jest danych na temat wpływu mikroplastiku na układ pokarmowy świni. Stąd podjęte badania są jak

najbardziej zasadne. Następnie autorka przedstawiła w/w hipotezę i cele badawcze oraz materiały i metody prowadzonych eksperymentów. Badania realizowała na 15 niedojrzałych płciowo loszkach (8 tygodniowych), które podzieliła na 3 grupy (po 5 sztuk każda); kontrolna, otrzymująca puste kapsułki żelatynowe, i dwie badawcze - otrzymującą niską dawkę mikroplastiku – 0,1g/dzień oraz otrzymującą wysoką dawkę mikroplastiku – 1g/dzień. Stosowała mikroplastik PET (politereftalan etylenu) o średnicy mikrocząsteczek w przedziale 7,6-416,9 μm (średnio 158,5 μm). Eksperyment prowadziła przez 4 tygodnie. Następnie po eutanazji zwierząt pobierała fragmenty dwunastnicy, jelita czczego i jelita krętego do badań immunofluorescencyjnych. Stosując odpowiednie przeciwciała pierwotne i wtórne wykrywała obecność struktur nerwowych immunopozytywnych na wybrane antygeny (PGP 9.5, CART, GAL, nNOS, SP, VAChT I VIP). Pobrane fragmenty tkanek badała również na obecność cytokinin: IL-1ß, IL-6, IL-8, IL-10,TNF-α. Uzyskane wyniki opracowywała statystycznie z użyciem testu Levene'a, jednoczynnikowej analizie wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Scheffe. Różnice pomiędzy grupą kontrolną i badawczymi rozpatrywała na poziomie istotności $p < 0,05$. Należy zaznaczyć, ze na całość badań doktorantka posiadała odpowiednią zgodę Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie.

Przeprowadzone badania wykazały, że wpływ dawki 0,1g/dzień był różny w zależności od badanego odcinka jelita cienkiego oraz splotu jelitowego. Było to zmniejszenie lub zwiększenie odsetka odpowiednich neuronów immunoreaktywnych, bądź brak zmian.

Dawka 1g/dzień powodowała szereg zmian odsetka neuronów, poza populacjami neuronów CART-pozytywnych w splocie mięśniowym jelita krętego i nNOS-dodatnich splotu podśluzowego zewnętrznego jelita czczego. W przypadku transkryptu regulowanego kokainą i amfetaminą (CART) obserwowała wzrost neuronów CART-pozytywnych w dwunastnicy, podczas gdy w jelicie czczym i krętym następował spadek populacji tych neuronów, przy czym głównym czynnikiem była wysoka dawka mikroplastiku.

W przypadku galaniny (GAL) niska dawka mikroplastiku nie powodowała zmian w populacjach neuronów w żadnym ze splotów jelitowych dwunastnicy. Natomiast w grupie zwierząt otrzymujących wysoką dawkę mikroplastiku obserwowała zwiększenie populacji neuronów GAL-pozytywnych we wszystkich trzech odcinkach jelita cienkiego.

Populacja neuronów nNOS-dodatnich ulegała redukcji po niskiej dawce mikroplastiku we wszystkich trzech odcinkach jelita cienkiego, podczas gdy pod wpływem wysokiej dawki odnotowywano zmniejszenie populacji tych neuronów we wszystkich odcinkach jelita. Największy spadek liczby neuronów występował w splocie błony mięśniowej jelita krętego.

Populacja neuronów SP-pozytwwnych zachowywała się różnie, w zależności od odcinka badanego jelita. W dwunastnicy, we wszystkich splotach obserwowano spadek populacji tych neuronów, zarówno po dawce niskiej, jak i wysokiej. W jelicie czczym, zmniejszenie populacji obserwowano w splocie błony mięśniowej, natomiast w splotach podśluzowych następował wzrost populacji neuronów S-dodatnich, zwłaszcza po wysokiej dawce mikroplstiku.
Populacja neuronów pozytywnych w odniesieniu do pęcherzykowego transportera acetylocholiny (VAChT) wykazywała spadki po obydwu dawkach mikroplastiku, przy czym istotne statystycznie po wysokiej dawce.

Wpływ mikrocząsteczek plastkiku na populację neuronów VIP- pozytywnych zaznaczał się spadkiem ich liczby właściwie we wszystkich splotach i odcinkach jelita cienkiego. Jedynie w splocie błony mięśniowej dwunastnicy obserwowano niewielki wzrost liczebności (nieistotny statystycznie).
Analiza stężenia badanych cytokinin nie wykazywała statystycznie istotnych różnic w grupach badawczych i kontrolnej.

Chciałbym także podkreślić, że uzyskane przez autorkę wyniki badań są jednymi z pierwszych nowych danych, bowiem, jak już zaznaczyłem, w odpowiedniej literaturze niewiele jest prac dotyczących wpływu mikroplastiku na układ pokarmowy ssaków, w tym świni domowej.

Biorąc pod uwagę coraz większe znaczenie świńskiego modelu badawczego, uzyskane rezultaty poza wartościami poznawczymi mają również znaczenie praktyczne, gdyż mogą być wykorzystane nie tylko w klinice weterynaryjnej ale również w medycynie ludzkiej oraz toksykologii środowiska.

Badania doktorantki ewidentnie wykazały, ze mikroplastik wpływa na kodowanie chemiczne neuronów układu nerwowego jelitowego i wykazuje pewne różnice w zależności od zastosowanej dawki i badanego odcinkach jelita . Zaistniałe różnice pomiędzy poszczególnymi odcinkami jelita cienkiego mogą wynikać ze zmian właściwości fizykochemicznych cząsteczek powstałych pod wpływem pasażu z treścią pokarmową przez przewód pokarmowy i być efektem ich oddziaływania mechanicznego i chemicznego. Układ nerwowy jelitowy wykazuje adaptację do podawanych dawek mikroplastiku, która wyraża się w zmianach ilościowych populacji neuronów CART-, GAL-, nNOS-, SP-, VAChT-, i VIP-dodatnich. Stwierdzone obniżenie populacji neuronów VAChT-pozytywnych doktorantka tłumaczy możliwością degeneracyjnego wpływu mikroplastiku na zakończenia nerwowe splotów jelitowych. W takich wypadkach dochodzi do zwiększenia neuronów GAL-dodatnich, które z kolei hamują wydzielanie ACh i SP.

Otrzymane wyniki autorka przedyskutowała z odpowiednim specjalistycznym piśmiennictwem, liczącym 97 pozycji, w tym także swoją publikacją.

Reasumując chciałbym podkreślić, że doktorantka podjęła się opracowania bardzo ważnego i bardzo aktualnego problemu, zastosowała metody adekwatne do tego typu badań a otrzymane wyniki w pełni zrealizowały założone cele badawcze i zostały właściwie zinterpretowane.

Praca doktorska przygotowana jest bardzo poprawnie i staranie. Moje jedyne zastrzeżenie dotyczy stosowanego przez doktorantkę terminu „jelitowy układ nerwowy", podczas, gdy poprawnym określeniem polskim jest „układ nerwowy jelitowy". Oczywiście powyższa uwaga nie wpływa na moją ogólną wysoką ocenę pracy doktorskiej lek. wet. Ismeny Gałeckiej, która spełnia wszystkie wymagania określone w art., 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2024, poz. 1571 ze zmianami), stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie lek. wet. Ismeny Gałęckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. wet. Ismeny Gałęckiej. W uzasadnieniu chciałbym podkreślić nowatorskość otrzymanych wyników badań oraz ich potencjalne znaczenie praktyczne w klinikach i ochronie środowiska. Na podkreślenie zasługuje także olbrzymi wkład pracy doktorantki w przygotowanie i analizie olbrzymiej ilości preparatów mikroskopowych.