

dr hab. Marianna Szczypka, prof. uczelni
Katedra Farmakologii i Toksykologii
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Wrocław, 14.03.2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Wojciecha Trybowskiego
pt. „Wpływ jednoczesnego podawania toksyny T-2 i zearalenonu na kształtowanie się
odsetka wybranych subpopulacji limfocytów B i T oraz wydzielanie cytokin
w ścianie jelita biodrowego świń”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została wykonana w Katedrze Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Promotorem pracy jest dr hab. Kazimierz Obremski, prof. UWM, promotorem pomocniczym - dr wet. inż. Paweł J. Wojtacha.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 15 grudnia 2023 r.

Mikotoksyny to wtórne metabolity grzybów głównie z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Ze względu na fakt, że mikotoksyny mogą zanieczyszczać pasze dla zwierząt, jak również produkty spożywcze przeznaczone dla ludzi, mogą powodować różne niekorzystne skutki zdrowotne i stanowić poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt, zwłaszcza gospodarskich. Niekorzystne działania mikotoksyn obejmują zarówno ostre zatrucie, jak i skutki długoterminowe, prowadzące m.in. do zaburzeń funkcjonowania układu odpornościowego. Rozwój pleśni i w konsekwencji zanieczyszczenie mikotoksynami może nastąpić na różnych etapach pozyskiwania surowców roślinnych oraz ich przechowywania. Przy czym większość mikotoksyn jest stabilna chemicznie, nie ulega degradacji i może przetrwać procesy przetwarzania żywności czy materiału paszowego. Według WHO, wśród

zidentyfikowanych kilkuset różnych mikotoksyn, największe zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt gospodarskich stanowią aflatoksyny, ochratoksyna A, patulina, fumonizyny, zearalenon i niwalenol/deoksyniwalenol. W odniesieniu do zwierząt gospodarskich, zanieczyszczenie pasz mikotoksynami to nie tylko zagrożenie zdrowia zwierząt, ale również problem o dużym znaczeniu ekonomicznym. Z badań przeprowadzonych zarówno *in vitro* jak i *in vivo* wiadomo, że mikotoksyny, w tym toksyna T-2 oraz zearalenon (ZEN), wpływają na funkcjonowanie układu immunologicznego oraz bariery jelitowej. Zatem podjęcie przez Doktoranta tematu badawczego dotyczącego wpływu równoczesnego podawania toksyny T-2 oraz ZEN u świń jest uzasadnione i interesujące. Podjęty problem naukowy jest prawidłowo sformułowany i nadal aktualny.

Oceniana rozprawa doktorska jest podzielona w sposób przyjęty dla tego rodzaju prac naukowych i zawiera: spis treści, wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim oraz w języku angielskim, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz spis literatury. Rozprawa doktorska liczy 74 strony, zawiera 21 rycin, 6 tabel oraz 154 pozycje piśmiennictwa.

Wstęp został podzielony na rozdziały, co ułatwia czytelnikowi zapoznanie się z przedstawianym tematem. Doktorant umiejętnie wprowadza w tematykę badań, w pierwszej kolejności ogólnie nakreślając problem zanieczyszczenia pasz mikotoksynami. Następnie charakteryzuje trichoteceny i należącą do nich toksynę T-2 oraz opisuje jej działania immunotoksyczne oraz wpływ na barierę jelitową. W analogiczny sposób został opisany zearalenon: charakterystyka, działanie immunomodulujące oraz wpływ na barierę jelitową. Układ rozdziałów wstępu jest przemyślany. Jednak rozdziały dotyczące działania immunotropowego i wpływu mikotoksyn na barierę jelitową, bardzo istotne biorąc pod uwagę cel pracy, przed publikacją badań wymagają poprawek (uwagi poniżej). Dobrym pomysłem jest osobny rozdział uzasadniający dobór dawek toksyny T-2 oraz ZEN. Wstęp rozprawy doktorskiej świadczy o odpowiednim przygotowaniu merytorycznym Doktoranta i stanowi wprowadzenie w tematykę badań oraz uzasadnienie ich przeprowadzenia.

Celem rozprawy doktorskiej jest ocena skutków równoczesnego doustnego podawania niskich dawek toksyny T-2 oraz zearalenonu przez 14, 28 lub 42 dni na wybrane parametry układu immunologicznego w ścianie jelita biodrowego świń. Dawka toksyny T-2 wynosiła 14,5 µg/kg m. c./dzień, co stanowi 50% dawki LOAEL, natomiast dawka ZEN wynosiła 10 µg/kg m. c./dzień, co jest równe dawce NOAEL.

Cel pracy został prawidłowo sformułowany i uzupełniony trzema celami szczegółowymi, które dotyczą oceny procesu kształtowania się u loszek tolerancji pokarmowej poprzez

miar stężenia wybranych cytokin (cel 1) oraz poprzez określenie odsetka wybranych subpopulacji limfocytów (cel 2), a także oceny wpływu badanych mikotoksyn na odpowiedź komórkową związaną z limfocytami T CD8+ i IFN- γ i odpowiedź humoralną/regulatorową związaną z limfocytami B2 oraz IL-4 (cel 3).

W części „Materiał i metody” Doktorant opisuje sposób przeprowadzenia doświadczenia oraz metodykę oznaczania badanych parametrów. Badania przeprowadzono na loszkach rasy wielka biała polska. Grupa kontrolna oraz grupa otrzymująca mikotoksyny liczyły po 15 zwierząt. Grupa doświadczalna otrzymywała toksynę T-2 oraz ZEN w ww. dawkach. Warto podkreślić, że dawkę modyfikowano w trakcie doświadczenia uwzględniając wzrastającą masę ciała zwierząt, co jest szczególnie istotne w przypadku dużego tempa przyrostów masy ciała. W trzech punktach czasowych tj. po 14, 28 i 42 dniach podawania toksyny T-2 oraz ZEN pobierano fragmenty ściany jelita biodrowego od 10 loszek, tj. 5 z grupy kontrolnej oraz 5 z grupy otrzymującej mikotoksyny, w celu wykonania oznaczeń. Oznaczano stężenia następujących cytokin: IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-12/IL-23 p40, IL-4, IL-10, TGF- β oraz odsetek limfocytów: CD2+, CD4+, CD8+, limfocyty podwójnie pozytywne CD4+CD8+, limfocyty śród nabłonkowe TCR $\alpha\beta$ + oraz TCR $\gamma\delta$ +, komórki NK, limfocyty B1 oraz B2. Zaproponowany schemat doświadczenia jest prawidłowy, dobór oznaczanych parametrów uzasadniony. Metodyka badań została prawidłowo dobrana pod kątem realizacji założonych celów naukowych: stężenia cytokin oznaczano metodą ELISA, natomiast odsetki limfocytów poszczególnych subpopulacji metodą cytometrii przepływowej. W tej części rozprawy Doktorant zamieścił tabele, które dostarczają szczegółowych informacji dotyczących składu podawanych pasz, zestawów do oznaczania cytokin oraz użytych przeciwciał. W formie tabeli zestawiono również oznaczane subpopulacje limfocytów. Tabele te są wartościowym uzupełnieniem tej części rozprawy i równocześnie ułatwieniem dla czytelnika. Na podkreślenie zasługuje fakt, że podawana zwierzętom pasza była badana pod kątem zawartości najważniejszych mikotoksyn, co eliminuje błąd związany z ewentualnym zanieczyszczeniem nimi paszy.

Otrzymane wyniki badań, poddane odpowiedniej analizie statystycznej, zostały szczegółowo opisane przez Doktoranta oraz przedstawione na 16 czytelnych wykresach słupkowych. Bardzo dobrym pomysłem jest zamieszczenie w tej części rozprawy przykładowych cytogramów. Ta część pracy jest przedstawiona w jasny, klarowny sposób a otrzymane wyniki prawidłowo opisane.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorant komentuje otrzymane wyniki badań, konfrontując je z wynikami uzyskanymi przez innych autorów. Dyskusja jest interesująca, sposób jej prowadzenia świadczy o odpowiednim przygotowaniu merytorycznym Doktoranta. Dyskusja jest pogłębiona i dociekliwa zwłaszcza w odniesieniu do oznaczanych cytokin. W mniejszym stopniu związana jest z wynikami dotyczącymi subpopulacji limfocytów, ten aspekt dyskusji mógłby być bardziej rozwinięty.

Przytoczone przez Doktoranta piśmiennictwo jest aktualne i właściwie dobrane. Doktorant słusznie odnosi się do badań dotyczących mikotoksyn pochodzących z różnych lat, włączając najnowsze publikacje. Doktorant wykazał odpowiednią znajomość literatury związanej z tematem badawczym rozprawy doktorskiej.

W oparciu o przeprowadzone badania Doktorant sformułował 4 interesujące wnioski, w których stwierdza, że:

- równoczesne podawanie toksyny T-2 oraz ZEN wpływa modulująco na badane parametry;
- zmiany stężenia cytokin wskazują na rozwijający się stan zapalny;
- zmiany w subpopulacjach limfocytów wskazują na nasilenie odpowiedzi komórkowej;
- wpływ jednoczesnego podawania T-2 oraz ZEN na układ immunologiczny badanego odcinka jelit jest negatywny.

Jednak wniosek trzeci nie jest w pełni zasadny, ponieważ zmiany statystycznie istotne w grupie otrzymującej mikotoksyny dotyczą jedynie subpopulacji limfocytów CD4+, komórek NK oraz limfocytów B2, a nie wszystkich subpopulacji limfocytów, które w tym wniosku są wymienione.

Po zapoznaniu się z przedstawioną pracą doktorską nasuwają się następujące uwagi.

- Jeśli różnica pomiędzy grupami nie jest istotna statystycznie, to nie może być interpretowana jako spadek czy wzrost spowodowany podaniem T-2 oraz ZEN. Jest to zmienność wynikająca z różnic indywidualnych, a nie spowodowana badanym czynnikiem. Błędy tego typu pojawiają się w dyskusji na str. 56 w odniesieniu do IL-4, na str. 59 w odniesieniu do IL-10, jak również w trzecim wniosku pracy.
- We wstępie w uzasadnieniu wyboru dawek mikotoksyn Doktorant przywołuje regulacje UE z 2006, 2011, 2013 i 2014 r. Tymczasem numer zgody Lokalnej Komisji Etycznej wskazuje na zaplanowanie badań najpóźniej w 2008 r. Zatem późniejsze regulacje nie mogły stanowić uzasadnienia dla doboru dawek T-2 oraz ZEN.
- Zmiana paszy następowała po osiągnięciu przez loszki masy 25 kg. Jednak w pracy brakuje bardzo ważnej informacji, w jakim momencie to następowało (zwłaszcza w odniesieniu do

punktów czasowych, w których pobierano tkanki). Ponadto, wartościowe byłoby uzupełnienie pracy o dane dotyczące tempa przyrostu masy ciała zwierząt w badanych grupach.

- Skoro w dwóch celach szczegółowych pojawia się pojęcie tolerancji pokarmowej, to brakuje omówienia samego zjawiska tolerancji pokarmowej i szerszego odniesienia się do tego w dyskusji.

- W pracy nieprawidłowo używane są słowa „dawka” oraz „stężenie”. Dawka odnosi się do ilości substancji wprowadzanej do organizmu. W innych przypadkach, np. dotyczących ilości mikotoksyn dodanych do hodowli komórkowych, powinno być używane słowo „stężenie” (ten błąd pojawia się np. w celu pracy czy w tekście na str. 21). Podobnie nie powinno być stosowane słowo „poziom” jako synonim „stężenia” (np. str. 29).

- Doktorant powołuje się na zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej do spraw Badań nad Zwierzętami, tymczasem prawidłowa nazwa to: Lokalna Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach.

- W dyskusji zbędny jest fragment dotyczący opisu badań (str. 53).

- W pracy występują dość liczne literówki (np. str. 18 - „saratotoksynia” zamiast „saratoksyna”, str. 35 - „10⁶/μl” zamiast „10⁶/ml”, str. 38 - „ng/mg” zamiast „pg/mg”, str. 57 - „kaludyna” zamiast „klaudyna”) oraz inne błędy językowe np.: „Splenocyty pozyskane od myszy, a otrzymujące przez 14 dni *per os* toksynę T-2...” (str. 21) czy też zdanie, z którego wynika, że regulacje UE zalecają maksymalne poziomy mikotoksyn w paszach (str. 17).

- Na str. 32 błędnie przywołana jest tabela 1 (skład mieszanek paszowych podany jest w tabeli 2). Na str. 38 zamiast Ryc. 6 dotyczącej IL-1β, załączony jest wykres z Ryc. 7., który dotyczy IL-2.

- Uwagi odnoszą się również do aspektów związanych z cytowaniem publikacji. W rozdziale 2.2.2. (str. 20) siedem cytowanych publikacji pojawia się na końcu całego akapitu, co znacznie utrudnia znalezienie konkretnych zacytowanych informacji, np. z której publikacji pochodzą informacje o dawkach toksyny T-2 podawanych myszom. W tym samym rozdziale niektóre odniesienia są nieadekwatne, np. na str. 21 opisane są badania *in vivo* dotyczące doustnego podawania T-2 myszom, tymczasem zacytowana publikacja (Hymery i in. 2009) dotyczy różnicowania się ludzkich monocytów w badaniach *in vitro*. Brak jest odniesień literaturowych na str. 21 dotyczących badań *in vitro* i wpływu T-2 na syntezę cytokin (IL-2, IL-4, IL-5) przez mysie splenocyty oraz wpływu T-2 po podaniu *in vivo*. Podobny problem braku lub błędnych odniesień literaturowych dotyczy rozdziałów 2.2.3., 2.3.1., 2.3.2: brak odniesień dotyczących badań na myszach z użyciem deoksyniwalenolu (str. 22), badań na

linii THP-1 (str. 26), badań na myszach z użyciem ZEN (str. 28); błędne odniesienia: cytowana publikacja Sergent i in. 2006 nie dotyczy linii IPEC-1 ani badań *in vivo* na myszach (str. 22), publikacja Awad i in. 2012 dotyczy tylko badań na linii IPEC-J2, a nie linii Caco-2, T84, HT29, IPEC-1 (str. 23).

Inne pomyłki dotyczą roku publikacji (str. 28 - Benthem de Grave 2016, str. 54 - Wang i in. 2017, str. 57 - Nakayama i in. 2020 oraz Zeuthen i in. 2007, str. 58 - Capaldo i Nusrat 2009, str. 59 - Johnston i in. 2015), jak również braku oznaczeń „a” i „b” przy publikacjach z jednego roku (Obremski i in. 2015, Rogowska i in. 2019, Wang i in. 2019). Publikacja Kasuga i in. 1998 została zacytowana w tekście, a brak jej w spisie literatury. Publikacje Mowat i Viney, 1997 oraz Twarużek i in. 2021 są ujęte w spisie literatury, a nie zostały zacytowane w pracy. Niektóre pozycje w spisie literatury wymienione są dwukrotnie (Benthem dr Grave i in. 2021, Bimczok i in. 2007, McCormick i in. 2011), pozycje 136-139 nie są wymienione w porządku alfabetycznym.

- Uwagi odnoszą się również do aspektów związanych ze skrótami. Niektóre skróty nie zostały uwzględnione w wykazie: np. IPEC-J2, ILC, TCR. Przy skrócie GALT pojawia się określenie w języku ang. „*mucosa-associated lymphoid tissue*” zamiast „*gut-associated lymphoid tissue*”. Brak dbałości w zapisie skrótów, np. TNF α , TGF β , Caco – 2, IL-12/23p40, zamiast: TNF- α , TGF- β , Caco-2, IL-12/IL-23 p40. Niektóre skróty nie są stosowane konsekwentnie, np. w odniesieniu do populacji limfocytów T $\gamma\delta$ w pracy stosowane są skróty: T $\gamma\delta$, T $\gamma\delta$ +, TCR $\gamma\delta$ + lub T $\gamma\delta$ TCR+. Chociaż nie stanowi to błędu *sensu stricto*, to jednak utrudnia zapoznanie się z przedstawianym tematem. Dotyczy to również niektórych innych skrótów, a przecież powinny one ułatwiać, a nie utrudniać lekturę rozprawy.

Podsumowując, pomimo wymienionych uwag, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera interesujące wyniki badań i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Doktorant posiada odpowiednią wiedzę teoretyczną i jest przygotowany do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Wyniki badań i wnioski z nich wypływające są wartościowe w sensie poznawczym, ponieważ pogłębiają wiedzę na temat wpływu mikotoksyn na funkcjonowanie GALT. Otrzymane wyniki są również wartościowe w aspekcie praktycznym, ponieważ wskazują, że bardzo istotne dla funkcjonowania GALT i w efekcie dla zdrowia zwierząt mogą być konsekwencje jednoczesnego zanieczyszczenia pasz toksyną T-2 oraz zearalenonem.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska lekarza weterynarii Wojciecha Trybowskiego pt. „Wpływ jednoczesnego podawania toksyny T-2 i zearalenonu na kształtowanie się odsetka wybranych subpopulacji limfocytów B i T oraz wydzielanie cytokin w ścianie jelita biodrowego świń” spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.) stawiane kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora i przedkładam Radzie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie lek. wet. Wojciecha Trybowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Marianna Szczyпка

dr hab. Marianna Szczyпка, prof. uczelni