

Jabłonna, 25 kwietnia 2022 r.

Prof. dr hab. Tomasz Misztal
Zakład Fizjologii Zwierząt
Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt
im. Jana Kielanowskiego PAN
e-mail: t.misztal@ifzz.pl

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Kingi Kowalik

pt. „**Oddziaływanie polichlorowanych bifenyli i ich hydroksyloowanych metabolitów na syntezę i metabolizm jodotyronin w tarczycy i wątrobie kury (*Gallus domesticus*)**”

1. Podstawy formalno-prawne oceny

Ocenę Pracy doktorskiej Pani mgr Kingi Kowalik wykonałem w oparciu o pismo sygnowane przez Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie dr hab. Andrzeja Kornasia, prof. UP, w którym informuje o podjętej przez Radę uchwale z dnia 23 marca 2022 roku, powołującej mnie na recenzenta w/w Rozprawy. Ocenę swoją przedstawiłem zgodnie z obowiązującymi wymogami prawnymi tj. Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami), uwzględniając również zapisy Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r., Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668 z późniejszymi zmianami). Celem tej oceny było, zatem, przedstawienie uzasadnienia, że recenzowana Praca doktorska Pani mgr Kingi Kowalik stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w danej dyscyplinie naukowej oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

2. Ogólna charakterystyka Rozprawy

Praca doktorska Pani mgr Kingi Kowalik została przygotowana w postaci klasycznej monografii naukowej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Andrzeja Sechmana (Promotora) w Katedrze Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Liczy łącznie 106 numerowanych stron i podzielona jest na typowe dla prac doktorskich rozdziały oraz podrozdziały, którym towarzyszą Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wykaz skrótów użytych w tekście,

Spis treści oraz Spisy piśmiennictwa (121 pozycji), rycin (23) i tabel (6). W Spisie piśmiennictwa dominuje literatura autorów zagranicznych (91,7%), a 82,6% pozycji, to opracowania z okresu od roku 2001 do chwili obecnej, co świadczy o aktualności problematyki podjętej przez doktorantkę.

Przedmiotem zainteresowania Doktorantki jest oddziaływanie, w dużej mierze niekorzystne, polichlorowanych bifenyli (PCB) oraz ich metabolitów na procesy biologiczne w organizmach zwierząt. PCB stanowią grupę organicznych związków chemicznych, będących pochodnymi bifenyli, w których cząsteczce, jako podstawniki w pierścieniu aromatycznym występują atomy chloru. PCB nie występują w przyrodzie, jako naturalne związki, a ich pojawienie się w środowisku wynika z nieświadomej bądź nieodpowiedzialnej działalności człowieka. Ze względu na właściwości fizyko-chemiczne i oporność na degradację PCB przedostają się prawie do każdego elementu środowiska. Człowiek, znajdujący się na końcu łańcucha pokarmowego, jest zatem narażony na najwyższe dawki tych związków. Budowa strukturalna PCB umożliwia im silne działanie modulujące w układzie endokrynnym, skutkujące zaburzeniami w funkcjonowaniu neurosekrecyjnych osi podwzgórze-przysadka-gruczoły dokrewne. Negatywną rolę tych związków udokumentowano m.in. w patogenezie zaburzeń rozrodu, chorób tarczycy, otyłości, cukrzycy i innych chorób hormono-zależnych u ludzi i zwierząt.

W swojej pracy doktorskiej, p. mgr K. Kowalik skupia się na molekularnych aspektach czynności sekrecyjnych gruczołu tarczowego oraz procesów metabolicznych jodotyronin w wątrobie kury poddanych działaniu *in vitro* związków należących do dwóch różnych klas PCB oraz ich hydroksyloowanych metabolitów. Z uwagi na rosnącą u ludzi częstość występowania niedoczynności tarczycy na skutek czynników środowiskowych oraz szczególnie ważną rolę hormonów tarczycy w utrzymaniu homeostazy metabolicznej organizmu, wybór tematyki badawczej przez Doktorantkę należy uznać za trafny i istotny, zarówno ze względów poznawczych, jak i praktycznych. Bardzo interesujący jest zastosowany model zwierzęcia doświadczalnego, jakim jest kura domowa (*Gallus domesticus*). Choć z jednej strony wybór taki może być podyktowany utrwalanym przez lata doświadczeniem macierzystej Katedry w prowadzeniu badań fizjologicznych na tym gatunku ptactwa domowego, to z drugiej, można przywołać preferowany obecnie w badaniach trend, dotyczący różnorodności gatunkowej, która pozwala na przyjrzenie się podobieństwom i różnicom w mechanizmach regulacyjnych u odległych od siebie grup taksonomicznych zwierząt. W aspekcie praktycznym, zaburzenia sekrecji, metabolizmu i funkcji hormonów tarczycy, wynikające z narażenia kur niosek na

skażenia środowiskowe, zwłaszcza za pośrednictwem pasz, mogą stanowić poważny problem w produkcji jaj.

Rozprawa doktorska jest napisana bardzo starannie, poprawnym i bogatym językiem, a także jest bardzo ładnie opracowana graficznie. Pomimo stosowania ogromnej ilości skrótów, których wyjaśnienia ujęto w cztero- i półstronicowym wykazie, a także przy pierwszym użyciu, czytelnik łatwo utrzymuje się w nurcie badań doktorantki. Do tekstu wkradło się jednak kilka drobnych błędów literowych i interpunkcyjnych np. Wstęp, str. 17 „*Jodotyroniny ... są odpowiedzialne adaptację ...*” Zauważone błędy nie wpłyną na moją dalszą ocenę merytoryczną dysertacji.

Badania przedstawione w niniejszej Pracy doktorskiej zostały wykonane w ramach kierowanego przez Doktorantkę projektu badawczego „Preludium 14” pt. „Oddziaływanie polichlorowanych bifenyli i ich hydroksylowanych metabolitów na syntezę i metabolizm jodotyronin w tarczycy i wątrobie kury (*Gallus domesticus*)”, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Należy podkreślić, że część wyników zaprezentowanych w Pracy doktorskiej została już opublikowana w artykule naukowym autorstwa Kowalik K. i Sechman A., pt. „*In vitro effects of polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites on the synthesis and metabolism of iodothyronines in the chicken (Gallus domesticus) thyroid gland*” w czasopiśmie *General and Comparative Endocrinology* 2022, 318, 113989 – IF = 2,822; pkt MEiN = 100.

3. Ocena strony merytorycznej

Tytuł Pracy doktorskiej p. mgr K. Kowalik – „Oddziaływanie polichlorowanych bifenyli i ich hydroksylowanych metabolitów na syntezę i metabolizm jodotyronin w tarczycy i wątrobie kury (*Gallus domesticus*)” trafnie nawiązuje do podjętego w rozprawie problemu badawczego i jest spójny z zawartością treści rozprawy. W liczącym 12 stron Wstępie Pracy, doktorantka przedstawia, w oparciu o studium literatury, znaczący zasób wiedzy w zakresie podjętych badań. W dwóch podrozdziałach, czytelnik zapoznaje się kolejno z procesami syntezy i metabolizmu hormonów tarczycy oraz związkami PCB i ich aktywnymi metabolitami. Dość szczegółowo opisane i zilustrowane są czynności sekrecyjne gruczołu tarczowego kury, drogi dejonizacji jodotyronin oraz genomowy mechanizm działania hormonów tarczycy. Ponadto, wskazane źródła oraz przedstawiona klasyfikacja i reaktywność różnych form PCB precyzują sposób doboru kongenerów tych związków, które będą zastosowane, jako czynniki doświadczalne. Pomimo szerokiego zakresu prowadzonych badań nad efektami niekorzystnego działania PCB w organizmach zwierzęcych, Autorka dysertacji

trafnie określa luki w dostępnej wiedzy, wskazując na mniej poznane hydroksylowane metabolity tych związków oraz mechanizmy ich działania na poziomie molekularnym w tkankach zwierzęcych. W mojej opinii, rozdział ten został opracowany właściwie, syntetycznie ujmuje wszystkie waźkie dla podjętych badań zagadnienia i dobrze wprowadza czytelnika do dalszych części pracy. Nie znajduję, jednak, w tej części rozprawy wyraźnych sugestii, które wskazywałyby na wykorzystanie wątroby, jako obiektu badań. Dlaczego nie mózg lub obie te tkanki?

Po zwięzłym i informatywnym Wstępie, Doktorantka formułuje 3 hipotezy badawcze dotyczące wpływu PCB i ich hydroksylowanych metabolitów na czynności sekrecyjne związane z syntezą i konwersją jodotyronin w gruczole tarczowym i wątrobie kury, stężenie dejodynaz jodotyroninowych w badanych tkankach oraz związane z tymi procesami mechanizmy molekularne, dotyczące ekspresji mRNA białek i enzymów uczestniczących w syntezie i metabolizmie hormonów tarczycy, transbłonowych białek transportujących oraz receptorów: hormonu tyreotropowego w gruczole tarczowym i hormonów tarczycy w wątrobie. W dalszej kolejności, postawionym hipotezom towarzyszą kompleksowo sformułowane cele i zadania badawcze, wskazujące przyjęte przez Doktorantkę oryginalne rozwiązania problemu naukowego.

W części metodycznej dysertacji, Doktorantka zapoznaje czytelnika w pierwszej kolejności z materiałem zwierzęcym oraz układem doświadczeń. W badaniach *in vitro* wykorzystano eksplanty przygotowane z gruczołu tarczowego i wątroby pochodzące łącznie z 38 kur linii nieśnej *Hy-line Brown* w wieku 24-28 tygodni. W zadaniu 3.3.1. wykorzystano 16 kur; w zadaniu 3.3.2. - 16 kur; w zadaniu 3.3.3. - 6 kur. Liczby ptaków w poszczególnych doświadczeniach wymieniam dlatego, ponieważ podana wcześniej przez Doktorantkę łączna liczba kur 40 (str. 31) nie jest zgodna. Uważam ponadto, że w klasycznej monografii, podrozdział dotyczący zwierząt doświadczalnych powinien zawierać więcej informacji na temat danej linii kur, ich pochodzenia, postępowania przed wejściem do doświadczenia oraz warunków wpływających na dobrostan zwierząt. Interesuje mnie również sposób pozyskiwania oraz wielkość lub rozmiar eksplantów tkanek wykorzystanych w doświadczeniach *in vitro*. W zadaniu 3.3.1. brakuje informacji dotyczącej objętości medium, oraz rodzaju naczynia hodowlanego, w jakim prowadzono inkubację eksplantów. Są to drobne niedopatrzienia, jednak mogą okazać się istotne w opracowywaniu metod badawczych do kolejnych publikacji.

W dążeniu do realizacji celów badawczych, ważnym elementem, decydującym o powodzeniu badań, było wykonanie przez Doktorantkę doświadczeń, które pozwoliły na

ustalenie dawki badanych PCB i ich hydroksyloowanych metabolitów, zastosowanej w kolejnych eksperymentach, zarówno na gruczole tarczowym, jak i wątrobie. Wzmianka o wyborze konkretnej dawki mogłaby pojawić się, odpowiednio na stronach 44 i 61, gdzie opisano wyniki tych doświadczeń. W kolejnych eksperymentach, wpływ dwóch różnych klas PCB oraz ich hydroksyloowanych metabolitów badany jest nie tylko w odniesieniu do stanu podstawowego sekrecji i konwersji hormonów tarczycy, czy też ekspresji transkryptów badanych genów, ale także po modyfikacji tych procesów przez bydlęcą tyreotropinę (bTSH) w gruczole tarczowym i deksametazon (DEX) w tkance wątroby. Dla uproszczenia orientacji w grupach zwierząt i stosowanych w nich czynnikach doświadczalnych Doktorantka przedstawia klarowne schematy doświadczeń.

Do oznaczenia specyficznych hormonów, enzymów i transkryptów genów w zebranych mediach i eksplantach tkanek Doktorantka zastosowała znane, lecz wymagające dużego doświadczenia metody badawcze: radioimmunologiczną (RIA); Bradforda; immunoenzymatyczną (ELISA), Real-Time qPCR oraz zaczerpniętą z literatury, metodę opisaną przez Darrasa i wsp. (1991) do określenia konwersji T4 do T3 w homogenatach wątroby. Zasady oznaczania każdego czynnika zostały skrupulatnie opisane, co sugeruje znajomość i praktyczne zaangażowanie Doktorantki w wykonywanie analiz laboratoryjnych. Na zakończenie części metodycznej przedstawiony jest sposób analizy statystycznej uzyskanych wyników. Ciekawość moją wzbudza pomysł zastosowania transformacji logarytmicznej wyników dla zmiennych niemających rozkładu normalnego. Czy nie lepiej byłoby posłużyć się bezpośrednio testami nieparametrycznymi, będącymi odpowiednikami analizy wariancji?

Opis wyników, jak przystało na monografię naukową, jest szczegółowy, ale klarowny i wzbogacony licznymi rycinami (23) i tabelami (6). Przedstawione wyniki pozwoliły wykazać wysoką efektywność działania wybranych macierzystych PCB oraz ich metabolitów w większości zastosowanych układów, w zależności od czasu inkubacji, zarówno w warunkach podstawowych, jak i po modyfikacji wywołanej dodatkowymi czynnikami (bTSH, DEX). Można, zatem, przyjąć, że wybrana kompromisowo dawka badanych związków pozwoliła na realizację założonych przez Doktorantkę celów. Następnie, Autorka dysertacji omawia i interpretuje uzyskane wyniki, odnosząc się do obserwacji innych badaczy. Porusza się przy tym sprawnie pomiędzy własnymi i literaturowymi danymi w odniesieniu do każdego zbadanego procesu, z podziałem na poszczególne tkanki, tarczycę i wątrobę. W końcowej części

Rozprawy, Doktorantka formułuje 5 zwięzłych i logicznych wniosków, które są zgodne z celem pracy i pozwalają ustosunkować się do postawionych hipotez badawczych.

Podsumowując ocenę merytoryczną Rozprawy, pragnę zaznaczyć, że przeprowadzone przez Panią mgr K. Kowalik badania, dotyczące niekorzystnego działania hydroksylowanych metabolitów PCB na sekrecję hormonów tarczycy oraz procesy odpowiedzialne za utrzymanie prawidłowego stężenia trijodotyroniny w krwi, a także molekularnych mechanizmów działania tych związków w komórkach tarczycy i wątroby, stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jaki wyznaczyła sobie Doktorantka. Ponadto, stwierdzam, że Autorka Rozprawy opanowała znaczący zakres wiedzy w danej dyscyplinie naukowej. Trafnie określiła założenia dotyczące analizy problemu i z sukcesem zastosowała odpowiednie metody badawcze. Wykazała się umiejętnościami właściwej interpretacji wyników i wyciągania wniosków, co świadczy o jej przygotowaniu do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

4. Wnioski końcowe

- 1) Przedstawiona do oceny Rozprawa doktorska Pani mgr Kingi Kowalik pt. „Oddziaływanie polichlorowanych bifenyli i ich hydroksylowanych metabolitów na syntezę i metabolizm jodotyronin w tarczycy i wątrobie kury (*Gallus domesticus*)” spełnia wszystkie warunki określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami).
- 2) Zauważone podczas wykonywania oceny Rozprawy drobne błędy i nieścisłości nie mają istotnego znaczenia dla wysokiej oceny wartości merytorycznej pracy.
- 3) **Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie o przyjęcie Rozprawy doktorskiej oraz dopuszczenie Pani mgr Kingi Kowalik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Tomasz Mielczak