

dr hab. Mariusz Kasprzak, prof. UZ
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Zielonogórski
ul. prof. Z. Szafrana 1
65-516 Zielona Góra
e-mail: m.kasprzak@wnb.uz.zgora.pl

Zielona Góra, 2022.09.20

Ocena pracy doktorskiej

mgr Łukasz Marcin Kołodziejczyk

pt.: „Wpływ benzo[a]pirenu i aflatoksyny B1 na zmiany morfologiczne i metaboliczne w układzie krwionośnym zarodków kurzych (*Gallus gallus domesticus* L.)

Zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny –Nauki Biologiczne Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie z dnia 9 czerwca 2022, powołującą mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Marcina Kołodziejczyka przedkładam poniższą ocenę.

Benzo[a]piren to substancja znajdująca się w zanieczyszczonym antropogenicznie powietrzu. W trakcie wytwarzania energii z kopalni organicznych do atmosfery uwalniamy duże ilości tej substancji. Znaczne ilości tego związku uwalniamy również w procesach wędzenia mięsa jak i palenia tytoniu. Jakakolwiek dawka tego związku jest dla nas szkodliwa.

Aflatoksyna B1 występuje w źle przechowywanej żywności oraz paszy dla zwierząt. W naszym życiu codziennym praktycznie nie ma możliwości nie mieć kontaktu z nimi. Obydwa związki mają teratogenne, karcinogenne, neurotoksyczne, nefrotoksyczne oraz hepatotoksyczne działanie na różne organizmy. Stąd w pełni uzasadnione było zajęcie się przez doktoranta tymi związkami.

Doktorant przeprowadził badania na zarodkach kurzych. Wysoce toksyczne właściwości badanych przez autora związków są szeroko opisane w literaturze, jednakże nie ma doniesień dotyczących wpływu tych związków na rozwój układu krwionośnego *in ovo*. Jak sam autor pisze „przebieg embriogenezy kury powiela ogólny plan rozwoju zarodkowego dla większości kręgowców” stąd zainteresowanie modelem *in ovo* kury, jednakże w domyśle mamy wpływ tych związków na organizm człowieka, jednakże podawanie tych substancji ludziom w okresie rozwoju prenatalnego jest niewyobrażalne. Stąd bardzo zasadne jest prowadzenie badań na innych organizmach zwierzęcych.

W pracy na 116 stronach maszynopisu przedstawiono zagadnienia wyszczególnione w tytule pracy. Dane liczbowe zostały zebrane i uporządkowane w 3 tabelach i zaprezentowane na 44 rycinach. Wszystkie tabele zostały zredagowane poprawnie, a ich układ i opisy nagłówkowe informują przejrzysto i wyczerpująco o uzyskanych wynikach.

Na początku pracy autor umieścił słownik najczęściej stosowanych pojęć, co znacząco ułatwia czytanie rozprawy. W przeważającej części pracy, autor posługuje się bardzo ładnym i jednoznacznie zrozumiałym językiem polskim. Ma umiejętność jasnego, precyzyjnego i syntetycznego formułowania myśli.

Zastosowany układ struktury pracy doktorskiej odpowiada standardom przyjętym dla prac biologicznych. Poszczególne rozdziały, objętościowo odpowiadają randze poruszanej w nich problematyce. Opracowując rozprawę autor korzystał z 96 pozycji piśmiennictwa. Zdecydowaną większość pozycji literaturowych stanowią art. naukowe, publikowane w czasopismach o wysokim współczynniku cytowań. Większość cytowanych artykułów została opublikowana po 2000 roku w tym dwa artykuły pochodzą z 2020 roku. Jest to dowód na to, że doktorant na bieżąco śledził informacje pojawiające się na badany temat. Nie lekceważy również wiedzy z bardzo odległych czasów (jedna pozycja opublikowana została w 1933 roku). Prawidłowość cytowani nie budzi moich żadnych zastrzeżeń.

Eksperyment został prawidłowo zaplanowany i zrealizowany. Procedury badawcze zostały poprawnie i szczegółowo opisane, osoba która chciałaby powtórzyć eksperyment nie będzie miała z tym większych problemów. Zastosowane metody statystyczne również nie budzą moich zastrzeżeń.

W przeprowadzonym eksperymencie doktorant badał wpływ benzo[a]piranu – wielopierścieniowego węglowodoru aromatycznego oraz aflatoksyny B1 – toksyny grzybiczej, na układ krwionośny kury w okresie rozwoju prenatalnego. W postawionych aż 7 hipotezach badawczych badał wpływ dwóch silnie toksycznych substancji na topografię, morfologię i histologię serca i naczyń krwionośnych. Badał również wpływ tych toksyn na reakcje układu antyoksydacyjnego, w 14. dniu embriogenezy kury domowej (*Gallus domesticus*). Do eksperymentu autor użył 350 jaj wylęgowych brojlerów linii hybrydowej Ross 308. W 6. dniu inkubacji, metodą *in ovo* autor podawał benzo[a]piren w stężeniach 0,1; 0,5; i 1 mg/kg masy jaj oraz aflatoksynę B1 w stężeniach: 80, 120 i 240 ng/kg masy jaj. Zastosowane stężenia toksyn były poprzedzone pilotażowymi badaniami uwzględniającymi śmiertelność zarodków zależną od stężenia.

Niestety w prezentowanej pracy autor nie podaje wyników dotyczących śmiertelności zarodków przy zastosowanych stężeniach toksyn.

W metodyce autor pisze, że do badań użył 350 jaj z „efektywnością pozyskania zarodków przydatnych eksperymentalnie na poziomie około 68%” –*nie rozumiem tej informacji, dlaczego określa liczbę analizowanych embrionów w procentach a nie podaje konkretnej wartości? Czym była spowodowana taka efektywność pobierania zarodków?*

Brakuje mi również zdjęć czy też schematów procesów preparowania tkanek, uatrakcyjniłoby to znacząco edytorską stronę pracy.

Zgodnie z oczekiwaniami uzyskał zmiany patologiczne we wszystkich zaproponowanych stężeniach benzo[a]pirenu oraz aflatoksyny B1.

Szeroko i precyzyjnie opisany w rozprawie rozwój zarodka kury stwarza doskonale tło do zrozumienia zmian rozwojowych spowodowanych działaniem benzo[a]pirenu oraz aflatoksyny B1.

Bardzo wysoko oceniam świetną orientację autora w mechanizmach działania układów antyoksydacyjnych. Profesor G. Bartosz w swojej książce „Druga twarz tlenu” w bardzo przystępny sposób tłumaczy procesy pro i anty oksydacyjne; mgr Ł. M. Kołodziejczyk poszedł w jego ślady. Precyzyjnie wyjaśnia zasady działania najważniejszych enzymów antyoksydacyjnych.

W recenzowanej pracy autor, badał aktywność enzymów antyoksydacyjnych: katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej oraz stężenie glutationu zredukowanego i dialdehydu malonowego w tkance serca i wybranych naczyń krwionośnych zarodków kury domowej.

Do pęcherzyka żółtkowego, w 6. dniu inkubacji jaj w trzech różnych stężeniach podawano: benzo[a]piren i aflatoksynę B1. Badania przeprowadzono również w grupie kontrolnej, której podawano jedynie rozpuszczalnik toksyn (olej rzepakowy) oraz w grupie nie poddawanej żadnym zabiegom. Po dwóch tygodniach przeprowadzono analizy rozwojowe tkanek oraz zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych.

Wyniki pracy autor podzielił na wiele podrozdziałów podając każdy parametr w osobnym podrozdziale –trochę mniej to razi. *Uważam, że można to było opisać w dwóch podrozdziałach z podziałem na badane związki –podobnie jak uczynił to w bardzo dobrze opisanej dyskusji.*

Autor stwierdził zmiany przerostowe w badanych narządach spowodowane niewydolnością krążeniową pod wpływem zastosowanych toksyn. Intoksykacja wywołała również wzmożenie procesów pro oksydacyjnych w tkankach układu serowo-naczyniowego, które autor słusznie uzasadnia aktywacją procesów obronnych organizmu.

Zamieszczone pod koniec pracy wnioski, są syntetycznym podsumowaniem pracy. Autor udowodnił osiągnięcie celu pracy jak i potwierdził sformułowane na początku hipotezy badawcze.

Autor manuskryptu dogłębnie zna procesy fizjologiczne, biochemiczne jak i histologię zarodków kurzych co umożliwia mu swobodne wyjaśnianie omawianych zagadnień.

Praca powstała na podstawie bardzo dużego wkładu pracy w liczne analizy biochemiczne jak i niezwykle pracochłonne prace histologiczne. Liczba użytych w eksperymencie jaj, jak i zastosowana metodyka eksperymentu nie budzą żadnych zastrzeżeń.

Doceniając wkład pracy jak i wysoką wartość naukową przeprowadzonych i opracowanych badań przez mgr. Łukasza Kołodziejczyka wnoszę o rozważenie przez Wysoką Radę możliwości jej wyróżnienia.

Konkluzja:

Przedstawiona do oceny praca mgr. Łukasza Marcina Kołodziejczyka spełnia wymagania określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Wnioskuje do Rady Dyscypliny o dopuszczenie Pana mgr. Łukasza Kołodziejczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Mariusz Kasprzak prof. UZ

