



Prof. dr hab. Andrzej Sechman
Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Al. Mickiewicza 24/28
e-mail: andrzej.sechman@urk.edu.pl

Kraków, 15 lipca 2022 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Łukasza Kołodziejczyka

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

wykonanej w Instytucie Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji
Narodowej w Krakowie pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Greń, prof. UP

1. Podstawa formalno-prawna wykonania recenzji

Ocenę Pracy doktorskiej wykonałem w odpowiedzi na pismo Pana dr hab. Andrzeja Kornasia, prof. UP, Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne, z dnia 9 czerwca 2022r, informujące, że Rada Dyscypliny na posiedzeniu w dniu 8 czerwca 2022r. podjęła uchwałę powołującą mnie na recenzenta ocenianej rozprawy doktorskiej. Ocena pracy została wykonana zgodnie z wymogami określonymi w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 poz. 1789 ze zm.).

2. Problem naukowy i znaczenie badań

Badania prezentowane w ocenianej rozprawie doktorskiej dotyczą wpływu benzo[α]pirenu, związku organicznego należącego do grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA), oraz aflatoksyny B1 – toksyny grzybiczej, na wybrane parametry morfologiczne oraz wskaźniki biochemiczne serca i naczyń krwionośnych embrionów kury domowej (*Gallus domesticus*) izolowanych w 14 dniu embriogenezy. Autor pracy wykorzystując powszechnie stosowany w badaniach model embrionu kurzego oraz szereg metod analitycznych skupił się na określeniu oddziaływania wspomnianych związków chemicznych na topografię i morfologię mięśnia sercowego, jego histologię oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych, stężenie glutatjonu zredukowanego i aldehydu malonowego w tkance mięśnia sercowego i sieci naczyniowej krążenia pozazarodkowego.

Głównym źródłem benzo[α]pirenu, jak również innych WWA, zaliczanych do grupy trwałych zanieczyszczeń organicznych, są procesy spalania w sektorze komunalnym i mieszkaniowym, jak również procesy produkcyjne, szczególnie produkcja koksu. W Polsce ponad 80% obecnych w powietrzu WWA jest wynikiem spalania paliw kopalnych. Istotne źródło stanowi także sektor transportu. Innym źródłem tych związków w organizmie jest palenie tytoniu oraz spożywanie żywności poddanej wędzeniu lub grillowaniu. Benzo[α]piren jest najlepiej poznanym związkiem zaliczanym do grupy WWA; został po sklasyfikowany przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem jako związek rakotwórczy, działający bezprogowo, tzn. narażenie na każde stężenie substancji może powodować zmiany



nowotworowe. W literaturze światowej można znaleźć prace dotyczące wpływu benzo(α)pirenu na funkcje poszczególnych układów organizmu, chociaż molekularny mechanizm działania tego związku nie został dostatecznie wyjaśniony. Drugą toksyną, której oddziaływanie badano w niniejszej pracy, jest aflatoksyna B1. Jest to mykotoksyna o wysokim poziomie toksyczności, która podobnie jak inne aflatoksyny stanowi ważny problem natury praktycznej w medycynie oraz rolnictwie. Związki te mogą zakażać żywność na każdym etapie jej produkcji. Ich obecność wykazywano w paszach dla zwierząt oraz wielu produktach żywnościowych przechowywanych w niewłaściwych warunkach fizyko-chemicznych. Podobnie jak związki z grupy WWA, wykazują one działanie mutagenne, teratogenne i hepatotoksyczne. Interferują z DNA komórek docelowych, wpływają na transkrypcję genów i wywołują zmiany rakowe.

Pomimo znaczącej liczby publikacji dotyczących wpływu benzo[α]pirenu oraz aflatoksyny B1 na czynność poszczególnych układów organizmu, jednym z najmniej poznanych zagadnień jest problem negatywnego oddziaływania tych związków na czynność mięśnia sercowego zarówno u ludzi, jak i zwierząt. W tym kontekście podjęte przez Doktoranta badania są znaczące, aktualne i ważne, przede wszystkim w aspekcie poznawczym zmierzającym do wyjaśnienia wpływu WWA i mykotoksyn na czynność mięśnia sercowego oraz układów antyoksydacyjnych w komórkach tworzących miokardium oraz tkankach naczyń krwionośnych.

3. Ogólna charakterystyka pracy i ocena merytoryczna

Rozprawa doktorska Pana mgr Łukasza Kołodziejczyka została przygotowana w postaci klasycznej monografii naukowej, obejmującej łącznie 116 numerowanych stron. Została ona podzielona na 6 rozdziałów, typowych dla dysertacji doktorskich: „Wstęp” (22 strony), „Materiał i metody” (11 stron), „Wyniki” (46 stron), „Dyskusja” (11 stron), „Wnioski” (2 strony), „Spis literatury” (10 stron). Zostały one poprzedzone streszczeniami polsko- i anglojęzycznym, wykazem skrótów i akronimów oraz spisem treści. W pracy zamieszczono również „Aneks”, w którym znajduje się spis rycin i tabel. Praca została przygotowana starannie pod względem merytorycznym i edytorskim, a podzielenie tekstu poszczególnych rozdziałów na podrozdziały ułatwia poruszanie się po tekście i analizę uzyskanych wyników badań.

W pierwszym podrozdziale **Wstępu** Autor dysertacji przedstawia zalety zarodka kury domowej jako organizmu modelowego w embriologii, zwracając szczególną uwagę na jego znaczenie w badaniach toksykologicznych. Następnie zapoznaje czytelnika z zagadnieniami dotyczącymi przebiegu procesu embriogenezy u kury domowej oraz prawidłowego i patologicznego rozwoju układu sercowo-naczyniowego u tego gatunku. W dwóch kolejnych podrozdziałach **Wstępu** Autor opisuje w sposób syntetyczny występowanie i źródła benzo[α]pirenu i aflatoksyny B1 w środowisku, molekularny mechanizm i toksyczne ich działanie w komórkach organizmów żywych. Ponieważ ekspozycja na obydwie toksyny w komórkach docelowych może wywoływać stres oksydacyjny, w kolejnej części **Wstępu** Autor zapoznaje czytelnika z wybranymi i oznaczanymi markerami stresu oksydacyjnego, opisując rolę katalazy, dysmutazy nadtlenkowej, peroksydazy glutationowej i glutationu zredukowanego w obronie antyoksydacyjnej, a także znaczenie dialdehydu malonowego jako markera uszkodzeń oksydacyjnych. Reasumując uważam, że rozdział „Wstęp” został dobrze przygotowany. Szkoda, że opisy dotyczące przebiegu embriogenezy i rozwoju układu krwionośnego w okresie embriogenezy kury domowej opierają się jedynie na kilku pozycjach



piśmiennictwa, w tym na podręczniku „Embriologia” Pani Prof. Zofii Bielańskiej-Osuchowskiej. Ponadto uważam, że w omawianym rozdziale Autor mógł dołączyć przynajmniej kilka rysunków lub schematów, które ułatwiałyby czytelnikowi zrozumienie opisywanych procesów oraz mechanizmów.

W kontekście przedstawionych danych literaturowych dotyczących negatywnego wpływu benzo[α]pirenu i aflatoksyny B1 na procesy zachodzące w komórkach organizmu, Autor pracy w podrozdziale 1.7. „**Cel i zakres pracy**”, stanowiącym ostatni podrozdział Wstępu, najpierw podaje cel badań, a następnie formułuje 8 hipotez badawczych, z których cztery pierwsze dotyczą benzo[α]pirenu, a następne cztery aflatoksyny B1. Hipotezy te są zgodne z celami badań, lecz ich kolejność nie jest adekwatna do kolejności realizowanych zadań badawczych i oznaczeń przedstawionych w rozdziałach „Materiał i metody” i „Wyniki”. Ponadto zdaniem recenzenta najpierw powinny być sformułowane hipotezy badawcze, a następnie cele badań, a następnie sposoby ich realizacji.

Autor podaje, że celem badań było określenie wpływu wczesnej ekspozycji zarodka kury domowej na benzo[α]piren i aflatoksynę B1 na morfologię mięśnia sercowego i naczyń krwionośnych w trakcie rozwoju embrionalnego, określenie charakteru zmian patologicznych i ich związku z wybranymi parametrami biochemicznymi. W przeprowadzonych badaniach analizowano najważniejsze parametry morfometryczne serca, aktywność enzymów antyoksydacyjnych: katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej oraz stężenie glutationu zredukowanego i dialdehydu malonowego w tkance serca i wybranych naczyń krwionośnych w 14 dniu inkubacji. Cel badań został prawidłowo nakreślony, a następnie zrealizowany poprzez zaplanowanie odpowiedniego doświadczenia, którego wyniki zamieszczono w dalszej części dysertacji.

W rozdziale **Materiał i metody**, Autor najpierw opisuje przebieg eksperymentu, w którym wykorzystano 200 jaj wylęgowych brojlerów linii hybrydowej Ross 308 pozyskanych w Zakładzie Wylęgu Drobni w Łęzkowicach. Jaja inkubowano w standardowych warunkach, przy czym w 6 dniu inkubacji, do zarodków, metodą *in ovo*, podawano benzo[α]piren (w dawkach: 0, 0,1; 0,5 i 1 mg/kg masy jaja) lub aflatoksynę B1 (w dawkach 0, 80, 120 i 240 ng/kg masy jaj). Oprócz grupy kontrolnej, w każdym z doświadczeń utworzono również grupę, w której jaja nie były iniekowane (tzw. grupa „intakt”). W 14 dniu inkubacji zarodki uśmiercano przez dekapitację, a następnie izolowano serce oraz wybrane skrawki naczyń krwionośnych. Tkanki podzielono na dwie grupy: pierwszą - przeznaczoną do badań histologicznych oraz drugą – do badań biochemicznych. Układ doświadczeń, podział na grupy oraz ich liczebność przedstawiono w Tabeli 1. W dalszej części omawianego rozdziału Autor przedstawia sposób przygotowania roztworów benzo[α]pirenu i aflatoksyny B1 do iniekcji, szczegółowo opisuje przebieg preparatyki histologicznej, barwienia preparatów hematoksyliną i eozyną oraz techniką Trichrome, a następnie metodykę prowadzonych analiz morfometrycznych poszczególnych części serca zarodków wykonanych na wcześniej przygotowanych preparatach topograficznych. Szkoda, że Autor nie pokusił się o precyzyjne przedstawienie na rycinach sposobu wykonywania preparatów topograficznych, a także pomiaru poszczególnych parametrów morfometrycznych serca. W kolejnym podrozdziale, Autor zamieszcza opis metodyki oznaczania wspomnianych wcześniej enzymów antyoksydacyjnych, glutationu zredukowanego oraz dialdehydu malonowego, a także białka w badanych tkankach. W ostatnim podrozdziale znajduje się dokładny opis analizy statystycznej uzyskanych wyników badań.

W odniesieniu do tego rozdziału pracy proszę Doktoranta, aby w czasie obrony pracy wyjaśnił:



- ✓ czy jaja były prześwietlane w początkowej fazie inkubacji, a jeśli tak to jaki był odsetek zamarłych zarodków?
- ✓ czy liczba zamarłych zarodków była uwzględniana podczas nakładu jaj do inkubatora?
- ✓ czy w porównaniu z grupą kontrolną lub „intakt” obserwowano wpływ stosowanych dawek benzo[α]pirenu lub aflatoksyny B1 na śmiertelność zarodków?
- ✓ w jaki sposób podawano poszczególne toksyny do jaj? Co Autor miał na myśli pisząc, że substancje podawano do „pęcherzyka żółtkowego”?
- ✓ dlaczego względna wilgotność w inkubatorze wynosiła 65%, skoro optymalna powinna wynosić 50%?
- ✓ w jakim celu stosowano podczas inkubacji reżim świetlny 12L:12D?

Uzyskane wyniki badań zostały dobrze udokumentowane i zaprezentowane na 42 rycinach i dwóch tabelach w następnym rozdziale pracy pt. „**Wyniki**”. Rozdział ten został podzielony aż na 22 podrozdziały. Zdaniem recenzenta nie było potrzeby wyodrębniania tak dużej liczby podrozdziałów, którą można zredukować przynajmniej o połowę. Ponadto lepiej byłoby najpierw przedstawić wpływ benzo[α]pirenu na badane parametry w sercu i naczyniach krwionośnych, a następnie aflatoksyny B1, co odpowiadałoby kolejności hipotez badawczych i podziałowi treści zastosowanym w rozdziale Dyskusja. Badania wykazały, że zarówno benzo[α]piren jak i aflatoksyna B1 w sposób negatywny oddziałują na badane komponenty układu krwionośnego zarodków kurzych. Po ekspozycji zarodków na obydwie toksyny stwierdzono wystąpienie uszkodzeń tkanki serca, dawko-zależnych zmian części analizowanych parametrów morfometrycznych mięśnia sercowego (głównie o charakterze przerostowym) oraz zmian w aktywnościach enzymów antyoksydacyjnych, stężeniach glutationu zredukowanego i aldehydu malonowego w badanych tkankach, a także osłabienie rozwoju sieci naczyniowej krążenia pozazarodkowego w przypadku grup traktowanych najwyższymi dawkami badanych toksyn. Uzyskane wyniki badań wskazują, że obydwie toksyny istotnie modyfikują równowagę oksydoredukcyjną w tkankach układu sercowo-naczyniowego zarodków kurzych. Podawanie benzo[α]pirenu, toksyny zaburzającej metabolizm komórkowy, skutkuje aktywacją niektórych mechanizmów obronnych oraz kompensacyjnych. Z kolei aflatoksyna B1 w tkance mięśnia sercowego indukuje silną odpowiedź obronną wykorzystującą enzymatyczne antyoksydanty, przy równoczesnym obniżeniu stężenia glutationu zredukowanego oraz wzroście stężenia aldehydu malonowego. Wyniki te korespondują z danymi literaturowymi dotyczącymi wpływu benzo[α]pirenu i aflatoksyny B1 na organizmy innych zwierząt i człowieka, a także z efektami oddziaływania niektórych innych toksyn na rozwój zarodków kurzych. Dostarczają wiele nowych informacji na temat skutków ekspozycji układu krwionośnego na te substancje w modelu *in ovo*.

W odniesieniu do wyników badań chciałbym prosić Doktoranta, aby w czasie obrony pracy ustosunkował się do następujących kwestii:

- ✓ w przypadku pomiarów morfometrycznych serca, zanotowano zwiększenie niektórych badanych parametrów w grupie kontrolnej (np. powierzchnia prawej komory); jaka mogła być tego przyczyna?
- ✓ czy obserwowane zmiany morfologiczne i histopatologiczne mogą być wynikiem oddziaływania badanych toksyn na procesy apoptozy i proliferacji kardiomiocytów lub komórek naczyń krwionośnych?



- ✓ *iniekcje benzo[α]pirenu powodowały zmniejszenie, natomiast aflatoksyny B1 zwiększenie stężenia aldehydu malonowego w tkance mięśnia sercowego; jak można wyjaśnić tę różnicę?*
- ✓ *czy benzo[α]piren i/lub aflatoksyna B1 mogą oddziaływać na ekspresję i/lub aktywność enzymów uczestniczących w pierwszej lub drugiej fazie procesu ich detoksykacji?*

W rozdziale **Dyskusja**, Doktorant w logiczny i umiejętny sposób przedstawia analizę uzyskanych przez siebie wyników badań oraz konfrontuje je z danymi literaturowymi. Rozdział ten został podzielony na dwa główne podrozdziały; pierwszy dotyczący wpływu benzo[α]pirenu na badane parametry układu krwionośnego, a drugi dotyczący wpływu aflatoksyny B1 na te parametry. Lektura tego rozdziału dowodzi erudycji Autora, znajomości przedmiotu badań oraz dojrzałości naukowej. Czytelnikowi zaś ułatwia prześledzenie znaczenia uzyskanych wyników dotyczących wpływu benzo[α]pirenu i aflatoksyny B1 na funkcję komórek miokardium oraz naczyń krwionośnych.

W pracy Autor zamieścił również osobny rozdział pt. **Wnioski**, w którym w sposób syntetyczny przedstawił najistotniejsze wyniki i konkluzje. Zdaniem recenzenta lepiej byłoby najpierw przedstawić wnioski dotyczące działania benzo[α]pirenu, a następnie aflatoksyny B1. Nie mniej jednak zamieszczone wnioski, będące jednocześnie swoistym podsumowaniem uzyskanych wyników badań, są prawidłowo sformułowane i nie budzą zastrzeżeń recenzenta.

W rozdziale zatytułowanym **Bibliografia** Autor cytuje 96 pozycji piśmiennictwa, głównie anglojęzycznego. Obejmują one szeroki wachlarz najnowszych publikacji naukowych (78% stanowią prace opublikowane po roku 2000) ściśle związanych z tematem pracy doktorskiej i wykorzystanych przez Doktoranta w trakcie przygotowania manuskryptu ocenianej dysertacji. Szkoda, że Autor pracy nie pokusił się o dołączenie do bibliografii przynajmniej kilku publikacji autorów z Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, którzy od wielu lat prowadzą badania na modelu embrionu kurzego. Wyniki tych badań są ściśle związane z tematem ocenianej rozprawy doktorskiej.

4. Podsumowanie i wniosek końcowy

Przeprowadzone przez Doktoranta badania dotyczące wpływu benzo[α]pirenu i aflatoksyny B1 na morfologię mięśnia sercowego i naczyń krwionośnych oraz ich oddziaływania na układy antyoksydacyjne w tych tkankach w trakcie rozwoju embrionalnego zarodka kury domowej, stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, nakreślonego w celu badań. Autor dysertacji opanował znaczący zakres wiedzy związanej z przedmiotem badań i jednocześnie dyscypliną nauki biologicznej. Wykazał się umiejętnościami zaprojektowania doświadczeń, wykorzystania wielu metod badawczych i technik laboratoryjnych do oznaczenia badanych parametrów, a także opracowania uzyskanych wyników badań i ich właściwej interpretacji, co świadczy o jego przygotowaniu do samodzielnej pracy naukowej.

Konkludując, uważam przedstawioną mi do oceny pracę doktorską Pana mgr Łukasza Kołodziejczyka za interesującą rozprawę naukową. Została ona napisana w sposób przejrzysty i zrozumiały, a Autor potrafił przedstawić trudne zagadnienia w przystępnej formie. Mając powyższe na uwadze stwierdzam jednoznacznie, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska pt. *"Wpływ benzo[α]pirenu i aflatoksyny B1 na zmiany morfologiczne i metaboliczne w układzie krwionośnym zarodków kurzych (Gallus domesticus L.)"* spełnia warunki określone



UNIWERSYTET ROLNICZY

im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt

Katedra Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt

w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz. U. 2017 poz. 1789 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie wniosek o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pana mgr Łukasza Kołodziejczyka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.