

Dr hab. Barbara Tombarkiewicz

Kraków, 27.04. 2018 r.

Zakład Weterynarii, Rozrodu i Dobrostanu Zwierząt

Instytut Nauk Weterynaryjnych

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Semli-Kurzawa pt.:

„Wpływ akrylamidu, kationów magnezu i cynku na parametry morfologiczne krwi oraz status antyoksydacyjny w wybranych narządach myszy

wykonanej w Zakładzie Fizjologii Zwierząt i Toksykologii Instytutu Biologii

Uniwersytetu Pedagogicznego w Krakowie

pod kierunkiem dr hab. Grzegorza Formickiego, prof. UP

Niekorzystne zmiany środowiska przyrodniczego, będące wynikiem postępu cywilizacyjnego, którego stan może często przekraczać możliwości adaptacyjne i bariery ochronne żywego organizmu, znacznie zmniejszają szansę przetrwania większości gatunków, w tym także człowieka.

W renomowanym czasopiśmie naukowym Lancet, w numerze 391 z 2018 r. na stronach 264-512 opublikowany został obszerny raport na temat wpływu zanieczyszczenia środowiska na zdrowie ludzi. Z raportu wynika, że skażenie powietrza, wody i gleby stanowi najważniejszą środowiskową przyczynę chorób i przedwczesnych zgonów we współczesnym świecie. Łączna liczba takich zgonów w 2015 r. została oszacowana na 9 mln (co stanowi 16 proc. wszystkich zgonów), a prawdopodobnie jest jeszcze gorzej, gdyż autorzy przyznają, że są to dane niedoszacowane. Według przedstawionego raportu, w Polsce na milion mieszkańców przypada rocznie 1047 zgonów spowodowanych zanieczyszczeniem środowiska. Z powyższego raportu można się ponadto dowiedzieć, że począwszy od 1950 r. na świecie wyprodukowano ponad 140 tys. różnego rodzaju chemikaliów, z których około 5 tysięcy wytwarzanych jest na masową skalę. Niestety, tylko około połowa z tych ostatnich została w pełni przebadana pod kątem bezpieczeństwa zdrowotnego. Tak więc w naszym środowisku

znajduje się wciąż bardzo wiele potencjalnie groźnych toksyn, których wpływ na zdrowie nie jest jeszcze znany.

Jednym z ksenobiotyków powszechnie występujących w środowisku jest akrylamid (AA). Związek ten oraz jego pochodne wykorzystywane są między innymi do produkcji nawozów sztucznych, farb, lakierów, kosmetyków, papieru, materiałów budowlanych oraz jako wypełniacz filtrów do oczyszczania wody. Związek ten powstaje również w wyniku takich procesów jak smażenie, pieczenie oraz grillowanie produktów zawierających białka i cukry w temp. powyżej 170°C. Do organizmu akrylamid przedostaje się drogą pokarmową, wziewną oraz przez skórę. W wątrobie ulega on przemianom metabolicznym do glicydamidu będącego związkiem o wysokim potencjale kancerogennym.

W świetle powyższych informacji jasnym się staje, że narażenie ludzi na działanie akrylamidu i jego pochodnych jest powszechne, a pojęte przez doktorantkę badania nad wpływem tego związku na wybrane parametry zdrowia oraz nad poszukiwaniem substancji chroniących organizm przed toksycznym działaniem akrylamidu, są w pełni zasadne i ważne nie tylko z naukowego ale również z utylitarnego punktu widzenia.

Ocena formalna

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska liczy 121 stron tekstu, w tym 5 rycin, 14 tabel, 54 wykresy i 72 fotografie. Do pracy dołączone jest streszczenie w języku polskim i języku angielskim, spis piśmiennictwa obejmujący 265 cytowanych pozycji literaturowych - głównie anglojęzycznych oraz spis rycin, tabel, wykresów i fotografii. Autorka zastosowała klasyczny układ pracy z podziałem na Wstęp, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski, Bibliografię, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz stosowanych w pracy skrótów.

Praca ma charakter pracy naukowo-badawczej. Napisana jest poprawnym językiem z wykorzystaniem naukowej terminologii, w sposób przejrzysty i logicznie spójny.

Poniżej zamieszczam uwagi i omówienie poszczególnych rozdziałów.

Wstęp

Stosunkowo obszerny, 25 stronicowy rozdział Wstęp napisany jest poprawnie. Dla przejrzystości przekazu doktorantka podzieliła go na 8 głównych podrozdziałów. W pierwszym z nich Autorka przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat funkcji krwi,

wątroby, nerek i śledziony w metabolizmie ksenobiotyków, a w czterech następnych scharakteryzowała właściwości akrylamidu i jego pochodnych a także drogi jego wchłaniania, rozmieszczenie w organizmie, metabolizm, cytotoksyczność oraz rolę w indukcji stresu oksydacyjnego i apoptozy. W następnych dwóch podrozdziałach Doktorantka omówiła rolę jonów magnezu i cynku (będących kofaktorami kilkuset substancji enzymatycznych) w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu, między innymi poprzez udział w biotransformacji ksenobiotyków i neutralizacji wolnych rodników.

Szczegółowe omówienie powyższych zagadnień w sposób jasny i logiczny uzasadnia celowość podjętych badań wskazując, że ich wyniki mogą być pomocne przy opracowywaniu prostych metod wspomagania detoksykacji i ochrony organizmu przed toksycznym działaniem akrylamidu.

Na podstawie informacji przedstawionych we wcześniejszych podrozdziałach Wstępu, Autorka poprawnie sformułowała trzy hipotezy badawcze, do weryfikacji których przyjęła 6 celów roboczych.

Materiał i metody

W rozdziale tym Autorka szczegółowo opisała układ doświadczenia oraz zastosowane metody badawcze.

Doświadczenie obejmowało badania *in vivo*, które prowadzone były w dwóch etapach na łącznej liczbie 80 samców myszy białej (*Mus musculus L.*) szczepu swiss oraz badania *in vitro* prowadzone na komórkach szpiku kostnego królików rasy nowozelandzkiej białej.

W I etapie badań *in vivo* myszom z grup doświadczalnych podawano AA oraz jony magnezu, a w II etapie AA i jony cynku w celu zbadania wpływu tych substancji na parametry krwi w zależności od wielkości dawki oraz od tego czy substancje podawane były osobno czy łącznie. W każdym etapie doświadczenia badane substancje podawane były przez dziesięć kolejnych dni. Krew do badań pobierano z żyły ogonowej po 24 godz. od pierwszego podania AA i jonów Mg^{2+} lub Zn^{2+} oraz po 24 godz. od ostatniego podania tych substancji, po czym myszy były uśmiercane i pobierano od nich wątrobę, nerki i śledzionę w celu wykonania badań biochemicznych i histologicznych.

Badania *in vitro* miały na celu ocenę wpływu akrylamidu oraz jonów cynku i magnezu na przeżywalność komórek szpiku kostnego.

Użyte w badaniach metody są nowoczesne, sprawdzone i odpowiednie do oznaczeń badanych parametrów a metody statystyczne prawidłowo dobrane i wystarczające do oceny uzyskanych

wyników. Podkreślić również pragnę mnogość oznaczeń i związany z tym duży nakład pracy jaki Pani magister musiała włożyć w realizację badań.

Niemniej jednak uwagę moją zwróciły pewne niedopowiedzenia, a mianowicie:

- czy myszy przeszły etap aklimatyzacji do warunków doświadczenia oraz oswojenia (*handling*) z eksperymentatorem
- od ilu królików pobrany był materiał do badań *in vitro*
- brak informacji jakie czynniki (efekty główne) były uwzględniane w dwuczynnikowej analizie wariancji

Ponadto pragnę zwrócić uwagę Autorki na zdarzające się nieścisłości językowe np.;

Str. 32 (linia 4 i 15) „W trakcie doświadczenia zwierzęta były hodowane na standardowej diecie”; proponuję „... zwierzęta były żywione standardową paszą”

Str. 35 (linia 4 i 5) zamiast „stężenie białych krwinek, ...limfocytów, ...erytrocytów” proponuję zgodnie z nazewnictwem „liczba białych krwinek...” itd., sugeruję nomenklaturę taką wprowadzić w całej pracy.

Wyniki

Uzyskane wyniki Autorka opisała w tekście rozdziału oraz przedstawiła w tabelach, na wykresach i fotografiach spod mikroskopu. Moje uwagi do tej części dysertacji są następujące:

- jak słusznie zauważyła Doktorantka, analizy laboratoryjne krwi są podstawowymi badaniami diagnostycznymi w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej i dostarczają istotnych informacji na temat stanu zdrowia ludzi i zwierząt. Za prawidłowe (normatywne) wyniki analizy morfologicznej krwi przyjmuje się zwykle wartości z określonego przedziału. Szkoda, że dla określenia wpływu badanych substancji na oceniane parametry krwi nie pobrano jej od myszy również przed rozpoczęciem podawania badanych substancji, co pozwoliłoby na prześledzenie zmian w obrazie krwi pod wpływem AA oraz jonów magnezu i cynku u tych samych zwierząt w obrębie grup badawczych.

- opis tabel i wykresów zawierających sformułowania np. „procentowe zmiany stężenia WBC w krwi żyłnej myszy po 24 godz. i 10 dniach od podania AA i jonów Mg^{2+} ” może wprowadzać czytelnika w błąd, sugerując, że drugie pobranie krwi miało miejsce po 10 dniach od zakończenia podawania substancji badanych, podobnie np. „średnia aktywność fosfatazy zasadowej (ALP) w wątrobie myszy po 10 dniach od podaniu AA i jonów Zn^{+} ” itp.

- czym Pani tłumaczy znaczący wzrost liczby białych krwinek przy drugim pobraniu krwi w grupach kontrolnych obydwu etapów doświadczenia.

Dyskusja

W mojej opinii rozdział ten jest bardzo dobrze opracowany. W oparciu o dostępne piśmiennictwo, na 20 stronach maszynopisu, Autorka przeprowadziła bardzo wnikliwą i szczegółową, a jednocześnie krytyczną analizę wyników badań własnych. W rozdziale tym Doktorantka nie tylko omówiła uzyskane wyniki na tle literatury, ale podjęła również próbę wyjaśnienia mechanizmów wzajemnych oddziaływań pomiędzy akrylamidem a jonami cynku i magnezu, co jest szczególnie cenne ze względu na fakt, że w literaturze brak jest szczegółowych badań nad charakterem wzajemnych oddziaływań między tymi substancjami. Poznanie wzajemnych interakcji pomiędzy czynnikami chemicznymi jest bardzo ważne w kontekście badań toksykologicznych. W przeprowadzonym doświadczeniu Doktorantka m.in. wykazała, że podanie myszom akrylamidu spowodowało u nich zmiany morfologiczne krwi, zmiany histopatologiczne w wątrobie, nerkach i śledzionie oraz zaburzenie równowagi oksydacyjno-redukcyjnej, a suplementacja jonami cynku i magnezu powodowała częściowy powrót tych parametrów do wartości kontrolnych, co wskazuje na ochronne działanie zastosowanych jonów na toksyczne działania akrylamidu.

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka sformułowała 5 wniosków, które potwierdzają słuszność postawionych hipotez badawczych. Sugeruję jednak drobną korektę sposobu przedstawienia wniosków, a mianowicie skrócenie ich poprzez pominięcie informacji, które znajdują się w rozdziale Wyniki i Dyskusja.

We wniosku pierwszym proponuję zmianę sformułowania „Przeprowadzone badania wykazały...” na „Przeprowadzone badania potwierdziły... itd. aż do momentu „a suplementacja magnezem...” na „a uzyskane wyniki badań własnych wykazały, że suplementacja magnezem...itd”

Podsumowanie

Przedstawiona mi do oceny praca została opracowana w sposób staranny i niewątpliwie jest wartościowa pod względem naukowym i utylitarnym. Na uwagę zasługuje bardzo dobre przygotowanie merytoryczne Autorki oraz szeroki, wymagający ogromu pracy zakres badań. Uzyskane wyniki niewątpliwie poszerzyły wiedzę na temat ochronnego wpływu jonów magnezu i cynku na toksyczne działanie akrylamidu na organizmy zwierzęce. Uwagi oraz sugestie wymienione z obowiązku recenzenta w niczym nie umniejszają wartości pracy, którą oceniam wysoko, a drobne błędy stylistyczne i edytorskie zostały naniesione w manuskrypcie przedstawionej mi do oceny pracy.

Uważam, że przedłożona mi do recenzji praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie nr 595 o Tytule Naukowym Stopniach Naukowych oraz Tytule Naukowym i Stopniach Naukowych w Dziedzinie Sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. Nr 65, poz. 595) wraz z późniejszymi zmianami.

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Semli - Kurzawa do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Barbara Tombarkiewicz