

dr hab. inż. Małgorzata Dżugan, prof UR

Katedra Chemii i Toksykologii Żywności
Wydział Biologiczno-Rolniczy
Uniwersytet Rzeszowski
e-mail: mdzugan@ur.edu.pl, tel. 178721619

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr inż. **Marty Batoryny** pt. *Changes in the antioxidative status of developing brain under acrylamide influence with the use of in ovo model*

Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr inż. Marty Batoryny została wykonana w Zakładzie Fizjologii Zwierząt i Toksykologii Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie pod kierunkiem dra hab. Grzegorza Formickiego, prof. UP. Rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnego tematycznie zbioru 3 artykułów, dwóch opublikowanych w renomowanych czasopismach ujętych w bazie JCR (łącznie współczynnik oddziaływania IF 2,69, 50 pkt. wg obowiązującej listy MNiSW) oraz manuskryptu złożonego w redakcji czasopisma (wg deklaracji autorki „w trakcie oceny”). We wszystkich artykułach mgr M. Batoryna, jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym, dlatego mimo braku oświadczeń dotyczących określenia wkładu pracy dwóch pozostałych współautorów (w tym Promotor), należy uznać, że prace te stanowią oryginalne osiągnięcia Doktorantki. Część zasadnicza rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Batoryny, zawiera zwięzły (34 str.) opis przeprowadzonych badań w układzie pracy naukowej, z obszernym wprowadzeniem do tematyki badawczej, który podobnie jak artykuły oryginalne został napisany w języku angielskim. Na końcu dołączono Streszczenie (w języku polskim i angielskim) oraz Spis literatury (zawierający 94 pozycje). W załącznikach zamieszczono kopie prac wchodzących w skład rozprawy:

Załącznik 1: Batoryna M., Lis M., Formicki G., 2018. Antioxidant Defence in the brain of 1-d-old chickens expose in ovo to acrylamide. Br Poult Sci, 59(2),198-204. <https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1415427>

Załącznik 2: Batoryna M., Lis M., Formicki G., 2017. Acrylamide-induced disturbance of the redox balance in the chick embryonic brain. J Environ Sci Health, Part B, 0(0)1-7. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1316158> (dołączona do autoreferatu pozycja 2, jest wersją online, obecnie ma ona już pełne dane bibliograficzne: Batoryna M, Lis M, Formicki G.(2017) Acrylamide-induced disturbance of the redox balance in the chick embryonic brain. J Environ Sci Health B. 2017 Aug 3;52(8):600-606. doi: 10.1080/03601234.2017.1316158).

Załącznik 3: Batoryna M., Leśniak A., Kopańska M., Formicki G. Acrylamide influence on the activity of cholinesterases, oxidative stress markers, caspase-3 expression and microstructure of the forebrain of chicken embryos, w trakcie oceny, brak informacji o czasopiśmie, do którego wysłano pracę.

Merytoryczna ocena pracy doktorskiej

Akryloamid (akrylamid) to neurotoksyna, dobrze rozpuszczalna w wodzie, stosowana w produkcji poliakryloamidów, występująca powszechnie w żywności poddawanej obróbce termicznej (jako skutek reakcji Maillarda) oraz w dymie tytoniowym. Akryloamid jest uznanym mutagenem i kancerogenem, wykazuje właściwości toksyczne dla układu nerwowego i rozrodczego. Badania nad toksycznością tego związku prowadzone są od roku 2002, kiedy to naukowcy z Uniwersytetu w Sztokholmie opublikowali zaskakujące dane dotyczące znacznych zawartości akryloamidu w żywności, od tego momentu mechanizm toksyczności tej substancji jest intensywnie badany. Wiadomo, że ekspozycja na akryloamid objawia się występowaniem zaburzeń neurologicznych w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, które obejmują upośledzenie funkcji motorycznych i osłabienie mięśni. Wykazano, że akryloamid przekracza barierę łożysko-płód, ale badania dotyczące neurotoksycznego działania u embrionów są niezwykle rzadkie. Wykorzystanie w prowadzonych badaniach modelu *in ovo* stwarza doskonałe warunki do testowania wpływu akryloamidu na rozwijający się mózg zarodka, z wyeliminowaniem wpływów matczynych. Ten historycznie najstarszy model biologiczny, w ostatnich latach jest coraz powszechniej stosowany w badaniach toksykologicznych. W tym kontekście podjęta w pracy tematyka stanowi niezwykle istotne zagadnienie, tak w aspekcie naukowym jak i dla ochrony zdrowia konsumentów.

Głównym celem badań podjętych w pracy doktorskiej było oszacowanie wpływu akryloamidu na status oksydacyjny i cytoarchitekturę rozwijającego się mózgu zarodka z wykorzystaniem modelu *in ovo*. Do jego realizacji wyznaczono trzy cele szczegółowe:

1. Oszacowanie statusu oksydacyjnego w strukturach mózgu 1.-dniowych piskląt narażonych na akryloamid na początkowym etapie embriogenezy;
2. Oszacowanie statusu oksydacyjnego w mózgu zarodków narażonych na akryloamid w okresie okołolęgowym (przed wewnętrznym nakluciem);
3. Ocena skutków narażenia na akryloamid zarodków na wczesnym etapie embriogenezy, obejmująca monitoring zmian markerów stresu oksydacyjnego, neurotransmiterów, występowania apoptozy i zmiany mikrostruktury mózgowia zarodków kurzych.

Powyższe cele badawcze zostały osiągnięte w kolejnych publikacjach stanowiących podstawę pracy doktorskiej. Dwie z nich przeszły proces recenzji i spełniły wysokie wymagania stawiane w renomowanych czasopismach międzynarodowych, zarówno co do poziomu merytorycznego, jak i językowego oraz edytorskiego, co ułatwia pracę Recenzenta i sprowadza się do oceny wartości naukowej uzyskanych wyników.

W publikacji 1 (z 2018 roku) wykazano, że ekspozycja zarodków kurzych w 4. dobie inkubacji na wysokie dawki akryloamidu (1,25 i 2,4 mg/jajo) zaburza równowagę redox i aktywuje system obrony antyoksydacyjnej w mózgu 1-dniowych piskląt, powodując zmiany enzymów dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx) i katalazy (CAT), przy czym stwierdzono zróżnicowaną wrażliwość poszczególnych struktur mózgu. Po raz pierwszy wykazano, że narażenie na akryloamid w życiu płodowym może zaburzać funkcjonowanie układu nerwowego w rozwoju post-embryonalnym. W 2. publikacji (z 2017r.) badano wpływ akryloamidu (w dawce 2,4 mg/jajo) na równowagę oksydacyjną mózgu zarodków podczas wykluwania się pisklęcia. Ten etap uważany jest za krytyczny w rozwoju

ontogenetycznym ptaków i wiąże się z silnym stresem i mobilizacją organizmu (gwałtowne nasilenie metabolizmu wywołuje wzrost zapotrzebowania na tlen, następuje zmiana oddychania omocznioowo-kosmówkowego na płucne). Wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych SOD i GPx oraz spadek CAT i endogennego glutationu, będące wynikiem nasilenia stresu oksydacyjnego, obserwowano szczególnie po 72 godz. od ekspozycji. Może to wskazywać, że u ptaków akryloamid nie jest tak szybko metabolizowany jak u ludzi. W 3. pracy (w trakcie publikacji) przedstawiono dane dotyczące zmian wywołanych w mózgu zarodków ekspozycją na niskie dawki akryloamidu (30 i 300 µg/jajo) na wczesnym etapie rozwoju – w 5 dobie. Już po 7 godzinnej ekspozycji stwierdzono zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych, bez wzrostu markera peroksydacji lipidów (MDA), ale skorelowane ze wzrostem aktywności cholinoesteraz i zahamowaniem apoptozy. Po kolejnych 5. dniach ekspozycji wykazano zmiany w strukturze mikroskopowej mózgu.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że akryloamid zaburza równowagę redoks w rozwijających się strukturach mózgu zarodka, przy czym wrażliwość poszczególnych struktur mózgowych na działanie toksyny była zróżnicowana. Akryloamid osłabiał naturalną selekcję komórek nerwowych poprzez hamowanie procesu apoptozy, wpływał na aktywność nerwów cholinergicznym i cytoarchitekturę mózgu rozwijających się zarodków.

W mojej ocenie, wyniki doświadczeń składających się na rozprawę doktorską Pani mgr Marty Batoryny dostarczają przekonujących argumentów, że: 1) akryloamid może wykazywać neurotoksyczne działanie podczas rozwoju embrionalnego; 2) poszczególne struktury mózgowia charakteryzuje odmienna wrażliwość na działanie tej substancji, dodatkowo modyfikowana w zależności od dawki i czasu ekspozycji. Warto również podkreślić wybór zarodka kurzego jako organizmu modelowego (model *in ovo*). Pozwoliło to z jednej strony na uzyskanie wyników przy pełnej integralności organizmu (*in vivo*), a równocześnie rozwój zarodka ptaka poza organizmem matki pozwolił na ograniczenie wpływu innych chemicznych czynników środowiskowych

Zakres wykonanej pracy, świadczy o samodzielności i dojrzałości naukowej Doktorantki. Na szczególne wyróżnienie zasługuje opanowanie licznych metod laboratoryjnych: biochemicznych analiz aktywności enzymów antyoksydacyjnych i cholinoesteraz, kolorymetrycznych oznaczeń białka, glutationu czy dialdehydu malonowego, immunohistochemicznej detekcji kaspazy -3, a także histologicznej oceny struktur mózgowych. Przeprowadzenie przez Doktorantkę tak rozległych i kompleksowych badań wymagało ogromnego zaangażowania w pracę laboratoryjną. Współautorstwo 3 innych artykułów (indeksowanych w bazie Scopus) wskazuje na pracowitość i ciekawość badawczą Autorki.

Ocena formalna pracy

Forma rozprawy przyjęta przez Doktoranta – zbiór spójnych tematycznie publikacji naukowych – w znacznej części ogranicza rolę recenzenta jako oceniającego. Wynika to z faktu, iż załączone artykuły naukowe przeszły weryfikacje redakcyjne i wszelkie niedoskonałości oryginalnego tekstu zostały już usunięte. Z kolei komentarz do ich treści w nich zawartych, przygotowany przez Doktorantkę, z podaniem celu i najważniejszych wniosków wynikających z każdego etapu badań, jest zwięzły, dobrze skonstruowany i zrozumiale napisany, co wskazuje na biegłe posługiwanie się językiem angielskim. Z obowiązku Recenzenta należy wymienić

nieliczne błędy, np. w nazwie akryloamidu (właściwa prop-2-enoamid), czy niepełny opis sposobu utrwalenia preparatów histologicznych tkanek w pracy 3, literaturowe (pominięcie w dyskusji cennej pracy Venkataswamy i in., Eur. J. Biomed. Pharm. Sci. 2017; Erdemli i in., Neurotoxicol. Teratol. 2018). Uwagi te nie mają znaczenia dla oceny merytorycznej rozprawy.

W oparciu o przeprowadzone badania Doktorantka sformułowała 5 wniosków końcowych, z których wynika, że założony do realizacji cel badawczy został osiągnięty w pełni. Bibliografia rozprawy doktorskiej zawiera 94 pozycje piśmiennictwa w układzie alfabetycznym, w tym 20% z ostatnich 10 lat i wszystkie autorów zagranicznych, które zostały odpowiednio dobrane i wykorzystane w tekście opracowania. Dodatkowe publikacje zostały zamieszczone w opublikowanych pracach.

Z obowiązku Recenzenta, a także własnej naukowej ciekawości, chciałabym poprosić o wyjaśnienie następujących kwestii:

1. *W poszczególnych pracach zastosowano inne poziomy ekspozycji na akryloamid. W jaki sposób dobierano dawki? Czy zastosowana dawka miała odpowiadać narażeniu chronicznemu czy ekspozycji ostrej?*
2. *Akryloamid wprowadzano metodą iniekcji do białka jaja, jaka była droga pobrania toksyny przez zarodek w każdym z przeprowadzonych doświadczeń?*

Ponadto w oparciu o doświadczenie nabyte podczas realizacji pracy doktorskiej chciałabym poznać opinię Doktorantki odnośnie następujących zagadnień:

1. *Metabolizm akryloamidu u ludzi i gryzoni jest odmienny (str.7). Co wiadomo o biotransformacji toksyny u ptaków?*
2. *Czy w świetle przeprowadzonych badań można uzasadnić celowość ograniczania spożywania produktów o wysokiej zawartości akryloamidu przez kobiety w ciąży i dzieci?*

Podsumowanie i wniosek końcowy

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. *Changes in the antioxidative status of developing brain under acrylamide influence with the use of in ovo model* jest oryginalnym rozwiązaniem postawionego problemu naukowego, wnosi istotne elementy do nauki i **spełnia warunki określone w Ustawie** z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami w brzmieniu z dnia 15 września 2017 r. (Dz. U. 2017 r. poz. 1789.), zgodnie z Art. 175. 1. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669).

W związku z powyższym przedkładam Szanownemu Panu Dziekanowi i Wysokiej Radzie Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Marty Batoryny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość naukową opublikowanych prac oraz aktywność badawczą Doktorantki przedkładam Wysokiej Radzie wniosek o wyróżnienie powyższej pracy.

Rzeszów, dnia 27 czerwca 2019

dr hab. inż. Małgorzata Dżugan, prof. UR