

dr hab. Waław Tworzydło, prof. UJ  
Zakład Biologii Rozwoju i Morfologii Bezkręgowców  
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie



UNIWERSYTET  
JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

## O C E N A

**rozprawy doktorskiej Pani mgr Florentyny Anny Błaszczyk**

**pt. „Zmiany w strukturze i ultrastrukturze komórek jelita środkowego i ciała tłuszczowego dwuparca *Telodeinopus aoutii* (Myriapoda, Diplopoda) pod wpływem diety wzbogaconej w gluten”**

Wydział Biologii

Instytut Zoologii  
i Badań Biomedycznych

Zakład Biologii Rozwoju

i Morfologii Bezkręgowców

### 1. Informacje ogólne o pracy

Gluten to kompleks białek roślinnych, m.in. gluteiny i gliadyny występujący w ziarnach niektórych zbóż np. pszenicy, jęczmienia i żyta. Podczas obróbki mąki gluten w wyniku sieciowania tworzy z wodą nietypową przestrzenną strukturę o charakterystycznej ciągliwej konsystencji. Z tego powodu rozmaite postacie glutenu są powszechnie wykorzystywane przede wszystkim w przemyśle spożywczym, ale także w medycynie oraz w rolnictwie będąc popularnym składnikiem pasz dla zwierząt. Okazało się jednak, że ten często wykorzystywany zespół białek może powodować niepożądane reakcje organizmu, takie jak nietolerancja glutenu, reakcje alergiczne, czy autoimmunizacyjne. Jednym z najbardziej znanych zaburzeń związanych z reakcją na gluten jest celiakia. Jest to choroba o charakterze autoimmunologicznym, występująca u osób genetycznie predysponowanych.

O ile badania dotyczące wpływu glutenu na organizmy kręgowców, w tym ludzi są coraz liczniejsze, o tyle informacje na temat tego czynnika w kontekście zwierząt bezkręgowych nadal są nieliczne. A trzeba podkreślić, że gluten wpływając na strukturę i funkcjonowanie różnych układów u bezkręgowców może pośrednio mieć także wpływ na organizmy kręgowców, ponieważ nie są znane zdolności tego składnika do akumulacji podczas transferu przez kolejne poziomy łańcucha troficznego.

ul. Gronostajowa 9  
30-387 Kraków  
tel. +48 12 664 5090  
+48 12 664 5981  
fax +48 12 664 5101  
w.tworzydlo@uj.edu.pl

Zespół Promotorki, Pani prof. Magdaleny Rost-Roszkowskiej od kilku lat z sukcesami zajmuje się analizą wpływu rozmaitych substancji (stresorów) na ultrastrukturę układu pokarmowego bezkręgowców, w tym wijów. Oceniana rozprawa doktorska jest z jednej strony kontynuacją tych badań, a z drugiej próbą odpowiedzi na nurtujące pytania w kontekście zwiększającego się użycia glutenu w przemyśle. Doktorantka postanowiła szczegółowo przeanalizować ultrastrukturę komórek budujących jelito środkowe oraz ciało tłuszczowe u osobników dorosłych dwuparca *Telodeinopus aoutii* karmionych standardowo oraz karmą z dodatkiem glutenu. Szczególną uwagę zwróciła na procesy degeneracji i regeneracji oraz związane z nimi różne typy śmierci komórki. W świetle wszystkich powyższych informacji, wybór tematyki pracy oraz materiału do badań uważam za interesujący, nowoczesny i trafny.

## **2. Poprawność redakcyjna rozprawy**

Oceniana rozprawa ma układ typowy dla tradycyjnych prac doktorskich. Jest opracowaniem obszernym i składa się z dwóch tomów (części). Część pierwsza ma formę maszynopisu liczącego 91 stron wraz z bogatym piśmiennictwem obejmującym aż 293 pozycje. Pracę rozpoczyna obszerny „Wstęp” będący bardzo dobrym wprowadzeniem w tematykę ocenianej pracy. Doktorantka szczegółowo opisuje biologię badanej grupy zwierząt, ich układ pokarmowy, a także budowę, właściwości oraz wykorzystanie glutenu. Następnie przedstawiono „Cele pracy” oraz „Hipotezy badawcze”. Kolejny rozdział to „Materiał i Metody”, którym w sposób precyzyjny opisano poszczególne etapy eksperymentów oraz metodykę badań. W tym miejscu pragnę postawić swoją pierwszą wątpliwość. Na stronie 25 Pani mgr Błaszczuk pisze, że do analiz w mikroskopie elektronowym skrawki ultracienkie umieszczone na miedzianych siatkach kontrastowano przez 25 minut cytrynianem ołowiu i następnie przez kolejne 25 minut octanem uranylu. Czy rzeczywiście barwienie to trwało prawie godzinę? W klasycznych pracach opisujących technikę mikroskopii elektronowej sugerowany czas barwień to maksymalnie kilka minut (a nawet kilkanaście sekund). W rozdziale „Wyniki badań” Autorka opisała wyniki analiz mikroskopowych oraz badań ilościowych dotyczących zmian w ultrastrukturze, autofagii, apoptozy oraz obecności reaktywnych form tlenu w komórkach jelita oraz ciała tłuszczowego badanego gatunku zarówno z grup kontrolnych, jak i zwierząt eksperymentalnych. Rozdział „Dyskusja” jest obszernym i

dobrze poprowadzonym omówieniem otrzymanych wyników na tle najnowszej literatury. Następnie w pracy umieszczono 4 krótkie części: „Podsumowanie”, „Wnioski” oraz „Streszczenie” i anglojęzyczne „Summary”. Układ tej części pracy, podział na rozdziały i podrozdziały oraz ich wzajemne proporcje odpowiadają standardom pracy naukowej i nie budzą zastrzeżeń. Drugi tom rozprawy to bogata dokumentacja fotograficzna, na którą składają się 32 tablice z mikrofotografiami, z czego zdecydowaną większość stanowią elektronogramy oraz z wykresami. Niestety numeracja tablic i wykresów zastosowana przez Doktorantkę jest dla mnie niejasna. Tablice z dokumentacją rozpoczynają się od „Fot 1”, chociaż tablica nr 1 nie jest fotografią, tylko schematem obrazującym cały eksperyment. Tablica 5 (Fot. 5) to tak naprawdę dwie tablice. Dodatkowo, tablice z wykresami mają oddzielną numerację i rozpoczynają się do (Fig. 1). Sądzę, że numerację dokumentacji należałoby uporządkować i ujednolicić. W pracy pojawiają się gdzieś literówki, niezręczności językowe i stylistyczne. Występują też braki spacji (np. „czarnastrzałka” na str. 135) lub znaków interpunkcyjnych (np. „Fot 1” vs „Fot. 2”).

### **3. Ocena merytoryczna rozprawy**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest szczegółowym i wyczerpującym opracowaniem dotyczącym wpływu diety wzbogaconej o gluten na ultrastrukturę i fizjologię komórek jelita oraz ciała tłuszczowego u dorosłych osobników wija *Telodeinopus aoutii*. Na stronie 19 rozprawy Doktorantka dokładnie sprecyzowała cele swojej pracy doktorskiej w postaci 6 szczegółowych zadań badawczych. Warto w tym miejscu dodać, że wszystkie cele (zadania badawcze) zostały zrealizowane.

Praca jest opisem precyzyjnie zaplanowanego i dobrze przeprowadzonego eksperymentu mającego na celu potwierdzenie (lub obalenie) 4 alternatywnych hipotez przedstawionych na stronach 20-21 doktoratu. Autorka postanowiła wykazać, czy gluten wpływa na jelito środkowe i ciało tłuszczowe u badanego gatunku dwuparca. Karmienie wujów przez pierwsze 6 tygodni eksperymentu nie wpłynęło z znaczący sposób na ultrastrukturę i fizjologię komórek jelita środkowego. W kolejnych etapach eksperymentu Doktorantka zauważyła wyraźne zmiany w ultrastrukturze komórek jelita środkowego. Zmiany te dotyczyły morfologii mitochondriów. Zauważono także obecność komórek apoptotycznych. Co ciekawe, pod koniec eksperymentu, tj. u zwierząt karmionych dietą z dodatkiem glutenu przez 9 miesięcy zmiany w ultrastrukturze komórek jelita środkowego

ustępowały. Powyższe obserwacje Doktorantka tłumaczy tym, że gluten wywiera negatywny wpływ na jelito środkowe, jednak stresor ten musi oddziaływać odpowiednio długo. Zupełnie inaczej przedstawiała się sytuacja jeśli chodzi o komórki ciała tłuszczowego. W początkowych fazach eksperymentu wykazywały one zwiększone ilości materiałów zapasowych, natomiast później ich ultrastruktura nie odbiegała od komórek pochodzących od zwierząt kontrolnych. Doktorantka tłumaczy to zjawisko tym, że w ciele tłuszczowym szybciej dochodzi do aktywacji mechanizmów obronnych niż w komórkach jelita (po 9 miesiącach). Według Pani Florentyny Błaszczuk mechanizmem, który w komórkach obu narządów uczestniczy w utrzymaniu homeostazy jest nieselektywna autofagia.

W pracy nie znalazłem błędów merytorycznych. Pojawiające się nieścisłości są raczej skrótami myślowymi. Przykładowo Doktorantka zamiennie stosuje określenie „błona podstawna” (np. str. 43, 98) i „blaszka podstawna” (np. str. 102, 105, 113) – o ile oba określenia są zasadniczo poprawne, warto je ujednoczyć.

#### **4. Wartość naukowa pracy**

Rozprawa doktorska powinna być osiągnięciem naukowym. W pracy Pani mgr Florentyny Błaszczuk wyników, które zasługują na miano osiągnięcia naukowego jest co najmniej kilka. Wśród najważniejszych warto odnotować następujące:

1. W pracy przedstawiono obszerny opis zmian w budowie jelita środkowego oraz ciała tłuszczowego wijków pod wpływem diety wzbogaconej glutenem.
2. Zaobserwowano, że swoje negatywne efekty gluten wywoływał wyłącznie w przypadku długotrwałego działania.
3. Opisano mechanizmy związane z utrzymaniem homeostazy w komórkach jelita środkowego i ciała tłuszczowego.
4. Stwierdzono także, że ze względu na uruchamiane mechanizmy detoksykacji i regeneracji w ciele bezkręgowców, zwierzęta te najprawdopodobniej nie będą wektorami glutenu do wyższych poziomów łańcucha troficznego.

Podsumowując tę część recenzji mogę stwierdzić, że przedstawiona do oceny praca jest oryginalnym rozwiązaniem problemu badawczego. Bardzo dobrze napisany

Wstęp i właściwie poprowadzona Dyskusja świadczą o szerokiej wiedzy Pani mgr Florentyny Błaszczyk zakresu histologii, biologii komórki i morfologii funkcjonalnej bezkręgowców. Z pewnością recenzowana praca wnosi nowe interesujące dane do naszej wiedzy o funkcjonowaniu i toksykologii układu pokarmowego bezkręgowców.

#### **5. Wniosek końcowy**

Biorąc pod uwagę wszystkie powyższe dane oraz zgodnie z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 Przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Błaszczyk (Dz. U. 2018, poz. 1669) stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Florentyny spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim w myśl artykułu 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym, oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami; tekst jednolity Dz. U. z 2017 roku, poz. 1789) i wnoszę do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Florentyny Błaszczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 9 grudnia 2022

