

Dr hab. Izabela Jędrzejowska
Zakład Biologii Rozwoju Zwierząt
Uniwersytet Wrocławski
ul. Sienkiewicza 21
50-335 Wrocław

Wrocław, 19.12.2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej **Pani mgr Florentyny Anny Błaszczyk**
z tytułowanej:

„Zmiany w strukturze i ultrastrukturze komórek jelita środkowego i ciała tłuszczowego dwuparca *Telodeinopus aoutii* (Myriapoda, Diplopoda) pod wpływem diety wzbogaconej w gluten” wykonanej pod kierunkiem **Prof. dr hab. Magdaleny Rost-Roszkowskiej** w Zespole Histologii i Embriologii Zwierząt Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Florentyny Anny Błaszczyk wpisuje się w nurt badań kierowanych przez Panią prof. dr hab. Magdalenę Rost-Roszkowską, która od lat specjalizuje się w badaniach struktury i funkcji układu pokarmowego u przedstawicieli wybranych grup bezkręgowców.

Głównym celem przedstawionej do oceny pracy doktorskiej był szczegółowy opis zmian w komórkach nabłonka jelita środkowego oraz ciała tłuszczowego roślinożernego krocionoga *Telodeinopus aoutii* powstałych w wyniku karmienia zwierząt pożywieniem z dodatkiem glutenu.

Ocena merytoryczna

1. Znaczenie problematyki podjętej w recenzowanej rozprawie

Gluten jest składnikiem powszechnie występującym w diecie ludzi i zwierząt, w tym również zwierząt hodowlanych. Opisano szereg zaburzeń i chorób wywołanych spożywaniem pokarmu zawierającego gluten oraz sposobu łagodzenia przebiegu choroby poprzez eliminację glutenu z diety. Badania dotyczące tego problemu prowadzone są głównie na przedstawicielach ssaków, podczas gdy badania dotyczące wpływu glutenu na funkcjonowanie różnych narządów zwierząt bezkręgowych należą do rzadkości. *T. aoutii*, jak inni przedstawiciele Diplopoda, jest roślinożercą i detrytofagiem, a gluten nie jest naturalnym składnikiem jego diety. Gatunek ten cieszy się dużym zainteresowaniem hodowców. Jego hodowla jest prosta, co jest niewątpliwą zaletą w wyborze materiału do przeprowadzenia eksperymentu. Ze względu na typowe dla tej grupy stawonogów wymagania pokarmowe można przypuszczać, że uzyskane wyniki będą miały charakter bardziej uniwersalny. Podjęta przez Doktorantkę problematyka badawcza jest bardzo istotna z perspektywy poznania wpływu glutenu na strukturę i funkcję układu pokarmowego zwierząt bezkręgowych, jak również poznania procesów uruchamianych w komórce w odpowiedzi na działanie glutenu. W tym świetle wybór tematyki recenzowanej rozprawy, jak i wybór materiału do badań należy uznać za trafny.

2. Zastosowana metodyka badawcza (założenia, cele, hipotezy, metody),

Głównym celem pracy było opisanie zmian w komórkach nabłonka jelita środkowego oraz ciała tłuszczowego roślinożernego krocionoga *T. aoutii* powstałych w wyniku karmienia zwierząt

pożywieniem z dodatkiem glutenu. Realizację tego planu Doktorantka podzieliła na kilka zadań (cele szczegółowe). Cel główny i cele szczegółowe są jasno sprecyzowane i adekwatne do tytułu pracy. Jedynie ostatni cel szczegółowy: „Porównanie zmian wywołanych spożywaniem glutenu przez zwierzę roślinożerne w wybranych narządach ciała” nie jest w pełni zrozumiały. Autorka postawiła 5 HIPOTEZ BADAWCZYCH. Ich konstrukcja jest dość nietypowa, oparta na hipotezach przeciwstawnych. Tu warto podkreślić, że brzmienie głównego celu pracy sugeruje, że pod wpływem glutenu dochodzi do zmian w strukturze wybranych do analizy komórek, a więc te zmiany są spodziewane. Do realizacji celów Doktorantka zaplanowała wykorzystanie szeregu metod i narzędzi takich jak: mikroskopia świetlna, transmisyjna mikroskopia elektronowa, analiza w mikroskopie konfokalnym z zastosowaniem metody TUNEL, barwienia z użyciem LysoTrackera i dihydroetydyny, cytometria przepływowa, ocena ilościowa komórek żywych, apoptotycznych i nekrotycznych, ocena ilościowa komórek ROS+/ROS-, analiza statystyczna. Wybór metod badawczych należy uznać za trafny i potencjalnie umożliwiający osiągnięcie zaplanowanych celów.

3. *Ocena poprawności struktury rozprawy (kolejność rozdziałów, proporcje między poszczególnymi rozdziałami), język i formalna strona rozprawy*

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma formę manuskryptu, który liczy łącznie 156 stron. Praca została podzielona na dwie części. Część pierwsza (str. 1-91) zawiera tekst rozprawy. Część druga (str. 92-156) obejmuje bogato ilustrowaną Dokumentację badań, w której znajdują się 23 tablice oraz 8 wykresów wraz z opisami. Tekst rozprawy zawiera typowe dla pracy naukowej rozdziały: Wstęp, Cele pracy, Hipotezy badawcze, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Bibliografię. Proporcje między poszczególnymi rozdziałami są właściwe.

Zasadniczo tekst pracy napisany jest klarownym językiem. Błędy edytorskie lub interpunkcyjne są znikome. Niemniej jednak w pracy znalazłam zdania dość karkołomne pod względem stylistycznym, niejasne sformułowania oraz powtórzenia utrudniające lekturę rozprawy. Szczegółowe uwagi zostały umieszczone w pliku rozprawy doktorskiej i przekazane Doktorantce.

4. *Szczegółowa charakterystyka i ocena poszczególnych części rozprawy*

Rozbudowany WSTĘP dobrze wprowadza czytelnika w podjętą tematykę badawczą i zawiera informacje dotyczące charakterystyki badanej grupy, budowy układu pokarmowego wijów, roślin uprawnych, będących źródłem glutenu, składników glutenu, wykorzystaniu glutenu, zaburzeń wywołanych glutenem oraz wpływu glutenu na układ pokarmowy kręgowców i bezkręgowców. Tytuł podrozdziału 1.4 PSZENICA ZWYCZAJNA (TRITICUM AESTIVUM) nie jest adekwatny do informacji, które zawiera. Lepszym rozwiązaniem byłoby zatytułowanie go np.: Charakterystyka/odmiany pszenicy.

Rozdział MATERIAŁ I METODY zawiera charakterystykę badanego gatunku, szczegóły dotyczące prowadzonej hodowli oraz opis planowanego eksperymentu z podaną liczbą osobników użytych do eksperymentu w poszczególnych grupach kontrolnych i eksperymentalnych. Opis zastosowanych przez Doktorantkę technik badawczych jest poprawny, umożliwiający powtórzenie wykonanych analiz i uzyskanie porównywalnych wyników.

W WYNIKACH Pani mgr Florentyna Błaszczuk opisała rezultaty przeprowadzonego eksperymentu dzieląc je na dwie części. Pierwszą, dotyczącą opisu zmian w komórkach jelita środkowego i drugą, analogiczną, dotyczącą zmian w komórkach ciała tłuszczowego, realizując tym samym wyznaczone cele. Obie części Wyników zostały zredagowane pod kątem metod badawczych. Sposób prezentacji wyników jest zwięzły i przejrzysty, bez zbędnych powtórzeń.

DYSKUSJA jest rozbudowana i obejmuje zagadnienia związane bezpośrednio z tematem recenzowanej rozprawy, a także zagadnienia pokrewne takie jak np. różnorodna struktura ciała tłuszczowego stawonogów. Podobnie jak w Wynikach Doktorantka interpretuje uzyskane wyniki oddzielnie pod kątem zmian w komórkach trawiennych i trofocytach. Przy przygotowywaniu publikacji proponowałabym ograniczyć te fragmenty dyskusji, które zawierają informacje ogólne, takie jak np. dość szczegółowa charakterystyka komórek ciała tłuszczowego.

PODSUMOWANIE uzyskanych przez Doktorantkę wyników zostało przedstawione w postaci zwięzłego tekstu. WNIOSKI przedstawione są w osobnym podrozdziale w ośmiu punktach. Zasadniczo wnioski są poprawnie sformułowane. Sugerowałabym jednak drobną korektę dotyczącą zmiany kolejności wniosków. Najpierw przedstawiłabym te wnioski, które opisują zmiany powstałe pod wpływem glutenu, a następnie wymieniałabym wnioski dotyczące odpowiedzi komórek na te zmiany. Wniosek zawarty w pkt. 8 „Ze względu na fakt, że zmiany w komórkach badanych narządów wskazują na uruchamianie mechanizmów detoksykacyjnych i regeneracyjnych, zwierzęta roślinożerne hodowane w bliskim sąsiedztwie glutenu, nie będą wektorami tego ksenobiotyku do kolejnych poziomów łańcucha troficznego” jest niejasny. Czy chodzi o obecność glutenu w pokarmie?

BIBLIOGRAFIA obejmuje 293 pozycje. Dobór cytowanych prac jest właściwy i adekwatny do omawianych zagadnień, przemawiający za dobrą znajomością tematu.

Rozprawę doktorską Pani mgr Florentyny Anny Błaszczyk oceniam wysoko. Doktorantka zaplanowała i przeprowadziła eksperymenty przy użyciu różnorodnych i dobrze dobranych technik badawczych. Wyniki pokazały również, że łączny czas zaplanowanego eksperymentu tj. 9 miesięcy był dobrany właściwie. Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na uzyskanie nowych danych, które w sposób kompleksowy opisują wpływ glutenu na strukturę i żywotność komórek narządów układu pokarmowego u badanego przedstawiciela krocionogów.

Do najważniejszych osiągnięć pracy zaliczyłabym wykazanie, że u *T. aoutii*:

1. gluten wprowadzony do diety powoduje zmiany w strukturze komórek trawiennych jelita środkowego i trofocytów ciała tłuszczowego. Zmiany w obu typach komórek są różne i zachodzą w różnym czasie;
2. gluten nie wywołuje zmian w strukturze komórek sekrecyjnych i regeneracyjnych jelita środkowego;
3. w grupach eksperymentalnych dochodzi do wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu zarówno w komórkach trawiennych jak i trofocytach, jednak zmiany te odnotowywane są w różnym czasie;
4. po długotrwałym karmieniu zwierząt pokarmem zawierającym gluten w komórkach trawiennych obserwuje się regres powstałych zmian, przemawiający za uruchomieniem procesów adaptacyjnych;
5. procesem odpowiedzialnym za niwelowanie skutków wywołanych działaniem glutenu w komórkach trawiennych i trofocytach jest autofagia.

Lektura Dyskusji skłania do zadania Doktorantce pytań dotyczących interpretacji uzyskanych wyników:

1. Brak zmian w strukturze komórek regeneracyjnych i sekrecyjnych nabłonka jelita środkowego w grupie eksperymentalnej Autorka wyjaśnia brakiem bezpośredniego kontaktu tych komórek ze światłem jelita, a więc też glutenem. Niejasne jest wobec powyższego pojawianie się

zmian w komórkach ciała tłuszczowego, które również nie mają bezpośredniego kontaktu z glutenem. Proszę o wyjaśnienie tej kwestii.

2. Analiza poziomu ROS w komórkach trawiennych i trofocytach wykazała znaczące różnice w czasie pojawiających się zmian – komórki ciała tłuszczowego wydają się być pod tym kątem bardziej wrażliwe. Prosiłabym o próbę szerszej interpretacji tych wyników.

3. Wyniki zawarte w rozprawie wykazały, że w trofocytach ciała tłuszczowego odnotowano wyraźną redukcję materiału zapasowego oraz wzrost ilości ziaren glikogenu. Redukcję ilości materiału zapasowego Autorka tłumaczy udziałem w procesach detoksykacyjnych. Materiał zapasowy jest heterogenny. Ponieważ w tekście rozprawy brakuje tych informacji proszę o wyjaśnienie w jaki sposób ta detoksykacja zachodzi.

Uwagi redakcyjne

1. Nazwy rodzajowe i gatunkowe w języku polskim piszemy małą literą, a w tekście rozprawy pisane są wielką literą - Krocionóg kenijski (str. 22), Makak królewski (str. 45);

2. W Dyskusji (str. 42) Autorka odnosi czytelnika do kilku prac „ROST–ROSZKOWSKA I IN., 2018B, 2020A, 2021”. W spisie literatury są dwie pozycje z 2021 roku (A i B);

3. W Podsumowaniu pierwsza hipoteza jest niepoprawna „Karmienie osobników pożywieniem z dodatkiem glutenu nie wywołuje zmian na poziomie ultrastrukturalnym w komórkach nabłonka jelita środkowego i ciała tłuszczowego badanego gatunku wija”. Zakładam, że to zwykłe przeoczenie, na co wskazuje pozostała treść rozprawy.

Uwagi krytyczne dotyczą głównie dokumentacji uzyskanych wyników. W kilku przypadkach opisy zdjęć są niekompletne lub budzące wątpliwości. Trudność w rozpoznaniu struktur opisywanych na zdjęciach wynika ze zbyt małych powiększeń, lub z faktu, że symbole naniesione na zdjęcia nie wskazują precyzyjnie opisywanych struktur. W tym przypadku polecam na przyszłość obok symbolu wstawić kreskę dochodzącą do powierzchni wskazywanej struktury. Przykłady:

- komórki trawienne, regeneracyjne i komórki wydzielnicze nabłonka jelita środkowego nie są wskazane na zdjęciu 3A

- kompleksy Golgiego nie są widoczne na zdjęciach 3C, 4A, B

- na zdjęciach 6A i 6C wskazane są ciała wielopęcherzykowe. Na zdjęciu 6A wskazana struktura nie przypomina ciała wielopęcherzykowego, a na zdjęciu 6C powiększenie jest zbyt małe aby stwierdzić co znajduje się na zdjęciu;

- na zdjęciach 8B i C nie są wskazane mitochondria o elektronowo jasnej macierzy (str. 31), a jest to istotny dla pracy wynik;

- na zdjęciach 8A i B wakuole o elektronowo jasnym wnętrzu wyglądają różnie, a niektóre z nich są bardzo podobne do sferytów (str. 31);

- na zdjęciu 9B wakuole i ciała wielopęcherzykowe wyglądają podobnie, a różnice pomiędzy sferytami i autolizosomami nie są zbyt oczywiste. Ponadto w opisie Fig. 9B są wymienione autofagosomy, a w tekście pracy autolizosomy - brak spójności z tekstem. W tym miejscu chciałabym dodać, że na zdjęciach różnice pomiędzy autofagosomami i autolizosomami nie są wyraźnie widoczne;

1. Skala do Fot. 12A i Fot. 22 D jest nieprawidłowa. Zdjęcia różnią się powiększeniem od pozostałych zdjęć w tablicach, co utrudnia porównanie obrazów.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska **Pani mgr Florentyny Anny Błaszczyk** zatytułowana: „**Zmiany w strukturze i ultrastrukturze komórek jelita środkowego i ciała tłuszczowego dwuparca *Telodeinopus aoutii* (Myriapoda, Diplopoda) pod wpływem diety wzbogaconej w gluten**” wnosi nowe dane do wiedzy o wpływie glutenu na komórki narządów układu pokarmowego zwierząt bezkręgowych. Ponadto, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauk biologicznych oraz potwierdza umiejętność Doktorantki w zakresie samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, w tym bardzo dobre opanowanie warsztatu metodologicznego do prowadzenia prac o charakterze eksperymentalnym. Otrzymane wyniki uważam za bardzo interesujące i nowatorskie. Poszerzają one naszą wiedzę zarówno na temat przebiegu i tempa zmian wywołanych glutenem jak również na temat procesów uruchamianych w komórkach, niwelujących jego negatywne działanie. Wymienione w recenzji uwagi w żaden sposób nie obniżają wartości rozprawy.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska **Pani mgr Florentyny Anny Błaszczyk** spełnia warunki określone w artykuł 13. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) w związku z artykułem 179 ust. 2 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.- Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnioskuję do **Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach** o dopuszczenie **Pani mgr Florentyny Anny Błaszczyk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 19.12.2022 r.

dr hab. Izabela Jędrzejowska

Izabela Jędrzejowska