

Jastrzębiec 29 czerwca 2022r.

Prof. dr hab. Mariusz Pierzchała  
Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt  
Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu

Recenzja pracy doktorskiej mgr Aleksandry Szabelak  
pt. "**Zastosowanie L-proliny w łagodzeniu stresu termicznego u  
bezkręgowca *Daphnia magna* oraz w erytrocytach kury domowej  
(*Gallus gallus domesticus*)**"

pod kierunkiem Promotor: dr hab. Adama Bownika

Promotor pomocniczy: dr Sebastiana Knagi

**Ocena formalna**

Przedstawiona do recenzji dysertacja, Pani mgr Aleksandry Szabelak obejmuje cykl publikacji opatrzony wspólnym tytułem „*Zastosowanie L-proliny w łagodzeniu stresu termicznego u bezkręgowca *Daphnia magna* oraz w erytrocytach kury domowej (*Gallus gallus domesticus*)*”. W przedstawionym cyklu artykułów znajdują się trzy oryginalne prace opublikowane w recenzowanych czasopismach indeksowanych na liście JCR, w tym dwie prace w **Journal of Thermal Biology** (IF 2,361 roku publikacji 2019) oraz jedna w **Biotechnic & Histochemistry** (IF 1.834 rok publikacji 2021). Doktorantka jest pierwszym autorem w dwóch oraz drugim w jednej z publikacji. Wkład autorki w opracowaniu wynosi od 45% do 50% co zostało udokumentowane stosownymi oświadczeniami.

Załączony do wykazu publikacji autoreferat obejmuje streszczenie w języku polskim oraz angielskim; Wstęp; Cel i hipotezy badawcze; Materiał i metody; Wyniki i dyskusja; Podsumowanie i wnioski; Piśmiennictwo.

**Ocena merytoryczna**

**1. Tematyka badań i ich znaczenie**

Wiodący nurt badań rozprawy doktorskiej dotyczy stresu cieplnego i jego oddziaływania na organizm zwierząt w oparciu o modelowe badania wykorzystujące skorupiaki *Daphnia magna* oraz erytrocyty kury domowej. Charakterystyka zmian zachodzących w organizmie zwierząt pod wpływem stresu cieplnego wciąż nie jest w pełni poznana i opisana, mimo licznych badań naukowych na całym świecie. Wiadomym jest, że zwierzęta różnych gatunków charakteryzują się różnymi zdolnościami adaptacyjnymi do warunków środowiskowych, w tym temperatury otoczenia. W odniesieniu do tego czynnika,

można zdefiniować specyficzną u różnych gatunków tzw. strefę komfortu, określaną też strefą termicznie neutralną, obejmującą zakres temperaturowy, w którym zwierzęta czują się komfortowo jak też nie są zaburzane podstawowe funkcje organizmu.

Stres cieplny zaczyna być odczuwalny przez zwierzęta, gdy pojawiają się trudności z osiągnięciem równowagi pomiędzy wytwarzaniem i odprowadzaniem ciepła przez organizm. Taka równowaga jest też, wypadkową działania naturalnego mechanizmu obronnego zwierząt przed przegrzaniem oraz wpływu czynników środowiskowych. Pojawienie się i stopień stresu cieplnego jest nie tylko ściśle związany ze sprawnością działania mechanizmów termoregulacyjnych, ale też czasu i stopnia oddziaływania czynników środowiskowych, takich jak temperatura, wilgotność, przepływ powietrza, i innych np.: ekspozycja na światło słoneczne.

Stres termiczny jest identyfikowany niejednokrotnie jako poważny problemem w hodowli zwierząt. Dotyczy to różnych gatunków, w szczególności utrzymywanych w warunkach intensywnej produkcji, w których występuje duże zagęszczenie zwierząt, na przykład w systemach wielko-fermowych w produkcji trzody chlewnej i drobiu, gdzie problem narasta w sezonie letnim, wraz ze wzrostem temperatury otoczenia. Jednym, z pierwszych objawów efektu stresu cieplnego jest obniżenie apetytu, prowadzące w konsekwencji do zmniejszenia pobierania paszy a tym samym zmniejszenia przyrostów. W skrajnych przypadkach może prowadzić do zwiększonych upadków zwierząt. Stres cieplny może też zaburzać gospodarkę hormonalną prowadząc do obniżenia płodności, a nawet skutkować tzw. okresową niepłodnością. W niekorzystnych warunkach na poziomie komórkowym pojawia się stres oksydacyjny, wzrasta poziom reaktywnych form tlenu (ROS). Wywoływany stres oksydacyjny może wielokierunkowo zaburzać funkcje organizmu, co może być identyfikowane na poziomie molekularnym z wykorzystaniem odpowiednio wybranych poznanych i scharakteryzowanych tzw. markerów stresu któreymi mogą być specyficzne białka i enzymy. Oceniając ich stężenie i aktywność możemy dokładnie oceniać stopień niekorzystnego wpływu stresu cieplnego.

Niekorzystne efekty zdrowotne zaburzonego dobrostanu spowodowane stresem cieplnym u zwierząt hodowlanych mają wymierny wpływ w produkcji zwierzęcej na obniżenie wyników ekonomicznych. Przytoczone powyżej wybiórczo argumenty stanowią o zasadności podjętego przez Doktorantkę zadania badawczego, którego efektem jest niniejsza rozprawa.





## **2. Oryginalność tematyki i wartość poznawcza pracy**

Prezentowana praca podejmuje ważny temat zarówno od strony badań podstawowych jak i potencjalnych aplikacyjnych. O celowości podjętych badań świadczy, wciąż brak gruntownej wiedzy dokładnie opisujących wskaźniki stresu cieplnego oraz charakteryzujących dokładnie substancje, które stres ten mogą niwelować. Zostało to szczegółowo omówione i uzasadnione, oraz poparte cytowanym piśmiennictwem zawartym w publikacjach.

## **3. Zdefiniowanie celów/ hipotez badawczych**

Doktorantka właściwie zdefiniowała cele i szczegółowo opisała metody badawcze wykorzystane w badaniach prezentowanych w załączonych publikacjach, charakteryzujących termochronnego działania L- proliny.

Badania podjęte przez Doktorantkę miały na celu weryfikację następujących hipotez badawczych:

- 1. Ekspozycja *Daphnia magna* na L-PROL podczas stresu cieplnego wywołuje zahamowanie lub złagodzenie zmian parametrów behawioralnych.*
- 2. Stres cieplny indukuje zmianę obrazu morfologicznego, oraz parametrów komórkowych ptasich erytrocytów w warunkach *in vitro*.*
- 3. L-PROL hamuje lub łagodzi zmiany parametrów komórkowych erytrocytów kury w warunkach stresu cieplnego.*

Sformułowane powyżej hipotezy uważam za poprawne, jednakże w odniesieniu do pierwszej i ostatniej sugerowałbym bardziej precyzyjne sformułowanie, ujmujące też oddziaływanie właściwej/optimalnej dawki L-proliny w niwelowaniu niekorzystnych zmian wywołanych stresem cieplnym.

## **4. Zakres i metody badań**

Zakres i metody badan również nie budzą zastrzeżeń, są adekwatne do podjętych celów jak i weryfikacji założonych hipotez badawczych. Materiałem do badań w pierwszej z prezentowanych prac były rozwielitki (*Daphnia magna*), które uzyskano w partenogenetycznym cyklu rozmnażana. W tym doświadczeniu, Doktorantka przeprowadziła ocenę wpływu dodatku L-PROL w trzech różnych stężeniach 10 mg/L, 20 mg/L i 50 mg/L do pożywki, oraz stresu cieplnego w zakresie temp 35 i 38°C, na parametry behawioralne charakteryzujące ruchliwość skorupiaków po 2, 24 oraz 48 godz. inkubacji w różnej temperaturze z różnym stężeniem L- proliny.

W drugiej i trzeciej pracy badania przeprowadzono z wykorzystaniem ptasich erytrocytów, pozyskanych z krwi pobranej od kur rasy leghorn, zgodnie z zezwoleniem

wydanym przez Lokalną Komisję Etyki w Lublinie (Polska) numer (96/2017). Z pobranej krwi usunięto osocze i leukocyty, a uzyskaną zawiesinę erytrocytów rozcieńczono w odpowiednio przygotowanej pożywce, którą następnie poddano inkubacji w naturalnej i podwyższonej temperaturze wraz z różnym poziomem L-proliny. W dalszym etapie oznaczano przeżywalność, morfologię, aktywność kaspazy 3/7, HSP70, oraz poziom glutationu. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z zastosowaniem adekwatnych testów statystycznych, za pomocą pakietu Statistica™.

### **5. Wyniki zrealizowanych badań**

Doktorantka szczegółowo opisuje uzyskane wyniki w sposób jasny i czytelny odnosząc się do aktualnych danych literaturowych. Doktorantka potwierdziła założone hipotezy. Wyniki analiz opartych o modelowe badania z wykorzystaniem *Daphnia magna* wykazały istotne zmiany behawioralne jako odpowiedź na podwyższoną temperaturę, oraz korzystne oddziaływanie L- proliny na utrzymanie ruchliwości skorupiaków.

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych na erytrocytach kury domowej pozwoliły określić stopień ochronnego oddziaływania L-proliny na stabilizację procesów biologicznych, które w konsekwencji decydowały o zmianach morfologicznych, stopniu hemolizy, oraz zmiany żywotności komórek. Szczególnie interesujące są wyniki analiz wybranych parametrów związanych z aktywnością kaspazy 3/7 oraz białka szoku termicznego. Doktorantka stwierdziła, również że w zależności od temperatury inkubowania zawiesiny erytrocytów zmieniało się stężenie glutationu, natomiast aktywność kaspazy zmieniała się tylko w wyższych zakresach podwyższonej temperatury inkubacji. Natomiast dodatek L-proliny powodował wyraźne zmiany parametrów w stosunku do kontroli, która była tego dodatku pozbawiona. Interesujący wydaje się też specyficzny wzrost aktywności kaspazy spowodowany dodatkiem L- Proliny, dla którego istotnym czynnikiem decydującym o redukcji stopnia zmian aktywności, była wartość temperatury inkubacji 45°C, która wydaje się być wartością graniczną. Efekt modulującego oddziaływania L-proliny na stan erytrocytów został też odnotowany w poziomie glutationu, którego obniżony poziom spowodowany temperaturą, wzrastał po istotnym zwiększeniu ekspozycji erytrocytów na L-prolinę.

Biorąc pod uwagę znaczenie problemów związane ze stresem cieplnym u zwierząt hodowlanych należy uznać podjęte przez Doktorantkę badania za ważne, a uzyskane wyniki weryfikujące wpływ L-proliny na efekty stresu termicznego jako cenne z punktu widzenia poznawczego, jak i aplikacyjnego.



### *Uwagi i sugestie korekt*

Niemniej jednak w analizie i opisie badań są pewne elementy, które wymagają korekty bądź dodatkowego wyjaśnienia:

1. Doprecyzowania wymaga w jakim zakresie stres cieplny wpływał na aktywność białek a w jakim na ich stężenie. Czy mierzona zmiana aktywności nie jest pochodną zmiany stężenia?
2. W odniesieniu do zmian poziomu glutationu rodzi się pytanie, w jakim stopniu są one związane z wystąpieniem stresu oksydacyjnego?
3. Wskazaniem byłoby szersze omówienie co wg Doktorantki jaki jest mechanizm zmiany aktywności kaspazy spowodowanej dodatkiem L-Proliny ?
4. Dla lepszego wyjaśnienia zachodzących procesów starałbym się odpowiedzieć na pytanie, w jakim zakresie dodatek L- proliny wpływając na redukcję stresu oksydacyjnego może wpływać na poziom glutationu?
5. Stwierdzenie, że skorupiaki słodkowodne narażone na stres cieplny wykazują zmiany behawioru pływania, jest zbyt szerokie ponieważ badania dotyczyły tylko jednego gatunku *Daphnia magna*.
6. W prezentacji wyników pojawiają się pewne trudności interpretacyjne w identyfikacji różnic statystycznych wskazanych na rycinach, w szczególności w odniesieniu wpływu L- proliny i stresu cieplnego. Należałoby doprecyzować, że różnice istotne dotyczą porównania grup doświadczalnych z grupą kontrolną.
7. Cennym uzupełnieniem byłyby też analizy ekspresji genów, które mogłyby szerzej wyjaśnić zagadnienia związane z wpływem stresu cieplnego na poziomie molekularnym zarówno u *Daphni* jak w erytrocytach ptaków. Czy Doktorantka podejmowała takie próby, czy też są w planach dalszych badań?

Wymienione powyżej uwagi nie umniejszają wysokiej wartości rozprawy i prezentowanych w niej wyników. Niniejszą rozprawę oceniam pozytywnie, zarówno od strony formalnej ale przede wszystkim merytorycznej.

### **Podsumowanie**

Podsumowując recenzję stwierdzam, że niniejsza praca doktorska spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo, w postępowaniu prowadzonym na podstawie Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule



naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.), w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm. w Dz. U. z 22 marca 2019 r. poz. 534) i wnoszę o dopuszczenie **mgr Aleksandry Szabelak** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
**Prof. dr-hab. Mariusz Pierzchała**