

Wrocław, 31 marca 2022 r.

Prof. dr hab. Ewa Łukasiewicz
Zakład Hodowli Drobiu
Instytut Hodowli Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Ocena rozprawy doktorskiej

Pana mgr. inż. Arkadiusza Matuszewskiego pt.: „Wpływ nanocząstek wybranych związków wapnia podawanych *in ovo* na rozwój zarodka kury oraz wyniki produkcyjne i jakość kości kurcząt brojlerów”, wykonanej w Instytucie Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie,
pod kierunkiem dr hab. Moniki Łukasiewicz, profesora uczelni

Podstawą opiniowanej rozprawy doktorskiej są trzy, spójne tematycznie publikacje naukowe (jedna przeglądowa, dwie oryginalne prace twórcze), ujęte przez Doktoranta pod w/w tytułem, opublikowane w latach 2020-2021, w renomowanych, wysoko punktowanych, międzynarodowych czasopismach naukowych posiadających wskaźnik oddziaływania (IF):

1. Matuszewski A., Łukasiewicz M., Niemiec J. 2020. Calcium and phosphorus and their nanoparticle forms in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal*, 76 (2): 328-345; IF =2,91; 70 pkt ministerialnych; zgodnie z oświadczeniami Współautorów udział Doktoranta wynosił 85%;
2. Matuszewski A., Łukasiewicz M., Niemiec J., Jaworski S., Kamaszewski M., Szudrowicz H., Puppel K., Chwalibog A., Sawosz E. 2020. Effect of *in ovo* application of hydroxyapatite nanoparticles on chicken embryo development, oxidative status and bone characteristics. *Archives of Animal Nutrition*, 74 (5): 343-362; IF =2,242, 100 pkt; zgodnie z oświadczeniami Współautorów udział Doktoranta wynosił 65%;
3. Matuszewski A., Łukasiewicz M., Niemiec J., Kamaszewski M., Jaworski S., Domino M., Jasiński T., Chwalibog A., Sawosz E. 2021. Calcium Carbonate Nanoparticles-Toxicity and Effect of *In Ovo* Inoculation on Chicken Embryo Development, Broiler Performance and Bone Status. *Animals*, 11(4): 932; IF =2,752, 100 pkt; zgodnie

z oświadczeniami Współautorów udział Doktoranta wynosił 72,5% (błędne jest oświadczenie Pana dr hab. Macieja Kamaszewskiego, prof. uczelni).

Łączny IF publikacji stanowiących rozprawę doktorską wynosi 7,909, a liczba punktów ministerialnych 270. Jak wynika z powyższego zestawienia, Doktorant był pierwszym i wiodącym autorem. W każdej pracy w Acknowledgment zanaczono, że publikacja jest częścią rozprawy doktorskiej Pana mgr. Arkadiusza Matuszewskiego.

W/w wymienione artykuły w całości zostały zaprezentowane i obszernie omówione w bardzo starannie przygotowanym opracowaniu (w języku polskim), w formie „klasycznej” rozprawy doktorskiej w wersji „papierowej” zawierającej: Streszczenie (w j. polskim i angielskim), Spis treści, Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską; Wykaz stosowanych skrótów, Wstęp (zakończony hipotezą badawczą i nakreślonym celem pracy), Metodykę badań, Omówienie głównych wyników badań, Podsumowanie, Wnioski oraz Bibliografię. Na końcu opracowania zamieszczone zostały oświadczenia Współautorów omawianych publikacji.

Dawno nie oceniałam rozprawy doktorskiej i przyznam szczerze, że jestem pod dużym wrażeniem szerokiej wiedzy teoretycznej Doktoranta, a także Jego umiejętności praktycznych potwierdzonych ogromem różnorodnych analiz wykonanych w ramach realizowanych zadań badawczych. Również tematyka podjętych badań jest bardzo interesująca, aktualna, a zarazem przyszłościowa. Dotyczy próby podawania różnych substancji (w tym wypadku fosforanu i węgla wapnia) w formie nanometrycznej, co z jednej strony może przyczynić się do większej bio-przyswajalności i lepszego wykorzystania tych substancji przez organizm zwierzęcy, pozwalając tym samym na zmniejszenie ich poziomu w dawce pokarmowej, co z drugiej strony wpłynie korzystnie na mniejsze obciążenie środowiska metabolitami przemiany materii. Zdaniem wielu badaczy podanie wapnia i fosforu w formie nanometrycznej pozwala na o 50% niższe wydalanie tych pierwiastków do środowiska.

We „Wstępie” swojego opracowania, podobnie jak w pierwszym artykule pt.: „Calcium and phosphorus and their nanoparticle forms in poultry nutrition” (World’s Poultry Science Journal, 2020), będącym pracą przeglądową, Doktorant szeroko omawia zagadnienia dotyczące nanobiotechnologii, ich znaczenia w wielu dziedzinach życia, w tym w produkcji drobiarskiej, dając popis swojej wiedzy teoretycznej. Na tle obszernego piśmiennictwa (wykorzystano łącznie 121 pozycji bibliograficznych) omówiono źródła, dostępność,

zapotrzebowanie u kurcząt oraz rolę wapnia i fosforu w rozwoju i mineralizacji układu kostnego kurcząt, podawanych w formie tradycyjnej i nanocząstek.

Doskonała znajomość problemów związanych z mineralizacją i wytrzymałością układu kostnego szybko rosnących kurcząt o silnie rozwiniętych mięśniach piersiowych pozwoliła Panu mgr. Arkadiuszowi Matuszewskiemu na wyznaczenie sobie celów badawczych: określenie przyswajalności węglanu i fosforanu wapnia (hydroksyapatytu), wprowadzanych *in ovo* w formie nanometrycznej (odpowiednio: CCN oraz HA-NP), do świeżo zniesionych jaj wylęgowych kur kierunku mięsnego i ich wpływ na ... i tu wykorzystano bardzo wiele kryteriów oceny i technik analitycznych, co pozwoliło na:

- analizę rozwoju zarodków kurzych do 20. dnia inkubacji jaj (układu kostnego, mięśnia piersiowego, wątroby, parametry krwi) – w jajach iniekowanych różnym poziomem HA-NP (praca opublikowana w Archives of Animal Nutrition, określona przez Doktoranta jako Matuszewski i wsp., 2020b, choć nie ma 2020b?);

- ocenę toksyczności oraz wpływu iniekcji nanocząstek węglanu wapnia (CCN) do świeżo zniesionych jaj na rozwój zarodków kurzych do 20. dnia inkubacji jaj, wskaźniki produkcyjne oraz jakość mięsa i układu kostnego kurcząt brojlerów linii Ross 308, odchowywanych do 42 dnia życia (praca opublikowana w Animals, 2021).

Dodatkowym elementem pracy było wyhodowanie komórek osteogennych z kości udowej 12. dniowych zarodków kurzych, które posłużyły do wyboru najkorzystniejszego (najmniej toksycznego) stężenia CCN, wykorzystywanego w drugim doświadczeniu (określonym przez Doktoranta jako Panel II).

W pkt „Metodyka badań” opisano sposób: przygotowania nanocząsteczek wapnia; izolacji i hodowli komórek osteogennych; iniekcji świeżo zniesionych jaj CCN i HA-NP; inkubacji jaj; pozyskiwania 20. dniowych zarodków; warunków odchowu kurcząt do 42. dnia życia oraz analizy dysekcyjnej i oceny parametrów mięsa. W dalszej kolejności opisano metodykę obydwu Paneli, wyszczególniając wszystkie zastosowane techniki badawcze – 11 różnorodnych technik z wykorzystaniem, m.in. spektrofotometru płytkowego, spektrometru emisji atomowej, mikroskopu skaningowego, transmisyjnego i świetlnego, tomografu komputerowego do skanowania kości oraz mikrotomu do przygotowania skrawków kości do barwienia histologicznego. Do oceny jakości mięsa wykorzystano pH-metr i kolorymetr. Każde doświadczenie zostało zaprezentowane w bardzo czytelnej formie graficznej.

W omawianej części zauważyłam pewne niezręczne sformułowania, które przytaczam z obowiązku recenzenta, a także z nadzieją, że w przyszłości uda się ich uniknąć. Napisano, że do iniekcji jaj użyto igły 27G – należałoby wyjaśnić ten tajemniczy symbol; unikałabym, szczególnie w pracach naukowych, określenia „zaś potem”; losowo przydzielono do a nie podzielono do; W dniu – W 20. dniu; „Pierwszego dnia (str. 18) pisklęta zaszczepiono..., a następnie 15 dnia...Następnie pisklęta losowo przydzielono do boksów” – czy dopiero 15 dni po wykluciu? Jeśli tak to już nie pisklęta. Są pewne rozbieżności między oryginalnymi pracami i ich opisem w języku polskim. Z fermy pozyskiwano jaja wylęgowe, a więc hatching egg, a nie „fertilized eggs”, bo tego nie można było stwierdzić przed nalożeniem. Czy jaja ważono i iniekowano przed nakładem czy jak w oryginalnej pracy „The eggs were weighed... on day 1 of incubation”? Dlaczego linię Ross 308 określono w publikacji jako „Ross x Ross 308”. Zdziwiłam się, dlaczego przy odchowie kurcząt brojlerów nie zastosowano podgrup (powtórzeń), tylko odchowywano po 90 piskląt z każdej grupy (Animals, 2021)? Okazało się że, owszem wyodrębniono (podano to w oryginalnej pracy), trzy powtórzenia po 30 ptaków obu płci w każdej. Opublikowane już prace zostały poddane dogłębnym analizom przez recenzentów, ale mimo wszystko zastanawia mnie fakt dlaczego do analiz dysekcyjnych pobrano tylko kogutki (sugerowałabym cockerels lub chicken males a nie „cocks”)? Czy sześć kogutków pobrano łącznie z trzech podgrup? Czy to nie za mało? Czy dozwolony jest odchów kurcząt brojlerów przy 24 godz. dniu świetlnym przez cały okres? Pełny okres inkubacji jaj kurzych wynosi 21 a nie 20 dni (str. 24). W pracy opublikowanej w Archives of animal nutrition analizowano 20. dniowe (wyjmowano je z jaj), a w Tab. 1 podano „hatchability”, a de facto pisklęta do końca się nie wyklęły (nawiasem mówiąc w części opisowej zabrakło mi informacji o poziomie wylęgowości piskląt w przypadku jaj iniekowanych i z grupy kontrolnej, zabrakło jej też w artykule opublikowanym w Animals, natomiast jak wspomniano powyżej, wartość podana w pracy opublikowanej w Animals nie powinna być wskaźnikiem wylęgowości); „during incubation, the eggs were two times exposed to light” – lepiej po prostu „were candled”, bo nie chodzi w tym przypadku o oświetlanie jaj.

W kolejnym rozdziale Autor omawia skrótowo (dwie prace dotyczące badań eksperymentalnych są bardzo obszerne – każda z nich liczy 18-19 stron wydruku), najważniejsze wyniki przeprowadzonych eksperymentów. Tu wielokrotnie powtarza się jedno niezręczne sformułowanie, którego udało się uniknąć w tytułach pkt 4.1 i 4.2 – „iniekcja *in ovo* do białka HA-NP” oraz „iniekcja *in ovo* do białka CCN” – brzmi ono tak jakby do białka

HA-NN i CCN wprowadzono „coś” drogą iniekcji. Jestem zdania, że omówienie „Oceny żywotności i stopnia mineralizacji ptasich komórek osteogennych” powinno poprzedzać pkt 4.2, bo przecież na podstawie wyników tego doświadczenia wybrano poziom iniekowanego CCN. Jaka jest definicja „dużego ptaka” (str. 33)?

Opracowanie kończą „Podsumowanie”, „Wnioski” (które de facto stanowią podsumowanie uzyskanych efektów) oraz „Uogólnienia”, które zdecydowanie można nazwać, i są wnioskami, bowiem wytyczają drogę dalszych badań.

Zgodnie z założonymi hipotezami badawczymi (str. 15), oczekiwano, że: „Nanocząstki hydroksyapatytu ... działając (powinno być działają) stymulująco i modulująco, szczególnie w odniesieniu do rozwoju układu kostnego” – efekt pozytywny; że: „Nanocząstki węgla wapnia ... wywierają szereg efektów stymulujących i modulujących rozwój zarodka kury oraz wpływają na jakość kości kurcząt brojlerów ... wpływają na regulację osteokalcyny ... co skutkuje zwiększeniem mineralizacji kości” – ponownie efekty pozytywne i korzystne dla organizmu oraz wyników produkcyjnych, to dlaczego „Podsumowanie” i „Wnioski” rozpoczynają się od stwierdzeń, że nie było efektów „negatywnych”? Na wszystko, w tym również, a może przede wszystkim, na efekty własnych poczynań i osiągnięć, należy patrzeć pozytywnie i podkreślać co jest korzystne, a nie co okazało się nietoksyczne.

Przedstawione powyżej uwagi nie mają najmniejszego wpływu na ocenę naukową i merytoryczną pracy, należy je traktować wyłącznie jako zachętę do bardziej starannej edycji prowadzonych badań (w wielu miejscach brakuje spacji między wyrazami).

Obydwie prace eksperymentalne (jak również „wstęp” do nich opublikowany w formie pracy przeglądowej), są na bardzo wysokim poziomie merytorycznym, naukowym i edytorskim, o czy najlepiej świadczy ranga czasopism w których je opublikowano. Problematyka badawcza ma charakter interdyscyplinarny, łączy wysokie walory poznawcze oraz w przyszłości - aplikacyjne. Wnosi znaczący wkład w rozwój dyscypliny zootechnika i rybactwo, w szczególności z zakresu dobrostanu zwierząt, efektów produkcyjnych kurcząt brojlerów i ochrony środowiska. Wykazano zróżnicowane właściwości i oddziaływanie nanocząstek HA-NP i CCN wprowadzanych do jaj wylęgowych przed rozpoczęciem inkubacji na układ kostny zarodków oraz kurcząt brojlerów, a także mniejszą toksyczność nanocząsteczek wapnia w porównaniu do hydroksyapatytu. Na podkreślenie zasługuje bardzo różnorodny (w postaci tabel, wykresów, dokumentacji fotograficznej) i staranny sposób prezentacji wyników. Pomimo zastosowania wielu różnorodnych technik analitycznych nie

uzyskano jednoznacznej odpowiedzi na postawione zadania badawcze, ale z pewnością, i tak też konkluduje Pan mgr inż. Arkadiusz Matuszewski, można stwierdzić, że wykorzystanie nanotechnologii w żywieniu zwierząt, czy w omawianym przypadku, podawania określonych substancji *in ovo*, jest nową ale obiecującą dziedziną i warto kontynuować badania w tym zakresie.

Konkludując, stwierdzam z pełnym przekonaniem, że praca doktorska mgr. inż. Arkadiusza Matuszewskiego pt.: „Wpływ nanocząstek wybranych związków wapnia podawanych *in ovo* na rozwój zarodka kury oraz wyniki produkcyjne i jakość kości kurcząt brojlerów” spełnia warunki stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668) i w związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej dyscypliny zootechnika i rybactwo Szkoły Wyższej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pana mgr. inż. Arkadiusza Matuszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, biorąc pod uwagę szeroki zakres przeprowadzonych badań, które wymagały dużego zaangażowania, umiejętności manualnych oraz wiedzy, a także wysoki poziom naukowy rozprawy doktorskiej, co potwierdzają wysokie wskaźniki biometryczne czasopism naukowych, w których ukazały się artykuły będące podstawą rozprawy doktorskiej, wnioskuję do Rady Naukowej dyscypliny zootechnika i rybactwo o wyróżnienie dysertacji.

Wprawdzie nie mieści się to w zakresie oceny dysertacji doktorskiej dokonywanej przez recenzenta, ale pragnę zaznaczyć, że godna pochwały jest również dotychczasowa, szeroko zakrojona działalność naukowa, publikacyjna, dydaktyczna i organizacyjna Pana mgr. inż. Arkadiusza Matuszewskiego. Szczerze gratuluję Pani Promotor – dr hab. Monice Łukasiewicz, profesor uczelni oraz byłemu, wieloletniemu kierownikowi Katedry Hodowli Zwierząt – Panu prof. dr. hab. dr h.c. Janowi Niemcowi tak zdolnego i pracowitego doktoranta.

