



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Katedra Zoologii i Dobrostanu Zwierząt

Kraków, dnia 2 maja 2022 roku

dr hab. Marcin Lis, prof. URK
Katedra Zoologii i Dobrostanu Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja
w Krakowie

Recenzja 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
broilerów”**

wykonanej pod kierunkiem

dr hab. Moniki Łukasiewicz- Mierzejewskiej

„*Omne vivum ex ovo*”, ta maksyma, żyjącego w elżbietańskiej Anglii biologa William Harvey (1578-1657) może stanowić motto przedstawionej mi do recenzji 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 broilerów”. Jajko ptaka stanowi pozornie nieożywioną „kapsułę” w której zgromadzone są wszystkie składniki potrzebne do rozwoju nowego życia (Tullet, 1990, Science and the art of incubation, doi: <https://doi.org/10.3382/ps.0690001>). Jednocześnie, skład chemiczny jajka jest konserwatywny i tylko do pewnego stopnia może być modyfikowany żywieniem matki. Paradoksalnie na przełomie XX i XXI wieku pojawiły się opinie, że składniki zawarte w jajku mogą być niewystarczające dla zarodków i piskląt współczesnych szybko rosnących i wysokoprodukcyjnych linii drobiu (np. Al-Murrani, 1982, doi: [10.1080/00071688208447943](https://doi.org/10.1080/00071688208447943) ; Ohta i wsp. 1999, doi: [10.1093/ps/78.11.1493](https://doi.org/10.1093/ps/78.11.1493) ; Uni i wsp 2005 doi: [10.1093/ps/84.5.764](https://doi.org/10.1093/ps/84.5.764)). Hipoteza ta nabiera szczególnego znaczenia

30-059 Kraków, Al. Mickiewicza 24/28
tel. +48 (12) 662 40 53, e-mail: kzdz@urk.edu.pl

ze względu na ścisłą zależność pomiędzy jakością pisklęcia, a przebiegiem odchowu i wynikami produkcyjnymi stada, niezależnie od gatunku i typu użytkowania. Trudno również zaprzeczyć, że zaspokojenie potrzeb, na każdym etapie jego rozwoju ontogenetycznego, silnie obciążonego organizmu ptaka stało się jednym z głównych wyzwań, współczesnego, nastawionego na produkcję masową drobiarstwa.

Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Arkadiusza Matuszewskiego ściśle wpisuje się powyższą tematykę badawczą i stanowi ambitną próbę zmierzenia się wyzwaniem jakim jest konieczność poprawy jakości kośćca, a tym samym ograniczenie schorzeń układu szkieletowego u szybko rosnących kurcząt brojlerów. Zdaniem Autora jednym ze sposobów, o dużym potencjale aplikacyjnym, może być suplementacja *in ovo* związków mineralnych zawierających wapń i fosfor w formie nanocząsteczek. Użycie nanocząsteczek jest uzasadnione przez ich większą przyswajalność w porównaniu do tradycyjnych dodatków mineralnych pochodzenia organicznego. W celu weryfikacji powyższej hipotezy, zaplanowano cykl dobrze przemyślanych doświadczeń, które miały określić wpływ nanocząstek wybranych związków wapnia: (nanocząstki węgla wapnia (CNN, CaCO_3) i nanocząstki hydroksyapatytu (HA-NP; $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)), na rozwój embrionalny i postembrionalny kurcząt broilerów, ze szczególnym uwzględnieniem układu lokomotorycznego. Miało temu posłużyć zbadanie:

- żywotności i stopnia mineralizacji ptasich komórek osteogennych poddanych działaniu różnych dawek nanocząstek węgla w warunkach *in vitro*;
- przeżywalności po podaniu *in ovo* różnych dawek nanocząstki węgla wapnia i hydroksyapatytu zarodków kurzych i oznaczenie wybranych parametrów osteologicznych oraz biochemicznych w ich tkankach;
- przebiegu rozwoju postembrionalnego, przy uwzględnieniu wybranych wskaźników produkcyjnych i parametrów histologicznych, kurcząt broilerów, którym podano *in ovo* nanocząstki węgla wapnia.

Na rozprawę doktorską Pana mgr inż. Arkadiusza Matuszewskiego złożyły się ostatecznie trzy tematycznie spójne artykuły naukowe, w tym publikacją o charakterze przeglądowym i dwie prace oryginalne, tj.:

- 1) Matuszewski A, Łukasiewicz M, Niemiec J. 2020. Calcium and phosphorus and their nanoparticle forms in poultry nutrition. *World's Poultry Science Journal*, 76: 328- 345;
- 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: 343-362.
- 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: 932.

oraz

- 4) Autoreferat w j. polskich, w którym streszczono problematykę badawczą, wyniki doświadczeń, a także płynące z nich wnioski.

Wszystkie prace zostały opublikowane w uznanych czasopismach naukowych, objętych oceną przez ISI Journal Citation Reports, prezentujących prace z zakresu hodowli zwierząt (w tym drobiu), biotechnologii i bioinżynierii. Łączna wartość wskaźnika wpływu (IF) dla wymienionych prac wynosi 7,9, a liczba punktów MEiN wynosi 270. W każdej z wymienionych publikacji Pan mgr inż. Arkadiusz Matuszewski jest pierwszym autorem, a jego wkład w ich powstanie, szacowany odpowiednio na 85, 65 i 67,5%, jest niepodważalny i wiodący.

Chciałbym podkreślić przemyślany dobór publikacji składających się na Dysertację. Pierwszą z wymienionych prac można uznać za rodzaj klasycznego wstępu i przeglądu literatury, w której Doktorant opierając się na ponad 130 pozycjach literatury, punkt po punkcie, logicznie uzasadnia celowość podjętych badań oraz przyjęte rozwiązania. Szczegółowo omawia nie tylko fizjologiczne aspekty rozwoju kośćca u drobiu w aspekcie metabolizmu Ca i P, ale także problematykę zwiększenia dostępności i przyswajalności tych pierwiastków. Mogę tylko pogratulować, wytrwałości i sumienności, jakiej wymagało przygotowanie

powyższego artykułu. Równocześnie uważam, że opublikowanie przez Doktoranta, który dopiero ugruntowuje swoją pozycję w świecie nauki, pracy przeglądowej w *World's Poultry Science Journal*, dowodzą jego odwagi oraz pewności własnej wiedzy. Przypuszczam, że swoją rolę w podjęciu decyzji i formie publikacji odegrało również wsparcie oraz umiejętność korzystania z rad i doświadczenia Pani Promotorki oraz Pana prof. Jana Niemca. Są to walory bardzo pożądane u naukowca i stanowią świetny prognostyk dla dalszego rozwoju p. mgr. inż. Arkadiusza Matuszewskiego.

Publikacje oryginalne wchodzące w skład dysertacji przedstawiają bardzo wysoki poziom merytoryczny. Podkreślenia wymaga fakt, że prezentują one wyniki uzyskane dzięki posłużeniu się bardzo licznymi metodami i nowoczesnymi technikami badawczymi, które wykraczają poza zakres klasycznego drobiarstwa, i sięgają po osiągnięcia nanotechnologii, biochemii i fizjologii, histologii oraz biotechnologii.

Skorzystanie z tak zróżnicowanego instrumentarium pozwoliło Panu mgr. inż. Arkadiuszowi Matuszewskiemu udowodnić, że o ile nanocząsteczki hydroksyapatytu podane *in ovo* do białka (przy dawkach w zakresie 50-500 $\mu\text{g/ml}$) nie obniżają przeżywalności embrionów, to jednak nie można wykluczyć ich toksycznego działania. Dowodzi tego świadczy pobudzenie aktywności układu antyoksydacyjnego zarodka/pisklęcia. Jednocześnie dawka 500 $\mu\text{g/ml}$ HA-NP. wydaje się także zakłócać proces mineralizacji kośćca i powodować spadek ich masy. W przeciwieństwie do HA-NP, nanocząsteczki węglanu wapnia wydają się być materiałem w pełni biokompatybilnym, a ponadto o właściwościach osteokondukcyjnych. W przypadku iniekcji *in ovo* CCN (w stężeniu 500 $\mu\text{g/ml}$) nie zaobserwowano symptomów świadczących o zaburzeniu homeostazy zarodka. Co więcej wyniki oznaczeń *in vitro* i *in vivo* wskazują na przedłużone działanie ogólnoustrojowe, polegające głównie na poprawie mineralizacji kośćca (m.in. dzięki stymulacja komórek osteogennych, zwiększenie koncentracji Ca i P oraz osteokalcyny w kościach).

Uważam, że uzyskane rezultaty doświadczeń składających się na Rozprawę w pełni pozwoliły na weryfikację założonych hipotez. Co więcej stanowią solidny punkt wyjścia do dalszych badań dotyczących wykorzystaniem nanocząstek związków wapnia w produkcji drobiarskiej. Przekłada się to oczywiście na moją bardzo wysoką ocenę dysertacji doktorskiej Pana mgr inż. Arkadiusza Matuszewskiego. Niemniej jednak z obowiązku Recenzenta, ale także własnej naukowej dociekliwości, chciałbym

prosić Doktoranta o uzupełnienie pewnych drobnych kwestii dotyczących niektórych elementów prac eksperymentalnych.

- 1) W obu oryginalnych publikacjach podano, że ważenie jaj i iniekcje *in ovo* wykonywano w „d 1”, co należy odczytać jako pierwszą dobę inkubacji. Zgodnie z moim doświadczeniem, zarodek kurzy w pierwszych 48-72 godzinach inkubacji jest bardzo wrażliwy na wszelką manipulację, więc wykonywanie powyższych procedur wydaje się nielogiczne. Dotyczy to w szczególności ważenia jaj i ich selekcji. Czynności te zwykle wykonuje się przed rozpoczęciem doświadczenia. Przypuszczam więc, że zachodzi tu nieporozumienie w numeracji i powyższe manipulacje przeprowadzane były zapewne przed rozpoczęciem inkubacji („d 0”). Proszę o rozwianie moich wątpliwości w tej kwestii.
- 2) Z własnej praktyki laboratoryjnej świetnie rozumiem ograniczenia i dylematy związane z ustalaniem liczebności grup. W doświadczeniu omawianym w pracy Matuszewski i wsp (2020), użycie 30 szt. jaj/grupę było niewątpliwie uzasadnione i wystarczające w kontekście zaplanowanych i wykonanych analiz biochemicznych i histologicznych. Natomiast ocena wylęgowości przy takiej, w sumie niewielkiej liczebności grupy wymaga już pewnej ostrożności. Tym bardziej, że w metodyce nie zostało doprecyzowane, czy wskaźnik ten był liczony w odniesieniu do jaj nałożonych czy też zapłodnionych. Pragnę zaznaczyć, że pomimo tej uwagi interpretacja wyników wylęgowości jest bez wątpienia prawidłowa. Jednocześnie znając z autopsji kłopot jaki sprawia statystyczne porównanie wylęgowości pomiędzy grupami, chciałbym zasugerować stosowanie w takim przypadku testu U Manna-Whitneya. Test ten służy do badania istotności różnic w częstotliwości występowania przypadków (frekwencji) pomiędzy dwoma populacjami;
- 3) Proszę o doprecyzowanie, w którym obszarze skorupy wykonywano iniekcję. Czy był to ostry koniec jaja, czy też do białka przebijano się przez komorę powietrzną?
- 4) Ciekawym, chociaż nieoczekiwanym problemem badawczym, który pojawił się podczas wykonywania doświadczeń, były odnotowane bardzo liczne przypadki śmierci zarodków w kontroli pozytywnej (iniektowanej nośnikiem). Rozumiem powód rezygnacji z przedstawiania w publikacjach wyników z tej grupy. Uważam, jednak, że dla pełnego opisu doświadczenia powinny one zostać zamieszczone. Do tego zagadnienia wrócę jeszcze pod koniec recenzji.

Ponadto proszę o skorygowanie rozbieżności, co było wstrzykiwane do jaj należących do kontroli pozytywnej: płyn PBS (jak podano w Autoreferacie), czy też woda zdemineralizowana jak podano w publikacjach. Moim zdaniem, do jaj w kontroli pozytywnej powinna zostać podana ta sama substancja, która była medium dla w zawiesiny nanocząsteczek;

- 5) Dlaczego zrezygnowano z oznaczania aktywności katalazy, a więc podstawowego do obok SOD, i GSH-PX enzymu antyoksydacyjnego?
- 6) W jaki sposób ograniczono wpływ płci na wyniki analiz w doświadczeniu omówionym w publikacji Matuszewski i wsp. 2021, jeżeli pisklęta przed podziałem na grupy nie były seksowane.

Chciałbym także zwrócić uwagę, że w autoreferacie Doktorant licznie cytuje wyniki badań opublikowanych w czasopismach nie objętych oceną przez ISI Journal Citation Reports. Nie jest to zarzut, lecz refleksja. Obecnie, przy gwałtownym rozwoju czasopism internetowych, czasem w takich “nierenomowanych wydawnictwach” przedstawiane są wyniki ciekawych i niekonwencjonalnych badań. Jak dowodzi niniejsza Rozprawa, z takich publikacji, oczywiście przy zachowaniu naukowego obiektywizmu, też warto skorzystać.

Przedstawione oświadczenia współautorów publikacji jednoznacznie świadczą, że Doktorant brał czynny udział we wszystkich etapach ich powstawania: od opracowania koncepcji i planu doświadczeń oraz założeń metodycznych, poprzez samodzielną pracę laboratoryjną (pobieranie materiału, wykonanie manipulacji *in ovo*, hodowle *in vitro*, analizy histologiczne itp), analizę i interpretację wyników, aż po przygotowanie manuskryptów. Zakres wykonanej pracy, świadczy o dużej samodzielności i dojrzałości naukowej Doktoranta. Na szczególne wyróżnienie zasługuje opanowanie licznych metod laboratoryjnych. Niewątpliwie, bardzo wysoka jakość naukowa ocenianej dysertacji jest wynikiem samodzielnej ciężkiej pracy wykonanej przez Pana mgr inż. Arkadiusza Matuszewskiego i równocześnie możliwości czerpania z doświadczenia uznanych autorytetów z dziedziny drobiarstwa pracujących w Katedrze Hodowli Zwierząt SGGW w Warszawie, a także współpraca w sumie z czterema specjalistycznymi laboratoriami z Polski i Danii. Należy także podkreślić fakt, że rozprawa została wykonana ramach wewnętrznego grantu

badawczego SGGW nr 505-10-070300-Q00394-99 oraz projektu badawczego Narodowego Centrum Badań i Rozwoju 2016/21/B/NZ9/01029.

Czuję się także zobowiązany podkreślić, że dołączony do rozprawy opis działalność naukowej, organizacyjnej i dydaktycznej Pana mgr inż. Arkadiusza Matuszewskiego budzi mój autentyczny szacunek. W tym miejscu podkreślić zaangażowanie Doktoranta w działalność popularyzatorską naukę, na którą w dobie wszechobecnej „punktozy” zwykle brakuje czasu i energii.

Mając na uwadze bardzo wysoką jakość merytoryczną ocenianej Rozprawy, chciałbym zaprosić Doktoranta do naukowej dyskusji, dotyczącej takich kwestii:

- w ostatnich latach ukazało się wiele doniesień i opracowań (np. Abbas, i wsp 2020. Doi: [10.1016/j.envint.2020.105646](https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105646); Bundschuh i in 2018 doi: [10.1186/s12302-018-0132-6](https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6); Gupta, i Dhawan. doi: [10.1016/B978-0-12-820757-4.00004-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820757-4.00004-1)) omawiających negatywny wpływ na organizm i środowisko. Ten aspekt jest szczególnie interesujący w kontekście cytowanej w Dysertacji pracy Pineda i wsp. (2012), dotyczącej możliwości stosowania nanocząsteczek miedzi jako alternatywy dla antybiotyków w produkcji drobiarskiej;
- w kontekście mojej wieloletniej praktyki stosowania iniekcji *in ovo*, bardziej zaskoczyła mnie bardzo niska zamieralność w grupach doświadczalnych, niż wspomniana wysoka śmiertelność w kontroli pozytywnej. Jak do tej pory zgadzałem się z opinią Bruggeman i wsp. (2003; doi: [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(03\)00168-6](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00168-6)), że tolerancja zarodków na manipulację wzrasta wraz z przebiegiem embriogenezy. Być może wyniki wylęgowości uzyskane podczas Pańskich doświadczeń pracy dowodzą, że HA-NP i/lub CCN zapobiegają śmierci zarodków poddanych iniekcji *in ovo* przed/początku inkubacji, podczas gdy „czysty” nośnik jest embriotoksyczny?

Na zakończenie pragnę także wyjaśnić, że zauważone w Autoreferacie nieliczne drobne błędy i niezręczności stylistyczne oraz edytorskie, nie miały znaczenia dla ogólnej oceny merytorycznej Rozprawy i zostały pominięte w recenzji.

Reasumując, pozytywnie oceniam przedstawioną mi do recenzji rozprawę doktorską 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 broilerów”, wykonaną pod kierunkiem dr hab. Moniki Łukasiewicz-Mierzejewskiej. Tym samym stwierdzam, że spełnia ona warunki określone w Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668).

W związku z powyższym, przedkładam Panu Dyrektorowi Nauk o Zwierzętach i Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Arkadiusza Matuszewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, uznając bardzo wysoką wartość naukową oraz aplikacyjną recenzowanej Rozprawy, oryginalność podjętego tematu, a także szeroki wachlarz metod badawczych, które zapewniły obiektywną i wielokierunkową weryfikacji przyjętych hipotez zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z wnioskiem o wyróżnienie dysertacji mgr inż. Arkadiusza Matuszewskiego.

Kraków, dnia 2 maja 2022


dr hab. inż. Marcin Lis, prof URK