

Prof. dr hab. Katarzyna Ognik
Katedra Biochemii i Toksykologii
Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, dn. 27.03.2023 r.

Ocena

rozprawy doktorskiej mgr inż. Huberta Szudrowicza

pt. „Wpływ nanocząstek srebra na danio pręgowane (*Danio rerio*) podczas długoterminowej ekspozycji”, przedstawionej Radzie Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera ogółem 88 ponumerowanych stron. Poszczególne rozdziały to: *Spis treści* s. 5, *Streszczenie w języku polskim i angielskim* s. 4, *Wprowadzenie i cel pracy* s. 6-7, *Przegląd literatury* s. 8-26, *Materiał i metody* s. 27 - 37, *Wyniki* s. 38 - 49, *Dyskusja* s. 50-64, *stwierdzenia i Wnioski* s. 65, *Bibliografia* s. 66 – 88. W tekście zawartych są 4 tabele i 12 rycin. W *Bibliografii* wykazanych jest 194 numerowanych pozycji literatury krajowej i zagranicznej.

Te wszystkie wymienione rozdziały tworzą razem logiczną całość. Oceniana praca zawiera podstawowe elementy rozprawy doktorskiej, napisana jest dość poprawnym, naukowym językiem i formalnie odpowiada wymogom zawartym w *Ustawie* z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668).

Ocena merytoryczna

Podjęta przez Doktoranta tematyka dotyczy bardzo interesującego i aktualnego zagadnienia. Wstęp i przegląd literatury przedstawia istniejący stan wiedzy na temat srebra, jego obecności w środowisku i wpływie na organizm żywy. Autor dysertacji trafnie podkreśla w przeglądzie piśmiennictwa, że postępujący rozwój technologiczny wykorzystuje coraz częściej srebro, w tym również jego formę fizyczną w postaci nanocząstek. Autor dysertacji trafnie także argumentuje, że choć nanocząstki mogą pozytywnie oddziaływać na środowisko i organizmy, to jednak są ksenobiotykami, a ich zbyt wysokie stężenie w środowisku może być toksyczne zarówno dla organizmów lądowych jak i wodnych. W przeglądzie piśmiennictwa Autor w utworzonych zupełnie zbędnie kilku podrozdziałach zawarł podobne treści np.: 2.1. „Srebro i jego właściwości”, 2.2 „Toksyczność srebra”, 2.3. „Nanocząstki srebra”, 2.8. „Toksyczny potencjał nanocząstek srebra”. Wszystkie treści przytoczone w wyżej wymienionych rozdziałach warto było usystematyzować w jednym wspólnym rozdziale unikając tym



samym powtarzania treści. Zarówno w akapicie wprowadzającym jak i w przeglądzie piśmiennictwa Autor dość dobrze uzasadnił potrzebę przeprowadzenia badań dotyczących wpływu długoterminowego oddziaływania nanocząstek srebra na organizm danio pręgowanego, jednak analiza dokonana przez Autora przeglądu literatury pozwala ustalić, że podobne badania dotyczące wpływu oddziaływania nanosrebra na danio pręgowane były już prowadzone w latach 2017-2018 przez Lacave i wsp.,. W kontekście przytoczonych przez Autora danych tj. dostępnej wiedzy w zakresie przedmiotowej tematyki zabrakło w dysertacji wyraźnego podkreślenia: co nowego wniosą do nauki przeprowadzone przez Autora badania?- publiczna obrona będzie dobrą okazją do podkreślenia nowatorskiego aspektu przeprowadzonych badań.

Uważam, że **cel pracy** został dość niefortunnie sformułowany, „*celem niniejszej pracy jest analiza wpływu nanocząstek i jonów srebra na przeżywalność, rozwój i homeostazę danio pręgowanego podczas długoterminowej ekspozycji*” bowiem niejasne jest określenie „homeostaza danio” oraz brakuje „określenia długoterminowej ekspozycji na co....??”.

Z uwagi na fakt, że Autor nie przedstawił danych literaturowych czy danych WIOŚ jak jakie występują zawartości srebra w zbiornikach wodnych uwzględniając np. różnice pory roku (będą miały wpływ) trudno jest odnieść się do przedstawionej **hipotezy** o następującej treści „*Przyjęta hipoteza badawcza mówiąca, że długoterminowa ekspozycja na niskie, nawiązujące do obserwowanych w środowisku stężeń nanocząstek srebra zaburza homeostazę organizmów wodnych oraz wywołuje odpowiedź fizjologiczną organizmu*”. Z treści hipotezy wynika, a szczególnie z zawartego w niej sformułowania „mówiąca”, że nie jest to hipoteza Autora, a ogólnie dostępna i powszechna wiedza na ten temat. Ponadto stwierdzenie zawarte w hipotezie nasuwa również pytanie: czy chodzi o niskie stężenia srebra w formie jonowej, czy w formie nanocząstek w środowisku, i skoro niskie to jakie są wartości tych stężeń dla tych form?, czy jednakowe dla obydwu form?, czy i gdzie dostępne są dane na temat tych niskich stężeń dla obydwu form srebra w środowisku? na podstawie których postawiono hipotezę a następnie przeprowadzono eksperyment toksykologiczny? – z uwagi na fakt, że Autor nie podaje powyższych informacji w dysertacji, publiczna obrona będzie okazją do uzupełnienia tych informacji. Ponadto zawarte w hipotezie sformułowanie „wywołuje odpowiedź fizjologiczną organizmu” jest również mało precyzyjne, bowiem nie określa jakiej odpowiedzi fizjologicznej Badacz spodziewa się- przecież jest to hipoteza czyli założenie o wystąpieniu konkretnej reakcji.

W rozdziale 3 „Materiał i metody” Autor przedstawił układ doświadczenia, które przeprowadził w miesiącach maj-lipiec na danio pręgowanym (*Danio rerio*). Na przeprowadzenie doświadczenia otrzymał zgodę od II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie (Uchwała nr WAW2/009/2019). Doświadczenie prowadzono na 6 grupach doświadczalnych danio pręgowanym (po trzy powtórzenia na grupę). Danio utrzymywano w zbiornikach wodnych zawierających cztery różne stężenia nanocząstek srebra (0,001 mg/L, 0,01 mg/L, 0,1 mg/L, 1mg/L),

dotatkowo w zbiorniku zawierającym jedno stężenie azotanu srebra 0,001 mg/L oraz w zbiorniku zawierającym czystą wodę bez obecności srebra. Prezentowany układ metodyczny budzi wątpliwość w przypadku zasadności utworzenia grupy doświadczalnej, którą umieszczono w wodzie z azotanem srebra o stężeniu wyłącznie 0,001 mg/L. Poprawny układ metodyczny byłby wówczas wtedy, kiedy Autor oceniłby wpływ pozostałych stężeń azotanu srebra tj. 0,01 mg/L, 0,1 mg/L, 1mg/L na badane cechy i wskaźniki u danio pręgowanego. Poszerzony układ metodyczny o ocenę wpływu trzech stężeń azotanu srebra pozwoliłby na: a) ocenę wpływu formy srebra: azotan srebra/nanocząstki srebra oraz b) ocenę wpływu stężenia srebra. W przypadku zaprezentowanego układu metodycznego Autor mógł dokonać jedynie porównania: wszystkie grupy vs kontrola, a chcąc wykazać czy nanocząstki srebra są bardziej toksyczne niż azotan srebra (zakładam, że taki był zamysł) mógł to uczynić wyłącznie dla najniższego stężenia (0,001 mg/L).

Zaskakujący jest fakt bardzo wysokiej śmiertelności danio pręgowanego:60% (powyżej LD50) w zbiorniku zawierającym nanocząstki srebra o stężeniu 0,1 mg/L przy braku tak wysokiej śmiertelności w zbiorniku z 10 krotnie wyższym stężeniem nanocząstek srebra. Z uwagi na fakt, iż nie zostało to dostatecznie wyjaśnione w dysertacji, publiczna obrona będzie dobrą okazją do dyskusji na ten temat. Wątpliwość metodologiczną budzi również wymiana wody w zbiornikach podczas trwającego doświadczenia i uzupełnianie roztworami srebra do uzyskania oczekiwanych stężeń. Takie metody mogą być obarczone dużym błędem w uzyskaniu roztworu w zbiorniku o oczekiwanym stężeniu. Prawdopodobnie mogła to być przyczyna tak dużej śmiertelności wynikająca z niewłaściwego stężenia srebra. Proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do zagadnienia związanego z procedurą wymiany wody i zachowania czynnika doświadczalnego.

Należy podkreślić, że mgr inż. Hubert Szudrowicz zaplanował i wykonał dużą liczbę analiz i obserwacji. Małe rozmiary danio wymagają od Badacza bardzo dobrej wiedzy anatomicznej, precyzji i doświadczenia podczas pobrania materiału biologicznego, przygotowania do badań a następnie jego analizy. W trakcie eksperymentu Autor badań pobrał wątroby, trzustki od danio w od 4 lub 5sztuk z grupy do badań histologicznych odpowiednio w 26 i 100 dniu eksperymentu oraz wątrobę od 10 sztuk/grupy do badań biochemicznych (zawartość białka, aktywność fosfatazy alkalicznej i kwaśnej, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej, reduktazy glutationowej) oraz wątrobę od 5 sztuk/grupę do oceny ekspresji genów (katalazy-*cat*, reduktazy glutationowej-*gsr*, peroksydazy glutationowej-*gpx1a*, cytochromu P450-*cyp1a*, białka szoku cieplnego -*hsp70*). Szkoda, że Autor nie dokonał pomiaru stężeń srebra w narządach oraz nie prowadził kontroli dotyczącej zawartości srebra w wodzie poprzez jego regularne pomiary. Takie dane pozwoliłyby w sposób ciekawy skorelować obserwowane zmiany poziomu/aktywności badanych markerów z poziomem tego pierwiastka w organizmie.

3


Wątpliwość budzi opis metodyczny niektórych procedur m.in. oznaczania aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej. Autor badań w opisie metody oznaczania dysmutazy ponadtlenkowej odwołuje się do procedury opisanej przez Wooliams i wsp., 1983 dodając jednocześnie, że do oznaczeń wykorzystano kit firmy Randox, a obliczenia były zgodne z procedurą producenta kitu. Podobnie w przypadku oznaczenia aktywności peroksydazy glutationowej Autor podaje, że oznaczał zgodnie z Paglia i Valentine, 1967 oraz kitem Randox i analogicznie w przypadku reduktazy glutationowej zgodnie z metoda opracowana przez Goldberg, 1984 i kitem Randox. Zestawy diagnostyczne firmy Randox służą do oznaczeń aktywność ww enzymów, jednak nie są dedykowane do tkanki wątrobowej, a jedynie do krwi pełnej z której uprzednio należy wykonać odpowiednio hemolizaty i wówczas można oznaczyć aktywność tych enzymów podając wartość w U/gHb. Wyjaśnienia wymaga również fakt czym podyktowane było pobranie różnej liczby prób?, czy uwzględniano przy pobraniu prób powtórzenia w grupach (były trzy zbiorniki dla grupy), bowiem z liczebności chociażby $n=4$, $n=10$ wynika, że Autor nie uwzględniał powtórzenia?, a zatem czym kierował się ustalając taką liczebność do analiz?.

Uzyskane wyniki badań (rozdział 4) przedstawione i opisane zostały dość starannie. Na wykresach zabrakło jednak jednostek w jakich dokonano pomiaru badanych parametrów, a grupy doświadczalne podpisano jako stężenie, co jest niepoprawnie, bowiem w zbiornikach kontrolnych nie było srebra. Jeżeli Autor zdecydował się na opis osi x „stężenie” należało wpisać 0 mg/L przy grupie kontrolnej. Autor wykonał jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA (na co wskazują dane zawarte w tabelach i na rycinach), opisał je poprawnie w kolejnych podrozdziałach, co ułatwiało czytelnikowi ich analizę. W rozdziale 5 Autor także zrekapitulował najistotniejsze rezultaty swoich badań, odnosząc się do aktualnej wiedzy i poglądów prezentowanych w dostępnym piśmiennictwie. Niestety w rozdziale dyskusja Autor nie podjął się wyjaśnienia wszystkich (moim zdaniem interesujących zmian), podając przy ty zbyt dużo podręcznikowych informacji lub ograniczając się do porównania wyników własnych badań z wynikami innych Autorów. Podkreślić należy również fakt, że w rozdziale dyskusja znajduje się kilka niezrozumiałych zupełnie stwierdzeń, które należy skrupulatnie przeanalizować i poprawić podczas przygotowywania dysertacji do publikacji, dla przykładu na stronie 59 „*W związku z brakiem obserwacji silnych zmian patologicznych uzyskanych dzięki technikom histologicznym, biochemicznym i molekularnym ryb w setnym dniu eksperymentu, należy stwierdzić, że użyte w doświadczeniu warunki ekspozycji nie wpływają w sposób znaczący na prace wątroby*”. Inne drobne uwagi stylistyczne i interpunkcyjne, niejasne sformułowania oraz błędy w piśmiennictwie naniosłam w tekście maszynopisu.

Pomimo moich uwag i wątpliwości niewątpliwie warto podkreślić trafność zaplanowanych i wykonanych badań, a szczególnie molekularnych, które wzbogacają wartość poznawczą prezentowanej pracy, stanowią w moim przekonaniu element innowacyjności, a nade wszystko

pozwalają na precyzyjne ustalenie mechanizmu zmian aktywności enzymów w tkankach danio pod wpływem różnych form i stężeń srebra w wodzie.

W rozdziale 6 (Stwierdzenia i wnioski), Autor sformułował aż 12 stwierdzeń. Większość stwierdzeń stanowi powtórzenie uzyskanych wyników badań.

Istnieją również stwierdzenia mało precyzyjne lub niejasne, a szczególnie wymienione poniżej:

„Wyniki analiz laboratoryjnych po studniowej ekspozycji danio przegowanego na roztwory nanocząstek srebra, stężeniami nawiązującymi do obserwowanych w środowisku, wskazały na:”

„Możliwość wywołania efektów negatywnych u ryb w badanych stężeniach”- jakich efektów?, w jakich stężeniach? Stwierdzenie należy tak sformułować, aby czytelnik po jego przeczytaniu wiedział wszystko nie czytając całej pracy!

„Pobudzenie układu immunologicznego wątroby w AgNP 1mg/L w setnym dniu eksperyment”- czy Autor jest przekonany o prawidłowości stwierdzenia, przecież nie badał wpływu czynnika doświadczalnego na układ immunologiczny?, a ponadto sformułowanie „układ immunologiczny wątroby” jest również niepoprawne.

„Odczuwanie stresu oksydacyjnego przez ryby ze wszystkich grup badanych, ze szczególnym wyróżnieniem grupy AgNP 1mg/L” – stres oksydacyjny jest indukowany/występuje w komórce, ale nie należy mylić go ze stresem mechanicznym i używać określenia „odczuwanie stresu oksydacyjnego przez ryby”

„Odpowiedź osobników na stres oksydacyjny z użyciem metabolizmu glutationu” – proszę o wyjaśnienie o co chodziło Autorowi, w kontekście faktu, że nie oznaczał poziomu glutationu (jego form utlenionej/zredukowanej)?

„Większą toksyczność jonów srebra względem nanocząstek srebra w odpowiadających stężeniach” – stwierdzenie nie jest zgodne z metodologią, bowiem porównano wyłącznie jedno stężenie 0,001mg/L azotanu srebra i nanocząstek srebra, a zatem nie należy używać liczby mnogiej „stężeniach”.

W rozdziale 6 zabrakło syntetycznego wniosku, który będzie odpowiedzią na hipotezę/cel: czy długotrwała (dokładny czas) ekspozycja na niskie (jakie?) stężenie nanocząstek srebra powoduje negatywne/pozytywne? zmiany (określić te zmiany). Należy dowieść, że poziomy określone jako niskie, pojawiające się w środowisku wodnym są udokumentowane (gdzie?). Czy oceniane markery (które?) mogą być zaproponowane jako bioindykatory do oceny narażenia organizmu na metale, w tym nanocząstki metali? w badaniach toksykologicznych. Recenzent podczas publicznej obrony oczekuje merytorycznej dyskusji i wyjaśnienia przez Autora powyższych wątpliwości.

Podsumowanie: Wymienione z obowiązku recenzenta uwagi, usterki i wątpliwości powinny być wyjaśnione w czasie obrony, a także uwzględnione przy przygotowywaniu pracy do publikacji. Rozprawa wnosi do nauki istotne elementy poznawcze, szczególnie poprzez ukazanie wpływu różnych stężeń nanocząstek srebra na obraz histologiczny narządów i ekspresję genów w wątrobie danio

pręgowanego. Wyniki tych badań są bardzo ciekawe, w przyszłości mogą być wykorzystane jako nowe i ważne bioindykatory do oceny stanu zanieczyszczenia środowiska metalami.

Reasumując stwierdzam, że oceniana praca odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668) i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo. Dlatego też, przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Huberta Szudrowicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Katarzyna Cymle