

dr hab. inż. Ryszard Polechoński, prof. uczelni
Zakład Limnologii i Rybactwa, Instytut Hodowli Zwierząt
Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt,
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Ul. Chełmońskiego 38 C, 51-630 Wrocław
ryszard.polechonski@upwr.edu.pl,
tel. kom. +48 602 104 753

Wrocław, 20.03.2023 r.

Ocena rozprawy doktorskiej
Pana mgr. Huberta Szudrowicza
pod tytułem „Wpływ nanocząstek srebra na danio pręgowane
(*Danio rerio*) podczas długoterminowej ekspozycji”
wykonanej w Instytucie Nauk o Zwierzętach
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
pod kierunkiem Promotora
dra hab. Macieja Kamaszewskiego, prof. uczelni
oraz Promotora pomocniczego dra inż. Roberta Kasprzaka

Na podstawie pisma (INZ-7/2023, INoZ.5100.1.2020) z dnia 31.01.2023 r. Dyrektora Instytutu Nauk o Zwierzętach dr. hab. Marcina Gołębiowskiego, prof. SGGW o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr. inż. Huberta Szudrowicza, wykonałem recenzję monograficznej rozprawy doktorskiej, w której Doktorant przedstawił założenia i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Dysertacja w formie wydrukowanej ma 89 stron, w tym 12 rycin, zdjęć i wykresów oraz 4 tabele. Rozpoczyna się od stosownych oświadczeń i streszczenia. Słowa kluczowe powtarzają tytuł, co według niektórych wydawców nie powinno być stosowane. Niektórzy redaktorzy zalecają też ułożenie słów kluczowych alfabetycznie. Zalecam również poprawienie pisowni skrótów na stronie tytułowej (prawidłowe skróty to „dra” lub „dr.”).

W spisie treści w rozdziale Wyniki punkt 4.1 zatytułowano „Przeżywalność i śmiertelność ryb podczas doświadczenia”. Lektura tego rozdziału wskazuje, że Autor podał tylko dane dotyczące śmiertelności ryb w trakcie eksperymentu, zatem nie ma potrzeby opisywania przeżywalności jako przeciwstawnego wskaźnika. Podpunktowi 4.5 nadano tytuł

„Wyniki analiz genetycznych”, z jakiegoś powodu wyróżniając go wśród wcześniejszych podpunktów zatytułowanych „Analizy histologiczne” i „Analizy biochemiczne”.

Treść rozprawy została podzielona na części charakterystyczne dla doświadczalnych opracowań naukowych: Wprowadzenie i cel pracy, Przegląd literatury, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Stwierdzenia i wnioski oraz Bibliografia. Spis literatury obejmuje 194 prawidłowo dobrane pozycje, w tym większość (123) z ostatnich 10 lat.

Merytoryczna wartość przedstawionej dysertacji polega na wieloaspektowym przedstawieniu wpływu nanocząstek i jonów srebra w stężeniach spotykanych w środowisku naturalnym na przeżywalność, rozwój i homeostazę danio pręgowanego podczas ekspozycji obejmującej wszystkie fazy rozwojowe ryb tego gatunku. Na pochwałę zasługuje potraktowanie starannie zaplanowanego i rzetelnie zrealizowanego eksperymentu jako źródła materiałów badawczych dla wielu różnokierunkowych analiz, dających nadzieję na pozyskanie cennych danych. Jest to przykład skutecznie wprowadzanej w życie zasady 3R w odniesieniu do zwierząt laboratoryjnych. Znaczącym uzupełnieniem dotychczasowej wiedzy odnośnie wpływu nanocząstek i jonów srebra na danio pręgowane było przeprowadzenie długoterminowej obserwacji, obejmującej cały okres rozwoju osobniczego ryb, od formy larwalnej do osiągnięcia dojrzałości płciowej. Wymagało to od Doktoranta wszechstronnego przygotowania teoretycznego, opanowania różnorodnych i specyficznych metod badawczych a także sporej inwencji i wytrwałości w realizacji pracy.

Cel pracy został przedstawiony we Wprowadzeniu i ma charakter konkretny i spójny, hipoteza badawcza również została właściwie sformułowana. Warto podkreślić ambitne zamierzenia Autora na etapie planowania niełatwej pracy badawczej.

We Wstępie Autor pokrótce przedstawił właściwości srebra ze szczególnym uwzględnieniem jego toksyczności, opisał procesy produkcji nanosrebra i możliwości jego zastosowania a także zagrożenia powodowane przez toksyczność nanosrebra. W końcowej części Wstępu znajduje się odniesienie do ryzyka ekologicznego lub środowiskowego stosowania nanosrebra, w oparciu o rozmaite biomarkery a także uzasadnienie obranej metodyki przeprowadzonego eksperymentu. Autor jedynie zdawkowo informuje o sposobach stabilizacji używanego w eksperymencie nanosrebra, między innymi poprzez pokrywanie poliwinylpirolidonem (PvP). Skoro w eksperymencie stosowano taki rodzaj stabilizacji nanosrebra, to byłoby wskazane szersze wyjaśnienie chociażby reaktywności tego pierwiastka w różnych formach, tym bardziej, że równolegle zastosowano jony Ag.

Rozdział Materiały i metody przedstawia w spójny i skondensowany sposób schemat doświadczenia, które oparto na wzorach zaczerpniętych z literatury fachowej. Autor uzyskał zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie na przeprowadzenie zaplanowanego eksperymentu. Sposób utrzymania ryb w trakcie eksperymentu i ich karmienia odpowiada wskazaniom innych autorów zajmujących się zagadnieniami utrzymania i hodowli *Danio rerio*.

Ogólnym przypomnieniem metodycznym jest to, że większość wydawców publikacji naukowych wymaga stosowania jednostek układu SI. Litr jest pozaukładową jednostką objętości, odpowiadającą 1 dm³ w układzie SI. Zatem objętość powinna być wyrażana w dm³, podobnie stężenia powinno się wyrażać w mg/dm³. Stosowany przez Autora zapis objętości „litr” jako duża litera L praktykowany jest w USA, Kanadzie i Australii. W pozostałych krajach świata, w tym w Polsce, normą jest stosowanie małej litery l, choć stosowanie wielkiej litery

jest również dopuszczalne. Sugeruję sprawdzenie wymagań redakcji i uporządkowanie tej kwestii przed opublikowaniem materiałów zawartych w dysertacji. Zwracam też uwagę, że prawidłowa nazwa jednej z ważniejszych właściwości wody to odczyn, zaś pH jest symbolem stężenia jonów wodorowych.

Zapoznając się z warunkami utrzymania ryb w trakcie eksperymentu moją wątpliwość wzbudził skład przygotowanej wody E3 do akwariów doświadczalnych. Sole użyte do spreparowania wody to tylko chlorki. Skąd w tej wodzie znalazły się węglany powodujące twardość węglanową? Skoro twardość ogólna miała taką samą wartość jak twardość węglanowa (6-10 stopni niemieckich), można sądzić, że wynikała ona z obecności w wodzie jonów wapnia, magnezu, sodu i potasu w postaci wodorowęglanów, węglanów i wodorotlenków. Nie ma tu miejsca na twardość niewęglanową, powodowaną przez chlorki, siarczany i inne nierozpuszczalne sole, a przecież w tabeli 2 podano, że roztwór E3 składał się tylko z chlorków. Zwracam też uwagę, że zapis skrótowy jednostki twardości wody to °dH lub °n a nie °d, jak w tabeli 2. Mam wrażenie, że skład chemiczny roztworu E3 został niedokładnie przepisany. Inni autorzy podają odmienny skład wody do utrzymywania danio, np. wg Aleström, P.; D'Angelo, L.; Midtlyng, PJ; Schorderet, DF; Schulte-Merker, S.; Sohm, F.; Warner, S. Zebrafish: Housing and husbandry recommendations. Laboratory Animals Limited. 2020, 54, 213–224, cytując: „pożywka E3 zawiera wszystkie kluczowe jony (5 mmol/l NaCl, 0,17 mmol/l KCl i 0,33 mmol/l MgSO₄) przy niskim poziomie zasolenia i błękitu metylenowego (0,5 mg/l) w celu zmniejszenia infekcji grzybiczych”, koniec cytatu. Ponadto deklarowana wartość odczynu wody w trakcie eksperymentu $7,2 \pm 0,2$ pH wskazuje na istnienie sprawnie działającego układu buforowego. Sugeruję uporządkowanie tego podrozdziału przed opublikowaniem pracy.

Nie podano w metodyce początkowej liczebności grup eksperymentalnych ani pojemności akwariów, dopiero od 41. dnia doświadczenia wiadomo, że zmniejszono liczbę ryb w zbiornikach do 20 szt. (zagęszczenie 3,33 ryby/dm³), dzięki temu każdy czytelnik może sobie sam wyliczyć, że zbiorniki doświadczalne miały pojemność 6 dm³. Zbiorniki o pojemności 6 dm³ ze względu na niewielką objętość mogą sprawiać trudności z utrzymaniem stabilnych właściwości wody (temperatura, odczyn, twardość itp.), co jest wyzwaniem dla eksperymentatora. Szczególnej uwagi z pewnością wymagało regularne (co drugi dzień) czyszczenie akwariów oraz usuwanie części wody i dolewanie świeżej o tym samym składzie i stężeniu nanosrebra czy azotanu srebra. Biorąc pod uwagę szereg procesów mogących wpływać na stężenie nanocząstek w wodzie akwariów doświadczalnych (np. osadzanie się nanosrebra na ściankach naczyń, przywieranie do resztek pokarmu i nieczystości na dnie zbiornika i ich usuwanie) interesujące jest, czy prowadzono kontrolę stężeń nanosrebra i jonów srebra w czasie doświadczenia?

Rycina 2 na str. 30. przedstawia parametry i kształt nanocząstek srebra użytych w eksperymencie. Oprócz fotografii C ilustrującej wielkość i morfologię agregatów nanocząstek nie podano bardziej szczegółowego komentarza do wykresów A i B. Krótkiego wyjaśnienia wymaga chociażby kwestia rozkładu potencjału Zeta, jako funkcji ładunku znajdującego się na powierzchni cząsteczki, przylegającej do niej warstwy adsorbowanej i charakteru medium, w którym cząsteczki są zawieszane (chociażby zawartości jonów w roztworze i jego odczynu). Jeśli pomiary potencjału Zeta miały służyć do oceny stabilności dyspersji, to wskazane byłoby krótkie opisanie tej właściwości. Co prawda Autor odsyła do swej wcześniejszej publikacji na ten temat (str. 28), lecz w samej pracy powinien się znaleźć choćby krótki komentarz.

W rozdziale 3.2 opisującym metodę analiz histologicznych (str. 31) przedstawiono pobieranie materiału do badań w 26. dniu (n=4) i 100. dniu (n=5). Nie mam pewności, czy liczby odnoszą się do każdej grupy doświadczalnej? Czy tylko do wybranych?

Metody analiz biochemicznych, obejmujące ilościowe oznaczenie stężenia białka w próbkach, a także oznaczenie aktywności enzymatycznej fosfatazy alkalicznej, fosfatazy kwaśnej, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej i reduktazy glutationowej zostały szczegółowo opisane w rozdziale 3.3. Równie szczegółowo przedstawiono metodę analizy ekspresji genów (rozdział 3.4). Rozdział poświęcony metodyce zakończono opisem zastosowanych testów i analiz statystycznych.

Wśród danych uzyskanych przez Autora szczególną ciekawość budzi zastanawiająco wysoka śmiertelność ryb utrzymywanych w stężeniu $0,1 \text{ mg AgNP/dm}^3$, która rozpoczęła się od 11. dnia eksperymentu i trwała do 29. dnia. Podobna sytuacja wystąpiła w trzech akwariach napełnionych wodą o tym samym stężeniu AgNP, zatem trudno przypisać przyczynę przypadkowi. W rozdziale Dyskusja Autor zamieścił komentarz próbujący wyjaśnić tak wyraźnie zaznaczony toksyczny wpływ tego właśnie stężenia AgNP na ryby. Także w Stwierdzeniach i wnioskach można doszukać się ewentualnych przyczyn tak wysokiej i przedwczesnej śmiertelności, czyli zmian degeneracyjnych jelit, trzustek i w mniejszym stopniu wątrób ryb. Jednak podobne zmiany tych organów stwierdzono też u ryb utrzymywanych w stężeniu 1 mg AgNP/dm^3 , chociaż w tym przypadku śmiertelność nie była wysoka.

Płeć ryb w ostatnim dniu doświadczenia określano na podstawie zewnętrznych cech dymorfizmu płciowego. We wszystkich grupach eksperymentalnych wyróżniono spory udział (24-52 %) osobników o płci nieokreślonej. Oznacza to, że nie udało się ustalić przynależności płciowej znacznej części ryb za pomocą użytej metody. Nie wyklucza to reprezentowania przez nie określonej płci męskiej lub żeńskiej, którą można byłoby ustalić innymi metodami. Dlatego analiza statystyczna wpływu srebra na długość, masę czy też kondycję samców, samic oraz osobników o nierozróżnionej płci może być obciążona sporą nieścisłością wynikającą z przyjętej metody płciowego podziału ryb.

Skoro Autor zdecydował się relacjonować wyniki badań w czasie przeszłym, powinien to robić konsekwentnie (str. 43 obserwacje histologiczne w setnym dniu eksperymentu). Do tego podrozdziału odnosi się ryc. 9, a nie 8.

Pierwsze dwa akapity Dyskusji stanowią częściowe powtórzenie i uzupełnienie wstępnych informacji o działaniu nanosrebra i o celu pracy, jednak można je uznać za uzasadnione w tym rozdziale, aby przypomnieć czytelnikowi istotę rozważań. Przytaczając dostępne źródła piśmiennictwa Pan mgr Szudrowicz znalazł potwierdzenie własnych danych wskazujących na mniejsze wartości długości i masy ciała ryb, korelujące ze wzrastającymi stężeniami nanocząstek srebra. Wartościowa pod względem merytorycznym jest próba wskazania dróg i sposobów działania nanocząstek srebra na wzrost i kondycję ryb.

Podobne potwierdzenie dotychczasowej wiedzy znalazł Autor omawiając wpływ nanocząstek srebra na rozwój i pracę gonad. Zmiana płci lub opóźnienie rozwoju gonad może tłumaczyć dane opisane w rozdziale Wyniki odnośnie znacznej liczby ryb o płci nieokreślonej.

Powołując się na liczne doniesienia Autor omawia własne dane dotyczące biomarkerów histologicznych, znajdując potwierdzenie toksycznego wpływu nanosrebra na wątrobę ryb, jak również próbuje sprecyzować przyczynę gwałtownego wzrostu śmiertelności młodych ryb we własnym eksperymencie przy stężeniu $0,1 \text{ mg AgNP/dm}^3$, uzasadniając to

zjawisko zaburzeniami pracy trzustki jak również zmianami histopatologicznymi układu pokarmowego.

Rozważania dotyczące niespecyficznych biomarkerów biochemicznych, szczególnie aktywności fosfatazy alkalicznej i fosfatazy kwaśnej, łączą się z wcześniejszymi obserwacjami zmian histopatologicznych wątrób, jako reakcji organizmu na kontakt z cząstkami nanosrebra. Pojawia się przy tym wątek pozytywnego wpływu nanosrebra na homeostazę wątroby jako efekt jego antybakteryjnych właściwości, poprawiających warunki środowiskowe życia ryb.

Ustosunkowując się do własnych danych dotyczących niespecyficznych biomarkerów genetycznych Autor zachował stosowną dozę krytycyzmu i stwierdził, że zastosowane w doświadczeniu warunki ekspozycji nie wpłynęły wyraźnie na pracę wątroby ryb. Zaznacza przy tym, że wyjaśnienia wymaga stwierdzone pobudzenie układu immunologicznego i uwidocznione zmiany morfologiczne hepatocytów ryb utrzymywanych w najwyższym stężeniu cząstek nanosrebra.

Osobno omówione zostały biomarkery stresu oksydacyjnego, będące uznanymi wskaźnikami odpowiedzi organizmów na zanieczyszczenia środowiska. Odwołując się do bogatego przeglądu literatury fachowej Pan mgr Szudrowicz stwierdził, że u badanych ryb wystąpiły oznaki stresu oksydacyjnego o natężeniu w różnym stopniu zależnym od stężenia nanosrebra, przy czym główną odpowiedzią organizmów ryb było unieczynnienie reaktywnych form tlenu i azotu przy użyciu mechanizmów metabolizmu glutationu.

Porównanie działania na ryby zastosowanych stężeń nanosrebra i jonów srebra w postaci AgNO_3 nie było pełne, gdyż w eksperymencie użyto tylko jednego stężenia $0,001 \text{ mg AgNO}_3/\text{dm}^3$, odpowiadającego najniższemu stężeniu nanocząstek srebra. Jednak wybór takiego stężenia jonów srebra podyktowany był powszechnie znaną i dobrze udokumentowaną większą toksycznością srebra w postaci jonowej niż jego nanocząstek. Wartościowym przyczynkiem metodycznym jest fakt zwrócenia przez Autora uwagi na możliwość uwalniania jonów srebra z powierzchni jego nanocząstek, zatem ryby poddane wpływowi AgNP o najwyższym stężeniu mogły również wykazywać reakcję na uwolnione jony srebra.

W końcowej części Dyskusji Autor rozpatruje przyczyny nieliniowego działania toksycznego nanosrebra, uznając drugorzędne znaczenie zastosowanych stężeń, a uwypuklając rolę innych czynników decydujących o efektach toksycznych, np. sposobu produkcji nanosrebra czy zastosowaniu powłok stabilizujących ten produkt. Stąd mogą wynikać różnice w uzyskiwanych danych eksperymentalnych, co można stwierdzić na podstawie przeglądu literatury poświęconej temu tematowi. Jest to jednocześnie ważne zagadnienie metodyczne, którego powinni być świadomi badacze podejmujący się prowadzenia doświadczeń na rybach z zastosowaniem nanocząstek metali, gdyż – szczególnie w miarę wydłużania się czasu trwania doświadczenia – następują rozmaite zjawiska zmieniające środowisko bytowania ryb, w tym stężenia nanocząstek.

Przedstawione Stwierdzenia i wnioski byłyby bardziej przejrzyste, gdyby Autor spróbował oddzielić stwierdzenia od bezpośrednich wniosków dotyczących przeprowadzonego eksperymentu i opatrzyć je numerami. Sformułowany na początku dysertacji cel pracy oraz przyjęta hipoteza badawcza pozwalają na klarowne i zwarte wnioskowanie.

Pierwsze zaprezentowane stwierdzenie ma dość ogólnikowy wydźwięk i jest potwierdzeniem udowodnionych zależności, znanym powszechnie nawet szerokiej opinii publicznej, podobnie jak przedostatnie, szeroko udokumentowane w bibliografii. Autor zachował dużą ostrożność w sformułowaniach, co nie jest dziwne w świetle uzyskanych danych, ale lepsze wrażenie na czytelniku wywarłoby wyraźniejsze pochwalenie się zdobytymi w pracy efektami.

Przedstawione w recenzji zastrzeżenia i uwagi proszę potraktować jako sugestie służące lepszemu przygotowaniu manuskryptu do opublikowania. Nie umniejszają one dużego wkładu merytorycznego i metodycznego rozprawy doktorskiej w rozwój dyscypliny zootechnika i rybactwo oraz zbliżonych tematycznie gałęzi wiedzy. Mam nadzieję, że tematyka podjęta w rozprawie doktorskiej będzie przez Pana mgr. Huberta Szudrowicza kontynuowana i rozwijana.

Podsumowując recenzję stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr. Huberta Szudrowicza pod tytułem „Wpływ nanocząstek srebra na danio przegowane (*Danio rerio*) podczas długoterminowej ekspozycji” spełnia warunki stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora, określone w art. 187 ust.1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 wraz ze zmianą Dz.U. z 2020 r. poz. 85 z późniejszymi zmianami). Praca spełnia też warunki określone w par. 11 Regulaminu przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wprowadzonego Uchwałą nr 8 – 2019/2020 Senatu Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dnia 23 września 2019 r. Zatem zwracam się do Rady Naukowej dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie Pana mgr. Huberta Szudrowicza do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie Zootechnika i Rybactwo.

Z poważaniem



dr hab. inż. Ryszard Polechoński, prof. uczelni