

Dr hab. Agata Anna Cejko

Olsztyn 17.02.2023

Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza

Państwowy Instytut Badawczy

a.cejko@infish.com.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Huberta Szudrowicza
pt. „**Wpływ nanocząstek srebra na danio przegowane (*Danio rerio*)
podczas długoterminowej ekspozycji**”

wykonanej w Samodzielnym Zakładzie Ichtiologii i Biotechnologii w Akwakulturze, Instytutu Nauk o Zwierzętach pod kierunkiem dr hab. Macieja Kamaszewskiego prof. Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo SGGW w Warszawie z dn. 31 stycznia 2023 roku (INZ-7/2023 INoZ.5100.1.2020).

Przedstawiona wysokiej Radzie Naukowej praca doktorska dotyczy ważnych dla ekosystemów wodnych zagadnień. Doktorant w swojej dysertacji kontynuuje zainicjowany przed laty nurt badań Pana dr hab. Macieja Kamaszewskiego prof. SGGW, skoncentrowany na poznaniu szerokiego spektrum uwarunkowań determinujących jakość materiału biologicznego ryb na różnych etapach rozwoju ontogenetycznego. W celu weryfikacji postawionych hipotez Doktorant wykorzystuje dostępne i zaawansowane metody badawcze, wymagające posiadania wiedzy z zakresu anatomii, histologii, biochemii i genetyki ryb.

Temat przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej jest aktualny i ważny zarówno dla nauki jak i praktyk stosowanych w produkcji przemysłowej czy akwakultury.

Nanotechnologia, dzięki manipulacji materią w nanoskali staje się techniką szeroko stosowaną dla uzyskania pożądanych efektów wielu gałęzi przemysłu. Wykorzystanie związków nieorganicznych i organicznych w tworzeniu nanocząsteczek jest coraz częściej obiektem badawczym, gdyż nanocząsteczki cechuje wysoka absorpcja i akumulacja oraz biokompatybilność np. w tkankach docelowych organizmów. U ryb, które stanowią obiekt zainteresowań badawczych Doktoranta, wydzielina komórek śluzowych nie stanowi bariery dla nanocząsteczek, jak w przypadku transferu większych molekuł. Stąd wykorzystanie

nanocząsteczek o właściwościach bakterio – i grzybobójczych, w tym srebra zaczęły stanowić potencjalnie skuteczny składnik kąpiele profilaktycznych czy basenów podchowowych. Ta właściwość srebra w połączeniu z nanotechnologią umożliwiła rozwój pożądaných produktów również w przemyśle farmaceutycznym, medycznym, tekstylnym czy kosmetologii. Badania środowiskowe wskazują jednak coraz częściej na negatywny wpływ nanocząsteczek srebra na ekosystemy, w tym organizmy wodne, które narażone są na długoterminową ekspozycję na ten pierwiastek stając się ostatecznym jego biorcą.

W związku z powyższym z dużym uznaniem odnoszę się do pracy badawczej przeprowadzonej przez Pana mgr inż. Huberta Szudrowicza. Przedłożona do oceny rozprawa doktorska to jednolite opracowanie w formie manuskryptu obejmujące 88 stron maszynopisu podzielonego na 7 rozdziałów, poprzedzonych streszczeniem w języku polskim i angielskim. Wyniki zamieszczone zostały w 3 tabelach, 18 czytelnie opisanych zdjęciach histologicznych, 19 wykresach. Doktorant cytuje 194 pozycje anglojęzyczne, w znacznej większości najnowsze publikacje poświęcone podjętej problematyce badawczej. Wykorzystanie materiałów źródłowych, w tym dobór cytowań renomowanych czasopism naukowych przez Doktoranta stanowi trafną podbudowę merytoryczną wprowadzenia do tematu i części dyskusyjnej pracy. Manuskrypt jest przygotowany starannie, opatrzony nagłówkami w każdym z rozdziałów, co ułatwia zapoznawanie się z poszczególnymi zagadnieniami pracy.

Kolejność rozdziałów jest poprawna. W jednostronicowym wprowadzeniu Doktorant w sposób zwięzły i bardzo zrozumiały definiuje nanocząsteczki, wskazuje właściwości nanocząsteczek srebra i ich wykorzystanie w produkcji farb, kosmetyków, elektroniki czy tekstyliów oraz podkreśla ich długotrwałą ekspozycję na środowisko naturalne w kontekście jego zanieczyszczenia. Do tej części mam małą uwagę. W moim odczuciu zabrakło w nim odniesienia do ryb, które stanowią materiał badań Doktoranta i wielkości notowanych stężeń w środowisku wodnym. Ta część manuskryptu zakończona jest jednozdaniowym celem i hipotezą, w bardzo ogólnym ujęciu. Biorąc pod uwagę zakres przeprowadzonych analiz zarówno cel jak i hipotezy badawcze mogłyby być ujęte w kilku punktach.

Doktorant w swojej dystertacji wyodrębnił rozdział pt. „Przegląd literatury”, w którym bardzo dokładnie przedstawia historię wykorzystywania srebra, pierwsze doniesienia o jego toksyczności, obszary zastosowań nanocząsteczek i ich właściwości, a także sposoby ich wytwarzania. Świadczy to o właściwym rozpoznaniu tematu przez Doktoranta. Doktorant umiejętnie uzasadnia wybór danio pręgowane (*Danio rerio*) do przeprowadzenia doświadczenia i materiału biologicznego do wykonania analiz.

Do tej części pracy mam małą uwagę, na stronie 9 Autor podaje parametry fizykochemiczne wody do których zalicza naświetlenie, które to jest czynnikiem zewnętrznym stosowanym w określonym celu. Trafniej byłoby użyć terminu „oświetlenie”, które Norma PN-EN 12464-1: 2012 definiuje jako środowisko utworzone we wnętrzu przez światło i barwę”, jakkolwiek światła nie wymienia się wśród parametrów fizykochemicznych wody. Drobne nieścisłości w terminologii (strona 11, 13, 25) dot. sformułowań takich jak „połykanie wody” przez ryby, „łańcuch oddechowy”, czy „wysoco żywotna ryba”. Właściwe kreślenia dla taksonu, procesu czy przystosowania gatunku to odpowiednio „picie wody”, „oddychanie komórkowe tlenowe” i „szeroki zakres tolerancji na warunki środowiska”. Doktorant definiuje aglomerację nanocząsteczek jako „zwiększenie ich rozmiarów wraz ze zmianą kształtu”, gdzie termin ten dot. łączenia się drobnych molekuł w większe struktury. Na rycinie 1 Doktorant bardzo trafnie zilustrował transport czynny i bierny jonów przez błonę komórek nabłonkowych skrzelii. W opisie ryciny pojawiła się jednak nieścisłość w zilustrowaniu transportu jonów opisana jako „kierunek potencjałów membranowych” (strzałki). Potencjał błonowy to różnica ładunków spowodowana rozmieszczeniem jonów po obu stronach błony, który to wpływa na przemieszczanie się w poprzek błony substancji obdarzonych ładunkiem. Ze schematu wynika także, że srebro i miedź wpływają na transport jonów sodu, a nie jonów chloru i jonów amonowych. Powyższe uwagi nie umniejszają wartości dysertacji we wprowadzeniu czytelnika w znajomość tematu. Doktorant zadał sobie trud zestawiając tabelarycznie informacje nt. toksycznego wpływu nanocząsteczek srebra. Dzięki temu Autor zwraca uwagę czytelnika na konkretne problemy wynikające ze stosowania różnych stężeń nanocząsteczek. Wykazał się przy tym umiejętnością wnioskowania przy analizowaniu kilkunastu doniesień naukowych. Tabela 1 wymagałaby tylko drobnych edycyjnych poprawek (nazwy polskie gatunków, wyjaśnienia stosowanych skrótów).

Rozdział „*Material i metody*” liczący 12 stron został poprawnie zredagowany i jest uporządkowanym opisem metod stosowanych przez Doktoranta. W tym miejscu drobna uwaga, na początku rozdziału Autor używa sformułowania „by zweryfikować cel oraz hipotezę badawczą (...)”. To wyniki weryfikują hipotezę postawioną w pytaniu badawczym, na podstawie którego za celowe uznaje się przeprowadzenie określonego doświadczenia. Doktorant przeprowadził doświadczenie według wymaganych procedur, z zachowaniem dobrostanu zwierząt i stosując odpowiednią anestezję. Doktorant potrafił przy tym użyć właściwą ilość osobników do analiz i opracowania statystycznego wyników. Budzi jednocześnie szacunek w aspekcie pracowitości i bogatego warsztatu badawczego, jaki

opanovać musiał Autor dysertacji. Należy podkreślić, że Doktorant samodzielnie posługuje się procedurami badawczymi, wiarygodnymi i adekwatnymi do potrzeb wynikających z nakreślonego celu i zakresu badań. Na wstępie tego rozdziału czytelnik ma możliwość zapoznania się z warunkami techniczno-środowiskowymi doświadczenia. Dla oceny wpływu nanocząsteczek na danio w przeprowadzonych testach Doktorant posłużył się trafnie dobranymi wskaźnikami wzrostowymi (współczynnik Kondycji Fultona), rozkładu płci fenotypowej (stosunek samców i samic w populacji), w obszarze badań histologicznych skoncentrował się na pomiarach hepatocytów, wielkości jąder komórkowych, obserwacjach enterocytów, symptomach patologii analizowanych narządów wątroby, trzustki, jelita. Doktorant określił ważne w badaniach wpływu ksenobiotyku parametry aktywności enzymów fosfataz, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy i reduktazy glutationu oraz ekspresję genów niektórych z badanych białek enzymatycznych.

Czytając tą część manuskryptu nasunęło mi się kilka drobnych uwag. Z tekstu wynika, że materiał doświadczalny stanowiły osobniki danio po 11 dniach aklimatyzacji, licząc od 19 dnia po wykluciu (dph). Przedstawiając i opisując materiał badawczy w kolejnych etapach eksperymentu Doktorant odnosi go do dni eksperymentu, gdzie za zasadne uznaje podawanie dodatkowo wieku ryb (dph). Dla określenia współczynnika kondycji Fultona Autor używa określenia „standardowa długość ryb”. Jakkolwiek pomiar długości standardowej (długości ciała) (SL od ang. *standard length*; łac. *longitudo corporis*) u ryb wykonuje się, to dla współczynnika kondycji Fultona używa się długości ciała ogonowej, Lc (*logitudo caudalis*), co jest istotne gdyż odróżnia ten wskaźnik od współczynnika kondycji K określanego przy użyciu długości ciała całkowitej (TL od ang. *total length*; lub Lt od łac. *longitudo totalis*). Nie znalazłam też informacji, jak często czyszczono akwaria z paszy nie wyzerowanej i objętości uzupełnianej wody po tym zabiegu. W tabeli 3 Doktorant przedstawił parametry fizykochemiczne wody podając wartość średnią odczynu pH, podczas gdy w podchowach ryb należy uwzględniać zakres jego wartości. Podane na stronie 31, 32 i 36 wartości n dla prób przeznaczonych do analiz histologicznych, biochemicznych i genetycznych powinny być sprecyzowane, że dot. osobnika, od którego pobrano tkankę. W polskojęzycznej wersji opracowania sugeruję używać polskiej terminologii określającej nić matrycową i kodującą DNA dla starterów (tabela 4). W tym rozdziale zauważyłam kilka drobnych edycyjnych niedociągnięć (powtórzenia słów, niewyjaśnienia stosowanych skrótów, brak spacji), które w obszernym manuskrypcie mają prawo mieć miejsce.

Rozdział „Wyniki” obejmuje 11 stron manuskryptu, w którym Doktorant zamieścił dobrze przemyślane, przejrzyste wykresy i czytelne zdjęcia histologiczne. Autor mając

zebrany duży materiał liczbowy potrafił przedstawić wyniki analiz w formie skondensowanej. Szereg wyników prezentowanych jest po raz pierwszy i trudno przecenić ich aspekt poznawczy i aplikacyjny. Oceniając dysertację, w tym miejscu raz jeszcze chcę podkreślić szeroki zakres analiz i związaną z tym mnogość wyników. W tym rozdziale zauważyłam drobne nieścisłości. Autor tytułuje podrozdział 4.2 „*Tempo wzrostu ryb (...)*”, podczas gdy nie analizuje względnego przyrostu masy i długości ciała ryb, a wartości końcowe długości i masy ciała ryb przedstawiając je na wykresach porównawczych w 100 dniu doświadczenia. Doktorant w materiałach i opisie wskazuje na obliczenia współczynnika kondycji Fultona, zaś na wykresie znajduje się współczynnik kondycji K. W opisie osi Y każdego wykresów powinny być nazwy parametru (śmiertelność, długość standardowa ciała, masa ciała).

Dyskusja wyników badań z punktu merytorycznego jest prowadzona w sposób dojrzały naukowo i rzeczowy. Doktorant nawiązuje w niej do wyników najnowszych prac prowadzonych przez innych badaczy. Pozwala to na właściwą i obiektywną ocenę uzyskanych rezultatów, z czego Doktorant z sukcesem wywiązał się w dysertacji. Doktorant przeprowadzając dyskusję wyników własnych z obszerną i dobrze dobraną literaturą przedmiotu podzielił ten rozdział na 8 podrozdziałów. Na podstawie uzyskanych wyników Autor weryfikuje założenia przyjęte w pracy. Wykazuje, że nanocząsteczki w stężeniach 0,01 mg/L wpływają na masę ciała samców i współczynnik kondycji samic. Różnice w parametrach biometrycznych ryb Autor tłumaczy a) „zaburzeniami statusu energetycznego” i b) „nadmierną depozycją materiału zapasowego”. W mojej ocenie ta część dyskusji mogłaby być rozważona w aspekcie: a) wykorzystania energii na wzrost i b) zmiany współczynnika kondycji ciała dojrzewających samic spowodowaną masą gonad. Na stronie 50 Autor wskazuje na dynamikę populacji w analizach własnych, podczas gdy przeprowadzone badania dot. stosunku płci fenotypowej, a nie zmian liczebności ryb w czasie (dynamika populacji rozumiana jest bowiem jako wielkość populacji i dot. fluktuacji liczebności osobników). Autor zaliczył też rozwój embrionalny i larwalny do stadium młodocianego ryb (strona 52), a ten etap rozwoju ontogenetycznego dot. osobników, które zakończyły odżywianie endogenne.

Inne drobne uwagi, które nasunęły mi się podczas czytania manuskryptu dot. terminologii. Autor używa terminu „homesostazy pomp jonowych” (strona 10), a właściwe byłoby sformułowanie „homeostazy uwarunkowanej funkcjonowaniem pomp jonowych”, „homeostazy skrzeli” (strona 19) zamiast „prawidłowej wymiany gazowej w skrzelach”, czy „homeostaza wątroby”, „homeostaza jonów” (odpowiednio strony 26, 50, 58, 62), podczas gdy termin ten nie odnosi się do pojedynczego narządu i jego budowy histologicznej i transportu jonów. Homeostaza to zdolność organizmu do utrzymywania względnie stałych,

warunków wewnętrznych, sparametryzowanych np. odczynem płynów ustrojowych, wartością ciśnienia osmotycznego czy osmolarności. Zmiany histopatologiczne, aktywność enzymów, długość transkryptów, jakkolwiek mogą wpływać na mechanizmy utrzymujące homeostazę, to nie są bezpośrednim wskaźnikiem oceny jej zaburzeń. Sformułowania „kompozycja kwasów tłuszczowych”, „żeńskich ryb” czy „zatkanie naczyń krwionośnych” lepiej zastąpić „profilem kwasów tłuszczowych”, „samic” i „brakiem drożności naczyń” (strona 53 i 55). W dalszej części dyskusji Doktorant przejrzyście i trafnie wyjaśnia zmiany histologiczne narządów i aktywności enzymów. W tym miejscu chciałabym zaznaczyć, że reduktaza glutationowa katalizuje redukcję glutationu, a nie, jak podano w pracy reakcję jego syntezy (strona 61).

W dalszej części dyskusji Autor wyjaśnia wpływ srebra na różne gatunki ryb w zależności od formy jego ekspozycji (jony srebra vs. nanocząsteczki srebra). Doktorant podsumowując dysertację nie zapomina o stabilności nanocząsteczek srebra i ich reaktywności. Powyższe, ważne aspekty trafnie potrafił odnieść do wpływu badanego czynnika na organizmy wodne.

Uzyskane i przeanalizowane w dyskusji wyniki pozwoliły Doktorantowi na sformułowanie 12 wniosków. Wnioski uważam za zasadne, odnoszące się do założeń przyjętych w pracy. Niektóre z nich mają charakter ogólny, jednakże są pewnym wprowadzeniem do kolejnych, stąd uznaję, że pewna sekwencja wnioskowania była celem zamierzonym przez Doktoranta. W manuskrypcie Doktorant odwołuje się do 194 pozycji, starannie dobranych. Tylko w jednym przypadku nie znalazłam odniesienia w Bibliografii.

Przedstawiona do oceny praca doktorska posiada właściwą konstrukcję, przyjętą w tego typu opracowaniach. Metody zastosowane przez Doktoranta dowodzą dobrego opanowania warsztatu badawczego. Uzyskane wyniki wnoszą istotne informacje, możliwe do wykorzystania w działaniach prewencyjnych ekosystemów wodnych. Doktorant wykazał się więc umiejętnością podejmowania i realizowania kolejnych etapów badań naukowych. Stąd też dysertację oceniam bardzo pozytywnie. Przedstawione powyżej uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej rozprawy doktorskiej.

W oparciu o powyższe argumenty stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr inż. Huberta Szudrowicza pt. „Wpływ nanocząstek srebra na danio przegowane (*Danio rerio*) podczas długoterminowej ekspozycji” spełnia wymogi 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) oraz §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., stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę wobec wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo SGGW w Warszawie o przyjęcie i dopuszczenie jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę kompleksowe podejście do rozwiązywanego problemu, duże zaangażowanie i nakład pracy Doktoranta, znajomość zróżnicowanych technik analitycznych oraz wartość uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

