

Bydgoszcz, 19. 08. 2018 r.

prof. dr hab. Marek Bednarczyk  
Katedra Biotechnologii i Genetyki Zwierząt  
Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy  
im. J.J. Śniadeckich w Bydgoszczy

### Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Doroty Katarzyńskiej - Banasik pt. "Wpływ nanocząsteczek srebra na proces steroidogenezy i apoptozy w pęcherzykach jajnikowych kury (*Gallus domesticus*)", wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Sechmana oraz promotora pomocniczego dr hab. Małgorzaty Grzesiak

#### 1. Uwagi ogólne i redakcyjne

Celem pracy doktorskiej /str. 27/ było określenie wpływu nanocząsteczek srebra /AgNPs/ na czynność jajnika niosącej kury, a w szczególności na zachodzące w nim procesy steroidogenezy, proliferacji i apoptozy. Ponadto zbadano wpływ AgNPs na stężenie hormonów tarczycy we krwi kury. Badania zostało wykonane w ramach projektu badawczego Preludium, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

W pracy wyodrębniono następujące podrozdziały: Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Analizy statystyczne, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie, Wnioski i Literatura. Jest to typowy układ, stosowany najczęściej w tego typu opracowaniach. Na marginesie, można zauważyć jednak, że analizy statystyczne mieszczą się w zakresie rozdziału Materiał i metody, toteż niekoniecznie należało je wyodrębnić jako kolejny podrozdział.

Polemizowałbym z określaniem bibliograficznego spisu publikacji mianem "Literatury". Autorka zamieściła w rozprawie spis 212 publikacji, w stosunku, do którego powinno się

użyć terminu "piśmiennictwo" lub "bibliografia", gdyż termin "literatura" odnosi się do dzieł sztuki.

Streszczenie, zawierające krótkie informacje o celu pracy, zastosowanych metodach oraz uzyskanych wynikach spełnia w zasadzie swoją rolę, będąc krótką syntezą zamierzeń i osiągnięć autorki, przedstawioną w języku polskim /na str. 4 i 5/ oraz angielskim /Abstract na str. 6/. Znacznym ułatwieniem dla czytelnika jest zamieszczenie starannie przygotowanego wykazu skrótów używanych w tekście /str. 5 do 7/. W pracy umieszczono 31 rycin oraz 11 tabel.

## **2. Merytoryczna ocena pracy**

Koncepcja badań, a zwłaszcza budowa i procesy zachodzące w jajniku kury oraz ich regulacja, z uwzględnieniem możliwości oddziaływania nanocząsteczek srebra na czynności jajnika, została dobrze udokumentowana, z wykorzystaniem dostępnego, aktualnego piśmiennictwa z tego zakresu. Szczegółowo, przedstawiono /ryc. 2 i ryc. 3/ szlak biosyntezy hormonów steroidowych w białych pęcherzykach prehierarchicznych i w żółtych pęcherzykach przedowulacyjnych kury, co umożliwiło zaplanowanie odpowiednich analiz oraz późniejszą interpretację uzyskanych wyników badań.

W części dotyczącej opisu właściwości i zastosowania nanocząsteczek srebra znajdujemy m.in., stwierdzenia dotyczące powszechnego ich stosowania w medycynie /stosowane do produkcji opatrunków, instrumentów chirurgicznych, protez kości, środków dezynfekcyjnych i bakteriobójczych/ oraz przemyśle kosmetycznym /są składnikami past do zębów, szamponów, mydeł, płynów do płukania, kremów, toników, itp./.. Z drugiej strony autorka przytacza dane wskazujące na, cytując: „znaczną toksyczność (AgNPs) wobec różnych typów komórek ludzkich i zwierzęcych”. W tym kontekście nasuwa się pytanie, czy rzeczywiście ten sam rodzaj nanocząsteczek (właściwości biologiczne, chemiczne, rozmiar)

stosowanych szeroko w medycynie i kosmetologii wykazuje właściwości toksyczne? i nie zostały one wykluczone przed wprowadzeniem w/w produktów na rynek? Innymi słowy czy takie zestawienie informacji: szerokie zastosowanie w medycynie – toksyczne właściwości, jest uzasadnione? kwestia ta powinna zostać wyjaśniona.

Autorka podjęła się pracochłonnych, szerokich badań, z wykorzystaniem modelu zwierzęcego *in vivo* i *in vitro*, które wymagały opanowania szeregu metod, m.in., radioimmunologicznego oznaczania badanych hormonów, izolacji RNA, real time PCR, elektroforezy, rozdzielania białek metodą Western Blot, oznaczania aktywności białek, hodowli komórek *in vitro*, oceny ich proliferacji, itd. Szeroki zakres badań, został dokładnie opisany w rozdziale Materiał i Metody.

Zaplanowano dwa doświadczenia *in vivo* przeprowadzone na 65 kurach nioskach poddanych szczegółowej kontroli oraz jedno doświadczenie *in vitro* z wykorzystaniem hodowli komórek warstwy ziarnistej pęcherzyków przedowulacyjnych. Zostały one szczegółowo zaplanowane i opisane. W odniesieniu do doświadczenia pierwszego proponuję zrezygnować ze stwierdzenia, że analizie poddano podstawowe parametry dobrostanu kur takie jak: pobranie paszy, przyrost masy ciała i nieśność.

Ocena dobrostanu jest bardziej złożona, w piśmiennictwie dotyczącym jego oceny podaje się najczęściej cztery podstawowe grupy kryteriów:

- behawioralne;
- fizjologiczne (temperatura ciała, tętno, oddech, ciśnienie krwi, EKG, wskaźniki hematologiczne, biochemiczne i immunologiczne, poziom katecholamin i kortykosterydów);
- zdrowotne (wygląd zwierzęcia i jego kondycja, zachorowalność i śmiertelność, płodność i plenność);
- produkcyjne.

Tak więc, w przypadku recenzowanej pracy proponuję stwierdzenie, że badano wybrane wskaźniki produkcyjne kur: pobranie paszy, przyrost masy ciała i nieśność. Proszę także o wyjaśnienie, na jakiej podstawie wybrano parametry nanocząsteczek: rozmiar 13 lub 50 nm oraz stężenie koloidów 1, 10 lub 100 ppm.

Na szczególne podkreślenie zasługuje moim zdaniem intelektualny wkład Doktorantki w staranne zaplanowanie każdego z doświadczeń, zmierzającego konsekwentnie do realizacji założonego celu pracy. Przykładem może być, np. testowanie genu referencyjnego, jego walidacja jest bowiem kluczowym elementem prawidłowej oceny wyników analizy real time PCR. Do tego celu autorka zastosowała trzy niezależne algorytmy: geNorm, NormFinder BestKeeper, przy pomocy których oceniła w tkankach jajnika kur traktowanych nanocząsteczkami stabilność ekspresji ośmiu genów referencyjnych. Analizę dla każdego z genów przeprowadzono w 42 powtórzeniach. Takie podejście metodyczne i zaproponowany ranking testowanych genów referencyjnych pozwoliło na prawidłową, dobrze przemyślaną ocenę ekspresji badanych genów.

Uzyskane wyniki zostały dobrze udokumentowane i zaprezentowane w czytelnych tabelach (od 6 do 11) i rycinach (od 6 do 31). Interpretacja i dyskusja uzyskanych wyników jest dobrze przemyślana i moim zdaniem stanowi rzeczywisty wkład Autorki w ten nurt badań, które stawiają sobie za cel nie tylko gromadzenie faktów opisujących efekt oddziaływania nanocząsteczek srebra na układ rozrodczy kury i jego funkcje endokrynne, ale przede wszystkim podejmują próbę formułowania hipotez objaśniających obserwowane zjawiska. Temu ostatniemu służy np., zaproponowana hipoteza sugerująca istnienie mechanizmu dezaktywującego badane nanocząsteczki, co tłumaczy brak zmiany fizjologicznej funkcji osi podwzgórze-przysadka-jajnik i układu rozrodczego.

Autorka wykazała m.in., związek pomiędzy czasem podawania AgNPs (7 lub 14 dni), a zmianą ekspresji enzymów steroidogennych; dłuższe podawanie nanosrebra powodowało

zmianę ekspresji większej liczby genów. Na tej podstawie wnioskując, iż czas ekspozycji jest istotnym elementem decydującym o toksyczności AgNPs. W moim przekonaniu takie wnioskowanie nie jest uzasadnione uzyskanymi w badaniach własnych wynikami.

W części pracy zatytułowanej wnioski Autorka zawarła cztery uogólnienia do których nie wnoszę zastrzeżeń, zostały one odpowiednio udokumentowane i wyczerpująco omówione we wcześniej przedstawionym materiale. Dotyczą one w całości wykazanego wpływu nanocząsteczek srebra na niektóre z badanych cech. Jednakże, na szereg innych cech nie wykazano istotnego wpływu czynnika doświadczalnego, co moim zdaniem powinno także zostać uwzględnione w prezentowanych wnioskach.

### **3. Ocena końcowa**

Reasumując recenzowana praca jest moim zdaniem istotną próbą określenie wpływu nanocząsteczek srebra na funkcjonowanie układu rozrodczego kury. Praca została dobrze napisana, a przedstawione w recenzji uwagi pomogą, mam nadzieję, w przygotowaniu pracy do druku. Pani mgr Dorota Katarzyńska - Banasik wykazała się bardzo dobrą znajomością piśmiennictwa oraz planowania i prowadzenia skomplikowanych, interdyscyplinarnych badań. Przedstawiając powyższe Wysokiej Radzie Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie, stwierdzam, że oceniana praca doktorska odpowiada w pełni wymogom określonym w art. 26 ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, z późniejszymi zmianami i Ustawą „Prawo o szkolnictwie wyższym”. Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie pani mgr Doroty Katarzyńskiej - Banasik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.