

Prof. dr hab. Jan Udała
Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt
i Higieny Środowiska
Zachodniopomorski Uniwersytet
Technologiczny w Szczecinie

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Doroty Katarzyńskiej-Banasik pt. „Wpływ nanocząstek srebra na proces steroidogenezy i apoptozy w pęcherzykach jajnikowych kury (*Gallus domesticus*) wykonanej w Katedrze Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Andrzeja Sechmana i promotora pomocniczego dr hab. Małgorzaty Grzesiak

Niniejsza dysertacja doktorska dotycząca badań nad wpływem nanocząsteczek srebra na czynności rozrodcze kury jest najlepszym przykładem dynamicznego rozwoju nowej dziedziny jaką jest nanotechnologia i ogromnego postępu jaki dokonał się w minionych kilku dekadach w naukach przyrodniczych. Od wizjonerskich możliwości manipulowania pojedynczymi atomami czy molekułami i myślenia o nanotechnologii przez Richarda Feynmana minęło niewiele ponad półwiecza, a jej zastosowanie, tak jak przewidywał Eric Drexler uważany za twórcę tej dziedziny, widoczne jest we wszystkich sferach życia, od medycyny i przemysłu po ochronę środowiska i rolnictwo. Zastosowanie to widoczne jest również w hodowli zwierząt, a otrzymane nowoczesnymi technologiami nanomateriały wykorzystywane są coraz powszechniej jako środki lecznicze, stabilizatory, stymulatory itp. Od szeregu już lat stosowane są preparaty na bazie różnych nanometali. Jednymi z najpowszechniej wykorzystywanymi nanocząsteczkami są nanocząsteczki srebra. Duże znaczenie tych nanocząsteczek związane jest głównie z ich silnym działaniem przeciwdrobnoustrojowym. Stosunkowo niewiele jeszcze wiadomo o ich innych właściwościach i ewentualnym szkodliwym oddziaływaniu na organizmy żywe i środowisko naturalne. Mając na uwadze znaczenie środowiska w jakim powstają i dojrzewają komórki rozrodcze, wskazane jest bliższe poznanie oddziaływania omawianych nanocząsteczek na czynności gonad i innych narządów związanych z przebiegiem procesów rozrodczych. Takiego też zadania w odniesieniu do czynności jajnika i tarczycy podjęła się Autorka niniejszej pracy. Dysertacja ta jest kontynuacją nowatorskich prac realizowanych z dużym powodzeniem przez Zespół pracowników Katedry Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt

Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie nad uwarunkowaniami czynności jajnika i innych narządów rozrodczych ptaków w kontekście poprawy ich sprawności reprodukcyjnej.

Zaprezentowane wyżej wybrane aspekty z zakresu możliwości szerokiego wykorzystania nanocząsteczek srebra w różnych sferach życia człowieka i zwierząt wskazują na ważność podjętej tematyki pracy doktorskiej oraz celowość jej wykonania. Praca ta ma charakter studium eksperymentalnego dotyczącego wpływu nanocząsteczek srebra na procesy steroidogenezy, proliferacji i apoptozy w jajnikach oraz czynność tarczycy kury.

Praca liczy 123 strony maszynopisu i zawiera 212 pozycji piśmiennictwa, z czego 210 pozycji to prace obcojęzyczne (anglojęzyczne), 31 rycin i 11 tabel. Na początku zamieszczono wykaz skrótów stosowanych w pracy, co znacznie ułatwia jej czytanie. Praca została napisana według klasycznego schematu przyjętego dla tego typu opracowań naukowych, z podziałem na rozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie, wnioski, literatura.

We wstępie, będącym jednocześnie przeglądem piśmiennictwa, wyróżniono dwa podrozdziały. W pierwszym z nich Autorka przedstawia budowę jajnika kury domowej, procesy w nim zachodzące oraz ich regulację. Rozdział ten jest dobrym wprowadzeniem czytelnika w istotę zagadnienia, biorąc pod uwagę problematykę własnych badań. Budowę i procesy zachodzące w jajniku kury Doktorantka przedstawia na tle powyższych procesów przebiegających w jajnikach ssaków, co potwierdza posiadanie przez Nią szerokiej wiedzy w zakresie regulacji procesów rozrodczych u zwierząt. W przystępny i jasny sposób prezentuje złożone procesy zachodzące na osi podwzgórze-przysadka mózgowa-gonady oraz przebieg steroidogenezy w białych pęcherzykach prehierarchicznych i żółtych pęcherzykach przedowulacyjnych kury, zamieszczając schematy w modyfikacji własnej, co znacznie ułatwia czytelnikowi zrozumienie zagadnienia.

Przytaczając aktualne pozycje piśmiennictwa, na koniec podrozdziału Autorka wskazuje na złożoność procesu steroidogenezy i istotny udział poza gonadotropinami przysadkowymi i steroidami, innych czynników endokrynych, parakrynych i autokrynych. Ważnym w tym kontekście jest podkreślenie, iż funkcjonowanie osi podwzgórze-przysadka- jajnik może być także regulowane przez obecne w środowisku związki chemiczne, w tym pestycydy i zanieczyszczenia przemysłowe.

W drugim podrozdziale Doktorantka omawia nanotechnologię jako prężnie rozwijającą się dziedzinę nauki. Opierając się na materiałach źródłowych z ostatnich lat wymienia działy gospodarki, w których znajduje już zastosowanie. Główną uwagę poświęca jednak nanocząsteczkom srebra podając za Vance i in. (2015), iż ich zastosowanie przekracza

24% wszystkich produktów konsumenckich i medycznych. Dalej wyjaśnia z czego wynika tak szerokie ich wykorzystanie, zwracając uwagę na bakteriobójczy mechanizm ich działania związany z tworzeniem się na powierzchni nanocząstek wolnych rodników, które uszkadzają błonę komórkową bakterii i prowadzą do dalszych zmian powodując ich degradację. Istotnym w kontekście przyjętych założeń metodycznych we własnej pracy jest zaznaczenie, iż skuteczność przeciwdrobnoustrojowa nanocząsteczek zależy m.in. od ich wielkości i metody wytwarzania. Słusznym wydaje się także stwierdzenie, że powszechność stosowania nanocząstek srebra stwarza potrzebę prowadzenia badań dotyczących ich szkodliwego oddziaływania na organizmy żywe i środowisko naturalne. Pomimo podania wielu przykładów takiego działania tych nanocząstek, bardziej adekwatnym byłoby wstawienie do powyższego stwierdzenia „ewentualnego” ich szkodliwego

W swoich rozważaniach dotyczących oddziaływania AGNPs na organizmy żywe Autorka słusznie podkreśla, iż większość badań dotychczas przeprowadzono w warunkach *in vitro*, a w przypadku *in vivo* obejmowały głównie szczury i ryby. Niewiele prac wykonano natomiast na ptakach, a w produkcji drobiarskiej nanocząsteczki te znalazły już dosyć szerokie zastosowanie. Stąd też wskazane jest poznanie ich działania na organizm, nie tylko w aspekcie produkcyjnym, ale również oddziaływania na komórki na poziomie molekularnym i ewentualnych następstw w ujęciu wielopokoleniowym. Interesujące byłoby na pewno bliższe poznanie takiego wpływu nanocząstek srebra w odniesieniu do czynności gonad i pozostałych narządów rozrodczych u samców i samic ptaków.

W podsumowaniu prezentowanego rozdziału wstęp, będącego zarazem przeglądem piśmiennictwa, należy podkreślić jasność, przystępność i przejrzystość formy i sposobu przedstawienia informacji z wykorzystaniem aktualnych materiałów źródłowych. Materiały te poprawnie wyselekcjonowano, a zawarte w nich dane odpowiednio zinterpretowano, co świadczy o dobrej znajomości przez Autorkę omawianej tematyki i dobrym Jej przygotowaniu teoretycznym. Dokonany przez Nią na podstawie ponad 200 artykułów i monografii poprawnie przegląd piśmiennictwa naukowego, może stanowić źródło materiału faktograficznego dotyczącego wybranych procesów zachodzących w jajnikach kury oraz znaczenia i możliwości wykorzystania w różnych sferach życia, a także wpływu nanocząstek srebra na organizm zwierząt.

Na tle przedstawionych rozważań we wstępie, w pełni uzasadnionym jest podjęcie przez Autorkę realizacji niniejszej pracy i osiągnięcie celu jakim było zbadanie wpływu nanocząstek srebra na czynność jajnika niosącej kury, zwłaszcza procesy steroidogenezy,

proliferaacji i apoptozy oraz czynność tarczycy we krwi zwierząt. Postawiła trzy hipotezy badawcze, które poddała następnie weryfikacji przeprowadzając 3 doświadczenia.

Badania wykonano na 65 niosących kurach linii Hy-Line Brown w wieku 25 tygodni o średniej masie ciała 1,67 kg, utrzymywanych w odpowiednich warunkach środowiskowych i żywieniowych, z ustalonym reżimem świetlnym 14L:10D. Przyjęto, że owulacja zachodzi 15-30 min. po zniesieniu jaja przez kury, a dekapitowano je 22 godz. przed owulacją. Stosowane nanocząstki srebra były w postaci monodispersyjnych koloidów wodnych i zostały wyprodukowane w dwóch rozmiarach 13 nm i 50 nm przez firmę NPIN (NPIN S.C., Poland) metoda chemiczną.

W doświadczeniu pierwszym badano wpływ podania AgNPs na pobranie paszy, nieśność, masę kur i stężenie hormonów we krwi. Badania wykonano na 42 kurach, losowo podzielonych na 7 równych grup – 6 doświadczalnych i 1 kontrolną. W trzech grupach doświadczalnych ptaki otrzymywały AGNPS o rozmiarze 50 nm i koncentracji 1 ppm, 10 ppm i 100 ppm, a w trzech następnych zwierzętom podawano nanocząsteczki o rozmiarach 13 nm o tej samej koncentracji jak w poprzednich grupach. Grupa kontrolna otrzymywała bufor, w którym zawieszono były nanocząsteczki. W czasie doświadczenia kontrolowano spożycie paszy, masę ciała i nieśność kur, pobierając od nich krew w 0, 3, 7, 10 i 14 dniu. Po jej obróbce, uzyskane osocze zamrażano do czasu przeprowadzenia analizy stężeń hormonów steroidowych (P_4 , T, E_2) oraz jodotyronin (tyroksyny - T_4 i trijodotyroniny – T_3).

W doświadczeniu drugim badano oddziaływanie AgNPs *in vivo* na stężenie steroidów w tkankach jajnika, ekspresję mRNA i białka enzymów procesu steroidogenezy. W doświadczeniu tym, na podstawie stężenia hormonów z pierwszego eksperymentu, zastosowano nanocząsteczki w rozmiarze 50 nm i koncentracji 100 ppm. Ptaki podzielono na dwie równe grupy po 12 osobników. Kury grupy doświadczalnej otrzymywały po 1 ml/kg m.c. roztwór koloidalny, a grupy kontrolnej bufor. Krew pobierano w 0, 3, 7, 10 i 14 dniu, a otrzymane osocze zamrażano do czasu oznaczeń stężenia hormonów steroidowych. Ptaki dekapitowano w 7. (n=6) i 14. dniu (n=6), a z pobranych jajników izolowano małe i duże białe pęcherzyki prehierarchiczne oraz żółte przedowulacyjne pęcherzyki jajnikowe (F3-F1). Poszczególne tkanki jajnika zamrażano i przechowywano do czasu izolacji RNA, białka i oznaczenia steroidów.

W doświadczeniu trzecim natomiast badano wpływ AgNPs *in vitro* na proliferację oraz aktywność kaspazy-3 w warstwie ziarnistej pęcherzyków jajnikowych. Badania te wykonano na pęcherzykach F3-F1 pobranych od 6 niosących kur. Po odizolowaniu warstwy ziarnistej od osłonki pęcherzyka, komórki poddawano odpowiedniej obróbce w celu

określenia stopnia proliferacji i aktywności kaspazy-3. Hodowlę komórek prowadzono z dodatkiem AgNPs o dwóch rozmiarach (13 nm i 50 nm) stosując stężenia 0,1, 1, 5 lub 10 µg/ml. Stopień proliferacji oceniano testem WST (Quick Cell Proliferation Colorimetric Assay Kit Plus, BioVision, USA), a aktywność kaspazy 3 oznaczono testem fluorometrycznym (Caspase-3/ CPP32 Fluorometric Assay Kit, Bio Vision, USA).

Oznaczenia stężeń hormonów dokonano metodą radioimmunologiczną z użyciem specyficznych komercyjnych zestawów dla każdego z nich. W badaniach nad wpływem AgNPs na ekspresję mRNA i białka enzymów procesu steroidogenezy wykorzystano metodę real-time PCR, stosując kontrolę endogenną w postaci genu referencyjnego. Walidację genów referencyjnych w tkance jajnika kur wykonano za pomocą programu NormFinder, geNorm oraz BestKeeper, identyfikując geny najmniej i najbardziej stabilne. Izolację RNA przeprowadzono z użyciem zestawu EXTRACTME TOTAL RNA poddając tkanki obróbce według podanych procedur przez producenta. Amplifikację cDNA metodą PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono według metodyki oraz zestawach starterów i sond TagMan zaprojektowanych i dostarczonych przez firmę Applied Biosystems. Znormalizowany względny poziom ekspresji badanych genów NRQ obliczono według wzoru Pfaffla (2001) w modyfikacji Hellemans i in. (2007), uwzględniającego w obliczeniach możliwość wykorzystania wielu genów referencyjnych do normalizacji.

Elektroforetyczny rozdział białek tkanek pozyskanych w drugim doświadczeniu przeprowadzono w żelu poliakrylamidowym, po czym przenoszono je na membrany, które inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi i drugorzędowymi, poddając je następnie wizualizacji za pomocą chemiluminiscencji. Kolejnym etapem była archiwizacja wyników i analiza gęstości optycznej prążków.

Do oznaczenia stopnia proliferacji komórek warstwy ziarnistej użyto testu WST polegającego na określeniu metodą spektrofotometryczną ilości formazonu odzwierciedlającego ilość żyjących komórek. Aktywność kaspazy-3 oznaczono metodą fluorometryczną za pomocą komercyjnego zestawu (Bio Vision, USA) polegającego na redukcji substratu DEVD-AFC przez kaspazę 3 do AFC, emitującego żółto-zieloną fluorescencję, którą mierzono na czytniku fluorescencji.

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego SAS, sprawdzając normalność rozkładu danych za pomocą procedury Univariate i wyliczając średnie oraz błędy standardowe średniej za pomocą procedury Means. Przy analizie wyników dotyczących stężenia hormonów, aktywności kaspazy-3, proliferacji komórek, masy ciała,

pobrania paszy przez ptaki wykorzystano procedurę Mixed oraz testy Kruskala –Wallisa, test Bonfferoniego lub test Tukey’ a w zależności od rozkładu danej cechy.

Zarówno sam przebieg doświadczenia jak również zastosowane metody badawcze przedstawiono dokładnie i przejrzystie. Zamieszczone ryciny prezentujące układ doświadczeń pozwalają lepiej zrozumieć ich przebieg, podobnie jak podane w tabelach niektóre dane dotyczące wykonywanych analiz genetycznych. Poprawny opis wielu technik i procedur badawczych, co wyróżnia ten rozdział, świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Autorki do pracy od strony analitycznej.

W następnym rozdziale pracy scharakteryzowano uzyskane wyniki, prezentując je w formie tabelarycznej i graficznej. Wyniki te są interesujące i razem z wynikami przedstawionymi w innych pracach przez Zespół pracowników Katedry Fizjologii i Endokrynologii Zwierząt UR w Krakowie dostarczają nowych danych na temat wpływu wybranych czynników na zachodzące procesy w jajniku kury i możliwości ich stymulacji w aspekcie poprawy sprawności reprodukcyjnej i zwiększenia wydajności zwierząt.. Wykonane prace świadczą o trafności wyboru problematyki badawczej i znaczeniu realizowanych prac w kontekście zwiększającego się zapotrzebowania na żywność, której sektor drobiarski jest głównym dostarczycielem. Badania te ważne są także z uwagi na potrzebę poszukiwania nowych i doskonalenia znanych już metod biotechnologicznych w celu wykorzystania potencjalnych możliwości rozrodczych u samców i samic ptaków. Ze względu na budowę anatomiczną i odmienny układ chromosomów płci jak u ssaków, badania takie u ptaków napotykają na duże trudności. Należy także wspomnieć o poruszanych już obawach występujących przy coraz szerszym stosowaniu nanomateriałów niemalże w każdej sferze życia. W tym kontekście niniejsza praca wnosi duży wkład do skromnego wciąż dorobku związanego z wpływem nanocząstek srebra na czynność układu rozrodczego zwierząt. Dotyczy to zwłaszcza ptaków. W tym zakresie wykonane badania mają charakter nowatorski.

Wykonanie badań na reprezentatywnej liczbie ptaków i zastosowanie nowoczesnych metod z zakresu biologii molekularnej, pozwoliło Autorce na dokonanie szczegółowej charakterystyki badanego materiału i uzyskanie interesujących wyników, aczkolwiek nie zawsze jednoznacznych i łatwych do interpretacji. Pozwalają one jednak na wstępne rozeznanie problemu i wskazują na kierunki dalszych poszukiwań.

Analiza podstawowych parametrów uwzględnianych w użytkowości kur jak nieśność, przyrost masy ciała i pobranie paszy wykazała, że kształtują się one podobnie we wszystkich grupach. Różnice jakie wystąpiły między grupami otrzymującymi różne dawki AgNPs

okazały się statystycznie nieistotne, co Autorka próbuje tłumaczyć krótkim czasem ekspozycji ptaków na preparat lub specyfiką gatunkową. Wydaje się, że istotnym czynnikiem mogła być w tym przypadku również liczebność ptaków w grupach i zmienność wewnątrz- i międzygrupowa. Wskazuje na to rozkład wartości średnich (ryc. 10) zwłaszcza dosyć duża różnica między grupą otrzymującą nanocząsteczki o koncentracji 1 ppm i wielkości 13 nm, a grupą otrzymującą dawkę 100 ppm.

Nie wykazano także istotnych zmian po podaniu AgNPs w stężeniu hormonów steroidowych w osoczu kur. Zaobserwowano natomiast istotny wpływ czasu na poziom progesteronu i estradiolu. Stężenie progesteronu we wszystkich grupach spadło w 7. dniu po czym wzrosło w następnym tygodniu. W przypadku stężenia estradiolu można zauważyć tendencję wzrostu stężenia hormonu w większości grup w 3. i 7. dniu, po czym spadek w następnym dwóch dniach. Nieco inaczej interpretuje to Autorka, podając, że w 3. i 7. dniu podania AgNPs w większości grup doświadczalnych następowało zmniejszenie jego stężenia. Występujące różnice w stężeniu hormonu w kolejnych dniach pobrań krwi Jej zdaniem mogą wynikać z niewielkich wahań stężenia hormonów steroidowych pojawiających się w okresie kilku godzin po zniesieniu jaja, czego oczywiście nie można wykluczyć. Na podstawie braku efektu wpływu grupy na zawartość hormonów we krwi ptaków Doktorantka stawia hipotezę, iż w organizmie kury istnieje mechanizm dezaktywujący (lub metabolizujący) badane nanocząsteczki czego efektem jest utrzymanie fizjologicznej funkcji osi podwzgórze-przysadka-jajnik i układu rozrodczego. Ta hipoteza Jej zdaniem wymaga sprawdzenia z czym należy się zgodzić, zważywszy dość znaczne różnice między niektórymi grupami doświadczalnymi a kontrolną, które jednak nie potwierdzono statystycznie.

Ciekawe wyniki, skłaniające do rozważań, a jednocześnie inspirujące do podjęcia dalszych prac w obranym kierunku, uzyskała Autorka w odniesieniu do hormonów tarczycy. Stwierdziła bowiem, że podawanie AgNPs o wielkości 50 nm i koncentracji 100 ppm przez 14 dni zwiększyło stężenie T_3 w osoczu, podczas gdy stężenie T_4 pozostało niezmienione. Ponieważ u ptaków T_3 pochodzi z pozataarczycowej konwersji (dejodynacji) T_4 przypuszcza Ona, iż nanocząsteczki srebra wpływają dodatnio na tę konwersję. Przypuszczenia takie podpira badaniami innych autorów, którzy stwierdzili obecność dejodynazy I i II oraz AgNPs w tych samych narządach, m.in. w mózgu.

W swojej pracy Doktorantka poświęca wiele miejsca badaniom ekspresji genów na poziomie mRNA i białka enzymów biorącym udział w procesie steroidogenezy. Dokonana w tym celu walidacja genów referencyjnych w oparciu o trzy algorytmy pozwoliła na uszeregowanie genów od najbardziej do najmniej stabilnego i nadanie im rangi od 1 do 8,

osobno dla każdego parametru. Przeprowadzana walidacja wykazała jak ważne w tego typu badaniach jest podejście metodyczne i intuicja badacza. Analiza stabilności genów referencyjnych wykazała, że najmniej stabilnym okazał się gen 18S rRNA, natomiast najbardziej stabilnymi geny SDHA i RPL13, wobec których normalizowano ekspresję badanych genów w pracy. O ważności dokonanego wyboru przekonuje analiza ekspresji kluczowego genu CYP19A1 względem wszystkich testowanych genów referencyjnych. I tak przy użyciu genu 18S rRNA ekspresja aromatazy wzrosła o 220% w porównaniu do grupy kontrolnej, podczas gdy po normalizacji wybranymi genami zmalała o 30%.

Przeprowadzone szczegółowe badania nad ekspresją genów i białka enzymów zaangażowanych w proces steroidogenezy oraz koncentracją hormonów steroidowych w tkankach jajnika dostarczyły interesujących danych, pozwalając jednocześnie Autorce na podjęcie prób prześledzenia związków między poziomem ekspresji genu a uzyskanym produktem. Takich ciekawych porównań dokonała między ekspresją CYP17A1 a stężeniem testosteronu w pęcherzykach jajnikowych wskazując na pewną zgodność w tym względzie. Z drugiej zaś strony zaobserwowane różnice w ekspresji CYP17A1 i zawartości testosteronu w pęcherzykach prehierarchicznych wskazały, że profil ekspresji tego genu nie jest do końca zgodny z aktywnością enzymatyczną białka 17 α -hydroksylazy w takich pęcherzykach. Podobne porównania poczyniła między ekspresją mRNA dla 3 β -HSD a stężeniem progesteronu oraz ekspresją mRNA dla CYP19A1 a stężeniem testosteronu.

Analiza wpływu AgNPs na ekspresję genów kodujących enzymy szlaku steroidogenezy nie pozwoliła Autorce na zauważenie wyraźnych trendów poza tym, że dłuższe podawanie nanosrebra powoduje deregulację ekspresji większej liczby genów. Zmiany ekspresji enzymów steroidogennych na poziomie transkryptyu zostały potwierdzone przez ekspresję białka jedynie w przypadku genu CYP19A1 i białka aromatazy w pęcherzykach SWF.

Podobnie jak w przypadku stężenia hormonów steroidowych we krwi, również w pęcherzykach jajnikowych ich zawartość była w dużym stopniu związana z czasem działania AgNPs, gdyż stężenie T i E₂ zmieniło się dopiero po 14 dniach administracji nanosrebra i dotyczyło pęcherzyków prehierarchicznych. W swoich rozważaniach Autorka nie wyklucza, że AgNPs pośrednio oddziałują na pęcherzyki jajnikowe kury poprzez zwiększanie stężenia T₃ w osoczu. Hipotezę taką stawia podpierając się badaniami wykonanymi w macierzystej Katedrze nad wpływem T₃ na poziom hormonów steroidowych i LH w warunkach *in vivo* i *in vitro*.

Przeprowadzone hodowle komórek warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych wykazały dawkozależny wpływ AgNPs na stopień proliferacji tych komórek. Mniejsze stężenia nie wpływały na proliferację, natomiast najwyższe działały cytotoksycznie. Wpływ ten zależał też od czasu ekspozycji komórek na nanocząsteczki srebra oraz ich rozmiarów. AgNPs o wielkości 50 nm szybciej uśmiercały komórki niż mniejsze nanocząstki.

Rozmiar nanocząstek srebra miał także istotny wpływ na aktywność kaspazy-3. Wpływ taki miały cząsteczki o rozmiarach 13 nm, natomiast o wielkości 50 nm efektu takiego nie zaobserwowano. Opierając się na badaniach innych autorów Doktorantka stawia hipotezę o zależności śmierci komórkowej w zależności od wielkości nanocząstek srebra, co potwierdza Jej dobre rozeznanie w temacie i potrzebę rozwijania badań w celu wyjaśnienia tego oraz wcześniejszych wskazanych przez Nią problemów.

Uzyskane wyniki dobrze udokumentowano i w przekonujący sposób przedstawiono w formie tabelarycznej i graficznej. Autorka interpretuje je w następnym rozdziale, dyskusja. W rozdziale tym wyniki własne porównuje z pracami innych autorów, wykonanych na ludziach i zwierzętach, przedstawia własne spostrzeżenia i poglądy w kwestii omawianych zagadnień. Wszechstronny sposób interpretacji wyników własnych i podejmowane próby wyjaśnienia złożonych często zagadnień w oparciu o prace innych badaczy, świadczą o podejmowanych próbach dogłębnego zbadania poruszanych problemów. Problemy te stara się rozwiązać i przybliżyć czytelnikowi w możliwie prosty i zrozumiały sposób.

Jak wskazano wcześniej przy prezentacji osiągniętych wyników przez Autorkę, niektóre zagadnienia pozostają niewyjaśnione, skłaniając Ją do postawienia hipotez wymagających w przyszłości weryfikacji. Dowodzi to dojrzałości naukowej i ostrożności przy wyciąganiu zbyt pochopnych wniosków, co jest na pewno pozytywną cechą u młodego badacza.

Na tle rzeczowej dyskusji, bogatego i trafnego doboru materiałów źródłowych, opracowanie tego rozdziału świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu i znajomości tematu przez Autorkę pracy.

Po omówieniu wyników, w ośmiu punktach Autorka dokonuje ich podsumowania.

W przedstawionej formie są to raczej najważniejsze stwierdzenia dotyczące wpływu nanocząstek srebra na cechy, które badała. Mają one w niektórych punktach (2, 4, 6) charakter wniosków. Dokonanie takiego podsumowania, niezależnie od formy, należy jednak uznać za dobre rozwiązanie. Pozwala bowiem czytelnikowi szybko zorientować się o najważniejszych efektach pracy.

Na podstawie uzyskanych danych i przeprowadzonej ich analizy Doktorantka wyciąga 4 wnioski. Sądzę, że można było pokusić się o wyciągnięcie jeszcze innych, np. dotyczących wpływu nanocząstek srebra na cechy użytkowe czy stężenie hormonów w osoczu.

W wyniku przeprowadzonych badań uzyskano szereg cennych danych o charakterze poznawczym, mogących w przyszłości znaleźć zastosowanie praktyczne, co nadaje pracy oryginalności. Na podkreślenie zasługuje:

1. Wykonanie szerokich badań nad wpływem nanocząstek srebra na wybrane cechy użytkowe oraz inne wskaźniki charakteryzujące czynność jajnika kur, przy wykorzystaniu najnowszych metod z zakresu biologii molekularnej, co wskazuje na bardzo dobrą znajomość technik badawczych i posiadane umiejętności analityczne przez Doktorantkę.
2. Wykazanie związków między czasem podawania nanocząstek srebra a stężeniem hormonów steroidowych we krwi i pęcherzykach jajnikowych, co może mieć znaczenie praktyczne przy dłuższym stosowaniu tych nanocząstek i powinno być brane pod uwagę w hodowli kur.
3. Wykazanie, że działanie nanocząstek srebra jest specyficzne tkankowo oraz zasugerowanie pośredniego oddziaływania AgNPs na pęcherzyki jajnikowe kury poprzez zwiększenie stężenia trijodotyroniny.
4. Wskazanie na znaczenie rozmiarów AgNPs przy jego podawaniu zwierzętom i związaną z tym potrzebę szerszego wyjaśnienia wpływu wielkości nanocząstek srebra na czynność narządów układu rozrodczego.

Czytając pracę zauważyłem kilka drobnych pomyłek, np. na stronach: 40 (3d) – „oprocentowości”, 47 (8g) – „ikoncentracji”, 56 (2d) – „ołączej”, 86 (3g) – „poztarcycowym”, 86 (6g) – brak w zdaniu „z”.

Powyższe nieliczne pomyłki literowe nie mają większego wpływu na wartość merytoryczną pracy, która została napisana jasno i przejrzysto, poprawnie pod względem stylistycznym i gramatycznym. Jak podkreślono wcześniej, jest przystępna i zrozumiała dla czytelnika. Podjęta problematyka badawcza i uzyskane interesujące, aczkolwiek czasami niejednoznaczne i trudne do interpretacji wyniki, skłaniają do refleksji i inspirują do dalszych prac w omawianym temacie, co jest niewątpliwie pozytywnym aspektem pracy.

Wniosek końcowy

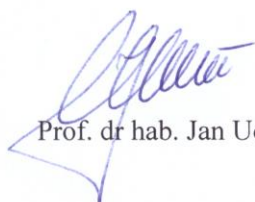
Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma walory poznawcze, a uzyskane wyniki mogą przyczynić się do szerszego i właściwego wykorzystania nanocząstek srebra w hodowli drobiu. Praca ma charakter interdyscyplinarny i wskazuje na coraz większe możliwości wykorzystania osiągnięć biotechnologii w hodowli zwierząt. Praca ta, ze względu na podjętą aktualną i nowatorską w odniesieniu do czynności jajnika ptaków tematykę badawczą, przyjęte rozwiązania metodyczne, osiągnięte interesujące wyniki i sposób ich interpretacji, wnosi nowe wartości do wspólnego dorobku myśli naukowej i przyczynia się do rozwoju badań w uprawianej przez Doktorantkę dyscyplinie naukowej biotechnologii oraz jej pokrewnych biologii i zootechniki.

Na podkreślenie zasługują przyjęte założenia metodyczne i wykorzystane nowoczesne techniki badawcze w realizacji badań, które pozwoliły Autorce wykonać postawione zadania i osiągnąć zamierzony cel. Na gruncie dociekań naukowych uzyskała interesujące wyniki, zachęcające do dalszych prac nad wpływem nanocząstek srebra na przebieg procesów rozrodczych u kur. Praca napisana została jasno i przejrzysto, a Autorka potrafiła przedstawić trudne zagadnienia w przystępnej formie. Świadczy to o Jej dojrzałości naukowej i posiadanej wiedzy w podjętym temacie.

*Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Doroty Katarzyńskiej-Banasik pt. „Wpływ nanocząstek srebra na proces steroidogenezy i apoptozy w pęcherzykach jajnikowych kury (*Gallus domesticus*) odpowiada wymaganiom określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. z 2017r., poz. 1789).*

Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Doroty Katarzyńskiej-Banasik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę przedstawione wyżej pozytywne aspekty pracy, wnioskuję o jej wyróżnienie.



Prof. dr hab. Jan Udała

Szczecin, 25 lipca 2018 roku