Uniwersytet Rzeszowski
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Instytut Biologii i Biotechnologii

Dr hab. Maciej Wnuk, Profesor UR
Katedra Biotechnologii
Kolegium Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Rzeszowski

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr. Anny Marii Grzesiakowskiej
pod tytułem
„Wpływ nanocząstek srebra na integralność chromatyny jądrowej w komórkach somatycznych wybranych przedstawicieli *Canidae*"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr. Anny Marii Grzesiakowskiej została wykonana pod kierunkiem Pani Profesor dr hab. lek wet. Olgi Szeleszczuk.

Problematyka pracy doktorskiej dotyczyła oceny poziomu uszkodzeń DNA limfocytów krwi obwodowej psa domowego (*Canis familiaris*) oraz lisa polarnego (*Alopex lagopus*) poddanych na ekspozycję nanocząstek srebra oraz azotan (V) srebra. W szczególności doktorantka skoncentrowała się na analizach porównawczych genotoksyczności nanocząstek srebra produkowanych metodą fizyczną, tj. wysokonapięciowych wyładowań w łuku elektrycznym, w tym względem różnic gatunkowych wyżej wspomnianych gatunków oraz dodatkowo od rodzaju roztworu w jakim zostały nanocząstki srebra zawieszone (woda lub trójcytrynian sodu). W dysertacji doktorantka zdefiniowała cztery hipotezy badawcze, których następnie weryfikację przeprowadzała za pomocą testów oceny łamliwości chromosomów metafazowych, testu mikrojądrowego w komórkach z blokiem cytokinezy (ang. *cytokinesis block micronucleus assay* – CBMN) oraz testu elektroforezy pojedynczych jąder komórkowych w żelu agarozowym (ang. *comet assay*, SCGE). Problematyka pracy doktorskiej tym samym dotyczy istotnego z punktu widzenia interesu społecznego zagadnienia jakim jest bezpieczeństwo oraz ocena ryzyka związanego ze stosowaniem nowych technologii.

Postawiony cel naukowy spełnia tym samym wymóg niezbędny dla uznania ocenianej pracy doktorskiej za odpowiadający poziomowi jakim powinna odznaczać się praca doktorska, ponieważ jego realizacja istotnie poszerza dotychczasową wiedzę oraz stanowi przyczynek do oryginalnego rozwiązania problemu naukowego.

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Marii Grzesiakowskiej została opracowana w sposób typowy dla prezentacji wyników doświadczalnych, obejmuje 176 str. i zawiera następujące rozdziały: wykaz skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, spis literatury, spis rycin, fotografii i wykresów, spis tabel, streszczenie w języku polskim oraz angielskim. Pod względem formalnym, mam tylko kilka drobnych uwag. W dysertacji nie podano informacji o miejscu realizacji pracy doktorskiej, nazwy gatunkowe nie zawsze zostały zapisane kursywą (np. Ryc. 2). W dysertacji używano nader często zapożyczone bezpośrednio z języka angielskiego nazwy i skróty pomimo możliwości zastosowania odpowiedniej polskiej terminologii np. ROS zamiast RFT (reaktywne formy tlenu). Podobnie, nazwy metod zdaniem recenzenta powinny zostać podane w dysertacji także w języku polskim np. test łamliwości chromosomów zamiast test *„Fragile site”*. Użyte w dysertacji nazwy testów pozwalają oczywiście zidentyfikować procedurę, ale należy pamiętać, że wybranym przez doktorantkę językiem pracy doktorskiej jest język polski, dlatego konsekwentnie należy unikać bezpośrednich zapożyczeń oryginalnych nazw angielskojęzycznych, jeśli jest taka możliwość.

Ocena części merytorycznej dysertacji.

We wstępie pracy zawarto informacje dotyczące charakterystyki nanocząstek srebra, struktury i organizacji chromatyny jądrowej, opisano mechanizmy odpowiedzialne za integralność chromatyny, opisano zasadę technik wykorzystywanych w testowaniu hipotez badawczych oraz scharakteryzowano kariotyp psa oraz lisa polarnego. Wstęp tym samym dotyczy tematyki dysertacji oraz w sposób wyczerpujący pozwala czytelnikowi dokładnie zapoznać się z zagadnieniami poruszanymi w rozprawie doktorskiej. Rozdział ten został opracowany w oparciu o adekwatną do tematyki literaturę. Natomiast zdaniem recenzenta część treści mogłaby zostać przedstawiona za pomocą tabel lub autorskich schematów, co niewątpliwie urozmaiciłoby estetycznie rozdziały, a jednocześnie pozwoliłoby na zwięźlejsze przedstawienie niektórych zagadnień. Z drugiej strony, w świetle ostatniej publikacji *Creevy, K.E., Akey, J.M., Kaeberlein, M. et al. An open science study of ageing in companion dogs. Nature 602, 51–57 (2022).* https://doi.org/10.1038/s41586-021-04282-9 za szczególnie intersujący uważam podrozdział omawiający gatunek psa jako organizm modelowy w badaniach biomedycznych. Przytoczona literatura podkreśla fakt, że badania prowadzone przez doktorantkę na materiale psowatych wpisują się w aktualny nurt międzynarodowej nauki.

Cel pracy doktorskiej został określony w sposób zwięzły zgodnie z tematem rozprawy. Dodatkowo doktorantka podkreśliła jeden cel szczegółowy dotyczący „*określenia genotoksycznego profilu nanocząstek srebra w zależności od zastosowanej dawki oraz czasu ekspozycji komórek*".

Rozdział zatytułowany „Materiały i metody" zawiera opis procedury otrzymania nanocząstek srebra oraz sposobu pozyskania materiału biologicznego, jak również procedurę oceny łamliwości chromosomów metafazowych, testu mikrojądrowego w komórkach z blokiem cytokinezy (ang. *cytokinesis block micronucleus assay* – CBMN) oraz testu elektroforezy pojedynczych jąder komórkowych w żelu agarozowym (ang. *comet assay*, SCGE). Ogólnie procedury zostały opisane prawidłowo, a zawarte informacje pozwalają na odtworzenie eksperymentów. Do tego rozdziału mam tylko kilka pytań związanych z doprecyzowaniem warunków wybranych układów eksperymentalnych. Czy przeprowadzone badania na materiale zwierzęcym wymagały zgody Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach? Proszę o doprecyzowanie warunków ekspozycji komórek na działanie roztworów srebra. Dlaczego nie inkubowano komórek z roztworami srebra w temperaturze 37°C? Czy sprawdzono hemolizę erytrocytów w eksperymentalnym układzie *in vitro* przed i po traktowaniu roztworami srebra - szczególnie podczas 24 h inkubacji? Czy zdaniem doktorantki ewentualna hemoliza może mieć wpływ na otrzymane wyniki? Proszę o komentarz jakie inne czynniki w układzie eksperymentalnym mogą mieć znaczenie dla biodostępności nanomateriałów? W jaki sposób utrzymywano w układzie eksperymentalnym odpowiednią jednakową biodostępność między poszczególnymi powtórzeniami biologicznymi eksperymentów? Jaki mitogen zastosowano w hodowli limfocytów *in vitro*?

Prezentacja wyników została usystematyzowana w sposób poprawny zmierzający do udzielenia odpowiedzi na zdefiniowane w pracy doktorskiej cele. Na podkreślanie zasługuje fakt, iż wyniki zostały przedstawione na 9 fotografiach, 2 wykresach oraz aż 31 tabelach. Wyniki zostały przeanalizowane z użyciem odpowiedniego testu statystycznego. Taka ilość danych wykonanych za pomocą metod cytogenetyki klasycznej wskazuje na ogrom włożonej pracy doktorantki na potrzeby przygotowania ocenianej dysertacji. Zdaniem recenzenta zasługuje to bez wątpienia na podkreślenie. W tym kontekście za szczególnie wartościowe wyniki uważam ilościową oraz jakościową analizę występowania miejsc łamliwych chromosomów psa oraz lisa polarnego, a także analizy z wykorzystaniem testu

mikrojądrowego. Do tego rozdziału mam jednak ogólną uwagę dotyczącą sposobu prezentacji danych w tabelach. W podpisie do tabel brakuje informacji o liczbie analizowanych komórek lub metafaz itp. Brak informacji o typie zastosowanego testu statystycznego, oznaczenia istotności statystycznej są ciężkie do odczytania, tzn. co z czym porównano lub zastosowano niefortunne sformułowania „*abc/ABC – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie gatunku i roztworu srebra różnią się wysoce istotnie przy p<0,01*", zamiast dokonać porównania odpowiednio na poziomie *p<0,05, p<0,01 lub p<0,001*. Także nazwy niektórych tabel mogłyby zostać precyzyjniej opracowane. Na przykład w dysertacji w tytule tabel od 6 do 9 brzmią: *„Średnia liczba miejsc łamliwych w komórkach…*" natomiast zgodnie z opisem metody oraz prezentowanymi wynikami na fotografii 3 i 4 - analiza dotyczyła miejsc łamliwych chromosomów metafazowych, nie komórek.

Niezależnie jednak od tych uwag, rozdział zawierający prezentację oraz opis wyników stanowi cenne źródło wiedzy naukowej. Przedstawione w pracy wnioski, zakres i jakość zaprezentowanych wyników wskazuje, że <u>doktorantka przedstawiła oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i tym samym spełniła ustawowy warunek stawiany pracom doktorskim.</u>

Dyskusja została opracowana w sposób poprawny w oparciu o aktualną i adekwatną do problematyki literaturę. Doktorantka w sposób syntetyczny oraz rzetelny krytycznie odniosła otrzymane przez siebie wyniki do danych literaturowych. Wnioski końcowe w większości są prawidłowo sformułowane względem otrzymanych wyników. Po przeczytaniu i merytorycznej analizie tych rozdziałów recenzentowi nasunęło się jeszcze kilka pytań. Czy doktorantka obserwowała inhibicję podziałów komórkowych limfocytów krwi obwodowej poddanych działaniu roztworom srebra? Dlaczego doktorantka nie zdecydowała się podać w pracy wartości indeksu mitotycznego lub indeksu podziału jądra (ang. *nuclear division index* (NDI)) lub cytotoksyczności indeksu podziału jądra (ang. *index nuclear division cytotoxicity index* (NDCI))? Czy doktorantka podczas analiz mikrojąder obserwowała także komórki o morfologii świadczącej o występowaniu śmierci nekrotycznej lub apoptotycznej zgodnie z nomenklaturą opisaną w publikacji autorów *Fenech i in., 2003 zatytułowanej „HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures"*? Jaki efekt będzie miała inhibicja podziału komórkowego lub apoptozy lub nekrozy na częstość obserwowanych struktur mikrojądrowych w komórkach (jedno- lub dwu- lub wielojądrzastych)? Jaka może być hipotetyczna przyczyna stwierdzonych różnić pomiędzy badanymi gatunkami w częstości

obserwowanych uszkodzeń DNA w limfocytach poddanych ekspozycji na nanomateriały srebra? Jakie dodatkowe techniki/metody zaproponowałaby doktorantka w celu poszerzenia swoich badań?

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji chciałbym stwierdzić, iż mimo moich uwag, bardzo wysoko oceniam przestawioną pracę doktorską Pani mgr Anny Marii Grzesiakowskiej oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim, ponieważ udowodniła, że samodzielnie potrafi rozwiązywać sformułowany problem naukowy poprzez odpowiednio zaplanowane eksperymenty, ich interpretację, krytyczną dyskusję oraz wyważone wnioski. W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego o dopuszczenie Pani mgr Anny Marii Grzesiakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rzeszów, 14/02/2022 Dr hab. Maciej Wnuk, prof. UR