

Prof. dr hab. Magdalena Chadzińska
Zakład Immunologii Ewolucyjnej
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Wydział Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego
30-387, Kraków, Gronostajowa 9
Tel. 0126645068, email: magdalena.chadzinska@uj.edu.pl

Kraków, 28.06. 2024

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kingi Surmiak-Stalmach pt. „Ocena parametrów komórkowych wybranych narządów oraz fizykochemicznych właściwości przędzy łownej samic pająka *Steatoda grossa* (Theridiidae) w aspekcie krótko- i długoterminowej ekspozycji na nanocząstki srebra”.

Rozprawa doktorska mgr Kingi Surmiak-Stalmach jest bardzo obszernym i ciekawym opracowaniem z zakresu ekotoksykologii pająków i znacząco poszerza tematykę badawczą od lat rozwijaną w zespole kierowanym przez Profesor Grażynę Wilczek, która jest promotorką obecnej rozprawy.

Celem pracy było zbadanie jak subletalne stężenia srebra podawanego w postaci AgNO₃ oraz w formie nanometrycznej (nanosrebro w osnowie poliwinylpirolidonu (PVP–AgNPs) i nanosrebro koloidalne (AgNPs)) wpływają na gruczoły przędne, gruczoły jelita środkowego i hemolimfę pająków *Steatoda grossa* oraz na skład i właściwości fizykochemiczne ich przędzy łownej.

Na wstępie należy podkreślić, że podjęcie badań tego typu jest szczególnie ważne z uwagi na wzrost zastosowania nanosrebra w produktach, takich jak bandaże, opatrunki, odzież sportowa czy tekstylia medyczne, a także w maściach i kosmetykach. Nanosrebro jest także na coraz większą skalę stosowane w filtrach wody i powietrza oraz w opakowaniach żywności. Większość tych zastosowań związana jest antybakteryjnymi właściwościami nanosrebra. Pamiętać jednak należy, na co zwraca uwagę w swojej pracy Doktorantka, że pomimo licznych zastosowań, istnieje również potrzeba monitorowania potencjalnych skutków ubocznych związanych z nanosrebrem, takich jak jego negatywny wpływ na środowisko naturalne oraz zdrowie zwierząt i ludzi.

Praca ma tradycyjną formę i składa się ze wstępu (23 strony), opisanych na 2 stronach celi pracy i hipotez badawczych, 20-stronnicowego, bardzo przejrzystego i opatrzonego licznymi schematami, rycinami i tabelami, rozdziału Materiały i metody, bogato ilustrowanego rozdziału wyniki oraz z 18-stronnicowej dyskusji. Pracę, liczącą 164 stron, zamyka spis literatury zawierający 336 pozycji oraz aneks zbierający szczegółowe dane statystyczne.

Wstęp, cele pracy i hipotezy badawcze:

Wstęp pracy bardzo dobrze wprowadza czytelnika w zagadnienia zastosowania i toksyczności srebra jonowego i nanosrebra oraz w tematykę użycia pająków jako zwierząt modelowych w badaniach ekotoksykologicznych. Wskazuje również na bogatą wiedzę Autorki i jej swobodne poruszanie się w tematach szeroko pojętej ekotoksykologii.

Do tej części pracy wkradły się drobne błędy lub nieścisłości, które przytaczam z obowiązku recenzenta:

- 1) Strona 14 – przy informacji, że nanosrebro przyczynia się do jakościowych i ilościowych zmian w produkcji białek, oczekiwałabym uszczegółowienia jakich białek i jaki jest kierunek tych zmian. Podobnie rzecz się ma w przypadku wpływu nanosrebra na wzrost aktywności enzymów. Tutaj również zabrakło mi informacji o jakie enzymy chodzi.
- 2) Strona 20: bardziej adekwatne od użycia słowa receptor (mimo iż zapisane w cudzysłowie) w stosunku do mikroorganizmów wydaje mi się słowo czujnik lub sensor.
- 3) Strona 20: przy stwierdzeniu, że srebro wpływa na geny nitryfikacyjne bakterii powinna się znaleźć informacja czy jest to wpływ na poziom ekspresji, czy też np. na zmiany potranslacyjne.
- 4) Strona 25: przy opisie wpływu srebra na *Caenorhabditis elegans* brakuje informacji, co kodują wymienione geny. Poza tym, nazwy genów zgodnie z regułami powinny być w tym wypadku zapisane kursywą.
- 5) Strona 31: przy opisie badań Garcia-Reyero i współpracowników z 2014 brakuje informacji o gatunku ryb, które były badane.

Po wstępie znajdujemy jasno zarysowane cele pracy i bardzo szczegółowe hipotezy badawcze.

Metodyka

Na rozdział „Materiały i metody” składają się podrozdziały opisujące odpowiednio: model badawczy, warunki hodowli pająków, schemat doświadczalny, oraz metody użyte do: (i) pomiaru stężenia srebra w ciałach pająków i będących ich ofiarami much, (ii) oceny parametrów stresu oksydacyjnego, (iii) oceny żywotności komórek, (iv) ilościowej oceny poziomu metalotionein, (v) analizy ultrastruktury komórek i (vi) oceny składu, kalorymetrii i architektury sieci pajęczych. W ostatniej części tego rozdziału Autorka wymienia też testy zastosowane do analiz statystycznych.

Na podkreślenie zasługuje bardzo szeroki panel technik stosowanych przez Doktorantkę, począwszy od analizy stężenia metali w próbkach, poprzez analizy mikroskopowe i

cytometryczne, analizy spektrofotometryczne, luminometryczne i cienkowarstwową chromatografię cieczową, po rentgenowską analizę dyspersji energii i kalorymetrię.

Uwagi i komentarze do rozdziału „materiały i metody”:

- 1) Umieszczona na stronie 43 tabela zestawiająca wszystkie zastosowane techniki i mierzone parametry jest bardzo przydatna, nie wydaje mi się jednak by konieczne było jej powielanie w streszczeniu pracy.
- 2) Zbędny jest również schemat 3.4. pokazujący jak przygotowywano krzywą wzorcową.
- 3) Zawarta na stronie 45 informacja, że fosfatydyloseryna ulega translokacji na powierzchnię komórek późnoapoptotycznych, powinna być skorygowana, bowiem do takiej translokacji dochodzi już w komórkach wczesnoapoptotycznych. W technice, którą posłużyła się Doktorantka do oznaczania żywotności/apoptozy, komórki późnoapoptotyczne związane są z aneksyną V (AnnV+) i chłoną dodatkowo jodek propydydy (PI+), a komórki wczesnoapoptotyczne opisujemy jako AnnV+PI-
- 4) Nie bardzo podoba mi się tytuł 1 kolumny tabeli 3.3. – „los komórek”
- 5) Bardziej logiczne byłoby umieszczenie informacji o metodzie pomiaru całkowitego stężenia białka w próbkach przed rozdziałem opisującym sposób oznaczenia metalotionein, bo rozumiem, że w tym wypadku we wszystkich próbkach najpierw znormalizowano to stężenie a dopiero potem wykonano test ELISA. W przypadku opisu tego ostatniego przy informacji o pierwszym płukaniu płytki niepotrzebnie znalazło się słowo „przeciwciał”, odpłukaniu ulegały bowiem niezwiązane antygeny.
- 6) Proponowałabym zwiększenie czcionki na rycinie 3.3.
- 7) Dość zagadkowa była dla mnie logika numerowania rycin w całej pracy, bo dlaczego po rycinie 1, nagle pojawia się rycina 3.1 a potem fotografia 3.1. Chyba prostsze byłoby sukcesywne numerowanie rycin.

Wyniki

W rozdziale 4 Doktorantka szczegółowo i bardzo jasno opisuje uzyskane wyniki, które zobrazowane są w postaci 36 wykresów, 8 tablic ze zdjęciami (w większości przypadków złożonych) oraz 4 tabel.

Za najważniejsze wyniki uzyskane przez Doktorantkę uważam te pokazujące, że spożycie przez pająki pokarmu zawierającego związkami srebra zwiększa, we wszystkich badanych pod tym kątem organach/tkankach, produkcję wolnych rodników tlenowych i że reakcja ta zależna jest od czasu ekspozycji na metal tzn. występuje u osobników narażonych na

pokarm zawierający wyższe stężenia Ag przez 1 i 3 miesiące i od formy Ag, jaka znajdowała się w pokarmie. W tym ostatnim przypadku stwierdzono bowiem, że AgNO_3 w większym stopniu pobudzało stres oksydacyjny, niż zastosowane formy nanocząstek srebra.

Uważam, że to właśnie te wyniki powinny się w rozdziale 4 pojawić jako pierwsze, można bowiem z dużą dozą prawdopodobieństwa założyć, że to właśnie wywołana przez cząsteczki srebra produkcja ROS powoduje zmiany w potencjale antyoksydacyjnym oraz nasila apoptozę i nekrozę komórek oraz ich autofagię. Pracę na pewno wzbogaciłoby zweryfikowanie czy tak jest w rzeczywistości.

Bardzo ciekawa jest również obserwacja, że największe zmiany pod wpływem Ag w poziomie mierzonych parametrów odnotowano w komórkach gruczołu jelita środkowego, co może potwierdzać rolę tego organu w procesach detoksykacyjnych. Chciałabym się dowiedzieć czy w tym kontekście możliwe byłoby oznaczenie stężenia srebra w poszczególnych badanych narządach/tkankach, a nie tylko w całych pająkach?

Interesujący jest także fakt, że suplementacja pokarmu wybranymi formami srebra skutkowałą zmniejszeniem średnicy włókien jedwabiu oraz kaloryczności sieci pajęczych. Autorka próbuje to tłumaczyć zjawiskiem trade-off, które zakłada, że w warunkach ekspozycji na metal pająki inwestowały więcej energii na kosztowne energetycznie reakcje detoksykacyjne, a działa się to kosztem produkcji włókien jedwabnych.

Dodatkowe uwagi/pytania do rozdziału „Wyniki”:

W moim przekonaniu, analizę wyników ułatwiłoby połączenie rycin obrazujących wpływ srebra na procent komórek, wczesno- i późnoapoptotycznych i nekrotycznych na 1 wspólnej złożonej rycinie (czyli połączenie ze sobą rycin 4.7, 4.8 i 4.9, a także 4.10 z 4.11 i 4.12, oraz 4.13 z 4.14 i 4.15). Wyniki te uzyskiwane są podczas 1 wspólnej analizy i oznaczane jako % komórek, a zatem uzasadnione jest ich połączenie.

Dlaczego nie wykonano analiz ultrastruktury jelita środkowego?

Dyskusja

W dyskusji znajdujemy wyczerpujące i rzeczowe omówienie otrzymanych wyników na tle dostępnej literatury. Sposób poprowadzenia dyskusji świadczy o dojrzałości naukowej Autorki.

W interpretacji wyników Doktorantka odnosi się zarówno do badań wykonanych na różnych gatunkach bezkręgowców, jak i kręgowców np. ryb, co podnosi wartość poznawczą opracowania. Może warto rozważyć napisanie na podstawie wstępu i dyskusji pracy przeglądowej. Dyskusję kończy lista 9 obszernych i logicznych wniosków.

Strona edytorska pracy

Praca jest starannie edytowana ale zapewne z uwagi na jej duży rozmiar wkradły się do niej pewne błędy literowe, stylistyczne i interpunkcyjne a także niezręczności językowe. Na przykład:

- strona 14 – niestylistyczne sformułowanie „Dzięki skutecznym właściwościom przeciwko bakteriom, grzybom i wirusom...” – chodziło pewnie o właściwości bakterio- i grzybobójcze oraz przeciwwirusowe.
- strona 19 – w sformułowaniu „....OEL dla AgNPs w przypadku synchronicznej ekspozycji drogą wziewną powinien wynosić 0.19 ug/ml”, powinno chyba być „nie powinien przekraczać wartości 0.19 ug/ml”
- strona 112 – sformułowanie „...wykazano również płciowe różnice..” brzmiało by pewnie lepiej jako „...wykazano również różnice zależne od płci..”

Zwracam także uwagę na wprowadzone jakiś czas temu zmiany zasad pisowni „nie” z imiesłowami bowiem nie zawsze zapisy znajdujące się w pracy podlegały tym regułom.

Na koniec chciałam zaznaczyć, że bardzo doceniam ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę, zdaję sobie bowiem sprawę, że badania prowadzone na tak nietypowym modelu badawczym jakim są pająki, są trudne i czasochłonne.

Wnioski końcowe

Rozprawę doktorską Pani mgr Kingi Surmiak-Stalmach oceniam bardzo wysoko, a moje krytyczne uwagi w niczym nie umniejszają tej dobrej oceny. W związku z tym stwierdzam, że rozprawa ta spełnia warunki określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 poz. 742 ze zm.) – art. 187 i zwracam się do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani magister Kingi Surmiak-Stalmach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie mając na uwadze bardzo szeroki wachlarz nowoczesnych technik badawczych zastosowanych przez Doktorantkę oraz nowatorstwo i oryginalność uzyskanych przez nią wyników wnioskuje o wyróżnienie pracy.

Z poważaniem,