

## Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Anny Ostróżki pt.: „Analiza zmian w strukturze i ultrastrukturze komórek nabłonka jelita środkowego słodkowodnej krewetki, *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) wywołanych obecnością niklu w środowisku życia” wykonanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Magdaleny Rost-Roszkowskiej**

Nikiel jest metalem powszechnie występującym w środowisku naturalnym. Zaliczany do mikroelementów odgrywających wiele ważnych funkcji w organizmach zarówno zwierząt jak i człowieka, m. in. jako składnik enzymów, ważny w przemianie białek, węglowodanów i tłuszczu. Jednocześnie powszechnie wiadomo, że jest pierwiastkiem alergennym a niektóre związki niklu wykazują działanie rakotwórcze. Do środowiska może uwolnić się ze źródeł naturalnych oraz wskutek działalności człowieka. Nikiel łatwo akumuluje się w roślinach i zwierzętach dlatego ważne jest monitorowanie jego zawartości w organizmach modelowych. Ponadto, istotnym problemem jest ocena wpływu podwyższonych zawartości niklu na funkcjonowanie organizmów oraz możliwości ich ewentualnego samooczyszczania. Spośród organizmów wodnych dobrymi modelami są skorupiaki, m.in. krewetki, które w dodatku mają znaczenie hodowlane. Takim gatunkiem jest, wybrana jako model w przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej *Neocaridina davidi*, słodkowodna krewetka pochodząca z Azji, hodowana powszechnie w wielu odmianach barwnych jako gatunek ozdobny. Jako tkankę badawczą wybrano nabłonek jelita środkowego, który jak słusznie podkreśliła pani mgr Anna Ostróżka, jest odpowiedzialny za kontakt ze środowiskiem zewnętrznym i w związku z tym pełni funkcję bariery pomiędzy środowiskiem zewnętrznym a ciałem zwierzęcia.

W mojej opinii tematyka pracy ocenianej rozprawy doktorskiej traktująca o zmianach w nabłonku jelita środkowego krewetki wywołanych obecnością niklu bardzo dobrze wpisuje się w nurt współczesnych badań dotyczących wpływu metali ciężkich na wybrane narządy różnych gatunków zwierząt, które z powodzeniem prowadzone są przez zespół Pani prof. Magdaleny Rost-Roszkowskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawarta została na 139 stronach (tzw. część pierwsza pracy). Część druga obejmująca 42 strony zawiera 36 rycin, w tym schemat eksperymentu, 20 rycin obejmujących fotografie ultrastruktury i histochemii oraz 15 rycin

z tabelami. Przyjęty układ pracy nie jest łatwy dla czytającego ponieważ zmusza do ciągłego wertowania stron w poszukiwaniu tabeli czy ryciny. Zdecydowanie byłoby lepiej gdyby praca stanowiła jedność tekstowo-graficzną!

Rozprawa doktorska mgr Anny Ostróżki ma układ właściwy pracom naukowym i zawiera rozdziały takie jak: wstęp, cele i hipotezy badawcze, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz literaturę.

Pracę doktorską rozpoczyna *Wstęp*, składający się z trzech podrozdziałów, w którym Autorka wyjaśnia dlaczego jako model do swoich badań wybrała jelito środkowe krewetki i nikiel jako metal ciężki. Dokładnie opisuje budowę i rolę jelita środkowego skorupiaków, ze szczególnym uwzględnieniem *N. davidi* podsumowując i zestawiając najistotniejsze informacje w bardzo użytecznych Tabelach 1 i 2. W ostatnim podrozdziale *Wstępu* dowiadujemy się o znaczeniu biologicznym i toksykologicznym niklu. *Wstęp* napisany jest w sposób jasny, zrozumiały i zwięzły językiem. Zdziwiło mnie jednak brak we *Wstępie* chociażby krótkiej informacji o badanym gatunku - krewetce *N. davidi*, jej występowaniu, biologii, cechach charakterystycznych. Informacje te zostały zawarte dopiero w rozdziale 3. *Materiały i Metody*, w podrozdziale 3.1.1. Charakterystyka biologii *Neocaridina davidi*. W mojej opinii informacje o biologii badanego gatunku powinny znaleźć się w rozdziale *Wstęp*, co znacznie ułatwiłoby przyswojenie dokładnych informacji o budowie poszczególnych komórek jelita środkowego. Tym bardziej, że informacje dotyczące dokładnego opisu budowy i funkcji komórek budujących jelito środkowe *N. davidi* pojawiają się także w Dyskusji (podrozdział 5.2. Budowa jelita środkowego u skorupiaków) i w dużym stopniu są powtórzeniem ze *Wstępu*.

Cele pracy zawarte zostały jako cel ogólny obejmujący cyt.: „opisanie zmian w komórkach nabłonka jelita oraz wątrobotrzustki słodkowodnej krewetki *Neocaridina davidi* (Crustacea, Malacostraca) powstałych w wyniku ekspozycji zwierząt na nikiel, a także przeanalizowanie zmian regeneracyjnych, które mogą pojawić się na skutek ponownego hodowania zwierząt w wodzie czystej po wcześniejszej ekspozycji na metal” oraz sześć, w mojej opinii nadmiernie rozbudowanych celów szczegółowych. Cel szczegółowy numer 3 wymaga doprecyzowania jakie „zmiany w mitochondriach” Autorka miała na myśli - domyślam się, że chodziło o analizę aktywnych i nieaktywnych mitochondriów. Ponadto, w treści celu 5. czytamy cyt.: „zanalizowanie [...] zmian mitochondrialnych”, co wymaga doprecyzowania o jakie zmiany chodzi?

Doktorantka postawiła sobie za cel zweryfikowanie sześciu hipotez badawczych, które określiła jako hipotezy zerowe i alternatywne; myślę, że jest to już zapomniana sztuka stawiania hipotez i uważam, że zasługuje na podkreślenie.

W rozdziale *Materiały i Metody* Autorka opisała sposób pozyskania krewetki, warunki jej hodowli, biologię gatunku i przebieg eksperymentu. Eksperyment polegał na hodowli, przez tydzień lub dwa, krewetki *N. davidi* w wodzie z dodatkiem niklu, w stężeniu określonym eksperymentalnie. Kolejne dwa warianty eksperymentalne polegały na hodowli krewetek (tydzień lub dwa) w wodzie z dodatkiem niklu a następnie hodowli w takim samym okresie w wodzie czystej. W ten sposób otrzymano sześć grup eksperymentalnych i grupę kontrolną. Opis eksperymentu jest prosty i jasny. nie budzi wątpliwości zastosowana dawka niklu, czas przetrzymywania zwierząt w wodzie z dodatkiem niklu i bez. W dalszej części tego rozdziału Doktorantka opisała metody użyte do określenia wpływu niklu na zmiany w jelicie środkowym krewetki. W Tabeli 4 w sposób bardzo czytelny zaprezentowała liczbę badanych osobników w każdej metodzie. Następnie, zwięźle ale z uwzględnieniem wszystkich etapów pozwalających na zrozumienie i powtórzenie przeprowadzonych badań opisała zastosowane metody mikroskopowe, histochemiczne i molekularne dzieląc je na metody jakościowe i ilościowe. Z opisu zastosowanych metod wynika, że Autorka rozumie je doskonale i umiejętnie się nimi posługuje. W odniesieniu do opisu zastosowanych metod mam jednak kilka pytań, których odpowiedzi pozwoliłyby na pełne zrozumienie wszystkich szczegółów: 1. Z którego fragmentu jelita wykonano skrawki półcienkie i czy, zdaniem Autorki, wybrany fragment mógł mieć wpływ na uzyskane wyniki? 2. Ile preparatów wykonano z każdego osobnika? 3. Ile powtórzeń wykonano w odniesieniu do każdej metody ilościowej? Poza tym, w opisie metody w podrozdziale 3.3.5.6 Muse Cell Cycle Kit wkraść się błąd ponieważ opis ten dotyczył zapewne analizy cyklu komórkowego a nie analizy aktywnych i nieaktywnych mitochondriów (strona 31 maszynopisu).

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały bardzo starannie udokumentowane i zaprezentowane na dobrej jakości rycinach, szczególnie elektronogramach przedstawiających zmiany w ultrastrukturze nabłonka jelita. Na początku rozdziału *Wyniki* podano zawartości niklu w ciele *N. davidi*. Proszę o wyjaśnienie, co oznacza określenie „Oznaczenie I, Oznaczenie II i Oznaczenie III” w tabeli 5?; w opisie metody nie podano liczby dokonanych oznaczeń oraz czy każdorazowo wykonano pomiar na 15 osobnikach? Rozumiem, że wyników dotyczących zawartości niklu w ciele nie poddano analizie statystycznej, dlaczego? Ułatwiłoby to opis i interpretację.

W dalszej części *Wyników*, w oparciu o bardzo dobrej jakości elektronogramy Doktorantka dokładnie charakteryzuje zmiany w ultrastrukturze komórek jelita *N. davidi* wywołane obecnością niklu w wodzie, a następnie zmiany, które zaszły po przeniesieniu zwierząt do czystej wody. Następnie, dokładnie analizuje uzyskane wyniki ilościowe zobrazowane licznymi dobrze je dokumentującymi i opisanymi wykresami.

W mojej opinii, wszystkie uzyskane przez Panią mgr Annę Ostrózkę wyniki są merytorycznie bardzo ważne. Za szczególnie interesujące uważam te, które dotyczą aktywacji procesów degeneracyjnych, w tym autofagii, apoptozy i nekrozy. Dane te są bardzo nowatorskie, przedstawione bardzo szeroko i wnikliwie, zarówno w postaci rycin uzyskanych przy pomocy mikroskopii elektronowej, fluorescencyjnej, jak i tabel oraz wykresów, w których pokazano wyniki przeprowadzonych analiz statystycznych. Doceniam ogrom włożonej pracy aby uzyskać takie dane przy zastosowaniu technik mikroskopowych i laboratoryjnych. Dzięki tej żmudnej pracy Autorka wykazała m. in., że dominujący udział w degeneracji nabłonków miała nekroza a zmiany te były intensywniejsze w jelicie, co najprawdopodobniej związane jest z funkcją detoksykacyjną wątrobotrzustki.

Ogólnie, rozdział *Wyniki* opisany jest dość sprawnie i klarownie. Mam jednak kilka uwag, które, być może ułatwią pracę nad przygotowaniem tekstu pracy do druku. Pierwsza uwaga, dotyczy różnych określeń używanych przez Autorkę w odniesieniu do przywrócenia krewetek do czystej wody (takie określenie jest w opisie eksperymentu, w *MM*). W *Wynikach* i w *Dyskusji* tę samą czynność Autorka nazywa: „przywróceniem zwierząt do środowiska nieskażonego” lub „oczyszczaniem” (na przykład w opisach rycin przedstawiających wykresy). Użycie słowa „oczyszczanie” może mylnie sugerować zastosowanie środków oczyszczających, usuwających nikiel z wody lub z ciała zwierząt. Ponadto, w całej pracy Doktorantka często nie stosuje zasady, że liczby od 1 do 9, lepiej napisać słownie i jeśli trzeba należy odmienić przez przypadki, np. zamiast „po okresach 1 oraz 2 tygodniu” (strona 52), powinniśmy zapisać: po jednym oraz dwóch tygodniach, co ułatwia czytanie i rozumienie tekstu.

Z ogólnych uwag, dotyczących treści całej rozprawy doktorskiej mam jeszcze jedną: przed nazwą łacińską gatunku należy podać nazwę polską jeśli takowa istnieje; czasami podawano błędną lub nie podawano wcale dla znanych w Polsce gatunków, np. racicznica zmienna *Dreissena polymorpha* (strona 50; poza tym jest to gatunek zarówno słodkowodny jak i morski a nie tylko słodkowodny), krab wełnistoszczypcy *Eriocheir sinensis* (strona 95), rak błotny to *Pontastacus (Astacus) leptodactylus* a nie *Scylla serrata* czyli krab błotny (strona 68), rak luizjański *Procambarus clarkii* (strona 54); błędne jest określenie „skorupiaki z rodziny *Balanus improvisus*” (strona 7), bo to jest nazwa gatunku, nie rodziny.

W wynikach nie znalazłam danych dotyczących przeżywalności krewetek podczas przeprowadzonych eksperymentów, proszę Doktorantkę o wyjaśnienie ile osobników przeżyło poszczególne etapy eksperymentu.

Rozdział *Dyskusja*, obejmuje aż 50 (!) stron tekstu. Jest bardzo długa i w wielu miejscach „przegadana”. Podkreślam jednak, że tak długi tekst wynagradza jego treść merytoryczna. Zawiera, bardzo dokładne i wnikliwe wyjaśnienia wszystkich uzyskanych wyników i ich umiejętne przedyskutowanie. Pani mgr Anna Ostróżka wykazała się umiejętnością krytycznej oceny uzyskanych wyników na tle dostępnego, dobrze Jej znanego specjalistycznego piśmiennictwa. Z dużą dojrzałością naukową bardzo wnikliwie przeanalizowała otrzymane wyniki, łącząc je w logiczną całość opisywanych procesów, np. apoptozy, autofagii i nekrozy. Dyskusja poprowadzona jest w bardzo logiczny sposób, od dokładnego wytłumaczenia zastosowanej w badaniu dawki niklu i długości trwania eksperymentu, przez opisanie dokładnej budowy jelita skorupiaków, następnie charakterystykę zmian degeneracyjnych powstałych w nabłonku jelita pod wpływem niklu zarówno na poziomie histologicznym, ultrastrukturalnym i histochemicznym jak również zmian aktywujących procesy śmierci komórkowej, w tym wzrost poziomu reaktywnych form tlenu, które połączono z analizą aktywności mitochondrialnej w komórkach nabłonka jelita. Ten logiczny ciąg myślowy zastosowała Autorka również do wyjaśnienia zmian w jelicie i wątrobotrzustce po przywróceniu *N. davidi* do czystej wody.

Po zapoznaniu się z treścią *Dyskusji* mam kilka pytań, które wynikają z zainteresowania tematem. Czy badano (w ramach innych prac) albo zaplanowano badania wpływu niklu na inne narządy, np. gonady lub na inne procesy życiowe, np. rozmnażanie? Czy nikiel użyty w badaniach wpływał na wielkość narządów? Na ile uzyskane przez Autorkę wyniki można wykorzystać w hodowli krewetek, które jak wiadomo, bardzo często prowadzi się w obecności metali ciężkich, które kumulują się w ciele tych zwierząt?

Po *Dyskusji* Autorka umieściła, krótki rozdział *Podsumowanie*, który jasno i zwięźle opisuje i wyjaśnia przebieg i rolę zachodzących w jelicie krewetki procesów wywołanych skażeniem środowiska niklem oraz po przywróceniu do wody czystej. Do rozdziału tego Doktorantka dołączyła dwie tabele (Tab. 7 i 8), które doskonale obrazują wszystkie analizowane parametry, zarówno jakościowe, jak i ilościowe.

Uzyskane przez mgr Annę Ostróżkę wyniki badań przedyskutowane z danymi dostępnymi w pracach innych autorów pozwoliły na sformułowanie siedmiu wniosków. Uważam, że są one ważnymi osiągnięciami Doktorantki, stanowiącymi Jej oryginalny wkład w nauki biologiczne w zakresie wpływu metali ciężkich - na przykładzie niklu, na budowę



i procesy zachodzące w przewodach pokarmowych (jelicie środkowym) bezkręgowców wodnych, na przykładzie krewetki *N. davidi*.

W pracy umiejętnie wykorzystano 322 (!) pozycje specjalistycznego piśmiennictwa, w zdecydowanej większości anglojęzycznego, aktualnego, w większości opublikowanego w ostatnich latach.

Podsumowując, do najważniejszych naukowych osiągnięć Doktorantki można zaliczyć:

- szczegółowe opisanie zmian ultrastrukturalnych w nabłonku jelita i wątrobotrzustki wywołanych obecnością niklu w środowisku,
- wykazanie, że obecność niklu w wodzie wpływa na aktywację procesów autofagii, apoptozy i nekrozy,
- udowodnienie, że przywrócenie hodowli słodkowodnej krewetki do wody czystej po uprzedniej ekspozycji na nikiel wpływa na procesy regeneracyjne w jelicie i wątrobotrzustce,
- wykazanie, że obecność niklu w środowisku życia krewetek wpływa na aktywację gromadzenia reaktywnych form tlenu, zmiany struktury i funkcji mitochondriów oraz zatrzymanie cyklu komórkowego.

Po zapoznaniu się z treścią rozprawy doktorskiej jestem przekonana, że zawiera ona oryginalne rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego wpływu niklu na zmiany w budowie jelita środkowego słodkowodnej krewetki *N. davidi*, a Pani mgr Anna Ostróżka jest naukowcem zdolnym do samodzielnego planowania i prowadzenia badań, a także prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników. Posiada wiedzę i umiejętności niezbędne do uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych. Chciałabym podkreślić, że wskazane w recenzji uwagi mogą być przydatne przy przygotowywaniu pracy do druku i nie mają wpływu na wysoką merytoryczną wartość ocenianej pracy doktorskiej.

**Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023, poz. 742 ze zm.). Na tej podstawie składam wniosek do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydziału Nauk Przyrodniczych, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr Anny Ostróżki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Donata Juchno