Prof. dr hab. inż. Jan Miciński
Katedra Hodowli Owiec i Kóz
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Olsztyn, 17.01.2022r.

RECENZJA
Rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Kalińskiej-Łukasiewicz
pt. „Wykorzystanie nanocząsteczek srebra i miedzi w zwalczaniu patogenów wywołujących mastitis u krów mlecznych"

Recenzję pracy doktorskiej sporządziłem zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie z dnia 16 października 2018r. oraz pismem INZ-121/2021 z dnia 23.12.2021r. otrzymanym od Dyrektora Instytutu Nauk o Zwierzętach dr hab. Marcina Gołębiewskiego, prof. SGGW wraz z egzemplarzem pracy doktorskiej, stanowiącej zbiór 3 publikacji naukowych.

1. Formalna ocena pracy

Przedłożona mi do oceny praca doktorska została wykonana w Katedrze Hodowli Zwierząt Instytutu Nauk o Zwierzętach SGGW w Warszawie pod promotorstwem dr hab. Marcina Gołębiewskiego. Praca spełnia wymagania postawione tego typu pracom naukowym w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie zootechnika i rybactwo. Zajmuje 112 stron maszynopisu. Autorka treść pracy przedstawiła w 6 rozdziałach z podrozdziałami, tj.: „Wstęp" (4 strony), „Hipotezy badawcze, cel i zakres pracy" (2 strony), „Materiał i metody" (9 stron), „Omówienie głównych wyników prac eksperymentalnych" (3 strony), „Wnioski" (1 strona) i „Bibliografia" (5 stron). Wstęp poprzedza: strona tytułowa, oświadczenia: promotora i autora pracy, Streszczenia: w języku polskim i angielskim, spis treści, wykaz 3 publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej oraz wykaz stosowanych skrótów. W dalszej części pracy znajduje się 38 stron kopii 3 opublikowanych prac naukowych stanowiących podstawę naukową dysertacji. Oświadczenia współautorów tychże publikacji zajmują 13 stron. Dysertację zamyka autoreferat zajmujący 16 stron. Na uwagę zasługuje Bibliografia, która w swoim spisie zawiera 58 pozycji, w tym prawie wszystkie (52 pozycje) stanowią prace naukowe zamieszczone na światowych listach, takich jak: JCR, Web of Science czy Scopus. Na uwagę zasługuje sposób zapisu literatury w spisie, tj. według kolejności cytowania w pracy, który jest popularny w wielu światowych redakcjach. Należy zaznaczyć, że praca jest czytelna, koncepcja przemyślana, materiał przedstawiony w oparciu o najnowsze piśmiennictwo naukowe dotyczące tematu rozprawy a kolejność poszczególnych rozdziałów jak i podrozdziałów jest właściwa.

Podstawą recenzowanej rozprawy doktorskiej są trzy artykuły naukowe, opublikowane w 2018, 2019 i 2020 roku w renomowanych i wysoko indeksowanych czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej, tj. *International Journal of Molecular Sciences* (IF = 4,556 i 140 pkt na liście MNiSW); *Animals* (IF = 2,752 i 100 pkt na liście MNiSW) oraz *Animal Science Papers & Reports* (IF = 0,697 i 40 pkt na liście MNiSW). Pragnę tu dodać, że obecnie według nowej punktacji MNiSW z dnia 1.12.2021r. prace wydawane w czasopiśmie Animal Science Papers & Reports uzyskują 100 pkt, natomiast IF tego czasopisma wynosi 1,078, co przemawia na korzyść Doktorantki. Zatem łączny Impact Factor, na dzień opublikowania wskazanych artykułów wynosi 8,005, a liczba punktów MNiSW 280. Dobór publikacji jest właściwy, tematycznie i merytorycznie związany z tematem dysertacji doktorskiej i nie budzi zastrzeżeń. W dwóch publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w kolejnej jest jako druga. Wszyscy współautorzy wydali oświadczenia, w których wskazali, że ma Ona wiodący udział w planowaniu, realizacji badań, wykonywaniu analiz laboratoryjnych, analiz danych i przygotowaniu prac do opublikowania. Potwierdzają to złożone oświadczenia, w których wskazują Jej udział w przedstawionych publikacjach odpowiednio: 60%, 45% i 60%. W jednej z tych prac Doktorantka pełniła obowiązki autora korespondencyjnego.

Do zbioru publikacji naukowych wchodzących w skład dysertacji doktorskiej należą:

1. Kalińska A., Wójcik A., Slósarz J., Kruzińska B., Michalczuk M., Jaworski S., Wierzbicki M., Gołębiewski M. 2018. Occurrence and actiology of staphylococcsl mastitis - a review". Animal Science Papers & Reports. (36(3); 263-273.
2. Puppel K., Kalińska A., Kot M., Slósarz J., Kunowska-Slósarz M., Grodkowski M., Kuczyńska B., Solarczyk P., Przysucha T., Gołębiewski M. 2020. The effect of Staphylococcus spp. and Enterobacteriaceae on the development of whey protein levels and oxidative stress markers in cows with diagnosed mastitis. Animals. 10(9); 1591. https://doi.org/10.3390/ani10091591.
3. Kalińska A., Jaworski S., Wierzbicki M., Gołębiewski M. 2019. Silver and copper nanoparticles - an alternative in future mastitis treatment and prevention. International Journal of Molecular Sciences. 20(7); 1672. https://doi.org/10.3390/ijms20071672.

2. Ocena merytoryczna pracy

Wiodącym tematem publikacji, przedstawionych jako rozprawa doktorska, jest doskonalenie profilaktyki i leczenia w zwalczaniu patogenów wywołujących mastitis u krów mlecznych poprzez analizę poziomu białka serwatkowego i markerów stresu oksydacyjnego a

także poprzez wykorzystanie nanocząsteczek srebra i miedzi. Moim zdaniem jest to bardzo trafne ujęcie tematyczne, biorąc pod uwagę znaczenie gospodarcze problemu masitis i przydatności takich badań w praktyce zootechnicznej. Doktorantka oraz zespoły badawcze podjęli się ważnego tematu, z punktu widzenia zdrowotności wymienia krów mlecznych, gdyż jak wiadomo od dawien dawna, mastitis zostało uznane jako choroba zawodowa krów. Poszukiwanie markerów zapalenia wymienia oraz alternatywnych substancji w zwalczaniu mastitis może być dobrą drogą do poprawy dobrostanu zwierząt, zmniejszenia poziomu brakowania krów, polepszenia jakości technologicznej mleka oraz zwiększenia opłacalności produkcji mleka.

Cel podjętych badań został jasno i precyzyjnie podany i dotyczył określenia wpływu:

- *Staphylococcus spp., Streptococcus spp.*, i *Enterobacteriaceae* na sekrecję bioaktywnych białek serwatkowych i kształtowanie się poziomu markerów stresu oksydacyjnego w mleku krów,
- toksyczności dostępnych na rynku NPs i wpływu wytworzonego na ich podstawie kompleksu na linie komórkowe ludzkie i bydlęce gruczołu mlekowego oraz na przeżywalność patogenów odpowiedzialnych za zapalenia wymienia, np. *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans*.

W pierwszej z prac (Kalińska i in. 2018) autorzy podjęli próbę analizy głównych przyczyn częstotliwości występowania zapalenia wymienia ze szczególnym uwzględnieniem zapaleń wywołanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus spp*., w tym *Staphylococcus aureus*, (gronkowca złocistego), który według najnowszej literatury jest jedną z najczęstszych przyczyn mastitis w stadach bydła mlecznego. Jednak chciałbym tu nadmienić, że w tej części przeglądu literatury jaki został przedstawiony w dysertacji, pewien niedosyt sprawia wyjaśnienie wpływu odpowiedniego poziomu zarządzania stadem, który, jak podkreśla Doktorantka, ma także kluczowe znaczenie dla profilaktyki zapalenia wymienia u krów.

W drugiej pracy (Puppel i in. 2020), wykonano doświadczenie, którego celem było określenie wpływu *Staphylococcus spp. Streptococcus spp*., i *Enterobacteriaceae* na sekrecję bioaktywnych białek serwatkowych i markerów stresu oksydacyjnego. Chciałbym tu zauważyć i podkreślić, że metody badawcze zastosowane przez autorów zostały gruntownie przemyślane, o czym świadczy ich wysoki standard, materiał dobrze dobrany, a analizy wykonane na nowoczesnej aparaturze badawczej, co pozwoliło na uzyskanie precyzyjnych wyników. W analizach statystycznych posłużono się najnowszym oprogramowaniem. W doświadczeniu I wykorzystano program SPSS 23, dzięki któremu otrzymane dane przetworzono statystycznie z zastosowaniem procedury GLM z utrwalonymi efektami LKS i badanych szczepów

bakteryjnych. Liczbę bakterii oznaczoną w próbkach podano w pracy jako log CFU/ml mleka, czyli jako liczbę jednostek tworzących kolonie w 1 ml mleka. Do analizy post hoc wykonano test Duncana. Natomiast w doświadczeniach II i III wyniki testów zostały opracowane statystycznie z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA za pomocą programu StatGraphics Centurion 17.2.05. Różnice między grupami analizowane były z użyciem testu Duncana. Wyniki zostały wyrażone jako wartości średnie z uwzględnieniem odchyleń standardowych. Za istotne statystycznie uznano różnice z wartością $p \leq 0,05$.

Działania zawarte w tych doświadczeniach wskazują na interesujące i nowatorskie badania, które znajdą swoje zastosowanie wśród producentów mleka. Wykonano w tym celu szereg analiz dotyczących:

- składu chemicznego mleka (analizator Milko-Scan FT-120) i liczby komórek somatycznych (LKS) (analizator Somacount 150),
- jakości mikrobiologicznej (analizator BactoScan),
- zawartości di-malonowego aldehydu (MDA) oraz potencjału antyoksydacyjnego (TAS) przy wykorzystaniu testu RANDOX (analizator TecanNanoQuant Infinite M200 Pro),
- zawartości białek serwatkowych (chromatograf cieczowy RP-HPLC Agilent 1100 i kolumna Jupiter C18 300A),
- standardowej analizy mikrobiologicznej przy użyciu analizatora WASP Bentley do kultur automatycznych, których posiew wykonywano na podłożach: Mannitol Salt Lab Agar (*Staphylococcus spp.*); Edwards Lab Agar (*Streptococcus spp*); Chromogenic Uri-Color Lab (*Enterobacteriaceae*).

W badaniach tych wykazano, że zdrowe krowy są predysponowane do wyższego potencjału antyoksydacyjnego, o czym świadczy zawartość w ich mleku LKS < 200 000 komórek/ml. Zakażenia *Enterobacteriaceae* z log CFU > 1,1 wiązały się ze spadkiem potencjału antyoksydacyjnego (TAS) i zwiększeniem zawartości di-malonowego aldehydu (MDA). Wówczas znacząco zwiększa się koncentracja laktoferyny szczególnie w przypadku zakażeń *Escherichia coli* i *Pseudomonas aureginosa.* Ponadto obecność bakterii z rodzaju Staphylococcus spp. istotnie wpłynęła na stężenie β-laktoglobuliny (BLG), która ogranicza rozprzestrzenianie się *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus u*beris. Krowy zakażone bakteriami Gram-ujemnymi miały niższą aktywność lizozymu niż zainfekowane przez bakterie Gram-dodatnie. Natomiast laktoferyna wykazała działanie przeciwbakteryjne wobec bakterii Gram-dodatnich.

W trzeciej pracy (Kalińska i in. 2019), celem badań była ocena potencjału oksydoredukcyjnego komórek gruczołu sutkowego bydła i człowieka poddanych inkubacji w

roztworach z dodatkiem kompleksu AgNPs (nanocząsteczki srebra) i CuNPs (nanocząsteczki miedzi) oraz określenie żywotności wybranych patogenów odpowiedzialnych za wywoływanie zapaleń gruczołu sutkowego u bydła poddanych ekspozycji na AgNPs, (nanocząsteczki srebra) CuNPs (nanocząsteczki miedzi) oraz kompleksu AgCuNPs (nanocząsteczki srebro-miedź). Doktorantka podaje: cytuję „w dalszej części eksperymentu wykorzystano do badań hodowle komórkowe gruczołu sutkowego linii bydlęcej (BME-UV1) i człowieka (HMEC)". Proszę o wyjaśnienie dlaczego włączono tu hodowle komórkowe gruczołu sutkowego człowieka i jak pozyskano hodowle HMEC? Kontynuując, w badaniach tych głównym zadaniem było wykonanie oceny integralności błon komórkowych z wykorzystaniem testu oznaczającego ilość uwalnianej z komórek dehydrogenazy mleczanowej (LDH) przy użyciu odczynnika LDH (*Cytotoxicity Assay Kit, ThermoFisher Scientific*), ocena potencjału oksydoredukcyjnego komórek gruczołu sutkowego linii bydlęcej i człowieka oraz określenie żywotności patogenów wywołujących zapalenie wymienia u bydła.

Analizując żywotność nabłonkowych komórek sutkowych bydła (BME-UV1) i człowieka (HMEC) po potraktowaniu je roztworami AgNPs, CuNPs, AgCuNPs wykazano, że NPs nie zmniejszyły aktywności oksydoredukcyjnej komórek, a tym samym nie wykazały działania cytotoksycznego. Uważam, że niezmiernie ważnym wynikiem uzyskanym z przeprowadzenia tych badań, który może znaleźć zastosowanie w praktyce, jest wykazanie, że zastosowanie NPs zmniejszyło żywotność patogenów: *Enterococcus faccalis, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Enterobactercloace, Streptococcus agalactiae* i drożdży *Candida albicans* w każdej grupie. Ważne jest również stwierdzenie, że zastosowane AgNPs, CuNPs oraz ich kompleks AgCuNPs wykazują silne działanie antybakteryjne, antygrzybiczne i jak wskazują niektóre doniesienia literatury antyglonowe, można je stosować przy stężeniu ≥1 ppm. A zatem AgNPS i CuNPs powinny być najskuteczniejszym rozwiązaniem w leczeniu zapalenia wymienia ze względu na ich synergiczny wpływ na różne patogeny.

Przedstawione w pracy w sposób jasny i przejrzysty wyniki Doktorantka poddała dyskusji odnosząc je do najnowszej, tematycznie związanej z dysertacją, literatury naukowej. Słusznie podkreśliła, że nanotechnologia jest obecnie bardzo szybko rozwijającą się dziedziną nauki i techniki ze względu na możliwość wytwarzania nowych materiałów w nanoskali. Nanomateriały charakteryzują się wysokim stosunkiem powierzchni do objętości oraz wyjątkowymi właściwościami chemicznymi i fizycznymi, które sprawiają, że stały się ważnymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi. Nanocząsteczki srebra i miedzi mogą być alternatywą dla tradycyjnych środków przeciwbakteryjnych, takich jak antybiotyki, chociażby z tego względu, że brak jest ryzyka wystąpienia odporności na nie. Nanocząsteczki srebra,

mając właściwości bakteriobójcze, i grzybobójcze uszkadzają błony komórkowe poprzez tworzenie mikrośrodowiska bogatego w jony srebra, denaturację białek, tworzenie reaktywnych form tlenu, zaburzając replikację DNA, ekspresję białek i enzymów w łańcuchu oddechowym, peroksydację lipidów. Czy Doktorantka mogłaby by odnieść się do tego zagadnienia, znajdując może w literaturze wyjaśnienie czy przy stosowaniu nanocząsteczek, które znajdą się w organizmie, ich obecność i działanie nie zagraża innym komórkom organizmu?

Prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych i wcześniej ocenione przez kilku recenzentów, zapewne specjalistów w tej dziedzinie, zatem ponowna ich ocena jest już zbędna. Opublikowanie wyników badań w tak uznanych czasopismach naukowych jest możliwe tylko wówczas, gdy otrzymają one pozytywną ocenę redaktora i recenzentów. A zatem najistotniejsza część rozprawy doktorskiej została już zweryfikowana i oceniona pozytywnie.

Natomiast odnosząc się do części wprowadzająco-przeglądowej rozprawy doktorskiej nie wnoszę żadnych uwag. Rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko, uznaję bardzo duży wkład Doktorantki przy wykonywaniu badań i opracowywaniu wyników prac do opublikowania. Pragnę podkreślić aspekt innowatorski i praktyczny prowadzonych badań i uzyskanych wyników. Praca Pani mgr inż. Aleksandry Kalińskiej-Łukasiewicz wnosi wiele nowych konkluzji z zakresu wykorzystania nanocząsteczek srebra i miedzi w zwalczaniu patogenów wywołujących mastitis, istotnych dla dobrostanu zwierząt i ekonomicznej strony produkcji mleka. Doktorantka w pełni sprostała wymogom stawianym kandydatom ubiegającym się tytuł doktora.

Uwzględniając powyższe pozytywne uwagi dotyczące Doktorantki oraz ocenę jej badań, które mają charakter aplikacyjny ze względu na swoją innowacyjność oraz ukierunkowanie na ich szybkie wdrożenie do praktyki produkcyjnej, wnoszę o wyróżnienie tej pracy nagrodą JM Rektora SGGW w Warszawie.

Wniosek końcowy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandr Kalińskiej-Łukasiewicz pt. „Wykorzystanie nanocząsteczek srebra i miedzi w zwalczaniu patogenów wywołujących mastitis u krów mlecznych" poszerza w znacznej mierze wyniki uzyskane dotychczas w tym zakresie badawczym. Wysoka wartość naukowa pracy stanowi mocną podstawę w procesie ubiegania się Doktorantki o stopień naukowy doktora. W podsumowaniu

stwierdzam, że oceniona przeze mnie rozprawa doktorska spełnia warunki określone a art. 13, ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

