

Lublin, 29.11.2017r.

dr hab. n. med. Lucyna Kapka-Skrzypczak, prof. IMW
Instytut Medycyny Wsi im. W. Chodźki
Z-ca Dyrektora ds. Naukowych
Kierownik Zakładu Biologii Molekularnej i Badań Translacyjnych
ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin
e-mail: kapka.lucyna@imw.lublin.pl

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Magdaleny Kowalskiej

pt. „*Komórkowe i molekularne efekty działania nanocząstek generowanych podczas spalania wybranych biopaliw pierwszej i drugiej generacji w silniku Diesla*”

Niekorzystne zmiany klimatu Ziemi, obawy o przyszłość energetyczną oraz potrzeba ochrony zasobów naturalnych stają się powodem do poszukiwania alternatywnych rozwiązań. Ponadto regulacje i przepisy prawne obligują kraje UE do zmniejszenia emisji zanieczyszczeń do atmosfery, a w związku z tym zwiększenia udziału biodiesla w ogólnym użyciu. Nowoczesne paliwa powinny być konkurencją dla paliw konwencjonalnych oraz charakteryzować się odnawialnością i jednocześnie ograniczać negatywny wpływ na środowisko. Obecnie uważa się, że takie warunki spełniają właśnie biopaliwa. W ogólnym zużyciu energii w Unii Europejskiej największy udział, wynoszący około 40%, mają paliwa transportowe, spośród których 5-6% pochodzi już ze źródeł odnawialnych. Chociaż obecnie używane są w stosunkowo niewielkim stopniu w Europie, Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady UE 2015/1513 z 9 września 2015 roku zakłada stopniowe zwiększanie ich udziału, aż do uzyskania 20% w 2020 roku oraz zastępowanie biopaliw I generacji tymi II generacji.

Coraz większe zapotrzebowanie na paliwo ekologiczne skłania naukowców do oceny skutków jego oddziaływania na zdrowie i życie ludzi, a także środowiska. Wiele badań wskazuje, że dodatek biodiesla do konwencjonalnego paliwa zmniejsza toksyczność emitowanych spalin poprzez obniżenie emisji cząstek stałych, tlenku węgla i węglowodorów, niemniej jednak towarzyszy temu zazwyczaj wzrost emisji NO_x. Chociaż przeprowadzono wiele badań dotyczących regulaminowej emisji ze spalania ciekłych biopaliw i ich mieszanek, wciąż niewielka ich część dotyczy emisji specyficznych toksycznych związków organicznych obecnych w spalinach. Należą do tych związków głównie związki karbonyłowe, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne czy lekkie węglowodory aromatyczne takie jak benzen, etylobenzen, toluen i ksyleny. Toksyczność emitowanych spalin i zmiana w profilu emitowanych zanieczyszczeń przy użyciu paliw odnawialnych jest więc niezwykle ważnym zagadnieniem,

z uwagi na zanieczyszczenie powietrza i w konsekwencji wpływ na zdrowie. Należy podkreślić, iż wg danych WHO co roku z powodu ksenobiotyków obecnych w środowisku umiera ponad 13 milionów ludzi, natomiast aż 24% chorób jest wywołanych ekspozycją środowiskową, którą można wykluczyć lub zminimalizować poprzez podjęcie odpowiednich działań profilaktycznych.

Doniesienia literaturowe wskazują na niekorzystny wpływ biopaliw ze względu na zaburzenia równowagi środowiskowej i zasad zrównoważonego rozwoju. Także właściwości techniczne biodiesla takie jak: duża lepkość podczas przechowywania, szybsze zużycie aparatury wtryskowej silników, powstawanie osadów węglowych, zwiększona emisja NO_x i wpływ na środowisko wodne stawiają te paliwa w niekorzystnym świetle. Udowodniono, że spaliny z silników Diesla stanowią mieszaninę niebezpiecznych związków, które ze względu na skład, w tym zwłaszcza dużą ilość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych i ich nitrowych pochodnych, posiadają właściwości mutagenne i rakotwórcze.

Niestety, nadal nie został dostatecznie zbadany i rozwiązany problem toksyczności nanocząstek generowanych podczas spalania biopaliw. Chociaż ich ilość może być częściowo zredukowana za pomocą filtrów cząstek stałych i katalizatorów, obecnie brak jest wiedzy na temat zależności pomiędzy zawartością i rodzajem biokomponentu w biopaliwie a wielkością, postacią, składem chemicznym i toksycznością cząstek stałych oraz ich potencjalnym zagrożeniem dla zdrowia ludzi i środowiska. Wciąż niewystarczające wyniki badań toksykologicznych pokazują, że nanocząstki mogą oddziaływać na komórki w sposób cytotoksyczny i genotoksyczny, jednak mechanizm ich działania i ewentualne efekty uboczne, zagrażające zdrowiu ludzi nie są do końca poznane. Rozmiar oraz mobilność nanocząstek sprawiają, iż mogą one bez problemu pokonywać bariery w organizmie i odkładać się w mózgu lub innych narządach, prowadząc - prawdopodobnie - do ich uszkodzenia.

Z uwagi na powyższe, problematyka naukowo-badawcza podjęta przez mgr Magdalenę Kowalską, która miała na celu analizę komórkowych i molekularnych efektów działania nanocząstek generowanych podczas spalania wybranych biopaliw I i II generacji przez silnik Diesla, w odniesieniu do ich właściwości fizykochemicznych, wpisuje się ściśle w obszar aktualnych problemów naukowo-badawczych z pogranicza kilku dziedzin nauki.

Na rozprawę doktorską mgr Magdaleny Kowalskiej składa się wstęp (20 str.), opis celów pracy, omówienie materiału i metodyki (27 str.), opis uzyskanych wyników (68 str.), dyskusja (12 str.), wnioski oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Opis pracy jest bardzo szczegółowy, co ułatwia ocenę doboru metod do założonych celów pracy i otrzymanych wyników. Dobór piśmiennictwa jest odpowiedni dla treści pracy. Piśmiennictwo stanowi 172 pozycje spośród których 97 zostało opublikowanych po roku 2010, co świadczy o aktualnym wymiarze naukowo-badawczym przeprowadzonych badań. Do przeglądu piśmiennictwa z zakresu tematyki pracy oraz do dyskusji uzyskanych wyników badań własnych doktorantka wykorzystywała głównie publikacje opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Praca ma charakter badawczy i stanowi spójną całość o typowym układzie edytorskim dla tego rodzaju monografii. Wstęp dysertacji we właściwy sposób wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące charakterystyki biopaliw, ze szczególnym uwzględnieniem tych I i II generacji oraz regulacji prawnych w tym zakresie obowiązujących w kraju i UE. Integralną część wstępu stanowi podrozdział, w którym doktorantka w bardzo profesjonalny sposób dokonała przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat wpływu biopaliw na zdrowie człowieka, w tym pod kątem toksyczności nanocząstek generowanych podczas ich spalania. Podrozdział ten w zgrabny sposób uzasadnia wybrany przez doktorantkę przedmiot badań własnych.

Cele pracy zostały zwięźle i zrozumiale sformułowane przez doktorantkę jako rozdział drugi na stronie 36 i 37 rozprawy. Analiza treści rozdziału trzeciego pracy opisującego bardzo szczegółowo materiały i metodykę badań pozwala na weryfikację przydatności przyjętych metod badawczych do założonych celów pracy. Należy podkreślić, iż przyjęte przez doktorantkę metody analizy statystycznej dla uzyskanych wyników badań własnych i ich zależności są wysoce właściwe dla tego rodzaju danych badawczych.

W celu odzwierciedlenia głównej drogi ekspozycji człowieka na działanie nanocząstek ze spalania biopaliw, w badaniach doktorantki zostały wykorzystane dwie linie komórkowe A549 i BEAS-2B. Linia A549 jest powszechnie stosowanym modelem ludzkich komórek nabłonka pęcherzykowego płuca typu II, odzwierciedlającym najważniejszą drogę wnikania ksenobiotyków środowiskowych. Z kolei linia komórkowa nabłonka dolnych dróg oddechowych BEAS-2B jest powszechnie stosowanym modelem badawczym w analizie patogenezy chorób układu oddechowego wywołanych stresem oksydacyjnym. Co należy podkreślić, przed rozpoczęciem właściwych badań, doktorantka w sposób wysoce profesjonalny przeprowadziła weryfikację fizycznych właściwości badanych nanocząstek poprzez wykonanie szeregu pomiarów i analiz, tj. pomiar rozkładu wielkości i szybkości aglomeracji (NanoSight), analiza wielkości i kształtu nanocząstek za pomocą elektronowego mikroskopu transmisyjnego, analiza stabilności systemu koloidalnego (potencjał Zeta, indeks polidispersji). Ponadto doktorantka przeprowadziła również analizę składu pierwiastkowego badanych nanocząstek (SEM-EDS) oraz analizę wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w organicznych ekstraktach z nanocząstek generowanych podczas spalania badanych biopaliw (GC/MS). Cytotoksyczny potencjał badanych nanocząstek w szerokim zakresie (m.in. na poziom białka, nekrozę i apoptozę komórek oraz indukcję stresu oksydacyjnego) został przeprowadzony przez doktorantkę z wykorzystaniem odpowiednich i rekomendowanych do tego celu testów. Testy: mikrojądrowy, kometowy oraz gamma-H2AX wykorzystane przez doktorantkę do oceny potencjału genotoksycznego nanocząstek generowanych podczas spalania biopaliw w silniku Diesla są rekomendowanymi metodami monitoringu biologicznego i zaliczane są do tzw. biomarkerów skutków będących indykatorami wczesnych skutków biologicznych i ryzyka zdrowotnego związanego z ekspozycją na ksenobiotyki środowiskowe. Dopełnienie już i tak szerokiego wachlarza metod badawczych stanowią badania wpływu wybranych nanocząstek na ekspresję genów związanych ze stresem oksydacyjnym, cytotoksycznością, indukcją uszkodzeń DNA i ich naprawą, przeprowadzone dla wybranych przez doktorantkę komórek. Choć wyniki badań z użyciem w/w modeli komórkowych nie mogą zostać wprost odniesione do ekspozycji na działanie nanocząstek w warunkach *in vivo*, wskazują jednak, że badane przez doktorantkę cząstki stałe generowane podczas spalania biopaliw przez silnik Diesla, mogą stanowić pojedynczo, jak również z pewnością w mieszaninie potencjalne zagrożenie dla ludzkiego organizmu.

Wytyczony przez doktorantkę kierunek badań jest realizowany poprzez kolejne problemy badawcze, logicznie ułożone i wynikające jedno z drugich, dobrze świadczące o zdolności doktorantki do oceny uzyskanych wyników. Rozdział opisujący wyniki uzyskane przez doktorantkę na podstawie przeprowadzonych badań eksperymentalnych jest napisany w sposób wyczerpujący. Dokumentacja fotograficzna z transmisyjnego mikroskopu elektronowego oraz mikroskopu fluorescencyjnego dodatkowo wizualizuje i potwierdza wiarygodność przeprowadzonych przez doktorantkę badań. Uzyskane przez doktorantkę wyniki są bardzo interesujące i mają bardzo wysoki potencjał praktyczny. Opis wyników jest wysoce właściwy i wyczerpujący. Wyniki są spójne i odpowiadają założonym celom szczegółowym pracy, a kolejne

etapy wynikają jedne z drugich tworząc bardzo logiczną całość. Na uwagę zasługuje bardzo dobry pomysł na podsumowanie uzyskanych wyników na str. 143 (w rozdziale dyskusja), które stanowi kwintesencję części badawczej pracy. Niemniej jednak w mojej ocenie podsumowanie wyników części badawczej pracy powinno zostać zaprezentowane raczej jako ostatni podrozdział wyników, aniżeli część dyskusji. Dyskusja, będąca najbardziej wymagającą częścią rozprawy, jest ciekawa i wyczerpująca. Cieszą podjęte przez doktorantkę próby wyjaśnienia i dyskusji sprzecznych wyników. Bardzo ciekawa jest dyskusja nad genezą zaobserwowanych właściwości genotoksycznych badanych nanocząstek.

Niejako jako konkluzję do uzyskanych przez doktorantkę wyników można przytoczyć słowa Robina Cooka - z wykształcenia lekarza medycyny, który swój thriller pt. "Nano" zadedykował "zarówno możliwościom jakie przed medycyną otwiera nanotechnologia, jak i nadziei, że jej ewentualne ujemne strony będą minimalne".

Kończąc recenzowanie pracy chciałabym się odnieść do sformułowanych przez doktorantkę wniosków. W mojej ocenie doktorantka nie oparła się pokusie nadmiernego rozbudowywania wniosków wynikających z pracy, z których część w obecnej formie jest raczej obserwacjami.

Pomimo opisanych powyżej uwag nie mam zastrzeżeń co do strony merytorycznej pracy. Dobór metod i wykonanie doświadczeń są odpowiednie i świadczą o bardzo dobrym warsztacie naukowym doktorantki. Z edytorskiego obowiązku mogę stwierdzić, że praca napisana jest poprawnie, chociaż autorka nie ustrzegła się drobnych błędów technicznych, np.: Przypis z piśmiennictwa zamieszczony przy opisie Tab. 1 jest rozbieżny z przypisem zamieszczonym przy opisie tej tabeli w tekście (Tab. 1.: źródło: Szewczyńska i wsp., 2013 *vs* opis w tekście na str. 28 odnoszący się do Tab. 1: Chłopek, Laskowski, 2009). Analogiczna rozbieżność w cytowanym piśmiennictwie dotyczy również opisu Ryc. 5 oraz jej opisu w tekście dysertacji (Ryc. 5: źródło Szewczyńska i wsp., 2013 *vs* opis w tekście na str. 30 odnoszący się do Ryc. 5: Totlandsdal i wsp., 2012). Pozycja cytowana w tekście na stronie 35 tj. Bünger i wsp. (1998) nie została umieszczona w wykazie piśmiennictwa. W wykazie tym również brak cytowania Kłósowski i wsp., 2007, które zostało przywołane w opisie Ryc. 1. Jest też niezgodność tego cytowania w odniesieniu do opisu tej ryciny w tekście rozprawy na str.18, gdzie przywołano cytowanie *Kłósowski i wsp., 2010*. Przywoływane przez doktorantkę cytowania z uwagi na powyżej wymienione przykładowe niezgodności oraz wykaz piśmiennictwa z uwagi na rozbieżności w zapisie cytowanych czasopism i autorów, wymagają korekty i ujednoczenia na etapie przygotowania kolejnych publikacji z uzyskanych wyników własnych.

Powyższe drobne uwagi mają raczej charakter pomocniczy oraz redakcyjny, a tym samym nie wpływają na moją wysoce pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kowalskiej. Należy również podkreślić, iż wyniki zawarte w ocenianej rozprawie doktorskiej zostały już opublikowane w 2017r. jako 2 artykuły w czasopiśmie z listy A MNiSW o wysokim współczynniku oddziaływania (*Environmental Science and Pollution Research*; IF=2.741), co dodatkowo podkreśla wysoką wartość uzyskanych przez doktorantkę wyników. Badania te zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu FuelHealth (jako program realizowany w Polsko-Norweskiej współpracy badawczej), którego kierownikiem była Pani Promotor: prof. dr hab. Anna Lankoff.

Zarówno zawartość merytoryczna rozprawy, jak i sposób przedstawienia wyników świadczą o dojrzałości naukowej mgr Magdaleny Kowalskiej i w pełni uzasadniają ubieganie się o stopień doktora. Przedstawiona praca stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego z punktu

widzenia toksykologii i zdrowia środowiskowego problemu naukowego i spełnia wymogi ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003r. z późniejszymi zmianami i może stanowić podstawę do nadania stopnia doktora. Wnioskuje zatem do Wysokiej Rady Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie mgr Magdaleny Kowalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wkład pracy, zakres przeprowadzonych badań, staranność realizacji oraz wartość praktyczną uzyskanych wyników wnioskuje do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Kowalskiej.

Lucyna Kępa-Słupca