

Prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg
Katedra Żywienia i Biotechnologii Zwierząt
Wydział Nauk o Zwierzętach
SGGW w Warszawie

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Magdaleny Kowalskiej

**“KOMÓRKOWE I MOLEKULARNE EFEKTY DZIAŁANIA NANOCZĄSTEK GENEROWANYCH
PODCZAS SPALANIA WYBRANYCH BIOPALIW PIERWSZEJ I DRUGIEJ GENERACJI W SILNIKU
DIESLA”**

przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Lankoff

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska stanowi zwarte opracowanie liczące 185 stron, zawierające 84 rysunki i 34 tabele, a także załączniki zawierające 4 tabele. Wyniki badań zostały częściowo opublikowane w publikacjach:

Lankoff A., Brzóska K., Czarnocka J., Kowalska M., Lisowska M., Mruk R., Øvrevik J., Węgierek-Ciuk A., Zuberek M., Kruszewski M. 2017. A comparative analysis of in vitro toxicity of diesel exhaust particles from combustion of 1st- and 2nd-generation biodiesel fuels in relation to their physicochemical properties-the fuelHealth project. Environ. Sci. Pollut. Res. 24:19357-19374.

Kowalska M., Węgierek-Ciuk A., Brzóska K., Wojewódzka M., Męczyńska-Wielgosz S., Gromadzka-Ostrowska J., Mruk R., Øvrevik J., Kruszewski M., Lankoff A. 2017. Environ. Sci. Pollut. Res. 24:24223-24234.

Prace opublikowane zostały w czasopiśmie z bazy JCR, listy A MNiSW, a ich IF₅ wynosi 3,023 i liczba punktów MNiSW 30. Publikacje mają charakter oryginalnych prac naukowych. W pracach tych Autorka dysertacji doktorskiej jest czwartym i pierwszym autorem. Współautorzy prac dołączyli oświadczenia dotyczące zgody włączenia wyników wspólnych badań do rozprawy doktorskiej Pani mgr Kowalskiej. Współautorzy określili równocześnie swój udział w publikacjach co pozwala ocenić, że znaczący udział w przygotowaniu publikacji należał do Kandydatki.

Praca doktorska została przygotowana w języku polskim, a jej struktura jest standardowa i charakterystyczna dla prac doktorskich. Opracowanie podzielono na części: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, literatura, streszczenie, załączniki. Opracowanie stanowi więc logicznie skonstruowaną całość, pozwalającą na ocenę spójności badań i sformułowanie syntetycznych wniosków. Praca zawiera również oświadczenie autora, zgodnie z zarządzeniem Rektora Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach. Praca doktorska zwyczajowo powinna również zawierać streszczenie w języku angielskim.

Ocena merytoryczna

Zanieczyszczenie środowiska, będące konsekwencją rozwoju cywilizacyjnego, jest coraz bardziej „palącym” problemem. Wzrost zapotrzebowania na energię jest nieuchronne, a poszukiwanie alternatywnych metod jej produkcji jest jedyną możliwością w obliczu prognoz wystarczalności światowych zasobów konwencjonalnych surowców energetycznych. Poszukiwanie nowych źródeł energii jest podyktowane i skoncentrowane głównie na aspektach ekonomicznych czy politycznych, a w mniejszym stopniu uwzględnia problem zanieczyszczenia środowiska i zdrowia człowieka. Poszukiwania nowych źródeł energii są znacząco zaawansowane, a ich produkcja rośnie intensywnie, co więcej wzrost wykorzystania energii ze źródeł odnawialnych jest narzucone ustawowo w UE. Jednak równolegle do badań dedykowanych problemom pozyskiwania, przetwarzania, zastosowania surowców i biopaliw powinny być prowadzone szeroko zakrojone badania nad wpływem uprawy surowców do biopaliw, przetwarzania tych surowców oraz surowców odpadowych, a przede wszystkim spalania produkowanych biopaliw na stan środowiska i zdrowie człowieka. Pozyskanie wiedzy na temat potencjalnego zagrożenia, wynikającego ze spalania biopaliw może wskazać na potencjalne metody zapobiegania tym procesom. Ujmując sprawę dosadnie, jeśli planujemy produkcję trucizny, zaplanujmy również odtrutkę. Badania nad szkodliwością biopaliw, biorąc pod uwagę skalę problemu, są niewystarczające, co więcej nawet badania nad przewagą biopaliw w porównaniu do paliw konwencjonalnych nie są jednoznaczne. Zatem, temat podjęty w przedstawionej mi do oceny dysertacji doktorskiej uważam za niezwykle interesujący, bardzo ważny i wręcz niezbędny z punktu widzenia rozwoju dyscypliny, a można nawet stwierdzić rozwoju cywilizacyjnego. Gratuluję Promotorowi pracy i Doktorantce podjęcia tego wątku i realizacji tego trudnego tematu.

Ocena merytoryczna pracy jest przedstawiona zgodnie z porządkiem pracy

Wstęp

We wstępie Kandydatka wskazała na ogólne kwestie z zakresu produkcji, charakterystyki i zastosowania biopaliw, wskazując na praktyczne a także naukowe przyczyny podjęcia tematu. Wstęp oparty jest na aktualnej literaturze naukowej z zakresu tematyki badań, Autorka przywołuje aktualne prawodawstwo, analizy i prognozy dotyczące stosowania biopaliw. W dalszej części wstępu przedstawiono aktualny stan badań, dotyczących powstających w procesie spalania produktów, a zwłaszcza nanocząstek i ich składu fizyko-chemicznego, a przede wszystkim biologicznych skutków ekspozycji organizmu na wymienione czynniki. Wstęp jest logicznym wprowadzeniem do celu pracy i podejmowanych badań, przedstawionych w dalszych częściach pracy.

Cel pracy

Cel badań i zakres badań zostały sformułowane bardzo trafnie i syntetycznie, w postaci 3 szczegółowych celów. Wydaje się jednak, że wstęp poprzedzający sformułowanie

celu powinien być przeniesiony i stanowić pewne podsumowanie wstępu.

Materiał i metody

Rozdział ten przygotowano niezwykle starannie z obszernym opisem metod analitycznych. Zgodnie z założeniem dysertacji naukowych, że materiał i metody powinny być przedstawione w sposób umożliwiający precyzyjne powtórzenie doświadczenia, niewątpliwie przedstawiony opis spełnia ten warunek. Jednak, opis powszechnie znanych, standardowych metod analitycznych, będącym niejednokrotnie tematem ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów wymaga jedynie podania procedury lub piśmiennictwa bez tak dokładnego opisu metody postępowania. Podobnie, opis działania aparatury, nie jest konieczny w przypadku niniejszej pracy, raczej bardzo istotne jest przygotowanie próbek do analiz. Dotyczy to m.in. zasady pracy TEM, SEM-EDS, GC i innych urządzeń czy też dywagacji nad wskaźnikiem potencjału Zeta. Jakkolwiek ten szczegółowy opis metod wskazuje na fakt, że autorka wykonywała te badania samodzielnie lub w bliskiej współpracy.

Ponadto, należy podkreślić, że rozdział ten nie powinien zawierać elementów dyskusji, bowiem ten element jest przedmiotem rozdziału pt. Dyskusja. Dotyczy to między innymi zagadnienia nekrozy i apoptozy, stresu oksydacyjnego, badania genotoksyczności.

W badaniach, które dotyczą nanostruktur niezwykle istotną sprawą jest charakteryzacja materiału badawczego, czyli w tym przypadku nanocząstek powstałych ze spalania biopaliwa. Nawet drobne różnice metodyczne dotyczące, na przykład przygotowania próbek, mogą być przyczyną istotnych nieporozumień w interpretacji wyników. Podczas czytania rozdziału materiał i metody nasuwają się więc pytania i wątpliwości;

- Brak precyzyjnego opisu procesu prowadzenia kolekcji nanocząstek, zwłaszcza, że na filtry zbierane są wszelkie cząstki większe niż pory filtra, nanocząstki wielkości kilku nanometrów mogą być natomiast tracone poprzez ich przywieranie do powierzchni filtra z włókna szklanego oraz unoszenie się w powietrzu czy też elektrostatyczne oddziaływanie ostrza służącego do pozyskiwania nanocząstek? Procedura ta wydaje się kluczowa dla wiarygodności uzyskanych w badaniach wyników oceny biopaliw.
- Jak przygotowano próbki do obserwacji pod TEM, ile zastosowano powtórzeń, jak wyliczono średnią wielkość nanocząstki i zakres wielkości?
- Pomiar potencjału zeta prowadzony był dla zawiesiny (koloidu) nanocząstek w pożywce? Jak przygotowano próbki? Czy oznaczono pomiar potencjału zeta dla nanocząstek zawieszonych w super czystej wodzie, co dałoby obraz uniwersalnej charakterystyki nanocząstek, nie wynikający z ich interakcji z pożywką. Zwłaszcza, że skład pożywki zmienia się w trakcie prowadzenia hodowli.
- Czy prowadzono obserwację zachowania nanocząstek po ich zawieszeniu w płynie hodowlanym (lub w wodzie) odnośnie powstawania osadu fazy, która nie tworzyła koloidu, czy obserwowano aglomeraty nanocząstek zawieszonych w płynie hodowlanym lub w wodzie.

- Czy dokonano pomiaru wielkości nanocząstek i rozkładu ich wielkości, jak również wielkości ich aglomeratów, zwłaszcza, że analizator Malvern (brak dokładnej specyfikacji tego urządzenia) daje takie możliwości.
- Czy procedurę postępowania z komórkami prowadzono w warunkach sterylnych pod komorą laminarną?

Wyniki

Należy podkreślić, że w pracy uzyskano bardzo interesujące wyniki, dotyczące wpływu nanocząstek, generowanych podczas spalania biopaliw na biochemiczno-molekularne cechy badanych komórek. Wyniki te, w części, są pierwszymi a w części są to jedne z pierwszych tego rodzaju wyników uzyskanych na świecie. Wyniki eksperymentów zostały przedstawione czytelnie, jasno i rzetelnie w postaci rysunków tabel i ich jasnego omówienia. Zarówno prezentacja wyników jak też ich opis nie budzą żadnych zastrzeżeń.

Dyskusja

Omówienie wyników przeprowadzono z uwzględnieniem podziału na trzy realizowane cele, a mianowicie:

1. Ocena wpływu wybranych biopaliw I i II generacji na fizyko-chemiczną charakterystykę emisji nanocząstek stałych, generowanych podczas spalania biopaliw przez silnik Diesla.
2. Analiza cytotoksyczności nanocząstek stałych, generowanych podczas spalania wybranych biopaliw I i II generacji oraz określenie potencjalnych mechanizmów ich cytotoksycznego działania *in vitro*.
3. Zbadanie genotoksyczności nanocząstek stałych, generowanych podczas spalania wybranych biopaliw I i II generacji oraz określenie potencjalnych mechanizmów ich genotoksycznego działania *in vitro*.

System ten wydaje się logicznym rozwiązaniem, biorąc pod uwagę dużą liczbę i szeroki zakres badanych czynników. W dyskusji powtórzono część wyników, co niekiedy można było ograniczyć, jednak nie umniejsza to jej walorów naukowych. Dyskusja jest prowadzona w nawiązaniu do najnowszych badań prowadzonych na świecie, przytoczono wiele ciekawych wyników innych autorów, które pozwoliły na interpretację własnych wyników badań. Ta część pracy prowadzona jest w sposób dowodzący doskonałej znajomości nie tylko piśmiennictwa a także wiedzy ogólnej z zakresu pracy. Dyskusja prowadzona jest bardzo wnikliwie, dowodzi odwagi Autorki w formułowaniu własnych wniosków a także zdolności logicznego, i co zwykle jest najtrudniejsze dla młodych naukowców syntetycznego myślenia. Jednocześnie ten rozdział pracy jest pozbawiony nadmiernej interpretacji i treści nie związanych bezpośrednio z dyskutowaniem uzyskanych wyników.

Charakterystyka nanocząstek, ich właściwości fizyczne i chemiczne decydują o cytotoksyczności jak również genotoksyczności. Również zjawiska cytotoksyczności i genotoksyczności są ze sobą związane w przyczynowo-skutkowy ciąg zdarzeń, dlatego też rozdział dyskusja zakończono częścią „Podsumowanie wyników”, które stanowi raczej podsumowanie dyskusji, ponieważ bardzo syntetycznie i kompleksowo analizuje wyniki uzyskane w ramach 3 zagadnień. Podsumowanie jest najbardziej interesującą częścią pracy, zwłaszcza koncepcja dominującego wpływu WWA (wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych) na toksyczność badanych nanocząstek, jak również prawdopodobny wpływ pierwiastków metali przejściowych, które mogły modulować stan redox komórki. Autorka potwierdziła również badania innych autorów dotyczące znaczącej roli wielkości nanocząstek w ich toksycznym działaniu.

Reasumując, Autorka omówiła najważniejsze wyniki przeprowadzonych badań w sposób syntetyczny i kompletny, dokumentując spójność i logiczne powiązanie 3 podstawowych celów naukowych.

Wnioski

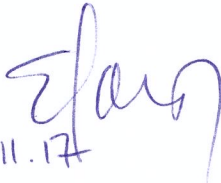
W tej części pracy sformułowano końcowe konkluzje uzyskanych badań. Wnioski odnoszą się do poszczególnych 3 zagadnień, badanych w pracy i są próbą odpowiedzi na postawiony na wstępie pracy cel. Jednak w ocenie merytorycznej należy stwierdzić, że większa część wniosków stanowi jedynie syntetyczne podsumowanie wyników. Wnioski dotyczące „dawkozależności” wnikania nanocząstek do komórek (współczynnik SSC) nie są uprawnione z uwagi na brak tej zależności (*sensu stricto*) ryc. 15, 16, 18, 19 (dla 48 godzin). Pod względem formalnym można mieć zastrzeżenia do konstrukcji stylistycznej p.6.1 poz. 2 oraz stosowania skrótów (SSC, FGP, B7, B20, SHB) czego we wnioskach powinno się unikać zgodnie z zasadą, że: wnioski powinny być zrozumiałe bez znajomości tekstu rozprawy.

Podsumowanie recenzji

Rozprawę doktorską mgr Magdaleny Kowalskiej pt KOMÓRKOWE I MOLEKULARNE EFEKTY DZIAŁANIA NANOCZĄSTEK GENEROWANYCH PODCZAS SPALANIA WYBRANYCH BIOPALIW PIERWSZEJ I DRUGIEJ GENERACJI W SILNIKU DIESLA, pomimo drobnych uwag, oceniam bardzo dobrze. W pracy podjęto nowatorskie zagadnienia, istotne zarówno z punktu widzenia nauk podstawowych, jak niezwykle ważne z punktu widzenia praktycznego, a zwłaszcza ważne dla zdrowia człowieka. Co więcej, zastosowany w pracy materiał badawczy jest niezwykle trudny metodycznie, brak jest bowiem opracowanych procedur i standardów do badania nanocząstek. Fakt, że operuje się cząstką a nie cząsteczką utrudnia a czasem wręcz uniemożliwia zastosowanie ogólnie przyjętych zasad. Pomimo tego, badania prowadzono z zastosowaniem licznych i zaawansowanych metod, uzyskane wyniki doskonale przedstawiono i przedyskutowano. Praca napisana została poprawnym językiem z zachowaniem zasad przygotowywania prac naukowych.

W konkluzji recenzji stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca mgr Magdaleny

Kowalskiej pt KOMÓRKOWE I MOLEKULARNE EFEKTY DZIAŁANIA NANOCZĄSTEK GENEROWANYCH PODCZAS SPALANIA WYBRANYCH BIOPALIW PIERWSZEJ I DRUGIEJ GENERACJI W SILNIKU DIESLA spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określonym w ustawie z dnia 14. marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule z zakresu sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 59, Dz. U. z 2005 nr 164, poz. 1365 oraz Dz. U. z 2011 r. nr 84, poz. 455). Dlatego też, przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach wniosek o dopuszczenie mgr Magdaleny Kowalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę również o wyróżnienie pracy doktorskiej, z uwagi na wysoki poziom naukowy przeprowadzonych doświadczeń i interdyscyplinarność podjętych badań, a także ich nowatorski charakter i kluczowy wpływ na rozwój nauk nanobiotechnologicznych, a w szczególności nanotoksykologii.


26.11.17