

Prof. dr hab. Ewa Sawosz Chwalibóg
Katedra Nanobiotechnologii
Instytut Biologii
SGGW w Warszawie

Ocena rozprawy doktorskiej

Pani mgr Barbary Flasz

**„Odziaływanie tlenku grafenu i/lub kwasu askorbinowego na potencjał reprodukcyjny oraz ekspresję witellogenin u *Acheta domesticus* z linii selekcyjowanych w kierunku różnej długości życia”
przygotowanej pod kierunkiem
Pani prof. dr hab. Marii Augustyniak**

Informacje ogólne o pracy

- Recenzja, przedstawionej mi do oceny pracy, została przygotowana na podstawie pisma Pana prof. dr hab. Piotra Świątko – Prodziekana ds. Badań Naukowych Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Rozprawa doktorska stanowi zwarte opracowanie, przygotowane w języku polskim, liczące 62 strony, zawierające streszczenie, streszczenie w języku angielskim, wprowadzenie, rozdział I (publikacja I), rozdział II (publikacja II), rozdział III (publikacja III), podsumowanie, bibliografię i oświadczenia współautorów. Praca, pod względem formalnym, jest przygotowana zgodnie z zasadami, obowiązującymi podczas pisania tego rodzaju opracowań naukowych, zawiera wszystkie niezbędne elementy pozwalające na przygotowanie jej formalnej oceny. Praca składa się z trzech wieloautorskich publikacji, w których Kandydatka jest pierwszym i co należy podkreślić korespondencyjnym autorem. Oświadczenia współautorów potwierdzają znaczący udział Pani mgr Flasz w przygotowaniu publikacji, określając ten udział jako 84% w publikacji I, 91% w publikacji II i 92% w publikacji III. Co więcej, publikacje zawierają opis zakresu pracy podczas przygotowywania publikacji, który wskazuje na kluczowy udział Kandydatki (konceptcja pracy, przeprowadzenie badań i analiz, przygotowanie publikacji). Wszystkie publikacje zamieszczone zostały w czasopiśmie należących do kwartyłu Q1, o wysokim IF, odpowiednio; Science of the Total Environment (IF₅ 7,842), Environmental Pollution (IF₅ 8,35) i Chemosphere (IF₅ 6,956).

Merytoryczna ocena

Praca stanowi cykl publikacji:

- I. Flasz Barbara, Dziewięcka Marta, Kędziorski Andrzej, Tarnawska Monika, Augustyniak Maria. 2020. Vitellogenin expression, DNA damage, health status of cells and catalase activity in *Acheta domesticus* selected according to their longevity after graphene oxide treatment. Science of The Total Environment, 737, 140274
- II. Flasz Barbara, Dziewięcka Marta, Kędziorski Andrzej, Tarnawska Monika, Augustyniak Jan, Augustyniak Maria. 2021 Multigenerational selection towards

- longevity changes the protective role of vitamin C against graphene oxide-induced oxidative stress in house crickets. ENVIRONMENTAL POLLUTION, 290, 117996
- III. Flasz Barbara, Dziewięcka Marta, Kędziorski Andrzej, Tarnawska Monika, Augustyniak Maria. 2021. Multigenerational graphene oxide intoxication results in reproduction disorders at the molecular level of vitellogenin protein expression in *Acheta domesticus*. Chemosphere, 280, 130772

Prace zostały opublikowane w czasopismach bardzo dobrych (Q1), co jest dowodem ich wysokiego poziomu merytorycznego. Badania przedstawione w publikacjach zawierają elementy nowatorskie, są poprawne pod względem metodycznym oraz niewątpliwie wnoszą nowe wartości, zarówno naukowe jak też aplikacyjne do dyscypliny biologii, lecz również ekotoksykologii.

Zastosowane w doświadczeniach metody badawcze i analityczne są dobrze opisane i nie budzą zastrzeżeń. Model badawczy *Acheta domesticus* jest w moim przekonaniu doskonałym narzędziem, zwłaszcza w badaniach z zakresu ekotoksykologii. Doświadczenie Jednostki w tym zakresie niewątpliwie budzi duże uznanie zarówno w Polsce jak też za granicą, co więcej pozwala na bardzo precyzyjne badania i obserwacje, co często jest niemożliwe w badaniach na innych zwierzętach modelowych. Podsumowując tę część pracy, zgodnie z założeniem dysertacji naukowych, że materiał i metody powinny być przedstawione w sposób umożliwiający precyzyjne powtórzenie doświadczenia, niewątpliwie przedstawione w pracach opisy spełniają ten warunek.

Praca, złożona z 3 publikacji, jest poprzedzona krótkim i skoncentrowanym omówieniem. Część ta zawiera cel badań i cele szczegółowe, hipotezy zerowe oraz ogólny plan badań. Część ta jest poprawnie napisana i dokumentuje spójność i logiczne powiązanie poszczególnych części pracy (publikacji I, II i III), które stanowią zwartą całość. W poszczególnych publikacjach. Kandydatka systematycznie bada toksyczny efekt GO, poczynając od poziomu obserwowanych zmian, ich stabilności w czasie, poszukiwania metody zmniejszenia toksyczności GO a kończąc na pokoleniowym efekcie toksyczności GO. Zatem kolejne badania i eksperymenty tworzą logiczną konstrukcję.

W publikacji I Kandydatka postawiła pytanie czy podawanie w diecie świeższa domowego tlenu grafenu (GO) może negatywnie wpłynąć na homeostazę organizmu i wywołać niekorzystne i patologiczne efekty, a także czy efekty te mają charakter stały, czy są przemijające. W badaniach oceniono wybrane parametry cytotoxycywności, genotoksycywności, stanu oksydacyjnego czy ekspresję witellogeniny. Badania przeprowadzono na modelu świeższa szczepu dzikiego vs. szczepu długożyjącego. Wyniki, które Kandydatka uzyskała są interesujące i potrzebne, a do ważnych zależności niewątpliwie należą: zróżnicowana reakcja pod wpływem podawania diety z GO w zależności od linii selekcyjnej oraz fakt, że zmiany na poziomie komórkowym, a również molekularnym, które wywołało podawanie GO ustępowały wraz z czasem po wycofaniu GO.

Odnosząc się do pierwszego zadania, wydaje się, że interesujące byłoby wprowadzenie dotyczące podstaw badania toksyczności GO, w tym na modelu *Acheta domesticus*, a zwłaszcza w kontekście wyboru zastosowanych stężeń. Byłoby wskazane przeprowadzenie

podstawowego badania typu „dose response”, w tym określenie poziomu LD₅₀ jak też poziomu określanego jako No Observable Adverse Effects Level.

Zatem moje pytanie dotyczy podstawowych zagadnień, a mianowicie: Czy znane są wyniki badań toksyczności GO na modelu *Acheta domesticus* metodą dose response, a jeśli tak jaka jest wartość LD₅₀, czy zastosowane przez Kandydatkę poziomy GO mają jakieś odniesienie do wartości krzywej toksyczności, jaka jest dawka minimalna GO, dlaczego koncentrację GO wyrażano w stosunku do paszy a nie na jednostkę masy ciała. Ponadto, biorąc pod uwagę, że doświadczenia mają raczej znamiona badań ekotoksykologicznych, czy Kandydatka mogłaby przeprowadzić przybliżoną symulację obrazującą jaki poziom zanieczyszczenia środowiska GO odpowiadałby zastosowanej w doświadczeniach koncentracji GO.

Publikacja II

W drugiej publikacji Pani mgr Barbara Flasz postawiło sobie cel, jakim było określenie wpływu tlenu grafenu GO na homeostazę redox i ekspresję białka witellogeniny oraz ocena możliwości zastosowania witaminy C w procesie cofania się negatywnych zmian wywołanych GO. Warto podkreślić, że są to pierwsze badania dotyczące potencjalnie leczniczego oddziaływania witaminy C na organizm *Acheta domesticus* u których stwierdzono patologiczne zmiany wywołane GO. Zastosowana dawka GO wpłynęła negatywnie na przeżywalność komórek, zwiększenie aktywności katalazy, degradacji DNA i ekspresję witellogeniny. Interesujące spostrzeżenie Kandydatki dotyczyło większej odporności świeższej linii długowiecznej na działanie GO. W kontekście działania witaminy C nasuwa się fakt, że w zależności od stosowanej dawki, witamina C może być zarówno antyoksydantem jak też prooksydantem, jako czynnik redukujący jony metali (via reakcję Fentona). Zatem kluczowym problemem jest określenie dawki witaminy C. A zatem nasuwa się pytanie na jakiej podstawie określono zastosowaną koncentrację witaminy C.

Publikacja III. Badania opublikowane w trzeciej pracy są kontynuacją wątków podjętych w poprzednich doświadczeniach i dotyczą interesujących aspektów negatywnego wpływu GO na organizm „świeższa domowego (ekspresja witellogeniny na poziomie białka) i jego zmiany na przestrzeni 3 pokoleń. Bardzo interesującą obserwacją jest wykazanie, że kolejne pokolenia nabywają większej odporności na działanie GO. Autorka wysunęła hipotezę o epigenetycznym charakterze zwiększającej się „odporności na zatrucie GO”, skutkującej zmniejszającą się negatywną reakcją w zakresie syntezy witellogeniny u *Acheta domesticus*. Te ciekawe wyniki są nowatorskie i ważne dla rozwoju ekotoksykologii.

Moje wątpliwości dotyczą jednak przygotowania paszy, a mianowicie: czy pasza była przygotowana jednorazowo na początku doświadczenia, czy była przygotowywana bezpośrednio przez rozpoczęciem obserwacji dla każdego pokolenia? Moje pytanie podyktowane jest skłonnością GO do tworzenia agregatów w miarę upływu czasu oraz powstawania korony białkowej na GO, która zmniejszać toksyczność GO.

Ostatnią częścią rozprawy doktorskiej jest Podsumowanie, które w sposób syntetyczny i jasny przywołuje najważniejsze wyniki obserwowane we wszystkich doświadczeniach, jak również ich znaczenie oraz zależności pomiędzy nimi. Podsumowanie jest bardzo dobrze przygotowane i dowodzi dojrzałości Pani mgr Flasz w formułowaniu naukowych wniosków, zdolności utrzymania porządku prowadzenia myśli przewodniej

podsumowywanych obserwacji, tworzenia konkluzji i hipotetycznych założeń na przyszłość. Można pogratulować Kandydatce tych umiejętności, cechujących zazwyczaj doświadczonych autorów prac naukowych. Z pewnością pomoc ze strony Zespołu, a zwłaszcza Promotora pracy została właściwie wykorzystana.

Moje jedyne zastrzeżenie dotyczy jednak faktu, że podsumowując badania nad toksycznością należy odnosić toksyczność do stosowanej dawki bowiem określenie niskie czy wysokie stężenia jest zbyt ogólne. Cytując Paracelsusa „Cóż jest trucizną? Wszystko jest trucizną i nic nie jest trucizną. Tylko dawka czyni, że dana substancja nie jest trucizną” (łac. Dosis facit venenum) również o tlenku grafenu można powiedzieć, że jest toksyczny lub nie jest toksyczny, w zależności od zastosowanej dawki.

Podsumowując ocenę dysertacji doktorskiej przygotowanej przez Panią mgr Barbarę Flasz można stwierdzić, że przeprowadzone badania są nowatorskie, doskonale opracowane, opublikowane w bardzo dobrych czasopismach. Badania, niewątpliwie przyczyniają się do rozwoju nanotoksykologii na świecie. Pytania i sugestie Recenzenta mają charakter dyskusji i nie wpływają na bardzo dobrą ocenę pracy.

Podsumowanie recenzji

Tematyka, jaką podjęła Pani mgr Barbara Flasz jest nowatorska, przygotowana na wysokim poziomie merytorycznym, bez wątpienia będzie miała wpływ na rozwój dyscypliny i postęp w zakresie bezpieczeństwa stosowania nanocząstek. W konkluzji recenzji stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska **mgr Barbary Flasz „Oddziaływanie tlenku grafenu i/lub kwasu askorbinowego na potencjał reprodukcyjny oraz ekspresję witellogenin u *Acheta domestica* z linii selekcyonowanych w kierunku różnej długości życia”** odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz.U z 2017 r., poz. 1789) w związku z artykułem 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz.1669 oraz art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. – Przepisy wprowadzające Ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, który stanowi, że przewody doktorskie, wszczęte i niezakończone przed dniem wejścia w życie ustawy, o której mowa w art.1, są przeprowadzane na dotychczasowych zasadach z tym, że jeżeli nadanie stopnia doktora następuje po dniu 30 kwietnia 2019 r. stopień nadaje się w dziedzinach i dyscyplinach określonych w przepisach wydanych na podstawie art.5 ust. 3 tej ustawy. Niniejszym, przedstawiam Wysockiej Radzie Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego wnioski o dopuszczenie mgr Barbary Flasz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę również o wyróżnienie pracy doktorskiej, z uwagi na nowatorski charakter badań i duży potencjał naukowy i aplikacyjny.

Ewa Sawosz Chwalibóg, 22.01.2022

