

Lublin, 26.04.2021r.

prof. dr hab. n. med. Lucyna Kapka-Skrzypczak
Instytut Medycyny Wsi im. W. Chodźki
Kierownik Zakładu Biologii Molekularnej i Badań Translacyjnych
ul. Jaczewskiego 2, 20-090 Lublin
e-mail: lucynakapka@gmail.com

RECENZJA

pracy doktorskiej **mgr inż. Kingi Izabeli Hęclik**

pt. „*Tworzenie i agregacja nanocząstek metali szlachetnych w ekstraktach torfu. Biosynteza, izolacja, identyfikacja i badania cytotoksyczności*”

Gwałtowny rozwój nanotechnologii jaki nastąpił w ostatnich latach powoduje wzrost narażenia ludzi i środowiska naturalnego na potencjalnie niekorzystne działanie nanomateriałów (materiałów których przynajmniej jeden wymiar jest mniejszy niż 100 nm). W przeciwieństwie do rosnącej liczby badań, wskazujących na ogromne możliwości stosowania nanomateriałów w życiu codziennym, stosunkowo niewiele wiadomo na temat zagrożenia, jakie stanowią one dla zdrowia człowieka i środowiska. 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. Ponadto nanocząstki mogą zmieniać np. swój stan agregacji, stopień utlenienia pod wpływem zmieniających się warunków środowiska. Z uwagi na fakt, że coraz więcej badań naukowych wskazuje, iż nanomateriały, w tym zwłaszcza nanocząstki, mogą mieć niekorzystny wpływ na środowisko i zdrowie człowieka, konieczne jest realizowanie interdyscyplinarnych badań umożliwiających poznanie, zarówno możliwości ich syntezy oraz mechanizmów oddziaływania, jak również możliwości ograniczania ich negatywnego wpływu.

Istotnym czynnikiem sprzyjającym rozwojowi nanotechnologii jest opracowywanie sposobów otrzymywania nanomateriałów z wykorzystaniem metod biologicznych, do których należą procesy, w których wykorzystuje się bakterie, grzyby i ekstrakty roślinne. Procesy biologicznej syntezy nanocząstek przebiegają podobnie jak w przypadku syntezy chemicznej, ale z wykorzystaniem naturalnych substancji redukujących i stabilizujących takich jak: polisacharydy, lipoproteidy, glikoproteidy, kwasy organiczne wydzielane przez mikroorganizmy i innego typu biosurfaktanty. Bionanocząstki wykazują wysoką stabilność w zawiesinie wodnej, co umożliwia dalszą ich aplikację w procesach technologicznych, przemysłowych. Rozwój przyjaznych ekologicznie, nietoksycznych dla środowiska możliwości syntezy nanocząstek stanowi alternatywę wobec metod chemicznych i fizycznych, w trakcie których często wykorzystywane są toksyczne związki. Jednym z głównych kierunków syntez rozwijanych w obrębie definicji zielonej chemii

jest otrzymywanie nanowytrąceń metalicznych oraz układów opartych o tlenki metali. Wraz z rozwojem nanotechnologii, metody ekologiczne stały się alternatywą dla procesów tradycyjnych, które nie zawsze pozostają w zgodności z zasadami zielonej chemii i tym samym nie są obojętne dla środowiska naturalnego. Spośród naturalnych mediów stosowanych do biosyntezy nanomateriałów to właśnie ekstrakty roślinne stanowią najlepiej poznane i opisane środowisko. Z kolei zanieczyszczenie środowiska metalami stanowi poważny problem ekologiczny, wymagający nie tylko monitorowania ich losów w środowisku, ale także opracowania i wdrażania innowacyjnych rozwiązań ich eliminacji i detoksykacji na drodze fitoremediacji. Wykorzystanie w tym celu torfu nie jest aktualnie prowadzone na skalę przemysłową. Niemniej jednak istnieją naukowe dowody, iż znaczne ilości zanieczyszczeń wprowadzanych do środowiska przez człowieka, mogą w prosty sposób, rozłożony w czasie być zneutralizowane i usunięte poprzez zatrzymanie ich w obrębie torfowiska, a następnie usunięte dzięki udziałowi budujących je roślin. Ponadto, dzięki zawartym w torfie kwasom humusowym, umożliwiającym kompleksowanie jonów metali i zmianę stopnia ich utlenienia, dochodzi do ich zatrzymania w podłożu.

Z uwagi na powyższe, problematyka naukowo-badawcza podjęta przez mgr inż. Kingę Izabelę Hęclik, która miała na celu biosyntezę wybranych nanocząstek metali (miedzi, srebra i cyrkonu) w obecności kwasów humusowych, dla których podjęta została próba wyjaśnienia mechanizmu ich tworzenia oraz analiza ich właściwości fizyko-chemicznych i biologicznych, wpisuje się ściśle w obszar aktualnych problemów naukowo-badawczych z pogranicza kilku dziedzin nauki.

Na rozprawę doktorską mgr inż. Kingi Izabeli Hęclik składa się wprowadzenie (40 str.), opis celów pracy, omówienie materiału i metodyki (22 str.), opis uzyskanych wyników (90 str.), dyskusja (13 str.), podsumowanie z wnioskami 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 417 pozycji spośród których większość została opublikowana 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 wykorzystwała głównie publikacje opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym.

Praca ma charakter badawczy i stanowi spójną całość o typowym układzie edytorskim dla tego rodzaju monografii. Wprowadzenie dysertacji we właściwy sposób wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące biologicznych metod otrzymywania nanocząstek metalicznych, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania w tym celu bakterii, grzybów i roślin. Integralną część wstępu stanowi podrozdział, w którym mgr inż. Kinga Izabela Hęclik w bardzo profesjonalny sposób dokonała przeglądu aktualnego stanu wiedzy na temat właściwości fizyko-chemicznych nanocząstek metalicznych oraz ich wpływu na środowisko, w tym zwłaszcza ich toksycznego potencjału. 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 51 rozprawy. W mojej ocenie cel nr 4 i nr 5 się nakładają i dlatego mogłyby zostać sformułowane jako jeden cel. Analiza treści rozdziału trzeciego pracy opisująca 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 właściwe dla tego rodzaju danych badawczych.

Na potrzeby realizacji części badawczej rozprawy mgr inż. Kinga Izabela Hęclik przeprowadziła syntezę nanocząstek wybranych metali tj. miedź, srebro i cyrkon, w wodnych ekstraktach z torfu kwaśnego i odkwaszonego (dostępnych komercyjnie), odwzorowując w warunkach *in vitro* procesy zachodzące w środowisku naturalnym. W celu optymalizacji realizowanych badań Doktorantka przeprowadziła dla badanych mieszanek torfowych oznaczenia zawartości frakcji huminowej i fulwowej według dwóch rekomendowanych metod. Ponadto w kolejnym etapie badań przeprowadziła również optymalizację syntezy nanocząstek wybranych metali szlachetnych uwzględniając 3 różne sposoby wprowadzenia do roztworu czynnika redukującego tj. kwasów huminowych. Analiza właściwości fizyko-chemicznych zsyntetyzowanych nanocząstek została przeprowadzona przez Doktorantkę z zastosowaniem wykorzystywanych w tym celu rzetelnych i rekomendowanych metod instrumentalnych tj. spektroskopia UV-Vis, skaningowa mikroskopia elektronowa z detektorem EDS czy mikroskopia sił atomowych i analiza śledzenia ruchu nanocząstek (NTA). Należy podkreślić, iż zoptymalizowana procedura syntezy drobin metalicznych zrealizowana na potrzeby ocenianej rozprawy jest przedmiotem zgłoszenia patentowego. W kolejnym etapie badań Doktorantka wykorzystwała nowoczesne narzędzie analityczne, którym jest modelowanie kwantowo-mechaniczne, którego zadaniem było ustalenie prawdopodobnej konformacji cząsteczek kwasów: fulwowego i huminowego oraz otrzymanych nanocząstek. W kolejnym etapie badawczym Doktorantka przeprowadziła badania bioakumulacji i potencjalnej toksyczności zsyntetyzowanych nanocząstek metalicznych z wykorzystaniem, zarówno roślin i organizmów modelowych, jak również ludzkich linii komórkowych. Jako rośliny modelowe zostały wytypowane przez Doktorantkę: 1) Pieprzyca siewna (pot. rzeżucha, *Lepidium sativum* L.) - gatunek rośliny jednorocznej z rodziny kapustowatych (*Brassicaceae*) oraz 2) Komonica błotna (*Lotus uliginosus* Schkuhr) - przedstawiciel roślinności typowej dla środowiska torfowego. Ciekawi mnie jakie były przesłanki do wyboru spośród znanych roślin modelowych właśnie Pieprzycy siewnej?. Dla wybranych przez Doktorantkę roślin modelowych została przeprowadzona analiza zdolności kumulacji w ich tkankach badanych nanocząstek metali, analiza wpływu otrzymanych nanocząstek na siłę kiełkowania i przyrost masy oraz określono ich potencjał antyoksydacyjny. Czy dla Komonicy błotnej został przeprowadzony test kumulacji nanocząstek metali szlachetnych?. W tekście rozprawy nie znalazłam informacji w tym zakresie. Organizmem modelowym, dla którego został przeprowadzony test przeżywalności w obecności zsyntetyzowanych przez mgr inż. Kingę Izabelę Hęclik nanocząstek metali, był skorupiak - Słonaczek (*Artemia salina*). Badania cytotoksyczności uzyskanych nanomateriałów w warunkach *in vitro* były przeprowadzone na komórkach dwóch ludzkich linii komórkowych: A549 i HeLa. Na tych liniach przebadany został cytotoksyczny potencjał zsyntetyzowanych na potrzeby realizacji rozprawy nanocząstek z wykorzystaniem testu MTT, który jest rekomendowany do badań aktywności metabolicznej komórek. Instygujące są przesłanki jakimi Doktorantka się kierowała przy wyborze w/w linii komórkowych do badań?.

Choć wyniki badań z użyciem w/w modeli komórkowych nie mogą zostać wprost odniesione do ekspozycji ludzi na działanie nanocząstek w warunkach *in vivo*, wskazują one pośrednio, że badane przez mgr inż. Kingę Izabelę Hęclik nanocząstki metaliczne, w określonym stężeniu zwłaszcza przy przewlekłej ekspozycji, mogą stanowić potencjalne zagrożenie, zarówno dla środowiska, jak też roślin i organizmów żywych w nim bytujących. Niemniej jednak

przeprowadzone na potrzeby realizacji ocenianej rozprawy badania wskazują na duży potencjał mieszanek torfowych jak środowiska/medium do wytwarzania bionanocząstek metali. Ciekawe byłoby porównanie toksyczności komercyjnie dostępnych, syntetyzowanych chemicznie nanocząstek i tych bionanocząstek zsyntetyzowanych przez Doktorantkę. Jest to ewentualna propozycja kierunku dalszych badań realizowanych przez mgr inż. Kingę Izabelę Hęclik w tym obszarze.

Wytyczony przez Doktorantkę kierunek badań jest realizowany poprzez kolejne problemy badawcze, logicznie ułożone i wynikające jedne z drugich, dobrze świadczące o zdolności mgr inż. Kingi Izabeli Hęclik do oceny uzyskanych wyników. Rozdział opisujący wyniki uzyskane przez nią na podstawie przeprowadzonych badań eksperymentalnych jest napisany w sposób właściwy. Dokumentacja fotograficzna ze skaningowego mikroskopu elektronowego (+/- kontrast topograficzny) oraz spektrometru dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego dodatkowo wizualizuje i potwierdza wiarygodność przeprowadzonych przez Doktorantkę badań. Uzyskane przez mgr inż. Kingę Izabelę Hęclik wyniki są bardzo interesujące i mają wysoki potencjał praktyczny. Opis wyników jest zasadniczo właściwy. Wyniki są spójne i odpowiadają założonym celom szczegółowym pracy, a kolejne etapy wynikają jedne z drugich tworząc logiczną całość. Na etapie publikacji wyników sugeruję aby wartość poziomu istotności (p), opis osi wraz jednostką miary czy też opis składowych prezentowanych na danym wykresie zamieszczać bezpośrednio na wykresie oraz prezentować w taki sposób aby nie było żadnych wątpliwości interpretacyjnych np. tj. czy tzw. wąsy to wartość min-max czy też coś innego lub jaka jest jednostka miary prezentowanego parametru.

Dyskusja, będąca najbardziej wymagającą częścią rozprawy, jest ciekawa. Cieszą podjęte przez mgr inż. Kingę Izabelę Hęclik próby wyjaśnienia i dyskusji sprzecznych wyników. Bardzo ciekawa jest dyskusja nad genezą zaobserwowanych właściwości toksycznych badanych nanocząstek. Intrygujące są wyniki wskazujące na bardzo wysoki potencjał cytotoksyczny nanocząstek miedzi?. Na etapie publikacji wyników rozprawy warto pogłębić dyskusję w tym zakresie. Sugeruję też aby przy przygotowywaniu publikacji z wyników rozprawy w sekcji dyskusja unikać powtórzeń wyników z przeprowadzonych obserwacji czy też powtórzeń informacji z metodologii badań. Zbędne jest też na etapie dalszego upowszechniania wyników rozprawy wyodrębnianie w ramach dyskusji sekcji tematycznych odnoszących się do wyników z poszczególnych metod badawczych. Zakładam, iż Doktorantka z uwagi na bardzo szeroki zakres zastosowanych metod badawczych zastosowała taką procedurę w celu usystematyzowania uzyskanych wyników.

Kończąc recenzowanie pracy chciałabym się odnieść do sformułowanych wniosków, które Doktorantka w sposób nietypowy połączyła z podsumowaniem. W mojej ocenie wskutek tego niestandardowego połączenia, ocena wniosków jest dość kłopotliwa.

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 mgr inż. Kingi Izabeli Hęclik. Z edytorskiego obowiązku mogę stwierdzić, że praca napisana jest zasadniczo poprawnie. Doktorantka nie uniknęła jednakże drobnych potknięć redakcyjno-edytorskich. W spisie treści nie uwzględniono pozycji streszczeń jak też nie uwzględniono niektórych podrozdziałów, które zostały wyodrębnione w tekście rozprawy np. podrozdziałów 3.5.1.1, 3.5.1.2, 3.5.1.3, 3.5.2.1, 3.5.2.2. Ponadto błędnie umieszczono np. podrozdział 3.6.1 (Analiza cytotoksyczności syntezowanych nanocząstek metali z wykorzystaniem ludzkich linii komórkowych HeLa i A549) jako element rozdziału 3.6 (Test

przeżywalności organizmów wodnych Słonaczka (*Artemia salina*) w środowisku syntezowanych nanocząstek metali). Na etapie publikacji wyników rozprawy zalecam więc bardziej staranne przemyślenie układu prezentacji poszczególnych metod badawczych oraz uzyskanych w wyniku ich realizacji wyników. Warto też umieszczać przy każdej rycinie czy też rysunku informację na temat źródła ich pochodzenia, nawet w przypadku gdy jest to tzw. opracowanie własne. W mojej ocenie niezręczne jest też nazywanie linii komórkowej organizmem modelowym, w tym przypadku organizmem modelowym jest komórka tejże linii. Opisane powyżej niedociągnięcia są łatwe do poprawienia czy też uzupełnienia, co z kolei na pewno ułatwi publikację uzyskanych przez Doktorantkę wyników badań własnych.

Powyższe drobne uwagi mają raczej charakter pomocniczy oraz redakcyjny, a tym samym nie wpływają na moją wysoce pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej mgr Kingi Izabeli Hęclik. Należy również podkreślić, iż wyniki przedstawione w ocenianej rozprawie doktorskiej zostały uzyskane w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu Preludium, którego kierownikiem była autorka ocenianej rozprawy doktorskiej. Fakt ten dodatkowo potwierdza wysoką wartość naukową podjętej przez Doktorantkę problematyki badawczej oraz zrealizowanych przez Nią badań.

Zarówno zawartość merytoryczna rozprawy, jak i sposób przedstawienia wyników świadczą o dojrzałości naukowej mgr inż. Kingi Izabeli Hęclik i w pełni uzasadniają ubieganie się o stopień doktora. Przedstawiona praca stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego z punktu widzenia nauk ścisłych i przyrodniczych 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 Kolegium Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie mgr inż. Kingi Izabeli Hęclik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na wkład pracy, interdyscyplinarny zakres przeprowadzonych badań oraz wartość praktyczną uzyskanych wyników, charakter wnioskuje do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Kingi Izabeli Hęclik.

KIEROWNIK
Zakładu Biologii Molekularnej i Badań Translacyjnych

prof. dr hab. n. med. Lucyna Kopka-Skrzypczak
Specjalista Zdrowia Środowiskowego
Specjalista Zdrowia Publicznego