

Formularz recenzji rozprawy doktorskiej

Wydziału Biologii

Uniwersytetu Jagiellońskiego

Imię i nazwisko kandydata: Zuzanna Świątek

Tytuł rozprawy doktorskiej: Toxicokinetics and toxicity of zinc nanoparticles in the earthworm *Eisenia andrei*

Promotor: prof. dr hab. Ryszard Laskowski

Promotor pomocniczy: dr hab. Agnieszka Bednarska

Recenzent: prof. dr hab. Maria Augustyniak

1. Wartość naukowa rozprawy

a. Oryginalność badań (25-200 słów):

Rozprawa doktorska Pani mgr Zuzanny Świątek dotyczy porównania toksykokinetyki oraz toksyczności cynku w formie jonowej ($ZnCl_2$) oraz w formie nanocząstek (ZnO-nano) u dżdżownicy *Eisenia andrei*. Toksykokinetyka oraz toksyczność cynku były już w przeszłości badane w różnych układach eksperymentalnych, jednak głównie w odniesieniu do formy jonowej. Użycie w badaniach różnych form cynku ($ZnCl_2$ oraz ZnO-nano) nadaje pracy zupełnie nowego charakteru. Ze względu na specyficzne właściwości fizykochemiczne nanocząstek można było bowiem podejrzewać, że ich losy w organizmie, tempo kumulacji oraz eliminacji, a co za tym idzie ich potencjał toksykologiczny, mogą być odmienne aniżeli w przypadku zastosowania prostych soli cynku. Pani mgr Zuzanna Świątek, kierując się tą przesłanką, zaprojektowała i przeprowadziła cykl eksperymentów, których celem była: ocena stopnia regulacji zawartości cynku w ciele *Eisenia andrei* (w zależności od jego formy); oszacowanie energetycznych kosztów przeciwdziałania skutkom narażenia na badane formy metalu; zbadanie efektów cytotoksycznych (ocena zmian w obrębie komórek nabłonka jelita oraz komórek chloragogenowych a także wyznaczenie stosunku ADP/ATP w ciele dżdżownic); oszacowanie śmiertelności, tempa wzrostu i rozwoju płciowego dżdżownic oraz respiracji mierzonej na poziomie komórkowym, po długotrwałej ekspozycji na $ZnCl_2$ lub ZnO-nano. Kompleksowe i wielopłaszczyznowe podejście do tematu oraz porównanie efektów oddziaływania nanocząstek cynku z formą jonową, bez wątplenia sprawiają, że praca jest oryginalna.

b. Wartość naukowa rozdziałów/artykułów (25-200 słów):

Na rozprawę składają się cztery główne rozdziały, które stanowią współautorskie prace (trzy już opublikowane artykuły oraz jeden manuskrypt złożony do redakcji) o tematyce w pełni zgodnej z tematem rozprawy doktorskiej. Rozdziały te są opatrzone wstępem teoretycznym oraz dyskusją scalającą i podsumowującą najważniejsze osiągnięcia zaprezentowane w kolejnych artykułach. Spośród wymienionych powyżej artykułów dwa opublikowano w *Ecotoxicology and Environmental Safety*, jeden w *Environmental Science and Pollution Research*. Ostatni manuskrypt został złożony do *Chemosphere*. Wzmiankowane artykuły bardzo dobrze wpisują się w cele i zakres tematyczny wybranych czasopism. Oceniam wysoko wartość naukową poszczególnych składowych rozpraw

doktorskiej mgr Zuzanny Świątek. Każda praca posiada oryginalne cele, dyskusję oraz wnioski. Do najważniejszych, oryginalnych osiągnięć można zaliczyć: (1) wykazanie sprawnej regulacji zawartości cynku w ciele *E. andrei* bez względu na jego formę (artykuł 1); (2) wykazanie, że sprawna regulacja zawartości metalu w ciele zwierząt pozostaje bez wyraźnego wpływu na rezerwy energetyczne oraz tempo respiracji (artykuł 2); (3) ujawnienie zmian w nabłonku jelita oraz w tkance chloragogennej bez różnic pomiędzy obiema zastosowanymi formami Zn (artykuł 3); wskazanie na istotny aspekt czasu trwania eksperymentu, gdzie dopiero długotrwała ekspozycja pozwala ujawnić istotne różnice pomiędzy wpływem obu form cynku na śmiertelność, tempo wzrostu oraz respirację mierzoną na poziomie komórkowym.

2. **Wartość merytoryczna rozprawy**

(umiejętność wprowadzenia w tematykę badawczą i jasność sformułowanych hipotez badawczych, dobór metod badawczych i narzędzi statystycznych do analizy danych, sposób przedstawienia wyników, krytyczna analiza wyników i umiejętność ich interpretacji na tle literatury przedmiotu, jasność i poprawność wniosków) (25-200 słów):

Praca mgr Zuzanny Świątek jest dziełem w pełni poprawnym merytorycznie. Badania zostały zaprojektowane na bazie i z uwzględnieniem dobrze udokumentowanych teorii, faktów i koncepcji naukowych, zwłaszcza w zakresie toksykokinetyki, toksyczności metali oraz kosztów fizjologicznych i energetycznych ponoszonych przez zwierzęta narażone na dodatkowe czynniki stresu. Pani Zuzanna Świątek jest bardzo dobrze zaznajomiona z tą tematyką i dobrze się w niej odnajduje. Wszystkie eksperymenty zostały zaplanowane i przeprowadzone rzetelnie i nie budzą zastrzeżeń (drobne wątpliwości, a raczej wątki do dyskusji, pozwalam sobie umieścić w dalszej części recenzji). Dobór metod badawczych oraz narzędzi statystycznych zapewniają weryfikację hipotez i osiągnięcie celów jakie postawiła sobie Autorka rozprawy doktorskiej. Wyniki przedstawione są w sposób czytelny. Artykuły, poza głównymi wynikami, zawierają bogate materiały uzupełniające, dokumentujące cały przebieg pracy oraz opracowania danych. Wyniki są przedyskutowane w sposób wyczerpujący a na pochwałę zasługuje rozdział 6 (Dyskusja i Wnioski), w którym Autorka w sposób syntetyczny podchodzi do całości uzyskanych wyników, wyjaśniając zależności pomiędzy poszczególnymi eksperymentami. Ta całościowa interpretacja wyników, dyskusja oraz wnioskowanie są spójne z dotychczasowym stanem wiedzy. Bez wątplenia praca stanowi znaczący wkład w poznanie zjawisk toksykokinetyki i toksyczności ZnO-nano u organizmów glebowych. Uzyskane wyniki oraz wnioski będą mogły być bez wątplenia wykorzystane przez grono naukowców zajmujących się oceną ryzyka ekologicznego oraz wyjaśnianiem mechanizmów toksyczności nanocząstek, zwłaszcza nanocząstek metali.

3. **Poprawność redakcyjna rozprawy**

(układ pracy, jasność stylu, szata graficzna itp.) (25-200 słów):

Układ pracy jest poprawny, typowy dla prac przygotowanych w oparciu o opublikowane artykuły i/lub manuskrypty złożone do redakcji czasopism. Praca została napisana w języku angielskim, który nie budzi zastrzeżeń. Poza czterema rozdziałami (3 artykuły i 1 manuskrypt) stanowiącymi główny rdzeń pracy, zamieszczono również streszczenia w języku polskim i angielskim, dyskusję oraz oświadczenia współautorów publikacji włączonych do rozprawy. Materiał ilustracyjny przygotowany jest starannie i poprawnie opisany. W mojej opinii praca jest spójna, poprawna pod względem formalnym i redakcyjnym.

4. **Uwagi krytyczne**

W pracy doktorskiej mgr Zuzanny Świątek nie znajdują poważnych uchybień lub też fragmentów zasługujących na krytykę. W trakcie lektury dzieła nasunęło mi się jednak kilka spostrzeżeń i przemyśleń,

które chciałabym przedstawić mgr Zuzannie Świątek jak wątki do przemyślenia lub doprecyzowania. Chętnie poznam opinię Pani Zuzanny Świątek w następujących kwestiach:

- 1) Przygotowując glebę zanieczyszczoną nanocząstkami dodano suchy proszek do mniejszej porcji gleby, mieszano przez 4-6 min, a następnie dodano pozostałą część gleby oraz wodę i ponownie homogenizowano. Rozumiem, że Autorka posłużyła się metodą opracowaną przez innych autorów (Romero-Freire et al., 2017). Interesuje mnie czy istnieje standardowa procedura oceny równomierności rozmieszczenia nanocząstek w glebie? Czy zna Pani inne metody skażenia gleby z użyciem nanocząstek?
- 2) W artykule 2 (rozdział 3) pojawia się stwierdzenie „[...] the dissolution of zinc ions rather than the direct impact of NPs was proposed as the mechanism underlying the toxicity of ZnO-NPs” Także w dyskusji (rozdział 6) pojawia się zdanie “Following this line of reasoning, we cannot exclude that the respiration rates measured for worms in the ZnO-NPs 125, ZnO-NPs 250, and ZnO-NPs 500 treatment groups were a result of stress since they were not different from that of the control, which could have been a result of the direct action of NPs, which can cause oxidative stress” Chętnie poznam zdanie Autorki na temat możliwych mechanizmów bezpośredniego oddziaływania ZnO-NPs w ciele zwierząt.
- 3) W eksperymentach przeprowadzono skażenie gleby z użyciem $ZnCl_2$ na 4 dni (artykuł 1) lub 7 dni (artykuły 2 i 3 oraz manuskrypt) przed rozpoczęciem eksperymentów (w celu zrównoważenia gleby). Skąd wynika ta różnica? Czy był konkretny powód wydłużenia czasu niezbędnego do zrównoważenia gleby? Czy mogło to mieć jakikolwiek wpływ na wyniki?
- 4) W artykule 2 (rozdział 3) Autorka, ustosunkowując się do wyników dotyczących zawartości białka w ciele zwierząt, pisze: „This phenomenon may be the result of the response of the earthworms to changes in the soil type. Sandy or clayey soils are not favorable conditions for earthworms (Guild 1948), and not only metal toxicity but also soil texture can affect protein content in earthworms (Beaumelle et al. 2014).” Ta sama argumentacja pojawia się w artykule 3 (rozdział 4) podczas omawiania wyników dotyczących stosunku ADP/ATP. Czy nie można było uniknąć tego efektu? Na przykład poprzez zaplanowanie kilkudniowego okresu aklimacji do innego rodzaju gleby. W eksperymencie opisanym w artykule 3 (rozdział 4) taką aklimację do gleby Lufa 2.2. przeprowadzono. Czas aklimacji wynosił jednak 24 godziny. Czy ten czas nie był nieco zbyt krótki? Mam tu na uwadze czas niezbędny do ustabilizowania się poziomu białek, także tych o których mowa w artykule 2. Kwestia ta jest w zasadzie przedyskutowana w rozdziale 6. Chciałabym jednak poznać opinię Autorki i Jej rekomendacje co do czasu aklimacji w kontekście potencjalnych przyszłych badań z użyciem nanocząstek.
- 5) W ostatnim (długotrwałym) eksperymencie stwierdzono wyższe tempo wzrostu dżdżownic eksponowanych na $ZnCl_2$ w niskim i średnim stężeniu (125 i 250 $mg\ kg^{-1}$) oraz u osobników z wszystkich grup eksponowanych na ZnO-nano (stężenia: 125 - 1000 $mg\ kg^{-1}$) w porównaniu do kontroli. Autorka tłumaczy to dość obszernie, zarówno w manuskrypcie 4 jak i w zbiorczej dyskusji, niedoborem Zn u osobników kontrolnych. Wyjaśnienie takie jest oczywiście bardzo prawdopodobne i logiczne. Zastanawiam się jednak w jaki sposób można zweryfikować to przypuszczenie? Ponadto, czy jest to jedyne wytłumaczenie uzyskanego wyniku? Jakie jest Pani zdanie na temat hiperfagii (o charakterze kompensacyjnym) obserwowanej czasem u zwierząt narażonych na dodatkowy czynnik stresu?

Drobne uwagi, które nie wymagają komentarza:

- W 1 artykule, opisując drogi przedostawania się Zn do ciała dżdżownic Autorka niefortunnie używa terminu „skin” Podobnie w artykule 2, gdy mowa o możliwym drażniącym wpływie piaszczystej, gliniastej gleby na tkanki. Termin „skin” jest raczej zarezerwowany dla kręgowców, a w przypadku dżdżownic powinniśmy raczej posługiwać się terminem „epidermis”

- W artykule 3 pojawia się zapis „ [...] no serve alterations in the shape [...]” Powinno raczej być: „ [...] no severe alterations in the shape [...]”

5. **Ocena końcowa** (uzasadnienie 25-200 słów):

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Zuzannę Świątek jest oryginalnym dziełem spełniającym wymagania do uzyskania stopnia doktora. Zawarte powyżej uwagi nie umniejszają dużej wartości naukowej i merytorycznej pracy, a są jedynie inspiracją do dalszych rozważań i przemyśleń. Zaprezentowane w pracy wyniki oraz wnioski mają dużą wartość naukową i z pewnością będą wykorzystywane w przyszłości przez naukowców zajmujących się ekotoksykologią, zwłaszcza toksykokinetyką metali występujących w różnych formach oraz kosztem energetycznym wynikającym z narażenia zwierząt na dodatkowe czynniki stresu, szczególnie związanego z wprowadzeniem nanomateriałów do ekosystemów glebowych.

Ja, niżej podpisany stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska **mgr Zuzanny Świątek** spełnia warunki określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie **mgr Zuzanny Świątek** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

TAK/NIE

Ja, niżej podpisany wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

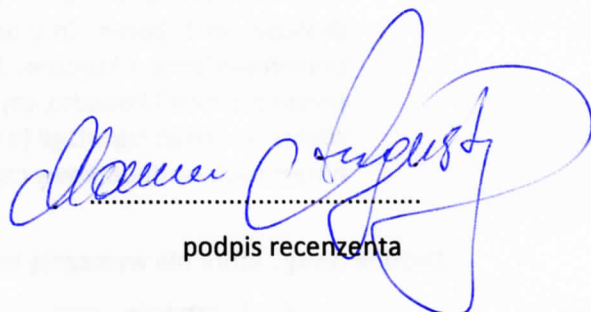
Uzasadnienie wniosku (25-200 słów)

Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zasługuje na wyróżnienie ze względu na kompleksowe, wielopłaszczyznowe i profesjonalne podejście do tematu toksykokinetyki i toksyczności nanocząstek cynku, dużą wartość naukową oraz staranne przygotowanie trzech artykułów i jednego manuskryptu.

TAK/NIE

11 lipca 2020

data sporządzenia recenzji


.....
podpis recenzenta