



Poznań, 29.01.2022

Dr hab. Małgorzata Słocińska, prof. UAM
Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Wydział Biologii Uniwersytetu im. A. Mickiewicza

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Barbary Flasz

pt. "Oddziaływanie tlenku grafenu i/lub kwasu askorbinowego na potencjał reprodukcyjny oraz ekspresję witellogenin u *Acheta domestica* z linii selekcyonowanych w kierunku różnej długości życia"

Przedstawiona do recenzji praca mgr Barbary Flasz została przygotowana w Zespole Nanotechnologii w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska UŚ w Katowicach pod kierunkiem pani prof. dr hab. Marii Augustyniak. Celem pracy było oszacowanie wpływu tlenku grafenu (GO) na potencjał reprodukcyjny i zawartość witellogenin u świerszcza domowego *Acheta domestica*, Badania wykonano na dzikiej i długowiecznej linii selekcyjnej owada podając wraz z pokarmem tlenek grafenu. Dodatkowo sprawdzono, jaki potencjał antyoksydacyjny niesie ze sobą podanie kwasu askorbinowego (witaminy C).

Tematyka rozprawy dotyczy bardzo aktualnej tematyki, istotnej zarówno ze względów poznawczych jak i aplikacyjnych. Uważany za materiał przyszłości grafen złożony z atomów węgla połączonych w sześciokąty przypominające plaster miodu o grubości jednego atomu jest nanomateriałem niezwykle wytrzymałym, o bardzo wysokiej przewodności, a jego właściwości dają możliwości zastosowania w nowoczesnych technologiach tj. produkcja nanokompozytów i elektronika. W dziedzinie medycyny grafen może być wykorzystywany jako nośnik leków, a także w regeneracji i różnicowaniu tkanek, czy leczeniu stanów zapalnych, charakteryzują go również silne właściwości antybakteryjne. Zalety tlenku grafenu doceniono dopiero w tym stuleciu, za co w 2010 r. Andre Geim i Konstantin Novoselov z Uniwersytetu w Manchesterze, otrzymali Nagrodę Nobla z fizyki.

Mimo iż z tlenkiem grafenu wiąże się olbrzymie nadzieje, jego oddziaływanie na środowisko oraz organizmy żywe nie jest do tej pory dobrze poznane. Kolejne badania wskazują na skutki uboczne stosowania grafenu, m.in. choroby płuc czy zanieczyszczenie wód. Dlatego też, podobnie jak w



przypadku innych nanocząsteczek ważne jest określenie zakresu toksyczności tlenku grafenu by bez szkody dla środowiska naturalnego i żyjących w nim gatunków wykorzystywać jego innowacyjny potencjał. Z punktu widzenia trwania i ciągłości gatunku, to niezaburzony wzrost i rozwój oraz wydawanie potomstwa odgrywają kluczową rolę. Dlatego też wybór tematu odnoszący się do wpływu tlenku grafenu na potencjał reprodukcyjny dobrze scharakteryzowanego organizmu modelowego jakim jest świerszcz domowy *A. domesticus* uważam z bardzo ciekawy i ważny. Badania te mogą ponadto stanowić pierwszy krok do badań toksykologicznych na ssakach.

Rozprawę doktorską stanowią trzy spójne tematycznie artykuły, opublikowane w latach 2020 - 2021 w międzynarodowych czasopismach indeksowanych w bazie JCR; w tym jedna wyróżniająca się praca opublikowana w *Science of The Total Environment* (200 pkt. MNiSzW). Chciałabym w tym miejscu podkreślić, że oprócz przedstawionych do rozprawy doktorskiej publikacji, w dorobku pani B. Flasz znajduje się 5 innych prac co wskazuje na ponadprzeciętną aktywność naukową i ogromną pracowitość Doktorantki.

W ramach rozprawy zostały przedstawione następujące publikacje:

Barbara Flasz , Marta Dziewięcka, Andrzej Kędziorski, Monika Tarnawska, Maria Augustyniak, **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*, 2020, 1;737:140274. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140274.

Barbara Flasz, Marta Dziewięcka, Andrzej Kędziorski, MonikaTarnawska, MariaAugustyniak **Multigenerational graphene oxide intoxication results in reproduction disorders at the molecular level of vitellogenin protein expression in *Acheta domesticus***, *Chemosphere*, 280, 2021, 130772, doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130772

Barbara Flasz, Marta Dziewięcka, Andrzej Kędziorski, MonikaTarnawska, Jan Augustyniak, Maria Augustyniak **Multigenerational selection towards longevity changes the protective role of vitamin C against graphene oxide-induced oxidative stress in house crickets**, 2021, *Environmental Pollution* 290:11799, doi: 10.1016/j.envpol.2021.117996

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF) powyższych publikacji wynosi 20,746, a liczba punktów MNiSW to 400.



Należy podkreślić, że we wszystkich publikacjach mgr Barbara Flasz jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym, ponadto deklarowany udział poszczególnych autorów w przedstawionych pracach wskazuje, że wkład Doktorantki w projektowanie badań, wykonanie eksperymentów oraz pisanie manuskryptów jest przeważający (84 - 92%).

W skład rozprawy doktorskiej, oprócz publikacji wchodzi: streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim, wprowadzenie obejmujące opis przedmiotu badań czyli tlenku grafenu, opis modelu badawczego – *A. domesticus*, Ponadto, Autorka wyodrębniła i jasno sformułowała cele badawcze (4), postawiła hipotezy badawcze (5), które w trakcie badań zweryfikowała oraz nakreśliła ogólny plan badań. Każdy rozdział, który stanowią poszczególne publikacje Doktorantka poprzedziła abstraktem graficznym. Po zaprezentowaniu publikacji składających się na dorobek autorki, znajdujemy podsumowanie najważniejszych osiągnięć, bibliografię na którą składa się 27 pozycji literaturowych oraz oświadczenia współautorów.

Ze względu na to iż prace zostały opublikowane w renomowanych czasopismach i poddane wnikliwej ocenie przez niezależnych recenzentów i ekspertów z dziedziny, którzy docenili wartość merytoryczną prezentowanych wyników, skoncentruję się jedynie na ogólnej ocenie wykonanych przez mgr Barbarę Flasz badań.

Głównym postawionym przez Doktorantkę celem było zweryfikowanie i oszacowanie toksyczności tlenku grafenu podawanego z pokarmem, w obecności i przy braku uznawanego za silny antyoksydant kwasu askorbinowego na potencjał reprodukcyjny oraz poziom witellogenin u *A. domesticus*. Badania przeprowadzono na liniach selekcyjnych świerszcza różniących się długością rozwoju ontogenetycznego: krótkowiecznych (K) i długowiecznych (D) oraz nieselekcyjowanej pod względem długowieczności linii dzikiej (H).

Badania zostały dobrze zaplanowane, a poszczególne cele badawcze zrealizowane przy zastosowaniu różnorodnych technik eksperymentalnych. W badaniach uwzględniono stężenie tlenku grafenu, oddziaływanie krótkiego i długiego czasu ekspozycji (intoksykacja przez 3 generacje), wiek owadów oraz wpływ kwasu askorbinowego na potencjał reprodukcyjny (poziom witellogenin), poziom stresu oksydacyjnego czy stabilność DNA. Realizując postawione zadania badawcze Autorka musiała posiadać znajomość wielu metod badawczych i technik laboratoryjnych takich jak: prowadzenie i monitorowanie hodowli selekcyjnych, preparacja tkanek owadzi (jelito, hemocyty, ciało



tłuszczowe), identyfikacja białek metodą Western Blot, ocena integralności DNA z wykorzystaniem testu kometkowego, ocena poziomu apoptozy i kondycji komórek metodą cytometrii przepływowej, pomiar aktywności enzymów antyoksydacyjnych metodami spektrofotometrycznymi, ocena poziomu apoptozy, czy określanie poziomu witellogenin metodą immunoenzymatyczną (ELISA), co świadczy o dużej wszechstronności Doktorantki w pracy doświadczalnej.

Pierwszym wyodrębnionym przez Doktorantkę celem badawczym było porównanie kondycji komórek, stabilności DNA i poziomu witellogenin między linią dziką (H), a długowieczną (D) po długotrwałym narażeniu na tlenek grafenu, a następnie porównanie parametrów w ww. liniach po 15 dniach od odstawienia pokarmu podawanego z GO. Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, że tlenek grafenu zaburza badane parametry w jelicie, hemocytach i ciele tłuszczowym już w niskich stężeniach 0.2 g/kg, przy czym efekty toksyczne są bardziej widoczne w linii dzikiej w porównaniu z linią długowieczną. Odstawienie skażonego pokarmu poprawia kondycję komórek, i pozwala wnioskować, że włączają się w komórce systemy obronne, niwelujące toksyczny efekt GO.

Drugim celem badawczym było sprawdzenie antyoksydacyjnego działania witaminy C po długotrwałej ekspozycji owadów na tlenek grafenu. Efekt leczniczy witaminy sprawdzono porównując kondycję komórek, stabilność DNA w hemocytach, poziom stresu oksydacyjnego, ilość białek - witellogenin w ciele tłuszczowym oraz wskaźnik rezerw energetycznych wyrażony jako stosunek ADP/ATP. Badania wykonane w obrębie tego zadania wykazały, że podawanie z pokarmem witaminy C nie wywołuje efektu prozdrowotnego, Autorka sugeruje, że sam mechanizm toksyczności GO może być bardziej złożony.

Trzecim wyodrębnionym celem badawczym było oszacowanie czy poziom witellogenin zmienia się w zależności od stężenia GO, czasu ekspozycji oraz wieku owadów (osobniki dorosłe młode i dorosłe stare). Uzyskane wyniki pokazują, że intoksykacja owadów GO przez 3 pokolenia zaburza procesy reprodukcji, powodując w 1 pokoleniu znaczny spadek witellogenin, w 2 pokoleniu wzrost witellogenin, w 3 pokoleniu natomiast następuje ustabilizowanie się poziomu białka wynikające prawdopodobnie z uruchomienia mechanizmów epigenetycznych.



Nawiązując do uzyskanych w pracy wyników chciałabym zapytać:

*- Jakie mechanizmy mogą odpowiadać za brak antyoksydacyjnego/ prozdrowotnego działania witaminy C, a wręcz wzmocnienia efektu cytotoksycznego GO u *A. domesticus*?. Czy efekt ten może być związany z naturą samego tlenku grafenu, czy też pro- lub antyoksydacyjne właściwości kwasu askorbinowego będą zależne od typu tkanki i/ lub kondycji komórek? Czy jednoczesne podawanie GO i wit. C wzmocniłoby jej efekt ochronny?*

- Czy owady, do których pożywienia podawano pokarm z witaminą C chętnie go jadły i nie traciły wagi w stosunku do owadów kontrolnych?

- Jak wygląda perspektywa dalszych badań nad oddziaływaniem GO na organizmy żywe? Czy w przyszłości możliwe będzie stosowanie tlenku grafenu np. w regulacji populacji szkodników?

Podsumowując, przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską pani mgr Barbary Flasz oceniam wysoko. W trakcie realizacji pracy otrzymała ona oryginalne wyniki, zawierające elementy nowości naukowej i opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych, które przybliżają nas do wyjaśnienia mechanizmów toksyczności GO. Praca doktorska wskazuje na bogaty warsztat badawczy Autorki, dużą samodzielność oraz ogólną i specjalistyczną wiedzę. Drobne błędy i niedociągnięcia, niefortunne sformułowania w tekście (tj. ekspresja białka, sam termin ekspresja stosuje się zwykle do genu, do białka - ilość lub poziom) nie wpływają na pozytywną ocenę merytoryczną całego projektu.

Rozprawa doktorska mgr Barbary Flasz spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595), z późniejszymi zmianami z dnia 18.03.2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz.455), w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669). W związku z powyższym wnioskuję do Rady IBBiOŚ o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na wysoką merytoryczną wartość pracy wnoszę o jej wyróżnienie.