



Kraków 07.07.2024

Dr hab. inż. Roman Major prof. PAN

Instytut Metalurgii i Inżynierii Materiałowej PAN

Ul. Reymonta 25, 30-059 Kraków

### RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Kingi Surmiak- Stalmach pt. „Ocena parametrów komórkowych wybranych narządów oraz fizykochemicznych właściwości przędzy łownej samicy pająka *Steatoda grossa* (Theridiidae) w aspekcie krótko- i długoterminowej ekspozycji na nanocząstki srebra”

Srebro było stosowane od wieków w leczeniu różnych chorób, od zwykłego przeziębienia po raka. Ze względu na swoje działanie przeciwdrobnoustrojowe srebro jest nadal wykorzystywane w produktach do miejscowego leczenia przeciwdrobnoustrojowego, np. w srebrnych opatrunkach na rany. Jednak stosowanie ogólnoustrojowe zostało zakazane w UE jako nieskuteczne i potencjalnie toksyczne (dyrektywa UE 2002/46/WE). Chociaż nanocząstki srebra (AgNP) są skuteczne przeciwko bakteriom, a także niektórym grzybom i wirusom, bakterie mogą stać się odporne na srebro. Toksyczność AgNPs jest spowodowana kilkoma mechanizmami i została szczegółowo omówiona w wielu publikacjach. Ważnym mechanizmem działania przeciwdrobnoustrojowego AgNPs jest silna aktywność oksydacyjna spowodowana obfitym uwalnianiem jonów srebra ( $Ag^+$ ), co jest również podstawą jego toksyczności w różnych narządach. Jednak do tej pory nie było jednoznacznych stwierdzeń na temat ich toksyczności ze względu na brak badań nad losem AgNP w warunkach laboratoryjnych. Zasugerowano trzy główne mechanizmy wyjaśniające toksyczność AgNP: (1) AgNP mogą bezpośrednio uszkadzać błony komórkowe ze względu na rozmiar nano (wpływ fizyczny), (2) AgNP i jony srebra generują reaktywne formy tlenu (ROS) oraz (3) AgNP mogą uwalniać jony Ag. Ten ostatni mechanizm został zasugerowany w wielu badaniach. Niektórzy badacze sugerują, że AgNP mogą służyć jako "koń trojański", omijając wspólne bariery, uwalniając jony  $Ag^+$  i powodując uszkodzenia komórek. AgNPs są przekształcane z formy Ago do formy rozpuszczania lub jonizacji ( $Ag^+$ ).

Praca ma charakter podstawowy, jednak rozwijane narzędzie badawcze z wykorzystaniem modelu pająka daje tej pracy mocną i ciekawą przesłankę aplikacyjną. Rozwijane są zagadnienia dotyczą wykorzystania modelu pająka do oceny wpływu toksycznego jonów srebra na

otaczające środowisko. Aktualnie problem ochrony środowiska i wpływu środowiska na ludzi jest bardzo szeroko omawiany. Obserwowane katastrofy ekologiczne powodujące powstanie ciężkiego uszczerbku na zdrowiu stanowią duży problem obecnego Świata.

W ramach realizacji pracy, przeprowadzono badania kumulacji jonów  $Ag^+$  na tkanki oraz wytwarzaną sieć. W części eksperymentalnej wykorzystano narzędzie biologiczne jakim jest pająk do oceny wpływu toksycznego jonów srebra, Jest to bardzo ciekawe i zarazem nowatorskie podejście do przedstawionego problemu. Jednak, jak autorka zaznaczyła pająk jest idealnym modelem do przeprowadzenia tego typu eksperymentów ze względu na powszechność występowania oraz to że stanowią ważną część łańcuchów pokarmowych w ekosystemach lądowych.

Praca zawiera 149 stron z wykazem bibliograficznym. Część teoretyczną oraz aktualny stan wiedzy z zakresu pracy oparto na 336 pozycjach literaturowych. Praca ma typowy układ prac doktorskich. Składa się z sześciu głównych rozdziałów oraz dwóch rozdziałów dodatkowych. Wykaz bibliograficzny i aneks zawierający statystyki opisowe. Część teoretyczna została przedstawiona na 55 stronach. Pozostała część pracy dotyczy opisu zastosowanego materiału badań, metodyki badań, wyników i dyskusji oraz zawiera podsumowanie i wnioski.

#### Ocena części teoretycznej:

Część teoretyczna pracy została przygotowana na podstawie bardzo rzetelnych studiach literaturowych liczących 336 pozycji. Dogłębne przeanalizowanie tematyki stanowiło podwaliny do przygotowania pracy i zaproponowania metody badawczej. Do tej części mam jedynie takie zastrzeżenie, że pozycje literaturowe, które zacytowano w pracy są już dość stare, głównie pomiędzy 2013 a 2019. Znalazłem niestety tylko nieliczne pozycje napisane po roku 2020. W danych bibliograficznych można też znaleźć liczne prace promotorki pracy oraz wspólne prace Pani Promotor z Doktorantką. Na tej podstawie można stwierdzić, że praca zrealizowana została w zespole, który posiada wieloletnie doświadczenie w tej dziedzinie co oceniam bardzo pozytywnie. Praca jednak w zespole o wysokiej renomie to nie wszystko. Zaangażowanie i chęć poznawcza Doktoranta to drugi element sukcesu. W ocenianej pracy, od początku czytelnik wprowadzany jest kolejno w zagadnienie i problematykę badań. Użyty język jest prosty co powoduje, że przedstawiony do oceny tekst jest łatwy do zrozumienia przez czytelnia nie związanego z tematyką. W mojej ocenie jest to duży plus. Sztuką jest przedstawić skomplikowane zagadnienie w sposób czytelny i przejrzysty. W ocenianej pracy tą cechę jak najbardziej dostrzegam. Wiele słyszy się o zastosowaniach srebra w przemyśle, zwłaszcza stosowanego jako ochrona przeciwbakteryjna, ale niewiele osób zdaje sobie sprawę z jego szkodliwości. Ostatni rozdział części teoretycznej wprowadza czytelnia do sedna zagadnienia, czyli do opracowanego modelu badawczego w postaci modelu pająka w badaniach ekotoksykologicznych. Część teoretyczną jako całość oceniam bardzo wysoko jednak mam dwie uwagi.

- **Studia literaturowe wpływu toksycznego na komórki ludzkie oparto głównie na komórki linii nowotworowych. Czy nie jest to zbyt duże uproszczenie? Czy w literaturze nie przedstawiono wpływu nanocząstek srebra na komórki zdrowe?**
- **Stwierdzono, że dane literaturowe dowodzą, że na toksyczność nanocząstek ma ich wielkość. Jaki zakres jest najbardziej toksyczny i czy to koreluje z uzyskanymi wynikami i ogólnie przyjęta definicją nanomateriału?**

Ocena części dotyczącej celu i hipotez badawczych:

Kolejna polemika dotyczy sformułowania celu. Cel, wg wytycznych [DIN 69905] jest to weryfikowalny efekt i/lub żądanie zrealizowania całego zakresu zadań w projekcie. Aby umożliwić dokonanie skutecznej weryfikacji powodzenia pracy lub projektu, musi on być kwantyfikowalny, tj. mierzalny, ponieważ cele są pomocne jedynie wtedy, gdy można je przekształcić w zdefiniowane cele ilościowe. Oczywiście jest, że poprawnie zdefiniowane muszą one być także osiągalne. Na podstawie tej definicji wg Stowarzyszenia Project Management Polska, uważam, że zaproponowane cele powinny być sklasyfikowane wg następującej nomenklatury: wyznaczenie celu głównego, czyli tego, który stanowi całość pojedynczych celów związanych z efektem projektu i przebiegiem zadań, definiowanych jako produktowe. Zgodnie z wytycznymi IPMA Polska mamy do czynienia z jednym celem głównym, który jest osiągalny poprzez osiągnięcie celów produktowych. **Dlatego sugerowałbym zmienienie celu z formy „sprawdzenia...” na formę bardziej wymierną. Czy cel pracy nie jest celem głównym? Dlaczego sformułowano cele zasadnicze i czy nie powinny one być zdefiniowane jako cele produktowe?**

Ocena części doświadczalnej:

Część doświadczalna pracy została przedstawiona bardzo czytelnie. W pierwszej części opisano dokładnie materiały i metody. W tym miejscu mam drobną uwagę, **wzmianka o tym rozdziale powinna się pojawić również w spisie treści**. Pozostałe uwagi mają charakter jedynie polemiczny biorąc pod uwagę, zwłaszcza, bardzo wysoki poziom merytoryczny pracy. Sugerowałbym, aby rozdział 3.1 umieścić w opisie teoretycznym. Jest to rozdział, który odbiega charakterem od pozostałych podrozdziałów w tej części i ma formę bardziej opisową, wprowadzającą w zagadnienie, niż formę opisu doświadczenia. Pozostałe rozdziały, dotyczące materiałów i metod, przygotowane zostały wg mnie perfekcyjnie. Zwykle oceniając tą część pracy zastanawiam się, czy eksperyment opisany przez autora można powtórzyć, czyli czy praca ma charakter dydaktyczny i czy kolejne pokolenia naukowców pracujące w podobnej tematyce będą mogły skorzystać z wiedzy i doświadczeń obecnych. W tej pracy doświadczenie i metodyka przedstawione zostały czytelnie i bardzo dokładnie z uwzględnieniem szczegółów eksperymentu. Wszystkie opisy zostały wzbogacone o cenne ilustracje. Zakres badań jest imponujący, co jest dowodem

chęci bardzo dogłębnego zrozumienia problemu pracy. Mam jedynie pytanie dotyczące preparatyki do skaningowego mikroskopu elektronowego:

- **Dlaczego po odwodnieniu, jako warstwę przewodzącą zastosowano czysty Au, a nie, jak wskazują inne źródła literaturowe Au/Pd?**
- **Czy badania SEM są wystarczająco wiarygodne w celu oceny architektury sieci? Sugerowałbym analizy tomograficzne, składu fazowego.**
- **W pracy omawiany jest wpływ fazy krystalicznej na fazę amorficzną i uważam że badania przy zastosowaniu skolimowanej wiązki rentgenowskiej lub wiązki synchrotronowej mogłyby stanowić cenne źródło informacji.**
- **Czy w przypadku zanieczyszczeń jonami srebra mogą zmieniać się właściwości mechaniczne sieci i czy lepkość włókien też może się zmienić? Jeżeli tak, to sugerowałbym badania mechaniczne i mikromechaniczne.** W dyskusji jest mowa o tego typu badaniach, natomiast w pracy wyniki te nie są zauważalne.

Z uwagi na bardzo szeroki zakres pracy uwagi te mają jednak charakter polemiczny, a nie wskazują na jakiegokolwiek braki. Chciałbym podkreślić, że praca ma charakter interdyscyplinarny, gdzie autorka przeprowadziła ocenę wpływu nanocząstek na żywotność komórek w wybranych narządach, ocenę ilościową białek metaloproteinowych, ocenę ultrastruktury komórek w wybranych tkankach, skład aminokwasów w przędzy łownej, architektury sieci i kaloryczności sieci łownych. W tym miejscu pojawiają się kolejne pytania:

- **Czy metody immunofluorescencyjne nie mogłyby dać dodatkowych informacji o strukturze komórek?**
- **Czy oprócz wyglądu morfologii komórki, na zastosowanym modelu, można zobaczyć wpływ cyto i genotoksyczny?**
- **Jak model pająka można odnieść do osobnika ludzkiego?**

Bardzo cennym i ciekawym rozdziałem w ocenianej pracy jest „Dyskusja”. Dyskusję podzielono dodatkowo na podrozdziały dotyczące wyników dotyczących stężenia srebra w ciałach pająków, parametry antyosydacyjne i efekt cytotoksyczny, ocenę ultrastruktury hemolimfy i gruczołów przędných i właściwości fizykochemiczne.

#### Wnioski:

W ostatnim rozdziale Doktorantka przedstawiła wnioski z przeprowadzonych badań. Nie mam uwag do tej części pracy. Należy jedynie podkreślić, że Doktorantka w sposób prawidłowy rozumie pojęcie „wniosek”. W ocenianej pracy doktorskiej w rozdziale „Wnioski” przytoczono nie tylko obserwacje, ale również komentarz, co z tego wynika.

#### Ogólna ocena pracy:

Praca doktorska pt. „Ocena parametrów komórkowych wybranych narządów oraz fizykochemicznych właściwości przędzy łownej samic pająka *Steatoda grossa* (Theridiidae)

w aspekcie krótko- i długoterminowej ekspozycji na nanocząstki srebra” autorstwa mgr Kingi Surmiak-Stalmach przedstawia ciekawe opracowanie naukowe dotyczące rozwoju dziedziny biologii w ujęciu nanotechnologii. Udało się opracować bardzo ciekawy model oceny wpływu nanocząstek na środowisko, a w przede wszystkim, na organizmy żywe. Pomimo uwag, jedynie natury polemicznej, uważam, że praca jest przygotowana czytelnie i bardzo starannie. Wyniki badań są unikatowe i bardzo ciekawe. Imponujący jest wachlarz zastosowanych metod, które zrealizowano w taki sposób, że wyniki badań uzupełniają się i ogólnie stanowią spójną całość. Moja ocena pracy jest wysoka. Recenzent stwierdza, że przedstawiona praca doktorska odpowiada wymogom stawianym do uzyskania stopnia naukowego doktora nauk biologicznych przez Ustawę z dnia 20 lipca 2018 (Dz.U. z 2020 r. poz.85 z późniejszymi zmianami).

**Wnoszę o dopuszczenie mgr Kingi Surmiak- Stalmach do obrony przed Radą Wydziału Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Zważywszy na wysoki poziom pracy wnoszę równocześnie o jej wyróżnienie.**

**Dr hab. inż. Roman Major prof Instytutu**