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

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr Reyhaneh Seyed Alian

pt "The effect of graphene oxide, silver nanoparticles and graphene oxide-silver nanoparticles composite on the nutritional functions of *Acheta domesticus*"

wykonanej pod opieką promotora

Pani prof. dr hab. Marii Augustyniak,

zrealizowanej w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

Informacje ogólne

- Recenzja, przedstawionej mi do oceny pracy, została przygotowania na podstawie pisma Pana prof. dr hab. Mariusza Konturskiego – dyrektora Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych, z dnia 26.05.2025.

Rozprawa doktorska stanowi zwarte opracowanie, przygotowane w języku angielskim, liczące 142 strony. Dysertacja podzielona została na części; A. General information, B. Thesis description, C. Manuscripts included in the doctoral dissertation. W pracy uwzględniono również: Aknowledgements, Streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim. Część A zawiera listę publikacji, wchodzącą w zakres pracy, listę pozostałych publikacji oraz wykaz konferencji, projektów, stypendiów, kursów i nagród, które uzyskała Kandydatka. Część B pracy stanowi syntetyczny opis podjętych w pracy badań. Część C stanowi zbiór publikacji, które stanowią podstawę pracy doktorskiej wraz z deklaracjami współautorów. Formalna strona pracy mgr Reyhaneh Seyed Alian jest poprawna, zawiera wszystkie niezbędne elementy i nie budzi zastrzeżeń.

Merytoryczna ocena pracy

Rozwój nanotechnologii umożliwił zastosowanie nowatorskich metod leczenia, a w tym terapii celowanej, powstanie zaawansowanych leków, zwłaszcza zastępujących antybiotyki, produkcję nowoczesnych środków opatrunkowych, co pozwoliło na zmniejszenie cierpienia pacjentów i zwiększenie skuteczności leczenia. Nanotechnologiczne „wynalazki" dotyczą również wielu innych dziedzin życia, pozwalając na wprowadzenie nowatorskich materiałów do różnych sektorów przemysłu. Niestety, istnieje również ogromne źródło nanocząstek / nanomateriałów, pochodzenia antropogenicznego, które powstają w sposób niezamierzony, a co gorsza niekontrolowany prowadząc do poważnych negatywnych skutków dla człowieka i jego środowiska. Co więcej, zamierzona i celowa produkcja nanocząstek i nanokompozytów, a między innymi do celów medycznych, rolniczych i spożywczych również jest źródłem ich uwolnienia do środowiska. Wymienione problemy niezbicie wskazują, że podjęte badania są celowe, niezwykle potrzebne i interesujące.

Dysertacja doktorska jest oparta o cykl 3 publikacji, zamieszczonych w dobrych i bardzo dobrych czasopismach, wszystkich indeksowanych w Web of Science i obecnych na liście MNiSW. Kandydatka jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach. Jakkolwiek, prace te zostały pozytywnie zrecenzowane w procesie wydawniczym, nie mniej pozwolę sobie na kilka subiektywnych uwag.

Publikacja 1

Reyhaneh Seyed Alian, Marta Dziewięcka, Andrzej Kędziorski, Łukasz Majchrzycki, Maria Augustyniak, Do nanoparticles cause hormesis? Early physiological compensatory response in house crickets to a dietary admixture of GO, Ag, and GOAg composite, Science of The Total Environment, Volume 788, 2021,147801.

Celem, podjętych przez Kandydatkę badań było określenie wpływu diety, zawierającej tlenek grafenu (GO), nanocząstki srebra (AgNP) i kompozyt GO-AgNP na wybrane wskaźniki metabolizmu. Niewątpliwie, należy podkreślić zastosowanie bardzo dobrego modelu - świerszcza domowego i sprawne zastosowanie tego modelu w badaniach. Kandydatka uzyskała interesujące wyniki, w części nowatorskie, wnosząc do wiedzy na temat toksyczności nanocząstek Ag i GO nowe ciekawe spostrzeżenia. Zdaniem recenzenta, bardzo interesująca część badań dotyczyła oceny aktywności panelu enzymów świerszcza pod wpływem zastosowanych nanocząstek. Nie mniej, nasuwają się pytania, a mianowicie:

Na jakiej podstawie wybrano poziom nanoczastek Ag i GO oraz stosunek Ag do GO w kompozycie?

Na zdjęciach z SEM nanocząstki Ag występują jako duże aglomeraty, a na wykresie DLS jako bardzo małe nanocząstki, skąd taka różnica? Czy określono potencjał zeta oraz pH zastosowanych koloidów?

Jakimi metodami wyprodukowane zostały nanocząstki? Chemiczne metody produkcji mogą wprowadzać zanieczyszczenia (związki używane w procesie syntezy), co należałoby skontrolować analitycznie.

Czy zdaniem kandydatki efekt korony białkowej, który prawdopodobnie ma miejsce podczas mieszania z pokarmem i podczas pasażu pokarmu przez przewód pokarmowy, mógł modyfikować procesy trawienne i wchłanianie nanocząstek ?

Publikacja 2

Seyed Alian R, Flasz B, Kędziorski A, Majchrzycki Ł, Augustyniak M. Concentration- and Time-Dependent Dietary Exposure to Graphene Oxide and Silver Nanoparticles: Effects on Food Consumption and Assimilation, Digestive Enzyme Activities, and Body Mass in Acheta domesticus. Insects. 2024; 15(2):89.

Badania, zaprezentowane przez Kandydatkę w publikacji 2, stanowią kontynuację eksperymentów przeprowadzonych uprzednio i przedstawionych w publikacji 1. Konsekwentnie, analizowano problem potencjalnego zaburzenia procesów trawiennych i wzrostu świerszcza w wyniku pobrania nanocząstek Ag i GO. Badania również zostały przeprowadzone na modelu Acheta domesticus. Uzyskane wyniki wskazują niezbicie na dawko zależny charakter aktywności Ag i GO i potwierdzają badania prowadzone na innych modelach biologicznych o niewielkiej lub braku toksyczności Ag i GO, stosowanych w niskich stężeniach. Bardzo ciekawy wynik dotyczył modyfikacji procesów trawiennych, a mianowicie stymulację trawienia węglowodanów i lipidów, a hamowanie trawienia białek przez nanocząstki Ag i w mniejszym stopniu przez GO. Kolejnym ciekawym wynikiem jest fakt braku liniowej zależności masy ciała, spożycia i zmiany asymilacji od stężenia AgNP w pożywieniu. Wydaje się, że trafna jest hipoteza Kandydatki, że większe stężenia nanocząstek sprzyjają ich aglomeracji, a aglomeraty mogą nie wykazywać cech charakterystycznych dla nanocząstek i w konsekwencji indukować zmniejszoną lub zwiększoną toksyczność. Wielokrotnie obserwowaliśmy ten efekt w badaniach naszego zespołu. Obserwacje te stanowią kolejny dowód na fakt, że nanocząstki wymagają odmiennych procedur badawczych w porównaniu do tradycyjnie stosowanych w

badaniach biologicznych i medycznych, a zwłaszcza typu „dose response". Należy podkreślić, że Kandydatka zwróciła uwagę na ten fakt, w swoich badaniach z zastosowaniem modelu świerszcza, po raz pierwszy. Bardzo ciekawy wynik dotyczy również wpływu badanych nanocząstek, a zwłaszcza GO na status komórek przewodu pokarmowego i aktywności enzymów trawiennych. Co więcej, należy podkreślić, że przeprowadzona dyskusja wyników opublikowanych w publikacji 2 jest wszechstronna i wyczerpująca, zwłaszcza, że wyniki nie były łatwe do interpretacji i uogólnienia. Wiedza i umiejętność logicznego i syntetycznego myślenia, co znalazło odzwierciedlenie w przeprowadzonej dyskusji są wyróżniające.

Moje wątpliwości dotyczą jedynie badania potencjału zeta i braku badania dystrybucji nanocząstek metodą DLS.

Pytanie, które również nasuwa się w kontekście przeprowadzonych badań, brzmi następująco: Czy i w jaki sposób zastosowane czynniki doświadczalne (Ag i GO) mogły wpłynąć na mikrobiom, zwłaszcza mikroflorę przewodu pokarmowego świerszcza, co w konsekwencji może determinować metabolizm, wzrost i rozwój.

Publikacja 3

Alian, R.S., Flasz, B., Kędziorski, A., Rost-Roszkowska M., Rozpedek K., Majchrzycki Ł., Augustyniak M.Concentration-dependent disturbances of digestive functions in house cricket (Insecta: Orthoptera) exposed to GO-AgNP composite. Sci Rep ***15****, 12699 (2025)*

Badania i ich wyniki zamieszczone w Publikacji 3 są logiczną konsekwencją konkluzji zawartych w publikacji drugiej i wraz z publikacją pierwszą tworzą powiązany tematycznie, spójny i logiczny cykl badań. Należy podkreślić systematyczną kontynuację badań z uwzględnieniem modelu świerszcza, co zważywszy na osiągnięcia i doświadczenie Promotora w tym zakresie, zasługuje na wyróżnienie. Celem badań, przedstawionych w publikacji 3 było określenie wpływu kompozytu GO i nanocząstek Ag na status fizjologiczny i morfologiczny przewodu pokarmowego Acheta domesticus podczas długotrwałej ekspozycji. Kandydatka uzyskała wiele interesujących wyników, stwierdzając, że stężenie i czas ekspozycji istotnie wpłynęły na stan oksydacyjny, aktywność enzymów i morfologię komórek jelita. Interesujące wyniki dotyczyły stwierdzenia zależności obserwowanych zaburzeń funkcjonowania przewodu pokarmowego od czasu ekspozycji. Kandydatka słusznie zwróciła uwagę na mnogość czynników, które mogły modyfikować stan fizyko-chemiczny kompozytu GO-AgNP w jelitach, a tym samym jego biointerakcję i toksyczność. Jakkolwiek, w świetle wielu badań wydaje się, że wiązanie (prawdopodobnie oddziaływanie van der waalsa) pomiędzy GO i Ag jest raczej

stabilne, to jednak nasuwa się pytanie czy silne właściwości sorpcyjne GO i zdolność do uwalniania jonów przez nanocząstki Ag (nawet jeśli są związane z GO) mogły wpływać na procesy zachodzące w jelicie świerszcza?

Kandydatka, w sposób dojrzały przeprowadziła dyskusję wyników uzyskanych w doświadczeniach opisanych w publikacji 3. Proponowane mechanizmy i hipotezy, związane z generowaniem przez kompozyt stresu oksydacyjnego i jego fizjologicznymi konsekwencjami wydają się prawdopodobne. Nie mniej, należy pamiętać, że interakcja nanocząstek z organizmem jednokomórkowym, jakim są bakterie a komórkami tworzącymi tkankę jest zdecydowanie odmienna. Szkoda, że nie udało się zidentyfikować nanocząstek w obrazie TEM ultrastruktury komórek jelita, gdyż to wyjaśniłoby wiele kwestii, które na tym etapie badań muszą pozostać na poziomie hipotezy. Wiadomo, że GO i nanocząstki Ag są pobierane przez komórki zwierzęce poprzez różne ścieżki endocytozy, a między innymi zależy to od ich morfologii i modyfikacji ich powierzchni, co w konsekwencji decyduje o toksyczności tych nanostruktur. Kandydatka słusznie zwróciła uwagę, że toksyczność GO-AgNP zależy od czasu jego podawania, co więcej zasugerowała również, że wpływ zastosowanej dawki na obserwowane wskaźniki nie był jednoznaczny, jednak mógł być związany z kumulowaniem się nanocząstek w wyniku długości czasu ekspozycji. Uważam, że dyskusja wyników, które uzyskała Kandydatka jest odważna, wielokierunkowa, ale pomimo wszystko bardzo wyważona. Bardzo pozytywnie oceniam tę część pracy.

Z obowiązku recenzenta, muszę stwierdzić, że pewien niedosyt budzi bardzo skromna charakterystyka nanostruktur, zwłaszcza w kontekście tego, że toksyczność zarówno nanocząstek Ag, jak też GO oraz ich kompozytu znacząco zależy od ich wielkości, kształtu, modyfikacji powierzchni. Toksyczność Ag istotnie zależy od wielkości nanocząstek (DLS, TEM), natomiast niezwykle ważną cechą GO jest identyfikacja grup obecnych na powierzchni (FTiR), a także stabilność koloidu Ag, GO i kompozytu (potencjał zeta). Charakterystyka nanomateriałów przedstawiona przez Kandydatkę jest bardzo pobieżna i nieprecyzyjna. Uważam, że stwierdzenie toksyczności musi odnosić się do precyzyjnie określonej charakterystyki nanocząstek, czyli co najmniej wielkości, kształtu i charakterystyki powierzchni nanostruktur. Wiadomo, że chociażby różnica wielkości nanoczastek Ag (np. 100 nm vs. 1 nm) definitywnie zmienia ich toksyczność.

Część dysertacji „B" stanowi opis przeprowadzonych badań, zaprezentowanych w formie publikacji, w którym Kandydatka przeprowadziła ich syntezę. Wymieniona część pracy

została podzielona na: Introduction, Research aims and hypothesis, Research methodology, Discussion of the most important research results, Conclusions, References. Należy podkreślić, że ta część pracy została bardzo dobrze przygotowana. Jest ona zarówno uzupełnieniem informacji przedstawionych w publikacjach, zwłaszcza zawartych we Wstępie, jak również pozwala na przedstawienie szczegółowych celów, hipotez i dokonanie syntezy wyników. Bardzo dobrze zaprezentowany został „Model of experiments" w formie graficznej. Konkluzje zostały przedstawione w sposób bardzo dojrzały i wyważony, świadczący o dużej wiedzy i dojrzałości naukowej Kandydatki. Nie mniej uważam, że ta część pracy powinna być zakończona wnioskami końcowymi, jak również uważam, że stwierdzenie toksyczności lub jej braku musi być odnoszone do zastosowanych nanostruktur (wielkość, kształt). Poza tym tę część pracy oceniam bardzo dobrze i jako recenzent nie mam uwag.

Podsumowując recenzję, uważam, że cykl powiązanych tematycznie publikacji, opatrzonych syntetycznym opisem, scalającym zawartą w publikacjach tematykę został bardzo dobrze przedstawiony, zawiera liczne elementy nowatorskie, doskonale opisane i przedyskutowane. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie interesującego modelu biologicznego in vivo, z uwagi na fakt, że większość badań prowadzi się na liniach komórkowych, metodą in vitro, co nie daje pełnego obrazu odziaływań biologicznych. Ponadto, badania biologiczne przeprowadzono i opisano bardzo skrupulatnie i rzetelnie, z zastosowaniem adekwatnych i nowoczesnych metod i technik badawczych. Uzyskane wyniki wnoszą elementy nowatorskie do zakresu badań biologicznych, a zwłaszcza w zakresie ekotoksykologii, oraz badań medycznych.

Podsumowanie recenzji

Badania, jakie podjęła mgr Reyhaneh Seyed Alian w pracy pt "The effect of graphene oxide, silver nanoparticles and graphene oxide-silver nanoparticles composite on the nutritional functions of *Acheta domesticus*", wykonanej pod opieką promotora Pani prof. dr hab. Marii Augustyniak, zrealizowanej w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pozwoliły na uzyskanie wielu cennych obserwacji, w części o charakterze nowatorskim. Liczne i dobrze udokumentowane wyniki stanowią niewątpliwie znaczące osiągnięcie, wnoszące nowe wartości do rozwoju nauk biologicznych. Bardzo pozytywnie oceniam dysertację naukową mgr Reyhane Seyed Alian, a zawarte w recenzji uwagi stanowią jedynie podstawę do naukowej dyskusji. Rozprawa doktorska mgr Reyhane Seyed Alian spełnia wymagania prawne w kwestii nadania stopnia

doktora zawarte w art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 roku poz. 1571). Niniejszym, przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach wniosek o dopuszczenie mgr Reyhaneh Seyed Alian do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuję również o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Reyhaneh Seyed Alian pt "The effect of graphene oxide, silver nanoparticles and graphene oxide-silver nanoparticles composite on the nutritional functions of *Acheta domesticus*", wykonanej pod opieką promotora Pani prof. dr hab. Marii Augustyniak, zrealizowanej w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach z uwagi na wysoki merytoryczny poziom badań i uzyskanie nowatorskich wyników, pozwalających na rozwój nauk biologicznych w Polsce i na świecie.

Ewa Sawosz Chwalibóg, 11.07.2025