

Kielce, 17 maja 2018 r.

Prof. dr hab. Anna Lankoff
Zakład Radiobiologii i Immunologii
Instytut Biologii
Uniwersytet Jana Kochanowskiego
w Kielcach

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ
Pani mgr inż. Agnieszki Kozłowskiej
pt.: Biopaliwa jako środowiskowe zagrożenie zdrowia – analiza właściwości mutagennych i
cytotoksycznych ekstraktów organicznych wybranych mieszanek biodiesla

Przedłożona mi do oceny praca doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Kozłowskiej stanowi zwarte opracowanie liczące 181 stron, zawierające 33 rysunki i 31 tabel. Praca doktorska została przygotowana w języku polskim, a jej struktura jest standardowa i charakterystyczna dla prac doktorskich. Opracowanie podzielono na następujące rozdziały: wstęp (poświęcony klasyfikacji biopaliw, metodom ich otrzymywania, charakterystyce zanieczyszczeń emitowanych ze spalania biopaliw oraz ich wpływu na środowisko i zdrowie ludzi, monitoringowi biologicznemu oraz testom stosowanym w badaniach negatywnego oddziaływania ksenobiotyków), cel pracy, materiały i metody (obejmujące charakterystykę biologicznego materiału badawczego, charakterystykę ekstraktów organicznych z różnych mieszanek biopaliw, badania mutagenności i cytotoxyczności ekstraktów organicznych oraz zastosowane metody statystyczne), wyniki, dyskusja, wnioski, wykaz piśmiennictwa oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Opracowanie stanowi logicznie skonstruowaną całość, pozwalającą na ocenę spójności badań i sformułowanie syntetycznych wniosków. Opis doświadczeń jest wystarczająco szczegółowy (a nawet zbyt szczegółowy), aby można było ocenić stronę doświadczalną. Literatura przedmiotu jest bardzo dobrze dobrana. Autorka wybrała 246 pozycji, nie ograniczając się do prac najnowszych. Język pracy jest poprawny, a zakres przeprowadzonych badań oraz dyskusja i wnioski przedstawione są klarownie. Cel pracy został sprecyzowany jasno i konkretnie. Treść założeń, rozumowań i wniosków jest jednoznaczna i stąd dobrze zrozumiała. Praca od strony edytorskiej jest bardzo starannie opracowana, a układ graficzny i rozplanowanie tekstu zasługują na bardzo dobrą ocenę.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest ocena właściwości mutagennych i cytotoxycznych ekstraktów organicznych z fazy cząsteczkowej, generowanej podczas spalania wybranych mieszanek biopaliw do silników Diesla. Problematyka podjęta przez Doktorantkę jest bardzo aktualna, ważna i ciekawa, zarówno z poznawczego punktu widzenia jak również z punktu widzenia praktycznego wykorzystania uzyskanej wiedzy do projektowania nowych biopaliw, bezpieczniejszych dla zdrowia człowieka i środowiska.

Zanieczyszczenie powietrza atmosferycznego jest w obecnych czasach jednym z poważniejszych problemów współczesnej cywilizacji, a jego źródłem są głównie procesy niepełnego spalania związków organicznych i wysokotemperaturowe procesy spalania i przeróbki paliw kopalnianych. Spalanie i przeróbka paliw kopalnianych prowadzi natomiast do znacznej emisji gazów cieplarnianych, a w konsekwencji do zmian klimatycznych. W związku z tym, jak najbardziej zrozumiała jest pilna potrzeba poszukiwania nowych paliw o dużym potencjale redukcji dwutlenku węgla. Uważa się, że takie warunki mogą spełniać biopaliwa. Choć biopaliwa obecnie używane są w stosunkowo niewielkim stopniu w Europie (7%), Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2015/1513 z dnia 9 września 2015 roku zakłada stopniowe zwiększanie ich udziału, aż do uzyskania 20% w 2020 roku i zastępowanie biopaliw I generacji biopaliwami II generacji. Niestety, pomimo tych zaleceń, problemem, który nie został wciąż dostatecznie zbadany i rozwiązany jest toksyczność emisji gazowych i cząsteczkowych, generowanych podczas spalania biopaliw. Choć ich ilość może być częściowo zredukowana za pomocą filtrów cząstek stałych i katalizatorów, obecnie brak jest wiedzy na temat zależności pomiędzy zawartością i rodzajem biokomponentu w biopaliwie, a jego składem chemicznym, toksycznością oraz potencjalnym zagrożeniem dla zdrowia ludzi i środowiska. Właśnie powyższej problematyki dotyczy przedstawiona mi do oceny praca doktorska.

Autorka postawiła sobie cztery zasadnicze cele:

1. przygotowanie próbek organicznych ekstraktów ze spalania oleju napędowego i mieszanek o różnym składzie procentowym biokomponentu oraz poddanie ich analizie chemicznej,
2. określenie jakościowego i ilościowego składu zanieczyszczeń odpowiadających za toksyczne właściwości badanych biopaliw,
3. zbadanie efektu mutagennego organicznych ekstraktów ze spalania wybranych biopaliw przy użyciu testu Amesa w wariancie z aktywacją oraz bez aktywacji metabolicznej,
4. zbadanie cytotoksyczności organicznych ekstraktów ze spalania wybranych biopaliw przy użyciu testu Trypan Blue oraz testu MTT.

Przedmiot badań stanowiło sześć rodzajów paliw: B0 (100% olej napędowy), B100 (100% FAME, metylowe estry kwasów tłuszczowych), B7 (mieszanka w składzie 7% FAME + 93% olej napędowy), B15 (mieszanka w składzie 15% FAME + 85% olej napędowy), B30 (mieszanka w składzie 30% FAME + 70% olej napędowy) oraz HVO30 (mieszanka w składzie 30% uwodornionych olejów, HVO + 70% olej napędowy). Powyższe paliwa i ich mieszanki spalano w kontrolowanych warunkach, aby uzyskać próbki pyłów ze spalin do badań fizykochemicznych i biologicznych. Należy zwrócić uwagę na fakt i docenić, że zachowano kontrolowane warunki spalania. Ten kluczowy czynnik jest często pomijany w badaniach, chociaż wiadomo, że rodzaj silnika, warunki jego pracy i rodzaj paliwa wpływają istotnie na toksyczność spalin. Następnie, uzyskano organiczne ekstrakty ze spalania wybranych paliw i ich mieszanek, co zostało szczegółowo opisane w rozdziale Materiały i Metody. W ekstraktach oceniono emisję 13 wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz 6 nitrowych pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, które uległy adsorpcji

na cząstkach stałych, generowanych podczas spalania różnych mieszanek biopaliw w silniku Diesla. Organiczne ekstrakty zostały następnie wykorzystane w badaniach mutagenności i cytotoksyczności, które w mojej ocenie stanowią główną i najciekawszą część rozprawy doktorskiej. W celu zbadania mutagenności organicznych ekstraktów Doktorantka zastosowała mikropłytkowy test AMESA bez udziału i z udziałem aktywacji metabolicznej ($\pm S9$). Materiałem badawczym do powyższego testu były 3 szczepy bakterii: *Salmonella typhimurium* TA98, *Salmonella typhimurium* TA100 i *Salmonella typhimurium* YG1024. Materiałem do badań cytotoksyczności organicznych ekstraktów była linia makroflagów mysich RAW264.7, które zostały wykorzystane w 2 testach: w teście żywności komórek, polegającym na ocenie zdolności zahamowania wchłaniania do komórek błękitu trypanu oraz w teście MTT, umożliwiającym pomiar aktywności przemian energetycznych w mitochondriach traktowanych komórek. Powyższe metody zostały dobrane w sposób adekwatny do postawionych celów badań.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę, dotyczące fizykochemicznych właściwości organicznych ekstraktów wykazały, że nitrowe pochodne wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych obecne były jedynie w ekstraktach organicznych ze spalania oleju napędowego B0 oraz ze spalania biopaliw B7, B100 i HVO30. Nie stwierdzono ich w ekstraktach ze spalania biopaliwa B15 i B30. Największą ich ilość zawierał ekstrakt organiczny ze spalania oleju napędowego B0. Moją uwagę zwrócił fakt, że pomimo identycznej zawartości biokomponentu w biopaliwie B30 (biopaliwo I generacji) i HVO30 (biopaliwo II generacji), warunki do tworzenia nitrowych pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych okazały się bardziej sprzyjające podczas spalania biopaliwa HVO30, niż B30. Próba wyjaśnienia tego zjawiska przez Doktorantkę, jak również tego, dlaczego nie stwierdzono nitrowych pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w ekstraktach ze spalania biopaliwa B15 i B30, byłaby niezwykle interesująca. Wyniki dotyczące zawartości wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w badanych ekstraktach wykazały, że była ona uzależniona od rodzaju paliwa. Całkowita zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych była najwyższa w ekstrakcie organicznym ze spalania biopaliwa B30. Najniższą zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych stwierdzono w przypadku ekstraktu organicznego ze spalania biopaliwa B7. Uzyskane wyniki wykazały ponadto, że w ekstraktach organicznych ze spalania biopaliw HVO30, B30 oraz B100 występowały znaczne ilości 3-pierścieniowego fenantrenu oraz 4-pierścieniowego fluorantenu, pirenu i chryzenu. Emisja najlżejszych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych – acenaftenu i fluorenu, które wносиły największy wkład do sumy emitowanych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, była niższa dla paliw z dodatkiem FAME, w porównaniu do czystego oleju napędowego, z wyjątkiem niewielkiego wzrostu dla paliwa B30. Zawartość cięższych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, takich jak fenantren, antracen, fluoranten czy piren była zdecydowanie niższa w ekstrakcie organicznym ze spalania biopaliwa B7, w porównaniu do oleju napędowego, przy czym ich zawartość wzrastała dla paliw B15 i B30 i HVO30.

Wskazywałyoby to na fakt, że w miarę wzrostu udziału biokomponentu w biopaliwie zwiększa się sumaryczna ilość niektórych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych. Wyniki uzyskane przez naszą grupę w trakcie realizacji projektu FuelHealth wykazały przeciwną zależność, wskazującą na zmniejszanie się sumarycznej i indywidualnej ilości wybranych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych wraz ze wzrostem udziału biokomponentu w biopaliwie. Rozbieżność w uzyskanych wynikach pokazuje po raz kolejny, jak znaczny wpływ na ilość emitowanych cząstek stałych i zaadsorbowanych na nich wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych ma pochodzenie i jakość biopaliwa, rodzaj silnika, jego obciążenie, średnia prędkość oraz warunki zimnego rozruchu silnika.

Kolejnym, bardzo ciekawym aspektem badań Doktorantki była analiza aktywności mutagennej scharakteryzowanych ekstraktów. Wyniki uzyskane dla szczepu TA98 dla wariantu bez aktywacji metabolicznej (-S9) pokazały, że we wszystkich badanych ekstraktach zaobserwowano zależny od dawki wzrost aktywności mutagennej. Najniższą aktywność mutagenną stwierdzono w przypadku ekstraktu ze spalania biopaliwa HVO30, a najwyższą dla ekstraktu ze spalania biopaliwa B15. Analiza porównawcza aktywności mutagennej poszczególnych ekstraktów ze spalania biopaliw do czystego oleju napędowego wykazała 3-krotny spadek efektu mutagennego w przypadku HVO30, ponad 2-krotny w przypadku biopaliwa B7 oraz 1,2-krotny w przypadku biopaliwa B30. Nieco niższą wartość aktywności mutagennej wykazano dla tego samego szczepu w przypadku wariantu z aktywacją metaboliczną (+S9). Szczep TA100 był mniej wrażliwy na mutagenne działanie ekstraktów organicznych ze spalania biopaliw aniżeli pozostałe dwa badane. Ekstrakty organiczne ze spalania biopaliw HVO30 i B7 charakteryzowały się najwyższymi efektami mutagennymi dla tego szczepu, zarówno w wariacie bez aktywacji, jak i z aktywacją metaboliczną. W przypadku szczepu YG1024, najbardziej mutagennym okazał się ekstrakt uzyskany ze spalania oleju napędowego (B0). Po zastosowaniu frakcji mikrosomalnej S9 zaobserwowano znaczny spadek aktywności mutagennej badanych próbek. Ciekawi mnie jak Doktorantka tłumaczy różnice w mutagenności próbek w zależności od fazy S9 ?

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki wykazały ponadto cytotoksyczne działanie badanych ekstraktów organicznych. Najsilniejsze działanie cytotoksyczne wykazano dla organicznego ekstraktu ze spalania biopaliwa HVO30, nieco niższe dla biopaliw B15, B30 oraz czystego oleju napędowego B0. Z badanych mieszanek tylko organiczny ekstrakt ze spalania biopaliwa B7 nie wywołał efektu cytotoksycznego dla linii komórkowej makrofagów mysich. Organiczny ekstrakt ze spalania 100% biopaliwa w niewielkim stopniu zahamował aktywność metaboliczną makrofagów RAW264.7. Reasumując, uzyskane wyniki testu MTT wykazały, iż niskie dawki wszystkich badanych ekstraktów nie powodowały drastycznych zmian w metabolizmie komórek makrofagów. Natomiast, wraz ze wzrostem zastosowanej dawki stwierdzono obniżanie aktywności metabolicznej makrofagów mysich. Pewną moją wątpliwość budzi fakt zamiennego stosowania przez Doktorantkę pojęcia „aktywność metaboliczna” i „prolifracja komórek”. Oczywiście, te pojęcia są w pewnym stopniu ze sobą

powiązane, jednak nie zawsze obniżenie aktywności metabolicznej musi być równoważne obniżeniu proliferacji komórek. Tym bardziej, że zastosowany test MTT dedykowany jest do oceny aktywności metabolicznej, a nie proliferacji.

Podsumowaniem uzyskanych wyników jest analiza statystyczna zależności pomiędzy badanymi parametrami. Ta część pracy jest niezwykle interesująca, ponieważ pozwala, przynajmniej częściowo, na poznanie przyczyn różnej toksyczności badanych ekstraktów. Nie zagłębiając się w szczegóły uzyskanych wyników analiz statystycznych można stwierdzić, że zróżnicowana zawartość i rodzaj wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych oraz ich nitrowych pochodnych miały znaczący wpływ na zróżnicowane właściwości mutagenne i cytotoksyczne badanych ekstraktów.

Podsumowując, wyniki pracy są spójne, wzbudzają wysoki stopień zaufania czytelnika i poszerzają w istotny sposób wiedzę na temat mutagennych i cytotoksycznych właściwości wybranych biopaliw I i II generacji. W opinii recenzenta stanowią one niezwykle istotny wkład do osiągnięć naukowych w Polsce i na świecie. Pewien mój niedosyt budzi brak próby wyjaśnienia komórkowych, biochemicznych i/lub molekularnych mechanizmów zaobserwowanych efektów biologicznych, szczególnie w odniesieniu do komórek ssaków. Myślę, że wspomniana problematyka mogłaby być ciekawym aspektem przyszłej pracy naukowej Doktorantki.

Powyższe uwagi/watpliwości nie wpływają na moją wysoką ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Kozłowskiej. Oceniając całość recenzowanej rozprawy należy uznać, iż jest ona świadectwem dużej pracowitości Doktorantki i bardzo dobrej znajomości podjętego tematu. Zarówno zawartość merytoryczna rozprawy, jak i sposób analizy wyników świadczą o dojrzałości naukowej oraz dobrym warsztacie badawczym i w pełni uzasadniają ubieganie się o stopień doktora. Rozprawa spełnia warunki określone wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określonym w ustawie z dnia 14. marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule z zakresu sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 59, Dz. U. z 2005 nr 164, poz. 1365 oraz Dz. U. z 2011 r. nr 84, poz. 455), zatem wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Kozłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

