

Prof. dr hab. inż. Sławomir Ciesielski
Katedra Biotechnologii w Ochronie Środowiska
Wydział Geoinżynierii
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Oliwii Metryki pt.: „Indukcja stresu oksydacyjnego w komórkach bakterii przez wybrane nanocząstki metaliczne oraz jego związek z aktywnością przeciwdrobnoustrojową”

1. Podstawa opracowania

Podstawą formalną opracowania recenzji jest pismo skierowane przez Radę Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, datowane na dzień 29.05.2023 roku. Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska Pani mgr Oliwii Metryki "Indukcja stresu oksydacyjnego w komórkach bakterii przez wybrane nanocząstki metaliczne oraz jego związek z aktywnością przeciwdrobnoustrojową", która została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Agnieszki Mroziak. Promotorem pomocniczym jest Pan dr Daniel Wasilkowski.

2. Celowość podjętej tematyki badawczej

Nanocząstki metaliczne znajdują szerokie zastosowanie w produkcji różnych nanomateriałów. O ich popularności decydują unikalne właściwości fizyczne, chemiczne i optyczne. Ze względu na rosnący problem antybiotykooporności coraz większą uwagę poświęca się możliwości ich wykorzystania jako czynników przeciwbakteryjnych. Dotychczas otrzymane wyniki badań potwierdziły przeciwbakteryjną aktywność nanocząstek stworzonych na bazie metali. Mechanizm przeciwdrobnoustrojowego działania nanocząstek metali wynika z faktu, że powodują one destabilizację ściany komórkowej i błony bakteryjnej, indukowanie toksyczności i stresu oksydacyjnego poprzez generowanie reaktywnych form tlenu (ROS) i wolnych rodników, a w konsekwencji modulację szlaków transdukcji sygnału. Jednakże mechanizmy oddziaływania nanocząstek metalicznych nie są jeszcze do końca poznane.

Niewiele wiadomo na temat genotoksyczności nanocząstek oraz ich potencjalnego działania mutagennego. Podejrzewa się, że nanocząstki oraz ich jony mogą hamować replikację DNA oraz wpływać negatywnie na ekspresję genów w komórkach. Odkrywanie nowych zastosowań i zrozumienie dokładnych mechanizmów działania nanocząstek metalicznych ma kluczowe znaczenie dla dalszego rozwoju nauki i technologii. Dlatego też podjęcie przez Doktorantkę tego tematu badawczego uważam za dobrze przemyślane i mogące dostarczyć unikalnych oraz wartościowych wyników.

3. Ocena pracy

Rozprawę doktorską Pani mgr Metryki stanowią trzy oryginalne prace naukowe wraz z autoreferatem rozprawy. Prace naukowe mają charakter zespołowy i zostały opublikowane w języku angielskim w uznanych czasopismach naukowych posiadających współczynnik wpływu IF. Dwie prace zostały opublikowane w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* ($IF_{2023} = 5,6$), a jedna w czasopiśmie *Journal of Hazardous Materials* ($IF_{2023} = 14,22$). We wszystkich trzech pracach Pani Metryka jest pierwszą autorką. Doktorantka była również odpowiedzialna za przygotowanie koncepcji wszystkich trzech prac.

Pierwszą część autoreferatu rozprawy stanowi *Wprowadzenie*, przedstawiające problem badawczy, który jest punktem wyjścia zaplanowanych i przeprowadzonych badań. Następnie autorka przedstawia szczegółowy cel pracy, hipotezy oraz zadania badawcze. Ta część pracy przedstawiona jest w sposób niezwykle klarowny i nie budzący wątpliwości. W dalszej kolejności autorka umieściła rozdział *Materiały i metody*. W rozdziale tym, obejmującym ponad pięć stron, autorka koncentruje się na opisie metod badawczych wykorzystanych w pracy. Rozdział ten opisany jest w sposób przemyślany i staranny. Różnorodność wykorzystanych metod badawczych jest imponująca. Autorka przy opisie poszczególnych metod wskazuje, w której publikacji poszczególne metody były wykorzystane. Praca zyskałaby na wartości, gdyby Doktorantka wyjaśniła czym kierowała się wybierając szczepy bakteryjne do badań. Niejasne jest również dlaczego do wyznaczenia krzywej wzrostu posłużono się metodą posiewu a nie zrobiono tego z wykorzystaniem pomiaru gęstości optycznej (OD). Sprezycowania wymaga również sposób obliczania względnej zmiany ekspresji genów jeśli stosowano więcej niż jeden gen referencyjny. Dodatkowo, dla porządku opis powinien zawierać informacje względem czego odnoszono się obliczając względne wartości ekspresji genów.

W kolejnej części pracy autorka opisuje uzyskane wyniki. Jest to obszerny rozdział zawierający streszczenie wszystkich uzyskanych wyników. Autorka w sposób uporządkowany

przedstawiła wyniki stanowiące treść poszczególnych publikacji naukowych oraz dokonała ich dyskusji. Rozdział ten zawiera opis następujących badań:

1. Ocena indukcji stresu oksydacyjnego oraz funkcjonowania układu antyoksydacyjnego w komórkach bakterii traktowanych NPs.
2. Ocena zmian w profilach transkrypcyjnych i antyoksydacyjnych komórek bakterii traktowanych NPs.
3. Ocena zmian w strukturze i właściwościach osłon komórkowych oraz metabolizmie oddechowym bakterii traktowanych NPs.

Rozdział ten jest niezwykle cenny, gdyż daje jasny obraz wszystkich wyników uzyskanych w ramach obszernych badań. Dodatkowo, napisany jest w sposób przejrzysty poprzez wskazanie najważniejszych wyników. Pewien niedosyt może budzić brak próby integracji wszystkich uzyskanych wyników. Być może analiza wielowymiarowa pozwoliłaby wyciągnąć globalne wnioski dotyczące wpływu nanocząstek na bakterie.

Po spisie literatury autorka umieściła publikacje naukowe, stanowiące podstawę niniejszej rozprawy.

Pierwsza publikacja zatytułowana **“Insight into the antibacterial activity of selected metal nanoparticles and alterations within the antioxidant defence system in *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis*”** została opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* w 2021 roku. Publikacja ta, do tej pory była cytowana sześciokrotnie przez innych badaczy. Celem pracy było określenie profili stresu oksydacyjnego dla bakterii *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* i *Staphylococcus epidermidis* po ekspozycji na Ag-NPs, Cu-NPs, ZnO-NPs and TiO₂-NPs. Szczegółowymi celami było wyznaczenie podstawowych wskaźników toksykologicznych: MIC, MBC i IC₅₀, ocena zdolności Ag-NPs, Cu-NPs, ZnO-NPs i TiO₂-NPs do generowania reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach badanych bakterii, określenie aktywności enzymów oksydacyjnych i dehydrogenaz, określenie stężenia glutationu, zbadanie poziomu peroksydacji białek i lipidów oraz określenie zależności między tymi parametrami. Uzyskane wyniki potwierdziły antibakteryjne działanie wszystkich NPs przeciw *E. coli*, *B. cereus* i *S. epidermidis*. Badane szczepy były bardziej wrażliwe na działanie nanocząstek metali niż tlenków metali. Istotne, że bardziej wrażliwe na obecność Cu-NPs były badane bakterie Gram-dodatnie - *B. cereus* i *S. epidermidis*.

Co więcej nanocząstki powodowały wzrost stężenia specyficznych RFT w komórkach bakteryjnych, co z kolei przyczynia się do zmian w funkcjonowaniu układu antyoksydacyjnego i zwiększonej oksydacji białek. Doktorantka na podstawie uzyskanych

istotnych różnic w aktywności dehydrogenaz oraz podwyższonego poziomu peroksydacji tłuszczów dowiodła negatywny wpływ nanocząstek na osłony komórkowe bakterii. Ponadto udowodniła, że największy wzrost poziomu peroksydacji lipidów nastąpił w komórkach *B. cereus* i *S. epidermidis* traktowanych Cu-NPs.

Druga z zaprezentowanych prac, zatytułowana **“Evaluation of the effects of Ag, Cu, ZnO and TiO₂ nanoparticles on the expression level of oxidative stress-related genes and the activity of antioxidant enzymes in *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis*”** została opublikowana również w *International Journal of Molecular Sciences* w 2022 roku. Publikacja ta była cytowana już w pięciu publikacjach autorstwa innych badaczy. Celem niniejszej pracy było określenie zależności między ekspresją genów stresu oksydacyjnego a aktywnością kodowanych przez nie białek w warunkach stresu wywołanego przez nanocząstki. Badano wpływ Ag-NPs, Cu-NPs, ZnO-NPs and TiO₂-NPs w stężeniu IC₅₀ i ½IC₅₀ u *E. coli*, *B. cereus* and *S. epidermidis*. Przeprowadzone badania dowiodły, że Ag-NPs, Cu-NPs, ZnO-NPs i TiO₂-NPs istotnie wpływały na ekspresję wybranych genów stresu oksydacyjnego oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych u badanych szczepów bakterii. Co więcej stwierdzono, że wpływ nanocząstek na ekspresję genów był specyficzny dla każdej bakterii i zależał od zastosowanego stężenia.

Wykazano, że traktowanie nanocząstkami spowodowało obniżenie aktywności genów u *E. coli* i *S. epidermidis*, podczas gdy u *B. cereus* zaobserwowano wzrost aktywności genów. Największe różnice wykazano u *B. cereus* i *S. epidermidis* traktowanych TiO₂-NPs, podczas gdy u *E. coli* największe różnice stwierdzono po traktowaniu ZnO-NPs. Obserwowane różnice były głównie związane z genami kodującymi PER i CAT. Uzyskane wyniki wskazały, że wpływ nanocząstek na system antyoksydacyjny zależał od ich rodzaju i stężenia. Wyniki te są niezwykle wartościowe, gdyż dostarczają unikalnych informacji o molekularnym mechanizmie działania nanocząstek na komórki bakteryjne. Zapewne, mechanizmy te można byłoby jeszcze dokładniej wyjaśnić stosując podejście RNA-seq. Szczególnie ważne byłoby określenie czynników transkrypcyjnych, które regulują aktywność genów kodujących badane geny.

Ostatnia publikacja tworząca rozprawę doktorską zatytułowana jest **“Undesirable consequences of the metallic nanoparticles action on the properties and functioning of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis* membranes”** i została opublikowana w bardzo wysoko cenionym czasopiśmie *Journal of Hazardous Materials* w 2023 roku. Głównymi celami tej pracy było wyjaśnienie interakcji nanocząstek z osłonami komórkowymi bakterii, szczególnie poprzez wykazanie negatywnych zmian w tych strukturach. Dodatkowo, badano stężenie ATP i aktywność ATPazy. Ważnym celem pracy

było również określenie zmian w profilu kwasów tłuszczowych. Przeprowadzone badania wykazały wpływ nanocząstek na badane parametry w zależności od ich rodzaju i stężenia. Przepuszczalność błon komórkowych była skorelowana z wyciekami zawartości wewnątrzkomórkowych oraz redukcją całkowitego ATP i aktywności ATPazy. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAME) wskazała na zależny od stężenia wpływ badanych nanocząstek na udział procentowy analizowanych grup kwasów tłuszczowych u wszystkich badanych gatunków. Doktorantka potwierdziła, że badane bakterie Gram-dodatnie okazały się bardziej wrażliwe na działanie nanocząstek niż *E. coli*. Dodatkowo, przeprowadzona analiza SEM udowodniła, że poszczególne nanocząstki charakteryzowały się różnym stopniem powinowactwa do powierzchni badanych szczepów w zależności od ich budowy. Również ta publikacja dostarczyła unikalnych wyników, wzbogacając wiedzę na temat wpływu nanocząstek na strukturę i aktywność bakterii.

Kolejnym elementem rozprawy doktorskiej są *Wnioski*. Doktorantka przedstawiła 10 wniosków, które opisują wpływ działania nanocząstek na badane gatunki bakterii. W dalszej kolejności Autorka umieściła *Streszczenia* pracy w języku polskim i angielskim. Streszczenie stanowi doskonałą syntezę uzyskanych wyników i pozwala na szybkie zapoznanie się z założeniami pracy i uzyskanymi wynikami. Ostatnim elementem pracy są *Oświadczenia* współautorów publikacji o ich wkładzie w powstanie publikacji oraz oświadczenie samej Doktorantki.

4. Ocena końcowa pracy

Rozprawa doktorska Pani mgr Oliwii Metryki ma formę spójnego tematycznie cyklu trzech publikacji. Opisane w tych publikacjach wyniki wnoszą istotny wkład w rozwój nauk biologicznych w zakresie mikrobiologii. Wymiernym efektem, potwierdzającym wysoką jakość badań przeprowadzonych przez Panią mgr Metrykę, jest opublikowanie prac w czasopismach charakteryzujących się dużą rozpoznawalnością, wyrażoną wysoką wartością współczynnika wpływu (IF). Warta podkreślenia jest spójność tematyczna opublikowanych prac, wskazująca że praca doktorska była bardzo dobrze zaplanowana i skutecznie zrealizowana. Należy podkreślić, że Doktorantka podjęła się ambitnego zadania, co wiązało się z koniecznością poznania i wykorzystania różnych technik badawczych. Wyniki uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej nie tylko pogłębiają wiedzę na temat wpływu nanocząstek na bakterie, ale również mogą przyczynić się do opracowania nanomateriałów o działaniu antybakteryjnym. Wszystkie zawarte w recenzji krytyczne uwagi nie umniejszają wysokiej

wartości pracy, a jej całość pozwala na pozytywną ocenę założeń rozprawy, jej wartości merytorycznej, uzyskanych wyników i wyciągniętych wniosków.

5. Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że recenzowana praca doktorska Pani mgr Oliwii Metryki pt.: "Indukcja stresu oksydacyjnego w komórkach bakterii przez wybrane nanocząstki metaliczne oraz jego związek z aktywnością przeciwdrobnoustrojową " stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wnosi istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne. Doktorantka udowodniła, iż posiada ogólną wiedzę teoretyczną wystarczającą o ubieganie się o stopień doktora w dyscyplinie nauk biologicznych. Przygotowanie przez Autorkę omawianej rozprawy doktorskiej świadczy o Jej samodzielności w prowadzeniu badań naukowych i dużej, praktycznej znajomości metod badawczych. Praca doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 18 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). W związku z tym przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Oliwii Metryki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Jednocześnie, ze względu na wysoki poziom merytoryczny przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej wnioskuję o jej wyróżnienie.

Olsztyn, 19.07.2023

Stawomir Ciesielski