

Toruń, 27.07.2023

Dr hab. Patrycja Golińska, prof. UMK
Katedra Mikrobiologii
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr **Oliwii Metryki**

pt. **„Indukcja stresu oksydacyjnego w komórkach bakterii przez wybrane nanocząstki metaliczne oraz jego związek z aktywnością przeciwdrobnoustrojową”** wykonanej na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Mrozik i dra Daniela Wasilkowskiego.

1. Wprowadzenie

Recenzję wykonałam na zlecenie Dyrektora Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych UŚ w Katowicach. Pana dra Mariusza Kanturskiego, prof. UŚ, z dnia 29 maja 2023 r. Otrzymałam kompletny zestaw dokumentów umożliwiający ocenę rozprawy doktorskiej zgodnie z wymaganiami określonymi w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668 — tekst ujednolicony).

2. Ocena Wyboru problematyki badawczej

Nanotechnologia to obiecująca i szybko rozwijająca się dziedzina badań, zajmująca się wytwarzaniem i modyfikowaniem struktur w skali nano, która stale zyskuje zainteresowanie, ponieważ ma obiecujący wpływ na dobrostan ludzi i przynosi nowe możliwości w obecnej erze technologii. Nanocząstki (NPs) to materiały o charakterystycznych rozmiarach (zwykle w zakresie od 1 do 100 nanometrów), strukturze oraz właściwościach fizykochemicznych, elektrycznych, magnetycznych, termicznych, mechanicznych, katalitycznych, optycznych i biologicznych. Właściwości i reaktywność nanocząstek zależą głównie od ich bardzo małych rozmiarów i ogromnej powierzchni. Nanocząstki metali i tlenków metali znalazły szerokie zastosowanie w ochronie i monitorowaniu środowiska (rekultywacja, toksykologia, uzdatnianie wody, fotodegradacja), katalizie, przemyśle tekstylnym, elektronice, przemyśle mechanicznym, wychwytywaniu energii, sektorze farmaceutycznym i biomedycznym, w tym w dostarczaniu leków, terapii raka, naprawie tkanek i działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Jednakże, tak szerokie stosowanie nanomateriałów i ich niekontrolowane uwalnianie do środowiska stanowi zagrożenie dla ludzi i środowiska. Dużym zainteresowaniem cieszy się przeciwdrobnoustrojowe działanie nanocząstek, które charakteryzuje się plejotropowością. Takie działanie nanocząstek, choć pożądane w walce z mikroorganizmami patogennymi, po ich niekontrolowanym uwolnieniu do środowiska może niekorzystnie działać na mikroorganizmy w nim występujące, często dla tego środowiska pożyteczne. Chociaż ogólne mechanizmy działania nanocząstek na mikroorganizmy są często opisywane w literaturze to wiedza na temat ich działania na poziomie komórkowym jest nadal niepełna.

W tym kontekście podjęta problematyka badawcza przez mgr Oliwię Metrykę jest nowatorska a wybór tematu rozprawy doktorskiej pt.: „Indukcja stresu oksydacyjnego w komórkach bakterii przez wybrane

nanocząstki metaliczne oraz jego związek z aktywnością przeciwdrobnoustrojową” jest uzasadniony, zarówno z poznawczego, jak i użytecznego punktu widzenia. Tematyka podjęta przez Doktorantkę wpisuje się w dyscyplinę nauki biologiczne.

3. Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Oliwii Metryki, przygotowana pod kierunkiem prof. dr hab. Agnieszki Mrozik i dra Daniela Wasilkowskiego, zgodnie z artykułem 187 pkt. 3 ustawy prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, stanowi zbiór trzech opublikowanych, powiązanych tematycznie artykułów naukowych, które autorka wkomponowała w ich opis.

Rozprawa doktorska liczy 114 stron i składa się z następujących rozdziałów: autoreferat rozprawy (I) obejmujący wprowadzenie, cel pracy, materiały i metody, wyniki i dyskusję oraz literaturę i źródła internetowe, publikacje (II), wnioski (III), streszczenie w języku polskim (IV), streszczenie w języku angielskim (V) oraz oświadczenia doktoranta i współautorów publikacji (VI).

Najważniejszym rozdziałem jest rozdział II pt. „Publikacje”, ponieważ jest on podstawą rozprawy doktorskiej i obejmuje kopie następujących artykułów:

1. Metryka O., Wasilkowski D., Mrozik A. 2021. Insight into the antibacterial activity of selected metal nanoparticles and alterations within the antioxidant defence system in *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Molecular Sciences* 22(21): 11811.
2. Metryka O., Wasilkowski D., Mrozik A. 2022. 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*. *International Journal of Molecular Sciences* 23(9): 4966.
3. Metryka O., Wasilkowski D., Adamczyk-Habrajska M., Mrozik A. 2023. Undesirable consequences of the metallic nanoparticles action on the properties and functioning of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis* membranes. *Journal of Hazardous Materials* 446: 130728.

Artykuły te opublikowano w latach 2021-2023. Sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor) zbioru publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 25,408, a suma punktów według MEiN jest równa 480. Są to wskaźniki bardzo dobre. Wszystkie publikacje są wieloautorskie, liczące od 3 do 4 autorów. We wszystkich publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem i jednym z dwóch autorów korespondencyjnych. W oświadczeniach wszyscy autorzy określili swój udział i zakres wykonywanych prac w czasie realizacji badań i przygotowywania manuskryptów. Z oświadczeń wynika, że mgr Oliwia Metryka uczestniczyła w tworzeniu koncepcji prac, opracowaniu metodologii, zbieraniu i analizie danych, walidacji danych, wykonaniu analiz laboratoryjnych, wizualizacji wyników i przygotowaniu manuskryptów. Uwagę zwraca fakt, że taki sam udział wykazuje promotor pomocniczy rozprawy. Jednak ze względu na to, że mgr Oliwia Metryka we wszystkich pracach jest pierwszym i korespondencyjnym autorem, jej rolę w powstawaniu w/w prac uznaję za wiodącą. Na uwagę zasługuje fakt, że wyniki badań ukazały się w wysoko punktowanych czasopismach, a szczególnie trzecia z wymienionych publikacji, która ukazała się w *Journal of Hazardous Materials* wydawnictwa Elsevier (IF=13.6, MEiN=200 pkt).

Podsumowując ocenę formalną stwierdzam, że cykl publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe mgr Oliwii Metryki oraz ich opis spełniają wymagania stawiane przez obowiązujące prawo osobom ubiegającym się o stopień doktora.

4. Ocena merytoryczna

Pierwszy, trzydziestosześciostronicowy rozdział pracy doktorskiej zatytułowany „Autoreferat rozprawy” obejmuje następujące podrozdziały: wprowadzenie, cel pracy doktorskiej, materiały i metody, wyniki i dyskusja wyników oraz literaturę i źródła internetowe. **Wprowadzenie** to opis tematyki przedmiotu wprowadzający czytelnika w zakres prowadzonych badań. Doktorantka precyzyjnie przedstawia najważniejsze zagadnienia dotyczące nanotechnologii i produkcji nanomateriałów oraz ich unikalnych właściwości. Koncentruje się na omówieniu aktywności przeciwdrobnoustrojowej nanocząstek metali i ich zagrożeniu dla mikroorganizmów środowiskowych w przypadku niekontrolowanego uwalniania do środowiska. Istotny element wprowadzenia czytelnika w tematykę podejmowanych badań stanowi omówienie mechanizmów działania nanocząstek na bazie metali na mikroorganizmy (bakterie).

W mojej ocenie zaprezentowany przegląd literatury stanowi logiczną i spójną całość. Przedstawione podstawy teoretyczne są bardzo dobrym wprowadzeniem do „**celu pracy**”, którym była wieloaspektowa analiza mechanizmów indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach bakterii: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Bacillus cereus* (ATCC® 11778™) i *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 12228™), eksponowanych na działanie nanocząstek metalicznych: Ag-NPs, Cu-NPs, TiO₂-NPs i ZnO-NPs.

Doktorantka postawiła cztery hipotezy badawcze:

1. NPs wpływają na działanie bakteryjnych antyoksydantów.
2. NPs wpływają na poziom ekspresji genów stresu oksydacyjnego.
3. NPs modyfikują aktywność oddechową komórek bakteryjnych
4. NPs oddziałują z osłonami zewnętrznymi bakterii i powodują zmiany morfologiczne komórek.

Na weryfikację, słusznie postawionych hipotez badawczych pozwoliły zrealizowane zadania badawcze, jak poniżej, oraz otrzymane wyniki badań.

1. Wyznaczono wskaźniki toksyczności NPs względem badanych szczepów bakterii,
2. Zbadano rolę NPs w indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach bakterii,
3. Przeprowadzono analizę genotoksyczności NPs,
4. Określono zmiany w metabolizmie oddechowym bakterii oraz w strukturze i właściwościach błony komórkowej,
5. Zobrazowano komórki bakterii eksponowane na NPs z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM-EDS).

Schemat układu eksperymentalnego obrazujący etapy realizacji poszczególnych zadań badawczych i wykonane analizy zamieszczono na końcu tego podrozdziału.

W mojej opinii cel badań oraz hipotezy badawcze zostały poprawnie postawione. Hipotezy badawcze zostały zweryfikowane w logicznie zaplanowanych i konsekwentnie realizowanych zadaniach badawczych. Do realizacji postawionego celu i weryfikacji hipotez badawczych mgr Oliwia Metryka wykorzystwała szereg metod badawczych stosowanych w mikrobiologii, biochemii i biologii molekularnej, które w sposób syntetyczny przedstawiono w podrozdziale „**Materiały i metody**”. W poszczególnych artykułach naukowych w sposób szczegółowy omówiono metody i procedury przeprowadzonych badań.

W podrozdziale „**Wyniki i dyskusja wyników**” Doktorantka opisuje w sposób syntetyczny rezultaty badań przedstawione w poszczególnych artykułach naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Uzyskane wyniki wykazują, że analizowane nanocząstki, w zależności od typu i zastosowanej dawki indukują stres oksydacyjny oraz wpływają na funkcjonowanie układu antyoksydacyjnego w komórkach traktowanych bakterii. Powodują zmiany w profilach transkrypcyjnych i antyoksydacyjnych oraz strukturze i właściwościach osłon komórkowych a także metabolizmie oddechowym bakterii traktowanych NPs. Rezultaty badań zostały bardzo dobrze uzasadnione i porównane z danymi z literatury. Dyskusja jest rzeczowym omówieniem wyników z równoczesnym wykorzystaniem w ich interpretacji wyników innych badaczy. Rozdział ten dokumentuje dojrzałość naukową Doktorantki i pokazuje, że Pani Magister swobodnie porusza się w światowej literaturze dotyczącej tematyki badawczej. Doktorantka zebrała bogate piśmiennictwo, w którym w mojej ocenie, znajdują się wszystkie ważne publikacje dotyczące zakresu badań Doktorantki, które ukazały się w ciągu ostatnich dziesięciu lat. Zebraną literaturę umiejętnie wykorzystała.

Przeprowadzone badania zaowocowały dużą ilością wyników, które Pani mgr Oliwia Metryka opublikowała w trzech artykułach naukowych (rozdział II „**Publikacje wchodzące w skład rozprawy**”), w międzynarodowych czasopismach, posiadających współczynnik wpływu (IF) w zakresie od 5,6 do 13,8. Wyniki są zaprezentowane w poszczególnych publikacjach w sposób czytelny i przejrzysty. Są starannie opracowane, dobrze zilustrowane i dostosowane do wymagań czasopism. Wyniki zostały poprawnie opracowane pod względem statystycznym. Doktorantka udowodniła, że posiada ogólną wiedzę teoretyczną do właściwej oceny otrzymanych wyników badań. Nabyła też umiejętność syntetycznego opisanie problematyki badawczej zaprezentowanej w zbiorze publikacji, przedstawionych jako rozprawa doktorska.

Kolejny (III) rozdział rozprawy stanowią „**Wnioski**”, będące odzwierciedleniem otrzymanych wyników. Doktorantka sformułowała dziesięć trafnych wniosków, co pokazuje zdolność Doktorantki do syntetycznego ujęcia rezultatów pracy.

Najważniejsze osiągnięcia

Koncepcja badań oraz szeroki wachlarz metod badawczych umożliwiły osiągnięcie wielu cennych i wartościowych wyników, które poszerzyły dotychczasowy stan wiedzy na temat mechanizmów działania i toksyczności nanocząstek na bazie metali wobec komórek bakteryjnych.

Za najważniejsze rezultaty rozprawy uważam:

1. Potwierdzenie, że indukcja stresu oksydacyjnego i generowanie reaktywnych form tlenu (RTF) przez NPs w komórkach bakterii jest podstawowym mechanizmem ich działania, przy jednoczesnym wykazaniu, że poszczególne NPs generują różne RTF w traktowanych komórkach.
2. Wykazanie, że stres oksydacyjny generowany w komórkach bakteryjnych poddanych działaniu nanocząstek powoduje zmiany w aktywności enzymów systemu antyoksydacyjnego i poziomu zredukowanego glutationu, zwiększa poziom peroksydacji lipidów i utleniania białek oraz zaburza aktywność dehydrogenaz, obniża aktywność ATPazy i poziom ATP. Zmiany te zależą od typu nanocząstki, zastosowanej dawki i testowanego szczepu bakterii.
3. Wykazanie, że poszczególne nanocząstki i ich stężenie w różny sposób wpływały na poziom ekspresji wybranych genów stresu oksydacyjnego i że był on skorelowany z aktywnością kodowanych przez nie białek.
4. Wykazanie zróżnicowanego oddziaływania poszczególnych nanocząstek na osłony komórkowe bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, w tym na przepuszczalność błony komórkowej i wyciek

zawartości komórki, a szczególnie na skład i udział procentowy kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej oraz rozmieszczenie NPs na powierzchni komórek bakteryjnych.

Podsumowując ocenę merytoryczną, stwierdzam, że Pani mgr Oliwia Metryka uzyskała wiele cennych wyników poszerzających stan wiedzy w dyscyplinie nauki biologiczne.

Wyniki te wpisują się w światową dyskusję nad toksycznym działaniem nanocząstek na bazie metali wobec bakterii i ich potencjałem aplikacyjnym, ale i zagrożeniem wobec mikroorganizmów niebędących celem ich działania. Oceniając zbiór trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych oraz ich opis, stwierdzam, że Doktorantka wykazała się wiedzą teoretyczną w reprezentowanej dyscyplinie, posiadała umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, a rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Publikacje oryginalne są spójne i wzajemnie się uzupełniają. Dysertację doktorską mgr Oliwii Metryki uważam za wartościową pracę eksperymentalną, stanowiącą oryginalne rozwiązanie postawionego problemu badawczego. Wnosi ona do nauki istotne informacje poszerzające stan wiedzy w zakresie toksycznego działania nanocząstek na bazie metali wobec komórek prokariotycznych.

Doktorantka nie uniknęła drobnych błędów jak np. na stronie 13 w pkt. I.3.5. „fluorescamina” zamiast „fluoreskamina” lub w publikacji I, gdzie na Schemacie 8 nanocząstki Ag i ZnO mają wielkość >100 i >50 nm zamiast poniżej tych wartości, jak opisano w tekście. W publikacji I podano również zakres stężenia nanocząstek do wyznaczenia MIC, MBC i IC₅₀ od 0-1200, a w opisie (autoreferacie rozprawy) od 0,1-1500 mg/L. Wszystkie wymienione uwagi mają charakter edytorski i nie wpływają na wartość rozprawy.

Cennym uzupełnieniem byłoby dołączenie na końcu dysertacji CV naukowego, które uwidoczniłoby, poza pracami stanowiącymi podstawę pracy doktorskiej, inną aktywność naukową Doktorantki jak np. pozostałe publikacje, wystąpienia konferencyjne itp. Na podkreślenie zasługuje fakt, że badania przeprowadzono w ramach pozyskanego przez Doktorantkę z NCN grantu Preludium.

Podczas czytania i analizy rozprawy nasunęły mi się pytania, które chciałabym zadać Doktorantce podczas obrony rozprawy doktorskiej, które przedstawiam poniżej:

1. *Czym Doktorantka kierowała się przy wyborze szczepów bakterii do badań toksyczności nanocząstek?*
2. *Czy znane były lub zostały oznaczone inne właściwości fizyko-chemiczne zastosowanych nanocząstek, poza ich wielkością?*
3. *Co jaką wartość (krotność) zmieniało się stężenie nanocząstek przy oznaczeniach MIC i MBC?*
4. *Czy działanie nanocząstek metali/ tlenków metali na komórki grzybów jest odmienne od tego wobec komórek prokariotycznych?*
5. *Metoda wyznaczenia MIC, a następnie MBC nanocząstek opisana w publikacji I jest niejasna. W publikacji podano, że MIC wyznaczono stosując metodę rozcieńczeniową opisaną przez Wiegand et al. 2008, która jest opisem standardowej metody rekomendowanej przez CLSI, w której MIC wyznacza się jako najniższe stężenie, w którym prowadząc obserwację wizualną nie stwierdza się występowania zmętnienia/osadu komórek w studziencie/probówce w zależności czy zastosowana metoda jest mikro- czy makro-rozcieńczeniową. W metodzie tej wykonuje się zazwyczaj serię dwukrotnych rozcieńczeń testowanego czynnika przeciwdrobnoustrojowego w podłożu płynnym i dodaje zawiesinę bakterii o określonym stężeniu by uzyskać stężenie końcowe rzędu 10⁵ cfu/mL. W publikacji nie podano ilokrotnie rozcieńczano nanocząstki w badaniach, jakie było stężenie bakterii w próbie ani jak je ustalano. Natomiast MBC czyli działanie bójcze to działanie, w którym następuje redukcja co najmniej o dwa rzędy wielkości, co się przekłada na 99.0% redukcji liczebności komórek po wysiewie na płytki*

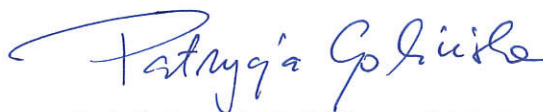
z agarem. Zatem sposób wyznaczenie MIC w publikacji wydaje się być zmodyfikowany. Proszę o wyjaśnienie.

6. Ocena końcowa

Reasumując, stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Oliwii Metryki pt.: „Indukcja stresu oksydacyjnego w komórkach bakterii przez wybrane nanocząstki metaliczne oraz jego związek z aktywnością przeciwdrobnoustrojową” spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U. 2018 poz. 1668 — tekst ujednolicony). Doktorantka opanowała warsztat badawczy z zakresu mikrobiologii, biochemii i biologii molekularnej. Udowodniła, że potrafi rozwiązywać problemy naukowe i posiada teoretyczną wiedzę w zakresie mikrobiologii. Pokazała, że ma umiejętność opracowania, interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników z wynikami dostępnymi w obszernej literaturze o zasięgu międzynarodowym. Ponadto, w cyklu artykułów naukowych zaprezentowała bardzo dobrą znajomość problematyki badawczej, stanowiącej rozprawę doktorską. W związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr Oliwii Metryki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wysoką wartość naukową tej pracy składam wniosek o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Wniosek o wyróżnienie uzasadniają: wysoka wartość naukowa rozprawy doktorskiej, szeroki zakres wykonanych badań, aktualność podjętej problematyki badawczej, umiejętne wykorzystanie nowoczesnych technik badawczych oraz opublikowanie zbioru artykułów naukowych w wysoko punktowanych międzynarodowych i uznanych czasopismach naukowych.



Dr hab. Patrycja Golińska, prof. UMK