

Toruń, dnia 30 listopada 2019 r.

dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch, prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Chemii
ul. Gagarina 7
87-100 Toruń

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Kingi Matuły
pt. „*Influence of physical and chemical factors on evaluation of cells*”
wykonanej w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk
w grupie badawczej Prof. dr hab. Roberta Holysta

Ocena wyboru tematyki badawczej

Nanotechnologia odgrywa kluczową rolę w różnych dziedzinach nauki i techniki, umożliwiając wprowadzenie znacznej poprawy w stosunkowo krótkim czasie ze względu na właściwości nanomateriałów, które odgrywają kluczową rolę w różnych procesach. W odniesieniu do biologii i medycyny ogromne wysiłki kładzione są na wykorzystanie nanocząstek jako innowacyjnych systemów dostarczania leków, narzędzi do wczesnej diagnozy, czy środków przeciwdrobnoustrojowych. Dlatego tak istotne stają się badania umożliwiające określenie efektu cytotoksycznego nanocząstek na układy biologiczne na poziomie *in vivo* lub/*i in vitro*. Ważną rolę odgrywają czynniki fizyczne i mechaniczne, takie jak rozmiar nanocząstek porównywalny lub mniejszy od struktur biologicznych. Dlatego też nanocząstki ze względu na ich niewielki rozmiar mogą zostać wchłonięte w wyniku endocytozy przez niektóre komórki organizmów żywych oraz kumulować się na skutek przyłączania się do białek, błon komórkowych i innych struktur biologicznych. Procesy te mogą powodować uszkodzenia komórek i tkanek poprzez zwiększony stres oksydacyjny, blokowanie kanałów jonowych, czy mechaniczne uszkodzenie błony komórkowej i innych organelli. Chęć wyjaśnienia tych zjawisk oraz podjęcie próby wyjaśnienia oddziaływań pomiędzy komórką a nanocząstkami (nanodruty ZnO) przyczyniły się do realizacji badań w zakresie tej tematyki badawczej przez Panią mgr inż. Kingę Matułę. Tematyka rozprawy doktorskiej realizowana pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Roberta Holysta i promotora pomocniczego Pana dr Jana Paczesnego wpisuje się w szerszy nurt prac prowadzonych przez macierzystą grupę badawczą, ale także wychodzi na naprzeciw współczesnym bolączkom współczesnej toksykologii oraz medycyny wynikającej z zagrożeń jakie mogą wywoływać nanocząstki. Dlatego, też uważam, że podjęta tematyka rozprawy doktorskiej jest w pełni uzasadniona z naukowego punktu widzenia.

Ocena formalna i merytoryczna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska posiada formę monografii liczącą 148 stron, na którą składają się kolejno: spis rozdziałów, wykaz skrótów, założone tezy, wprowadzenie z częścią literaturową i cel pracy (rozdział 1; 22 strony), część eksperymentalną, w której ujęto opis postępowania analitycznego podczas przygotowania próbek do badań, omówienia wyników i wnioski (rozdziały 2-5; 80 stron) oraz podsumowanie z perspektywami na przyszłość, podziękowania, informacje o Doktorantce i Jej dorobek naukowy (rozdział 6; 6 stron). Całość rozprawy doktorskiej zwieńczona jest spisem literatury obejmującym bardzo imponującą ilość - 501 pozycji.

Pierwszy rozdział Doktorantka poświęciła ogólnym zagadnieniom związanym z nanotechnologią i nanocząstkami w różnych aspektach. Przeprowadziła klasyfikację nanocząstek na podstawie ich składu wyróżniając cztery podstawowe grupy: nanocząstki organiczne i nieorganiczne, ich hybrydowe połączenie oraz nanocząstki na bazie węgla. Za bardzo cenny należy uznać podrozdział 1.1.3 ujmujący zestawienie różnych technik instrumentalnych pozwalających na pełną charakterystykę fizykochemiczną nanomateriałów. Zestawienie w tabeli 1.1 potencjalnych możliwości jakie niosą te techniki budzi podziw dla ogromnego zaangażowania i benedyktyńskiej cierpliwości Doktorantki podczas przeglądu aktualnej z tego zakresu literatury. Wnikliwie omówiono także oddziaływanie nanocząstek na komórki. Niewątpliwie zgłębienie wiedzy na ten temat było ważne i niezbędne do realizacji pracy eksperymentalnej. Rozdział pierwszy zamyka nadrzędny cel pracy, którym było zbadanie obciążenia mechanicznego wywołanego przez nanocząstki na żywych komórkach

Podsumowując, ta część pracy została przygotowana starannie i stanowi bardzo dobre uzasadnienie i wprowadzenie do podjętych przez Doktorantkę badań ukierunkowanych na zrozumienie fizycznych oddziaływań pomiędzy nanostrukturami i komórkami, co ma bardzo istotne znaczenie łączenia nanotechnologii z układami biologicznymi.

Po wstępnym zapoznaniu z tematyką badawczą oraz nakreśleniu głównego celu badań Doktorantka przystąpiła do opisu eksperymentu, który dotyczył zbadania obciążenia mechanicznego wywołanego przez zaokrąglone nanocząstki ZnO (NP) i nanodruły ZnO (NR) na żywe komórki. Pierwszym etapem prac było otrzymanie oraz charakterystyka fizykochemiczna uzyskanych nanomateriałów za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego, dyfrakcji rentgenowskiej i pomiaru potencjału zeta. W celu przeprowadzenia oceny żywotności komórek po ekspozycji na nanocząstki o dwóch różnych kształtach Doktorantka wykorzystwała bakterie Gram-dodatnie (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), Gram-ujemne (*Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*) i jednokomórkowe grzyby - drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz linie komórkowe.

Kolejne badania opisane w rozdziale 3 dotyczą określania cech fenotypowych *E. coli*, które przetrwały drugą ekspozycję na stres mechaniczny wywołany nanodrutami ZnO a w konsekwencji uzyskały odporność mechaniczną. Do określenia tych zmian

Doktorantka trafnie wybrała takie techniki instrumentalne jak: SEM, Cryo-SEM, TEM z EDS oraz przeprowadziła pomiary żywotności komórek, barwienie metodą Grama, testy z antybiotykami i testy oparte na bakteriofagach.

Dwa kolejne rozdziały stanowią rozszerzenie badań ukierunkowanych na poznanie genetycznego pochodzenia zmian w bakteriach narażonych na stres mechaniczny wywołany przez nanodruły ZnO poprzez określenie mutacji (sekwencjonowanie DNA), profilu ekspresji genów (sekwencjonowanie RNA) oraz pełną analizą transkryptomu (sekwencjonowanie RNA) bakterii podczas ekspozycji na nanodruły ZnO oraz badanie szybkości pojawiania się mutacji (sekwencjonowanie DNA).

W ostatnim rozdziale zamieszczono podsumowanie przeprowadzonych prac, perspektywy dalszych badań oraz najważniejsze osiągnięcia naukowe Doktorantki.

Biorąc pod uwagę powyższe rozważania można stwierdzić, że treść i zakres rozprawy doktorskiej ściśle związane są z tytułem. Doktorantka w jasny i precyzyjny sposób sformułowała nadrzędny cel i postawiła właściwe tezy. Dobór źródeł literaturowych wskazuje na bardzo dobre rozeznanie się w aktualnych osiągnięciach będących przedmiotem Jej zainteresowań. Imponująca ilość wyników zaprezentowana została w bardzo jasny, czytelny i przejrzysty sposób dzięki odpowiednio dobranym formom graficznym.

Ocena wartości naukowej

Pani mgr inż. Kinga Matuła udowodniała słuszność postawionych w rozprawie tez oraz osiągnęła wytyczony cel. Wyznaczony obszar badań jest ważny i aktualny z naukowego punktu widzenia. Podczas realizacji poszczególnych zadań badawczych Doktorantka wykazała się bardzo dużą wiedzą i swobodą w poruszaniu się po różnych obszarach w zakresie nauk ścisłych i przyrodniczych oraz umiejętnościami samodzielnego prowadzenia badań i interpretacji uzyskanych wyników.

Rozprawa doktorska charakteryzuje się wysokim poziomem naukowym, a do jej najważniejszych osiągnięć można zaliczyć:

- przeprowadzenie oceny wpływu nanocząstek ZnO różniących się kształtem na komórki prokariotyczne (bakterie Gram-dodanie i Gram-ujemne) oraz eukariotyczne (grzyby, linie komórkowe, komórki pierwotne),
- podjęcie próby określenia zmian fenotypowych dla bakterii Gram-ujemnych, które nabyły odporność mechaniczną,
- określenie genetycznego pochodzenia zmian w bakteriach narażonych na stres mechaniczny wywołany przez nanodruły ZnO,
- wstępne badania związane z określeniem transkryptomu bakterii podczas ekspozycji na nanodruły ZnO.

Dokonując oceny części doświadczalnej należy stwierdzić, że Doktorantka posiadała umiejętność samodzielnego prowadzenia prac eksperymentalnych oraz interpretacji uzyskanych wyników zaplanowanych i wykonanych różnymi metodami badawczymi. Interdyscyplinarne badania umożliwiły uzyskanie wyników, które wniosły istotny wkład nie tylko w rozwój chemii, ale również w zakresie biologii i medycyny. Można więc zatem stwierdzić, że zgodnie z wymogami ustawowymi oceniana praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego a Doktorantka wykazała umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Uwagi ogólne

W trakcie lektury rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka uwag do dyskusji:

1. str. 40 – Czym sugerowano się przy wyborze pożywki LB? Czy liofilizat drożdży nie dostarcza Zn^{2+} ?
2. str. 41 – Proszę wyjaśnić, z czego mogą wynikać znaczące różnice wpływu jonów Zn^{2+} na próbę kontrolną i badane bakterie Gram-dodatnie (*Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium glutamicum*)? Dlaczego przebieg tych zależności jest tak drastycznie odmienny w porównaniu z zależnościami uzyskanymi dla bakterii Gram-ujemnych?
3. rozdział 5 – Dlaczego nie podjęto badań związanych z określeniem profilu białkowego otoczki komórkowej z zastosowaniem techniki MALDI?
4. rysunek S1 – Proszę o wyjaśnienie, dlaczego wartości standardowego odchylenia przy pomiarach rozkładu rozmiaru cząstek nanodrutów ZnO jest tak wysoki?

Większość wyników prezentowanych w rozprawie doktorskiej zostało wcześniej pozytywnie ocenione w skali międzynarodowej i opublikowane z udziałem Doktorantki w dwóch artykułach z listy *Journal Citation Report* w czasopismach: *Scientific Reports* i *Soft Matter* (sumaryczny IF około 10,4). Pierwsza z publikacji to praca wieloautorska (21 osób), jednak należy podkreślić, że Doktorantka jest w niej pierwszym autorem. W drugiej publikacji zespół sześciuosobowy, gdzie Pani mgr inż. Kinga Matuła jest pierwszym i korespondencyjnym autorem. Warto również podkreślić, że zainteresowania naukowe Doktorantki nie ograniczyły się tylko do tematyki rozprawy doktorskiej o czym świadczą cztery publikacje naukowe w *ACS Applied Materials and Interfaces* (IF ok. 8,5), *Sensors and Actuators, B: Chemical* (IF ok. 3,4), *Chemistry - A European Journal* (IF ok. 5,8) i *Industrial and Engineering Chemistry Research* (IF ok. 5), trzy zgłoszenia patentowe oraz liczne prezentacje ustne na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Kingi Matuły jest wartościowym i oryginalnym opracowaniem naukowym, a uzyskane wyniki badań wzbogacają wiedzę związaną z oddziaływaniem nanocząstek na komórki żywe. Recenzowana rozprawa reprezentuje bardzo dobry poziom naukowy, zawiera elementy nowości naukowej, a wymienione powyżej uwagi polemiczne i pytania nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny

recenzowanej pracy. Doktorantka wykazała się umiejętnością planowania eksperymentów, dojrzałą interpretacją i krytyczną dyskusją uzyskanych wyników badań oraz formułowaniem poprawnych i obiektywnych wniosków. To dojrzałe podejście pozwoliło na międzynarodowe upowszechnienie uzyskanych wyników badań w dwóch publikacjach.

Podsumowując z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Kingi Matuły pt. „*Influence of physical and chemical factors on evolution of cells*” w pełni spełnia wymagania stawiane przez Ustawę z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym, wnoszę do Rady Nauki Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr inż. Kingi Matuły do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoki poziom merytoryczny rozprawy doktorskiej, nowatorstwo i aktualność podjętej tematyki, obiecujące wyniki, precyzyjnie sformułowane wnioski końcowe oraz z ogromną starannością redakcyjną i graficzną ocenianej pracy wnioskuję o jej wyróżnienie. Dodatkowym argumentem są dwie publikacje w bardzo dobrych czasopismach z listy JCR zawierające wyniki badań wchodzące w zakres rozprawy doktorskiej.

R. Gadoś - Kopicuch