



Warszawa, 12 grudnia 2019r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Kingi Matuły

pt.: “Influence of physical and chemical factors on evolution of cells”,

wykonanej pod opieką prof. dr. hab. Roberta Hołysta
 w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

Pani mgr inż. Kinga Matuła ukończyła Studia na kierunku Biotechnologia I-go i II-go stopnia na Politechnice Rzeszowskiej, gdzie w 2012 obroniła pracę inżynierską, a w 2013 pracę magisterską. Obecnie jest uczestniczką Studiów Doktoranckich w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk, w Warszawie, których zwieńczeniem jest przedłożona do recenzji rozprawa doktorska zatytułowana “ **Influence of physical and chemical factors on evolution of cells**” wykonana pod opieką prof. dr. hab. Roberta Hołysta oraz dr. Jana Paczesnego (promotora pomocniczego). W dorobku naukowym Pani Kingi Matuły znaleźć można **6** artykułów naukowych opublikowanych w renomowanych czasopismach z wysokim współczynnikiem oddziaływania (IF), **3** artykuły wysłane do wydawnictw, **3** w przygotowaniu oraz **3** patenty. W większości prac, wymienionych w dorobku naukowym, rola Pani Kingi Matuły, jako autora, jest wiodąca. Oprócz aktywności publikacyjnej Pani Matuła ma również imponujący dorobek w zakresie popularyzacji nauki, udziału w projektach badawczych, prezentacji wyników na konferencjach naukowych, współpracy naukowej z krajowymi i zagranicznymi zespołami badawczymi. Jest też laureatką wielu nagród i wyróżnień. Nie będę ich wszystkich wymieniał, ponieważ z pewnością Promotor na publicznej obronie zechce przedstawić sylwetkę swojej Doktorantki.

Tytuł recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani Kingi Matuły, jest może nazbyt ogólny, ale z drugiej strony budzi ciekawość czytelnika i zachęca do zapoznania się z treścią pracy. Praca ta, poświęcona badaniom nad oddziaływaniami nanocząstek tlenku cynku w postaci nanocząstek „obłych” i nanodrutów na żywe komórki bakterii, grzybów i ludzkich komórek nowotworowych i prawidłowych, została zrealizowana w znakomitym zespole badawczym o niezwykle szerokich horyzontach naukowych.

Przedłożona do recenzji praca Pani Kingi Matuły obejmuje 148 stron i składa się z 6 głównych rozdziałów. Zaraz po wykazie skrótów stosowanych w pracy, Autorka formułuje najważniejsze tezy swojej pracy. Nie będę ich cytował w swojej recenzji ponieważ na pewno Doktorantka przedstawi je na jednym z pierwszych slajdów swojej prezentacji. I o ile dwie pierwsze tezy postulujące, że kształt w połączeniu z charakterem powierzchni nanomateriałów może w istotny sposób wpływać na żywotność i zachowanie komórek, a nanocząstki w formie nanodrutów mogą wydajniej mechanicznie uszkadzać komórki, są stosunkowo intuicyjne. To kolejne tezy pracy Pani Kingi są bardzo odważne i śmiałe. Mówią one bowiem, że niektóre bakterie *E.coli* potrafią bardzo szybko przystosować się do warunków stresowych, wywołanych mechanicznym oddziaływaniem nanocząstek, zmieniając zarówno swój fenotyp, jak i genotyp. Zmiany te widoczne są m.in. budowie ściany komórkowej oraz w ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w kluczowych procesach metabolicznych.

W **Rozdziale 1**, na 22 stronach, cytując aż 326 pozycji literaturowych, Autorka przedstawia swoiste kompendium wiedzy na temat nanotechnologii i nanomateriałów, ich rodzajów, sposobów otrzymywania oraz technik pozwalających na ich pełną charakteryzację. Doktorantka w bardzo przystępny dla czytelnika sposób charakteryzuje najważniejsze grupy nanomateriałów (głównie ze względu na ich skład), przedstawia także ich klasyfikację ze względu na tzw. „wymiarowość”. Dalej, Pani Kinga Matuła omawia dwie strategie otrzymywania nanomateriałów „top-down” i „bottom-up” obrazując je bardzo czytelnym schematem. Za niezwykle wartościowy uważam podrozdział 1.1.3., w którym omówione są najważniejsze techniki stosowane do charakteryzacji nanomateriałów, a umieszczona w nim tabela, rodem jak z podręcznika do nanotechnologii, stanowić może swoisty przewodnik dla naukowców podejmujących badania w obszarze nanomateriałów. Następnie Doktorantka wymienia i krótko charakteryzuje najważniejsze mechanizmy oddziaływania nanocząstek z komórkami, zauważając że właściwości fizyczne nanomateriałów mogą mieć w tych oddziaływaniach kluczowe znaczenie. Na podstawie krytycznej analizy tak wielu pozycji literaturowych Autorka przedstawia krótko zarys planowanych badań, które mają na celu potwierdzenie sformułowanych tez rozprawy.

Rozdział 2 pracy poświęcony jest badaniom wpływu nanocząstek tlenku cynku na żywotność komórek bakterii, grzybów oraz komórek eukariotycznych. We wstępie do tego rozdziału bardzo podobały mi się przedstawione fascynujące przykłady naturalnych powierzchni antybakteryjnych takich jak skrzydła cykady, czy ważki, struktura skóry gekona etc. Obserwując ich topografię Doktorantka doszła do wniosku, że kształty syntetycznych nanomateriałów również mogą mieć wpływ na żywotność komórek. Zaproponowała więc przeprowadzenie badań, pozwalających na określenie wpływu kształtu nanocząstek ZnO na efektywność ich oddziaływania z komórkowych. Do tego celu, po uprzedniej charakteryzacji wieloma technikami

(SEM, XRD, zeta-potencjał), wykorzystwała dwa typy nanocząstek ZnO – cząstki o „obłym” kształcie oraz cząstki w postaci nanodrutów. Podejrzewając, i bardzo dobrze!, że z badanych nanomateriałów mogą być uwalniane jony Zn^{2+} , Pani Matuła, techniką miareczkowania spektrofotometrycznego (**na obronie poproszę o więcej szczegółów dotyczących tej procedury analitycznej**) oznaczyła stężenia wolnych jonów cynkowych po 24 godzinach mieszania z nanocząstkami ZnO, w wodzie laboratoryjnej o standardzie MiliQ oraz medium hodowlanym stosowanymi w dalszych badaniach. Oznaczone stężenia Zn^{2+} w wodzie i medium (niestety o nieznanym początkowym pH) LB wynosiły odpowiednio ok. 20 mg/L i 40 mg/L. Są to stężenia dość znaczne, i w związku z tym sprawdzenie ich wpływu na badane komórki nie powinno być pominięte. Do tego samego wniosku doszła Doktorantka i przeprowadziła szereg badań w tym kierunku dla komórek bakterii Gram-ujemnych, Gram-dodatnich oraz komórek drożdży... ale niestety zupełnie pominęła badania cytotoksyczności wolnych jonów cynku na ludzkie komórki prawidłowe i nowotworowe, które w dalszych etapach poddawała działaniu badanych nanocząstek. Szkoda również, że Autorka nie pokusiła się o wyznaczenie tzw. profili uwalniania jonów Zn^{2+} z badanych nanocząstek w czasie np. 6h, czyli takim, w którym prowadziła eksperymenty z komórkami. Wówczas miałaby pełną wiedzę na temat stężenia tych jonów w czasie trwania eksperymentów. Ma to szczególne znaczenie, głównie w badaniach nad komórkami ludzkimi, ponieważ wolne jony cynkowe już w 1989 r. zostały określone przez Borovansky'ego jako **niebezpieczne dla komórek** (*Cytotoxicity of zinc in vitro, Chem. Biol. Interactions, 69, 1989, 279-291,*) w stężeniach już na poziomie 10 mg/L. Znaczną (choć nie tak istotną, jak w przypadku badanych nanocząstek ZnO) cytotoksyczność wolnych jonów Zn^{2+} potwierdzono także w pracy (*Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles, Int. J. Nanomed., 8, 2013, 983-993,*). Potwierdzono cytotoksyczność wolnych jonów Zn^{2+} o stężeniach 5, 10 i 20 mg/L na komórki A375 (test MTT i LDH), roztwory te ponadto generują stres oksydacyjny, indukują apoptozę oraz uszkodzenia DNA. W 2016 r. opublikowano wyniki badań mechanizmów adaptacyjnych ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego narażonych na działanie właśnie wolnych jonów Zn^{2+} . Badania ekspresji genów pozwoliły stwierdzić, że komórki już po 4 godzinach inkubacji, dla stężenia powyżej $2\mu M Zn^{2+}$, przechodzą z fazy adaptacji w fazę stresu (*Developing a Gene Biomarker at the Tipping Point of Adaptive and Adverse Responses in Human Bronchial Epithelial Cells, PLoS ONE, DOI:10.1371/journal.pone.0155875*). Nilsson w swojej pracy (*Acta Protozool. 42, 2003, 19-29, How Cytotoxic is Zinc? A Study on Effects of Zinc on Cell Proliferation, Endocytosis, and Fine Structure of the Ciliate Tetrahymena*) badał cytotoksyczność cynku na orzęski Tetrahymena. Stężenia jonów Zn^{2+} w przedziale 0,5-2,0 mM negatywnie wpływały na prowadzone hodowle zmieniając czas trwania fazy lag lub istotnie zmieniając dynamikę proliferacji i morfologię

hodowanych mikroorganizmów. Jak widać z przytoczonych wyżej przykładów, rola wolnych jonów cynku, nawet tych uwalnianych z badanych nanocząstek, nie powinna być pomijana w badaniach tym bardziej, że już przy bardzo niskich stężeniach indukują one określone procesy wewnątrzkomórkowe.

W związku z tym, że dalsze rozdziały pracy poświęcone są głównie komórkom bakteryjnym, i stanowią logiczny i spójny ciąg myślowy, fragmentu poświęconego komórkom eukariotycznym (ludzkim), Doktorantka mogłaby w ogóle nie umieszczać w swojej pracy i nie wpłynęło by to zupełnie na jej i tak bardzo wysoki poziom naukowy. Skoro jednak ten fragment został zamieszczony w pracy, to do niego właśnie będę miał większość uwag:

1. W pracy błędnie jest użyta nazwa nowotworowej linii komórkowej A594 zamiast A549,
2. Na str. 52 pojawia się stwierdzenie, że badane będą 2 linie nowotworowe, w tym linia HaCaT, która w rzeczywistości nie jest linią nowotworową,
3. Na kolejnej stronie pojawia się zupełnie nowa linia komórkowa A531.... Co to za linia? - nie wiadomo...
4. Wykorzystywane przez Doktorantkę komórki eukariotyczne to komórki adherentne, dlaczego więc do przeprowadzenia eksperymentów z nanocząstkami były one trypsynizowane i następnie poddawane mieszaniu? Są to warunki nienaturalne dla tych komórek, które są często wykorzystywane do tworzenia trójwymiarowych sferoidów wielokomórkowych.
5. Test LDH; (i) jaka jest jednostka na osi Y, na wykresach obrazujących wyniki tego testu?; (ii) dlaczego nawet niemieszane kontrole wykazują zmianę LDH (rys. 2.14)?; (iii) na podstawie wyników tego testu nie można w 100% wnioskować o żywotności komórek ponieważ często komórki z naruszoną błoną komórkową zachowują zdolności proliferacyjne. Niezbędne jest więc wykonanie testów komplementarnych np. MTT.

W **rozdziale 3** mgr inż. Kinga Matuła zawarła wyniki badań potwierdzające tezę, że bakterie *E.coli* narażone na mechaniczny stres wywołany oddziaływaniem z nanodrutami ZnO istotnie zmieniają swój fenotyp – zmieniają swój kształt na bardziej okrągły, zmianie ulegają też właściwości ściany komórkowej takie jak gęstość, grubość a nawet skład pierwiastkowy. W tym celu Doktorantka wykorzystwała szereg zaawansowanych technik: spektrofotometria UV-Vis, SEM, Cryo-SEM, TEM, spektroskopia rentgenowska z opcją badania składu pierwiastkowego (EDS) oraz AFM. Wszystkie eksperymenty zostały bardzo dobrze zaplanowane oraz bardzo starannie przeprowadzone. Za niezwykle trafne pomysły potwierdzenia wyżej wspomnianych zmian fenotypowych uważam **badania oddziaływań bakterii z bakteriofagami oraz wybranymi antybiotykami**. Pierwsze pozwoliły stwierdzić, że poddane stresowi mechanicznemu (nanodrutu ZnO) bakterie wykazują aktywność metaboliczną zbliżoną do kontroli, nie przechodzą tym samym w przejściowy stan VNBC, lecz zmieniają swój fenotyp

zachowując zdolność do namnażania na standardowych podłożach LB-Miller. W związku z tym, że w barwieniu Grama bakterie *E.coli* (G-) poddane działaniu ZnO-NR, wykazywały zwiększoną zawartość peptydoglikanu, Doktorantka zaproponowała sprawdzenie, czy stają się one przez to bardziej odporne na antybiotyki. Największe różnice udało się jej zaobserwować dla antybiotyków zakłócających syntezę peptydoglikanu - ampicyliny, bacytracyny, oraz cefazoliny. Zwiększona sztywność błony komórkowej badanych bakterii Gram-ujemnych, związana z wyższą obecnością peptydoglikanu w błonie komórkowej, została także potwierdzona za pomocą mikroskopii AFM.

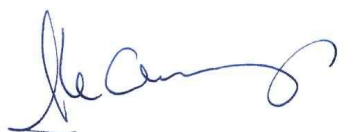
W tym rozdziale udało mi się znaleźć tylko jeden błąd i to tym razem chemiczny. Otóż w barwieniu Grama tworzone poliodki nie mają ładunku 3- tylko 1- więc powinny być zapisane jako I_3^- a nie jak pisze Autorka I^{3-} .

Rozdział 4 i 5 Doktorantka poświęciła badaniom genetycznym, w których sekwencjonowanie DNA i RNA zostały wykorzystane do poszukiwań mutacji i określenia zmian ekspresji genów. Pani Kinga Matule udało się potwierdzić kolejną postawioną w pracy tezę mówiącą, że konsekwencją działania warunków stresowych (w tym stresu mechanicznego) na bakterie są zmiany fenotypowe o podłożu genetycznym. Jest to także dowód na to, że bakterie po oddziaływaniu z nanodrutami ZnO nie przeszły w stan przejściowy VNBC. Ten bowiem, oprócz zmian w metabolizmie, nie wywołuje zmian ani w genomie ani w proteomie bakterii. Ten fragment pracy Doktorantki był dla mnie naprawdę fascynujący ponieważ prosty eksperyment o charakterze inżynierskim (mieszanie kolonii bakterii z zawiesiną nanocząstek) może prowadzić do tak zaawansowanych interdyscyplinarnych badań naukowych, których wyniki są niezwykle ciekawe i dające nowe spojrzenia na potencjalne konsekwencje zjawisk mogących wystąpić w środowisku nas otaczającym. Ponadto, oprócz ciekawych opisów i dyskusji przeprowadzonych badań w rozdziale 5 Autorka zamieszcza Tabelę 5.1, której konstrukcja przykuła moją uwagę na nieco dłużej i świadczy o dojrzałości naukowej Doktorantki. W tabeli tej w bardzo przemyślany sposób przedstawione są plany dalszych proponowanych badań w obszarze sekwencjonowania RNA. Pani Kinga Matuła podaje cel badań, stawia pytanie dlaczego należy dany fragment badań przeprowadzić, a w ostatniej kolumnie odpowiada na pytanie jak te badania można zrealizować.

Rozdział 6 stanowi podsumowanie pracy doktorskiej. Zawarte są w nim krótkie podsumowania poszczególnych rozdziałów oraz propozycje dalszych badań poparte krótką dyskusją, w której Autorka powołuje się na kolejne prace naukowe. W sumie w części literaturowej oraz części badawczej znaleźć możemy odniesienia do 501 pozycji bibliograficznych! Muszę przyznać, że podziwiam Panią Kingę Matułę za ogrom pracy włożony nie tylko w przeprowadzenie tylu interdyscyplinarnych badań, ale również za tak staranne

przygotowanie graficzne i edycyjne swojej pracy doktorskiej. Z pewnością będzie się nią mogła pochwalić w wielu zespołach badawczych, w których w przyszłości będzie pracować.

Podsumowując, recenzowana praca doktorska Pani Kingi Mały reprezentuje bardzo wysoki, poziom naukowy. Zaproponowane przez Doktorantkę metody oceny oddziaływań mechanicznych z nanocząstek tlenku cynku głównie z komórkami bakteryjnymi oraz uzyskane wyniki badań znacznie poszerzają naszą wiedzę na temat mechanizmów obronnych bakterii narażonych na działanie nanomateriałów. Z pełnym przekonaniem stwierdzam także, że recenzowana rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dn. 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65/2003 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr inż. Kingi Mały do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie mając na uwadze bardzo wysoki poziom naukowy recenzowanej pracy, jej interdyscyplinarny charakter oraz fakt, że prosty inżynierski eksperyment wsparty nowoczesnymi technikami badawczymi może prowadzić do niezwykle ciekawych wyników badań, stawiam formalny wniosek o wyróżnienie tej rozprawy.



Michał Chudy