

Warszawa, 26.07.2024 r.

prof. dr hab. n. med. Marta Wróblewska  
em. kierownik Zakładu Mikrobiologii Stomatologicznej  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

## **RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

**mgr Karola Skłodowskiego**

**pt. „Wpływ kształtu i rozmiaru nanocząstek złota na efekt przeciwbakteryjny i przeciwgrzybiczy ceragenin związanych z ich powierzchnią – badania *in vitro*”**

***Promotor: prof. dr hab. n. med. Robert Bucki***

***Promotor pomocniczy: dr n. med. Sylwia Joanna Chmielewska-Deptuła***

Recenzowana rozprawa doktorska dotyczy niezmiernie ważnej tematyki narastania lekooporności szczepów bakterii i grzybów wywołujących zakażenia u ludzi, a tym samym konieczności opracowania nowych metod terapii infekcji o takiej etiologii.

W ostatnich latach obserwuje się dynamiczny rozwój nowej dziedziny medycyny – nanomedycyny, który niewątpliwie przyczyni się do stworzenia nowatorskich opcji terapeutycznych w zakresie chorób zakaźnych. Trwają intensywne badania nanocząstek, które mogą być skutecznymi nośnikami leków przeciwdrobnoustrojowych, dostarczającymi te związki do komórek patogenów.

Oprócz dotychczas stosowanych antybiotyków i innych leków przeciwdrobnoustrojowych, nową opcją terapeutyczną zakażeń wywoływanych przez drobnoustroje wielolekooporne (ang. multidrug-resistant, MDR) mogą być cerageniny. Są to pochodne kwasu cholowego, będące analogami naturalnych kationowych lipidów o działaniu hamującym namnażanie się bakterii i grzybów. Doniesienia w literaturze naukowej wskazują, że w badaniach *in vitro* obserwuje się wzmocnienie działania takich związków, gdy są one związane z powierzchnią nanocząstek metali (np. złota).

Rozprawa doktorska Pana mgr Karola Skłodowskiego oparta jest na pracach badawczych przeprowadzonych z użyciem nanocząstek złota sfunkcjonalizowanych wybranymi cerageninami (CSA-13, CSA-44 i CSA-131), w celu określenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej tych związków zależnie od właściwości fizykochemicznych tych cząstek (kształt i rozmiar), możliwości indukcji oporności szczepów grzybów drożdżopodobnych na te związki, a także potencjalnej cytotoksyczności badanych substancji.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Karola Skłodowskiego stanowi cykl dwóch tematycznie spójnych artykułów (praca przeglądowa i praca oryginalna), opublikowanych w języku angielskim w 2021 r. oraz w 2023 r. w recenzowanych czasopismach naukowych, którym przypisano współczynnik oddziaływania (ang. Impact factor, IF) i punktację Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN). Doktorant jest pierwszym autorem tych prac (o wkładzie procentowym wynoszącym 60%), stanowiących opracowania zbiorowe. Dodatkowo rozprawa doktorska zawiera nieopublikowane wyniki oryginalnych badań tematycznie związanych z w/w cyklem artykułów.

Rozprawa doktorska mgr Karola Skłodowskiego liczy 148 stron, ma układ typowy dla prac doktorskich stanowiących cykl publikacji i obejmuje następujące części: Spis treści, Wykaz publikacji włączonych do rozprawy doktorskiej, Zestawienie publikacji oraz innego dorobku naukowego Doktoranta, Spis skrótów, Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Wnioski, kserokopie dwóch publikacji (Publikacja nr 1 i Publikacja nr 2) stanowiących cykl będący przedmiotem rozprawy, Streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim, Piśmiennictwo, Wykaz tabel i rycin, Dorobek naukowy (publikacje naukowe i doniesienia zjazdowe), Informacje o charakterze udziału współautorów w publikacjach, Oświadczenia współautorów publikacji oraz Zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. W przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej brak jest odrębnego rozdziału Dyskusja.

We wstępie liczącym 14 stron Doktorant przedstawił znaczenie zakażeń wywołanych przez poszczególne bakterie zawarte w grupie określanej akronimem ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) oraz drożdżaki z rodzaju *Candida*. Doktorant podał nowe nazwy gatunkowe drożdżaków znanych dotąd jako *Candida glabrata* (obecnie *Nakaseomyces glabratus*, aczkolwiek w pracy podano *N. glabrata*) oraz *C. krusei* (obecna nazwa *Pichia kudriavzevii*). W tej części rozprawy Doktorant scharakteryzował też mechanizmy oporności mikroorganizmów na leki przeciwdrobnoustrojowe. W dalszej części Wstępu zawarty jest opis ceragenin oraz nanocząstek złota sfunkcjonalizowanych cerageninami. Autor rozprawy wskazał, że wśród nanocząstek metali szlachetnych najlepsze właściwości (stabilność cząstek, silne działanie przeciwdrobnoustrojowe) wykazują nanocząstki złota. Należy podkreślić, że we wstępie Doktorant zamieścił trzy dodatkowe kolorowe ryciny, które znakomicie uzupełniają tekst tej części rozprawy i wyjaśniają omawiane mechanizmy oporności drobnoustrojów na antybiotyki, rodzaje nanocząstek będących przedmiotem badań w nanomedycynie oraz mechanizm działania nanocząstek złota.

W recenzowanej rozprawie doktorskiej Doktorant sformułował sześć celów pracy: określenie aktywności nanocząstek złota sfunkcjonalizowanych cerageninami wobec bakterii z grupy ESKAPE oraz grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*, ocena wpływu kształtu i wielkości tych nanocząstek na ich aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą, określenie mechanizmu działania badanych nanosystemów wobec grzybów i ocena indukcji oporności wybranych szczepów z rodzaju *Candida* na badane nanocząstki, a także określenie

aktywności badanych nanocząstek wobec zewnątrzkomórkowych i wewnątrzkomórkowych bakterii z grupy ESKAPE oraz ocena ich toksyczności wobec komórek gospodarza.

Rozdział „Materiały i metody” (8 stron) zawiera metodologię dodatkowych badań, przeprowadzonych oprócz eksperymentów opisanych w publikacji nr 2, m. in. użyte do badań szczepy bakterii i grzybów, podłoża i warunki hodowli, zastosowane związki przeciwdrobnoustrojowe, metody (określenie właściwości fizykochemicznych nanocząstek złota, wartości MIC, MBC i MFC badanych związków, test zliczania kolonii jako metoda określenia aktywności bakteriobójczej wybranych antybiotyków oraz badanych nanocząstek wobec *E. faecium*, *K. pneumoniae* i *A. baumannii* oraz ocena kinetyki wzrostu tych bakterii eksponowanych na badane związki. Kolejne eksperymenty obejmowały ocenę możliwości indukcji oporności grzybów *C. albicans* i *C. krusei* na badane nanocząstki, ocena działania badanych związków wobec drobnoustrojów pozakomórkowych i wewnątrzkomórkowych, porównanie aktywności przeciwgrzybiczej badanych nanocząstek złota w zależności od ich kształtu (patyczki, fistaszki, gwiazdki) i ceragenin w postaci wolnej, a także ocena cytotoksyczności badanych związków. Zastosowano adekwatne metody analizy statystycznej, a za poziom istotności statystycznej przyjęto wartość  $p \leq 0,05$ .

Rozdział „Wyniki” (9 stron) podzielony jest na osiem części, odpowiednio do przeprowadzonych eksperymentów wymienionych w rozdziale „Materiały i metody”. Wyniki przeprowadzonych badań oprócz opisu w tekście są także zilustrowane za pomocą tabeli i czterech rycin.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń naukowych Pan mgr Karol Skłodowski sformułował sześć wniosków, odpowiadających założonym celom recenzowanej rozprawy doktorskiej:

1. Nanocząstki złota sfunkcjonalizowane cerageninami wykazują wysoką aktywność bakteriobójczą i grzybobójczą.
2. Mechanizm aktywności przeciwdrobnoustrojowej nanosystemów obejmuje wytwarzanie reaktywnych form tlenu, depolaryzację oraz uszkodzenie błony komórkowej.
3. Nanocząstki złota sfunkcjonalizowane cerageninami nie indukowały oporności zarówno u szczepu wzorcowego *C. albicans*, jak i szczepu klinicznego *C. krusei*.
4. Badane nanosystemy charakteryzuje wysoka aktywność przeciwbakteryjna zarówno w stosunku do bakterii zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowych.
5. Niska aktywność hemolityczna badanych nanosystemów w dawkach bakteriobójczych oraz grzybobójczych wskazuje na ich duży potencjał w opracowywaniu nowych metod zwalczania infekcji wywoływanych przez bakterie z grupy ESKAPE oraz grzyby z rodzaju *Candida*.
6. Nanocząstki złota w kształcie fistaszków sfunkcjonalizowane cerageninami wykazują większą aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą w porównaniu do patyczków i gwiazdek.

Pierwsza publikacja wchodząca w skład cyklu, zatytułowana „Metallic nanosystems in the development of antimicrobial strategies with high antimicrobial activity and high biocompatibility” została opublikowana w 2023 r. w czasopiśmie „International Journal of Molecular Sciences” (IF: 5,6; punktacja MEiN: 140). Jest to bardzo obszerna praca przeglądowa, w której Doktorant i współautorzy szczegółowo opisali znaczenie badań nad nanomateriałami jako alternatywnej metody leczenia zakażeń wywoływanych przez wielolekooporne szczepy bakterii i grzybów. Nanomateriały (mające potencjał jako nośniki leków) obejmują cztery grupy związków: nanomateriały węglowe (np. fullereny, grafen i jego pochodne), nieorganiczne nanomateriały składające się z metali szlachetnych (np. złoto, srebro, platyna), organiczne nanomateriały (np. kationowe polimery, nanocząstki oparte na białkach lub lipidach) oraz nanomateriały kompozytowe (nanokompozyty), złożone z dwóch lub więcej składników (połączenie może obejmować nanomateriały metalu, węgla lub organiczne z metalami lub polimerami). W tej publikacji omówiono ogólne właściwości, zalety i wady tych czterech grup nanomateriałów i wskazano, że najbardziej obiecujące w medycynie są nanocząstki metali. Doktorant i współautorzy tej publikacji podkreślili, że szczególnie ważne jest opracowanie nowych skutecznych technik wprowadzania leku do komórek patogenów. W pracy tej przedstawiono potencjalne zastosowanie nanocząstek metali, sfunkcjonalizowanych odpowiednimi substancjami, w skojarzonej terapii zakażeń. Związki te nie tylko wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe, lecz także są skuteczne wobec drobnoustrojów zarówno w fazie planktonicznej, jak również w obrębie biofilmów. Być może dawki leków przeciwdrobnoustrojowych zastosowanych w terapii skojarzonej z użyciem tych nowatorskich związków będą mogły być zredukowane. Ważnym aspektem tych badań jest ocena biokompatybilności tych związków, szczególnie pod kątem braku toksyczności dla komórek organizmu gospodarza i jego fizjologicznej mikroflory. Dodatkowo, dotychczasowe badania nanocząstek metali sfunkcjonalizowanych odpowiednimi substancjami o działaniu przeciwdrobnoustrojowym wskazują na małe ryzyko powstania oporności mikroorganizmów na takie środki terapeutyczne. Praca ta stanowi niewątpliwie ważny wkład w przedstawienie aktualnego stanu wiedzy w zakresie potencjalnej roli nanocząstek metali, w tym złota, w opracowaniu nowatorskich terapii przeciwdrobnoustrojowych, o wysokiej skuteczności i biokompatybilności. Należy podkreślić, że artykuł ten liczy aż 44 strony i zawiera imponującą liczbę 301 pozycji piśmiennictwa.

Drugi artykuł z prezentowanego cyklu pt. „Ceragenin-coated non-spherical gold nanoparticles as novel candidacidal agents” jest pracą oryginalną, która ukazała się w czasopiśmie „Pharmaceutics” w 2021 r. (IF: 6, 525; punktacja MEiN: 100). W tej pracy Doktorant i współautorzy wykazali, że uzasadnione jest zastosowanie nanocząstek złota o różnych kształtach (patyczków, fistaszków lub gwiazdek), skonjugowanych z cerageninami CSA-13, CSA-44 lub CSA-131, jako podstawa do opracowania skutecznych terapii zakażeń wywoływanych przez grzyby z rodzaju *Candida*. W badaniach zastosowano wzorcowe oraz kliniczne szczepy *Candida albicans*, a także kliniczne szczepy *C. tropicalis*, *C. krusei* i *C. glabrata*. Doktorant i współautorzy tej publikacji podkreślają nowatorski aspekt tej pracy,

gdyż stanowi ona pierwsze w literaturze doniesienie zawierające porównanie aktywności różnych postaci nanocząstek złota sfunkcjonalizowanych cerageninami CSA-13, CSA-44 i CSA-131 z działaniem wolnych form tych ceragenin wobec szczepów drożdżaków z rodzaju *Candida*.

Bibliografia obejmuje 139 pozycji literatury, które są przedstawione według kolejności cytowania w tekście rozprawy. Prawie połowa tych pozycji literatury została opublikowana w latach 2018 – 2023, jednak brak jest publikacji z 2024 r. Dodatkowo piśmiennictwo podane jest też w poszczególnych pracach stanowiących cykl: 301 pozycji piśmiennictwa w publikacji nr 1 (artykuł przeglądowy) oraz 88 – w publikacji nr 2 (artykuł oryginalny). Niestety, w wykazie cytowanego piśmiennictwa brak jest ujednolicenia (pełne nazwy czasopism vs skróty nazw, pisownia nazw czasopism małymi literami, w niektórych publikacjach brak numeru wolumenu i stron). Jako mikrobiolog mam zastrzeżenia w odniesieniu do braku kursywy w nazwach gatunkowych bakterii i grzybów.

Z obowiązku recenzenta chciałabym przedstawić następujące uwagi:

- ESKAPE to grupa bakterii wykazujących oporność na leki przeciwbakteryjne, jednak uważam, że nie można jednoznacznie zdefiniować tej grupy jako patogeny wysoce zjadliwe (str. 8), ale raczej jako drobnoustroje oportunistyczne, gdyż z wyjątkiem *S. aureus* występują jako mikroflora fizjologiczna człowieka lub bytują w środowisku zewnętrznym, a zakażenia wywołują w sprzyjających warunkach (np. zaburzenia odporności gospodarza)
- fragment dotyczący szczepów MRSA (str. 12): chodzi o wprowadzenie do leczenia w 1959 r. metycyliny i opisanie 2 lata później (w 1961 r.) szczepów *S. aureus* opornych na ten antybiotyk, a nie antybiotyków  $\beta$ -laktamowych (penicylina należąca do tej grupy antybiotyków była wprowadzona do leczenia ludzi w 1941 r.)
- w tekście rozprawy używane są zamiennie terminy „posocznica” i „sepsa”, jednak w literaturze medycznej oraz w wytycznych różnych towarzystw na świecie (ang. Global Sepsis Alliance) i w Polsce (np. Narodowy Program Zwalczenia Sepsy) zaleca się obecnie stosowanie terminu „sepsa”
- karbapenemazy należą do metalo- $\beta$ -laktamaz (str. 16 powinno być: „metalo- $\beta$ -laktamazy, w tym karbapenemazy”)
- odnośnie do wniosku nr 4 interesujące byłoby rozszerzenie badań o bakterie wewnątrzkomórkowe, posiadające mechanizmy przeżywania i namnażania się wewnątrz komórek gospodarza (np. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, itp.)
- w tekście rozprawy są błędy edytorskie, które oczywiście nie mają wpływu na bardzo wysoką wartość naukową pracy, np. brak niektórych skrótów w „Spisie skrótów” (np. DMSO, VRSA); brak wyjaśnienia skrótów w tekście przy pierwszym użyciu, co utrudnia lekturę rozprawy; używanie słowa „medium” zamiast „podłoże”.

Stwierdzam, że w przeprowadzonej pracy badawczej Doktorant wykazał się bardzo szeroką wiedzą w zakresie tematyki artykułów stanowiących cykl publikacji oraz dodatkowych badań eksperymentalnych przedstawionych w recenzowanej rozprawie,

umiejętnością samodzielnego zaplanowania i prowadzenia badań naukowych, a także wnikliwą analizą uzyskanych wyników. Wnioski zawarte w rozprawie są spójne z założonymi celami pracy i są sformułowane poprawnie. Metody badawcze oraz uzyskane wyniki przeprowadzonych eksperymentów naukowych, opublikowane w artykule oryginalnym włączonym do cyklu publikacji (publikacja nr 2), zostały pozytywnie ocenione przez niezależnych recenzentów renomowanego czasopisma naukowego. Pragnę podkreślić duży dotychczasowy dorobek naukowy Doktoranta (sumaryczny IF 79,327; punktacja MEiN: 1840).

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Karola Skłodowskiego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Pracę tę oceniam pod względem merytorycznym bardzo wysoko, szczególnie w aspekcie oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych nanocząstek, co ma znaczenie w opracowywaniu nowatorskich metod terapii zakażeń wywoływanych przez MDR szczepy patogenów.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Karola Skłodowskiego spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023, poz. 742), zwracam się więc do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgr Karola Skłodowskiego ze względu na znaczący wkład w zakresie wiedzy o potencjalnym zastosowaniu klinicznym nanocząstek złota sfunkcjonalizowanych cerageninami wykazującymi aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą, przy jednoczesnym braku indukcji oporności drobnoustrojów i toksyczności tych związków, zastosowanie nowoczesnych metod badawczych oraz bardzo dużą wartość naukową cyklu publikacji stanowiącej pracę doktorską i przeprowadzonych badań eksperymentalnych.

.....Marta Wróblewska.....