

Dr hab. n. med. Marzena Wątek prof. URad.
Wydział Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu
ul. Chrobrego 27, 26-600 Radom

Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Karola Skłodowskiego
pt: **Wpływ kształtu i rozmiaru nanocząstek złota na efekt przeciwbakteryjny i przeciwgrzybiczy ceragenin związanych z ich powierzchnią – badania in vitro”**
wykonanej pod kierunkiem **Pana prof. dr hab. n. med. Roberta Buckiego** oraz promotora pomocniczego **Pani dr n. med. Sylwii Joanny Chmielewskiej-Deptuły** w Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Zakażenia wywoływane przez drobnoustroje lekooporne uważane są obecnie za jeden z najbardziej palących problemów zdrowotnych na świecie. Są problemem epidemiologicznym, ale również stanowią istotny problem ekonomiczny. Szacuje się, że w 2019 roku (przed erą zakażeń wirusem SARS-CoV-2) zakażenia bakteryjne były przyczyną śmierci około 7,7 miliona osób (4,95 miliona zgonów spowodowały drobnoustroje wielolekooporne). Szacuje się nadto, że z kolei zakażenia grzybicze każdego roku są przyczyną śmierci 1,7 miliona osób. Najnowsze prognozy wskazują, że do 2050 roku zakażenia wywołane przez drobnoustroje lekooporne będą powodować 10 milionów zgonów rocznie, a liczba zgonów z powodu zakażeń bakteryjnych będzie główną przyczyną śmierci ludności, przewyższając umieralność wywołaną przez choroby nowotworowe.

Niepowodzenie stosowanej antybiotykoterapii spowodowane jest między innymi narastającą lekoopornością mikroorganizmów spowodowaną nadmiernym stosowaniem antybiotyków (gł. w rolnictwie i medycynie), wynikającym z braku znajomości zasad racjonalnej antybiotykoterapii. Zdolność mikroorganizmów do tworzenia wielokomórkowych struktur biofilmu jest istotnym czynnikiem wpływającym na niepowodzenie stosowanej terapii. Komórki bakterii oraz grzybów chronione przez macierz biofilmu są nawet 1000 krotnie bardziej odporne na środki dezynfekcyjne oraz stosowane leczenie w porównaniu do planktonicznej formy wzrostu. Niepokojącym faktem jest, że większość stosowanych obecnie antybiotyków jedynie zmniejsza liczbę komórek bakteryjnych lub grzybiczych znajdujących się w strukturze biofilmu, nie prowadząc do ich całkowitej eradykacji. Konsekwencją tego jest rozwój przewlekłych i nawracających zakażeń. Z tego też względu, konieczne jest poszukiwanie nowych środków przeciwdrobnoustrojowych, skutecznych w stosunku do patogenów tworzących biofilm.

Doktorant we wstępie dysertacji szeroko wprowadza w temat epidemiologii zakażeń bakteryjnych oraz grzybiczych przybliżając ich cechy i szczegółowo charakteryzuje rodzaje mechanizmów oporności szczepów lekoopornych, co ułatwia zrozumienie i analizę dalszych części dysertacji.

Narastająca oporność bakterii i grzybów na antybiotyki stanowi globalne wyzwanie współczesnej medycyny. Obiecującym narzędziem w walce z narastającą opornością jest nanotechnologia.

Uważa się z kolei, że alternatywę dla współcześnie stosowanych antybiotyków mogą stanowić cerageniny (CSAs), ponieważ są lipidowymi analogami naturalnych peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Struktura ceragenin opiera się na kwasie cholowym, będącym naturalnym steroidowym związkiem chemicznym, który nadaje cerageninom ich charakterystyczne właściwości. CSAs wykazują amfipatyczny charakter – zawierają zarówno regiony hydrofilowe umożliwiające interakcje z wodą oraz innymi substancjami polarnymi oraz regiony hydrofobowe zapewniają interakcje z hydrofobowymi elementami błon lipidowych. Dzięki temu cerageniny mogą łatwo wbudowywać się w błonę lipidową drobnoustroju. Cerageniny, w przeciwieństwie do kwasu cholowego, posiadają grupy funkcyjne z dodatnim ładunkiem. Kationowy charakter CSAs umożliwia ich oddziaływanie z negatywnie naładowanymi cząsteczkami na powierzchni komórek mikroorganizmów. Główny mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego CSAs obejmuje bezpośrednią interakcję elektrostatyczną z ujemnie naładowanymi błonami komórkowymi drobnoustroju, co po wbudowaniu CSAs w strukturę błony prowadzi do zmian w organizacji fosfolipidów błony oraz jej depolaryzacji. Mechanizm działania ceragenin obejmuje również stymulację wytwarzania wolnych rodników co prowadzi do stresu oksydacyjnego. Tym samym, skutkiem oddziaływania ceragenin z komórkami bakterii jest utrata integralności ich błony komórkowej, zwiększenie jej przepuszczalności i utrata składników wewnątrzkomórkowych, a także uszkodzenie materiału genetycznego komórki oraz zaburzeniami w procesie replikacji i naprawy DNA. Uważa się, że CSA stanowią alternatywę dla antybiotyków ze względu na szerokie spektrum działania obejmujące bakterie Gram-dodatnie i Gram-ujemne, grzyby, a także szczepy wielolekooporne. Cerageniny wykazują także działanie przeciwbiofilmowe, sporobójcze, przeciwwirusowe, przeciwpasożytnicze i przeciwnowotworowe. Co więcej, cerageniny, w porównaniu z klasycznymi antybiotykami, charakteryzują się mniejszą tendencją do indukcji lekooporności.

Nie opisano dotychczas szczepów bakteryjnych czy grzybiczych wykazujących oporności na cerageniny. Potencjał terapeutyczny CSAs podkreśla także ich niska toksyczność, stabilność w warunkach fizjologicznych i niskie koszty produkcji. Dodatkowo, cerageniny posiadają szereg korzystnych cech farmakokinetycznych i farmakodynamicznych, takich jak amfipatyczny charakter chemiczny, niespecyficzny, błonowy mechanizm działania, niewrażliwość na proteazy, a także wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową w płynach ustrojowych.

W związku z tymi faktami, celem analizy naukowej Doktoranta było 1. określenie aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej nanocząstek złota sfunkcjonalizowanych cerageninami wobec bakterii z grupy ESKAPE oraz grzybów drożdżopodobnych. 2. ocena wpływu kształtu oraz wielkości nanocząstek złota sfunkcjonalizowanych cerageninami na aktywność przeciwbakteryjną oraz przeciwgrzybiczą. 3. określenie przeciwgrzybiczego mechanizmu działania badanych nanosystemów. 4. ocena indukcji oporności na nanocząstki złota sfunkcjonalizowane cerageninami u wybranych szczepów *Candida*. 5. określenie aktywności badanych nanosystemów w stosunku do zewnątrzkomórkowych oraz wewnątrzkomórkowych patogenów z grupy ESKAPE (grupa lekoopornych bakterii, które ze względu na swoją niewrażliwość na powszechnie stosowane antybiotyki, wynikającą z obecności różnych mechanizmów oporności, stały się istotnym problemem epidemiologicznym o charakterze globalnym: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterobacter* spp.). Ale także 6. ocena toksyczności badanych nanocząstek złota sfunkcjonalizowanych cerageninami w stosunku do komórek gospodarza.

Wybór tematu rozprawy doktorskiej należy uznać za wyjątkowo istotny, szczególnie w kontekście uwzględnionej we wstępie dysertacji narastającej z każdym rokiem liczby zgonów pacjentów.

Rozprawa doktorska stanowi zbiór dwóch opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, jednej publikacji pogładowej oraz jednej publikacji oryginalnej. Sumaryczny współczynnik wpływu Impact Factor (IF) tych prac wynosi 12,125, suma punktów MEiN 240. Doktorant jest pierwszym autorem obydwu prac zbioru.

Na realizację tematu badawczego uzyskana została zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku – uchwała nr R-I-002/231/2019r z dnia 28.03.2019 r.

Rozprawa doktorska magistra Karola Skłodowskiego liczy 120 stron standardowego maszynopisu według typowego, powszechnie akceptowanego układu, który obejmuje: wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, zestawienie publikacji, spis skrótów, wstęp, cele pracy, materiał i metodykę badań, wyniki wraz z ich omówieniem, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz cytowanego piśmiennictwa, spis tabel i rycin. Doktorant zamieszcza również informację o pozostałym dorobku naukowym, informację o charakterze udziału współautorów w publikacjach, oświadczenie współautorów oraz zgodę Komisji Bioetycznej na prowadzone badania.

W pierwszej publikacji w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences, 2023, IF: 5,6; MEiN: 140 Doktorant przedstawił dane historyczne dotyczące rozwoju nanotechnologii oraz przedstawił aktualny stan wiedzy na temat nanomateriałów i możliwości ich użycia jako alternatywy dla obecnie stosowanych antybiotyków i leków przeciwgrzybiczych. Doktorant przeanalizował rodzaje nanocząsteczek uwzględniając ich właściwości materiałowe, fizyczne i fizykochemiczne, celem najskuteczniejszego efektu p/drobnoustrojowego. Główne mechanizmy

działania przeciwdrobnoustrojowego nanocząstek metali obejmują: (1) uszkodzenia ściany komórkowej patogenu powodujące ich zwiększoną przepuszczalność, (2) generowanie ROS zakłócających homeostazę redoks i uszkadzających struktury komórkowe, (3) wiązanie ze strukturami wewnątrzkomórkowymi powodując ich dysfunkcję.

Doktorant uwzględnił w publikacji informację, że kombinacje nanocząstek i środków przeciwdrobnoustrojowych mają wyższą skuteczność w porównaniu do samych środków przeciwdrobnoustrojowych i jak wykazano mogą zmniejszyć rozwój oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe.

Szczegółowo przedstawione zostały również

1. kategorie metalicznych nanocząstek na podstawie rodzaju ich składników: (i) monometaliczne nanocząstki, (ii) metaliczne nanocząstki w połączeniu z konwencjonalnymi antybiotykami/fungicydami lub związkami innymi niż środki przeciwdrobnoustrojowe, (iii) wielometaliczne nanocząstki same i (iv) w połączeniu z antybiotykami/fungicydami, (v) metaliczne nanocząstki, których powierzchnia została dodatkowo funkcjonalizowana antybiotykami/fungicydami lub związkami innymi niż środki przeciwdrobnoustrojowe.

2. rodzaje funkcjonalizacji powierzchni metalicznych nanocząstek pożądanymi związkami z pomocą wiązań kowalencyjnych lub niekowalencyjnych z pomocą cząsteczek łączących, a) materiały organiczne (glikol polietylenowy (PEG), alkohol poliwinylowy (PVA), chitozan, dekstran, alginian, kwas poliakrylowy, cytryniany, fosforany, aminy) lub substancje nieorganiczne (metale i tlenki metali, krzemionki), b) funkcjonalizacja niekowalencyjna oparta na dużej liczbie słabych oddziaływań, takich jak oddziaływanie jonowe, oddziaływanie van der Waalsa, oddziaływanie hydrofobowe, oddziaływanie elektrostatyczne, wiązania wodorowe, które są stosowane do nanocząstek metalicznych i krzemionkowych. Jedną z najważniejszych nanocząstek ze względu na ich prostą i kontrolowaną syntezę, obojętność, biokompatybilność i niską toksyczność w porównaniu z innymi nanomateriałami są nanocząsteczki złota (AuNP).

Wyniki analizy działania kandydabójczego tych właśnie nanocząsteczek pokrytych cerageniną stały się podstawą drugiej publikacji Doktoranta „*Ceragenin-Coated Non-Spherical Gold Nanoparticles as Novel Candidacidal Agents*” w czasopiśmie *Pharmaceutics* w 2021 r. IF: 6,525; MEiN: 100. Ta praca oryginalna włączona do rozprawy doktorskiej zawiera uzyskane w analizie naukowej wyniki dotyczące aktywności badanych ceragenin i nanosystemów wobec *Candida* spp. Jak wykazało badanie, wszystkie badane nanosystemy wywierały silny wpływ na *Candida* niezależnie od gatunku lub podatności na inne czynniki przeciwgrzybicze. Co istotne, zaobserwowano brak rozwoju oporności po 25 przejściach komórek *Candida* z nanosystemami AuR-CSA-13, AuR-CSA-44 i AuR-CSA-131. Ponadto, grzybobójczy mechanizm działania badanych nanosystemów obejmował wytwarzanie ROS, uszkodzenie błony komórki grzybiczej i wyciek zawartości

wewnątrzkomórkowej. W szczególności nie wykryto znaczącej hemolizy krwinek czerwonych w dawkach kandydabójczych badanych nanosystemów.

Wyniki dostarczają uzasadnienia dla rozwoju nanocząstek złota rod-, peanut- and star-shaped sprzężonych z CSA-13, CSA-44 i CSA-131 jako skutecznych czynników kandydabójczych.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki odpowiadają postawionym celom i opierają się na wynikach istotnych statystycznie.

Na podstawie przeprowadzonych analiz naukowych Doktorant sformułował wnioski:

1. Nanocząstki złota sfunkcjonalizowanie 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 sfunkcjonalizowane cerageninami w kształcie fistaszków wykazują większą aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą w porównaniu do patyczków i gwiazdek.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska magistra Karola Skłodowskiego charakteryzuje się niezwykłą trafnością wyboru tematu. Doktorant wykazał się umiejętnością wykorzystania dostępnej bibliografii oraz formułowania celów planowanych badań naukowych i wniosków z nich wypływających. Zawarta w rozprawie analiza tematu jest spójna i przyczynia się do lepszego poznania omawianej tematyki, jest cennym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego. Autor nie ustrzegła się drobnych błędów edycyjnych, które nie umniejszają jednak wartości pracy. Doktorant w pełni zrealizował zaplanowany cel, dobrze opanował warsztat badawczy i wykazał doskonale przygotowanie merytoryczne. Dysertacja ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska magistra Karola Skłodowskiego spełnia warunki określone w Ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2023 r poz. 742 z późn.zm). Tym samym wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie magistra Karola Skłodowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuję o uznanie pracy za wyróżniającą.

dr hab. n. med. Marzena Wątek prof. URad

Handwritten signature of Marzena Wątek in blue ink.