



UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE
Wydział Biologii i Biotechnologii

Lublin, 2 sierpnia 2023

Monika Janczarek
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Środowiskowej
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
tel. 81-537-59-09
monika.janczarek@mail.umcs.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Justyny Rewak-Soroczyńskiej

pt. „Badania aktywności biologicznej jonów lantanowców i jonów metali przejściowych oraz nanomateriałów na bazie hydroksyapatytu współdomieszkowanych tymi jonami wobec *Pseudomonas aeruginosa*” w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne

Rozprawa doktorska została zrealizowana w Oddziale Fizykochemii Biomedycznej Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych Polskiej Akademii Nauk we współpracy z Zakładem Biologii Patogenów i Immunologii na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Promotorem tej rozprawy jest prof. dr hab. Rafał J. Wiglusz, a promotorem pomocniczym dr Agata Dorotkiewicz-Jach.

Recenzję ww. rozprawy doktorskiej wykonano w odpowiedzi na pismo nr RN-64/2023 z dnia 28 czerwca 2023 przesłane przez prof. dr. hab. Andrzeja Gamiana, Dyrektora Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, zawierające informację o powołaniu mnie na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Justyny Rewak-Soroczyńskiej.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma postać monografii liczącej 209 stron, łącznie z literaturą, materiałami dodatkowymi i rozdziałem opisującym osiągnięcia naukowe Doktorantki. W mojej ocenie monografia jest bardzo wymagającą formą prezentowania wyników pracy naukowej, która wymusza konieczność panowania nad całością tekstu przez jedną osobę. Ale ogromną zaletą takiej formy prezentowania wyników jest możliwość zapoznania się z osobistym nastawieniem Autora do swoich badań w kontekście badań innych naukowców, a przez to można poznać Jego dojrzałość naukową. Dzięki ogromnemu wsparciu merytorycznemu i dużemu doświadczeniu naukowemu obu Promotorów, prof. dr. hab. Rafała Wiglusza i dr Agaty Dorotkiewicz-Jach, Pani mgr Justyna Rewak-Soroczyńska, mogła uzyskać wiele wartościowych wyników o dużym potencjale aplikacyjnym. Pozwoliło to na uzyskanie rozprawy na bardzo wysokim poziomie

naukowym, której znacząca część wyników została już opublikowana w czterech pracach eksperymentalnych: *Biomolecules 2022*, *Curr. Issues Mol. Biol. 2022*, *Biomaterials Advances 2022*, *ACS Omega 2020* oraz jednej pracy przeglądowej (*Tygiel 2022*). Doktorantka jest pierwszym autorem w trzech z tych prac. W mojej ocenie, mgr Justyna Rewak-Soroczyńska wyróżnia się dużą aktywnością naukową. Potwierdzeniem tego jest Jej współautorstwo 15 publikacji, 12 wystąpień na konferencjach naukowych oraz jednego patentu w okresie 2018-2023. Uważam osiągnięcia te za wybitne, biorąc pod uwagę obecny etap kariery naukowej Doktorantki.

Problem badawczy

Tematyka badawcza podjęta przez mgr Justynę Rewak-Soroczyńską jest bardzo ważna i aktualna ze względu na duże zagrożenie zdrowia ludzi powodowane przez bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Ten oportunistyczny patogen człowieka wytwarza wiele czynników wirulencji (m.in. siderofory oraz zewnątrzkomórkowe enzymy: proteazy i elastazy) i charakteryzuje się wysoką antybiotykoopornością oraz zdolnością do wywoływania infekcji w miejscach wszczepów. Zdolność do efektywnego tworzenia trwałych i odpornych na działanie antybiotyków biofilmów na powierzchniach stałych przez *P. aeruginosa*, w tym na materiałach wszczepiennych, umożliwia tym bakteriom efektywne zasiedlanie różnych nisz ekologicznych, wliczając w to tkanki ludzkie. Dlatego istnieje konieczność intensywnego poszukiwania nowych materiałów implantacyjnych o właściwościach antybakteryjnych. *P. aeruginosa* jest jednym z wielolekoopornych patogenów charakteryzujących się zdolnością do szybkiej adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych, w tym także do leków przeciwbakteryjnych oraz dezynfektantów. O istotności zagrożenia zdrowotnego ze strony tej bakterii świadczy fakt zaklasyfikowania jej do grupy patogenów ESKAPE. Z tych powodów tematyka badawcza podjęta przez Doktorantkę i zespół Profesora Rafała Wiglusza jest bardzo ważna i wpisuje się ona doskonale w aktualne potrzeby medyczne.

Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne. Tytuł pracy odpowiada treściom w niej zawartym, a opisywane zagadnienia dotyczą aktualnych kierunków badań związanych z opracowaniem nowych biokompatybilnych materiałów implantacyjnych, które byłyby nietoksyczne dla komórek ludzkich, a posiadały właściwości antybakteryjne wobec bakterii *P. aeruginosa*. Struktura rozprawy jest typowa dla tego rodzaju prac naukowych. Ogółem dysertacja składa się z trzynastu rozdziałów i jest bardzo bogato ilustrowana. Zawiera bowiem 50 rycin i 18 tabel w części zasadniczej rozprawy oraz 11 rycin i 7 tabel w Materiałach dodatkowych, umieszczonych na końcu pracy. Siedem rozdziałów dysertacji ma charakter merytoryczny (Wstęp, Cel rozprawy doktorskiej, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Materiały dodatkowe), a sześć rozdziałów charakter pomocniczy (Streszczenie, Abstrakt, Wykaz skrótów, Wykaz rycin i tabel, Literatura, Dorobek naukowy Autora). Dodatkowy podział rozdziałów „Wstęp”, „Materiały i metody” i „Wyniki” na wiele podrozdziałów sprawia, że praca jest przejrzysta i czytelna. Rozprawa została opracowana

szczegółowo i starannie, zarówno pod względem naukowym, jak też graficznym, dzięki czemu czytało się ją z dużą przyjemnością.

Rozdział „Wstęp” (38 stron) jest obszernym opisem cech charakterystycznych *P. aeruginosa* oraz nowych alternatywnych strategii w walce z zakażeniami wywołanymi przez szczepy tych bakterii. Doktorantka opisała szczegółowo najważniejsze czynniki wirulencji (tj. struktury powierzchniowe - LPS, fimbrie, rzęskę, pili, substancje wydzielane poza komórkę (tj. barwniki, siderofory i enzymy) oraz zdolność ruchu, adhezji i tworzenia biofilmów. W dalszej części tego rozdziału Doktorantka scharakteryzowała nowoczesne metody zwalczania zakażeń wywołanych *P. aeruginosa*, oparte na nanotechnologii i wykorzystaniu antybakteryjnych właściwości jonów metali. Spośród różnych materiałów, hydroksyapatyt wapnia (HAp), będący związkiem naturalnie występującym w organizmie człowieka (jako składnik kości i zębów), jak też jego modyfikacje za pomocą różnych podstawników, są najbardziej obiecującym materiałem do zastosowania w medycynie. Doktorantka opisała szczegółowo aktualny stan wiedzy w tym temacie z cytowaniem licznej literatury (łącznie 210 prac), co stanowiło bardzo dobre wprowadzenie do części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej.

Cel rozprawy został sformułowany bardzo jasno i precyzyjnie. Doktorantka postanowiła zbadać aktywność biologiczną jonów lantanowców i jonów przejściowych w formie wolnej oraz jako domieszek w różnych formach nanohydroksyapatytu wobec wybranych szczepów wzorcowych i klinicznych *P. aeruginosa*. Cel ten był bardzo ambitny i szeroko zakrojony, lecz mimo tego osiągnięto go w pełni, konsekwentnie realizując powiązane ze sobą zadania badawcze.

Rozdział „Materiały i metody” (29 stron) – ta część rozprawy została opisana przez Doktorantkę również bardzo dokładnie i wyczerpująco, co pozwoliłoby czytelnikowi na odtworzenie przeprowadzonych analiz. Bardzo precyzyjnie i drobiazgowo zostały opisane stosowane szczepy i biomateriały, jak też metody i techniki badawcze. Na podkreślenie zasługuje bogaty warsztat metodyczny Doktorantki oraz ogromna liczba związków, które zostały poddane analizom.

Podobnie rozdział „Wyniki” jest bardzo obszerny (60 stron); został przygotowany przez Doktorantkę bardzo szczegółowo i bogato ilustrowany licznymi rycinami (50) oraz tabelami (18). Uzyskane wyniki opisano drobiazgowo w dwóch obszernych podrozdziałach. Ponadto, szczegółowe wyniki, które były uzupełnieniem danych zawartych w głównej części rozprawy dołączono w formie „**Materiałów dodatkowych**” na końcu pracy. Uważam to za bardzo dobre rozwiązanie, które zwiększa przejrzystość pracy i ułatwia analizę danych.

Pierwsza część rozdziału „**Wyniki**” zawiera rezultaty badań dotyczących aktywności biologicznej wolnych jonów lantanowców i jonów metali przejściowych. Ze względu na znane z literatury informacje częstego wykorzystywania lantanowców jako domieszek w nanomateriałach z potencjałem zastosowania w implantologii, Doktorantka na wstępie swoich badań sprawdziła wpływ tych jonów na wzrost i wirulencję dwóch szczepów wzorcowych *P. aeruginosa* (PAO1 i ATCC278530) oraz kilku szczepów klinicznych. Określono wartości minimalnych stężeń hamujących wzrost tych bakterii (MIC) przez 13 jonów Ln³⁺, stosując jako parametry: stopień zmętnienia hodowli (OD₆₀₀) i CFU/ml. Wartość MIC dla wszystkich badanych jonów

Ln^{3+} ustalono na 500 $\mu\text{g/ml}$. Nie zaobserwowano istotnych różnic między aktywnością poszczególnych jonów, jak też pomiędzy szczepami PAO1 i ATCC27853 w obecności niższych stężeń tych jonów (tj. 250 $\mu\text{g/ml}$ = 0,5 MIC i 125 $\mu\text{g/ml}$ = 0,25 MIC). Stąd, w dalszych etapach badań Doktorantka stosowała już konsekwentnie te stężenia subinhibicyjne jonów Ln^{3+} . W kolejnym etapie badań sprawdzono wpływ tych jonów na tworzenie biofilmu przez szczepy PAO1 i ATCC27853, stosując metodę z fioletem krystalicznym i obrazowanie z wykorzystaniem barwników specyficznych dla żywych i martwych komórek (zestaw LIVE/DEAD) oraz mikroskopu konfokalnego. Zdolność tworzenia biofilmu przez ten patogen jest poważnym utrudnieniem w jego eliminacji z organizmu człowieka. Stąd, ten aspekt badań uważam za szczególnie istotny. Doktorantka poczyniła bardzo ważne obserwacje w tym zakresie, potwierdzając że bakterie *P. aeruginosa* wytwarzają znacznie większe ilości biofilmu w obecności jonów lantanowców (250 $\mu\text{g/ml}$ - 0,5 MIC), który jest większej grubości w porównaniu do biofilmu tworzonego w warunkach kontrolnych. Zaobserwowano też różnice między testowanymi jonami. Najwięcej biofilmu powstawało w obecności jonów Eu^{3+} , Tb^{3+} , Dy^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} . Zaobserwowano jedynie niewielkie różnice między szczepami. Co ciekawe, komórki bakterii w tych biofilmach były w ogromnej większości żywe, co wskazuje na brak negatywnego wpływu tych metali na żywotność *P. aeruginosa* w badanych warunkach. Do tej części badań mam pytanie do Doktorantki, czy był brany pod uwagę aspekt prawdopodobnie zwiększonej produkcji zewnątrzkomórkowego polisacharydu (alginianu) w obecności jonów badanych metali, jak ma to miejsce w przypadku innych bakterii oraz metali? Egzopolisacharydy stanowią zwykle znaczący składnik matrix biofilmu i chronią bakterie w nim zawarte przed szkodliwymi czynnikami środowiskowymi. Czy znane są dane literaturowe wskazujące na protekcyjną rolę tego polisacharydu u *P. aeruginosa* wobec toksycznych warunków panujących w obecności jonów metali? Prosiłabym Doktorantkę o komentarz w tej kwestii.

W dalszej części pracy Doktorantka scharakteryzowała właściwości powierzchniowe komórek *P. aeruginosa* (tj. hydrofobowość, ładunek powierzchniowy, przepuszczalność błon), w celu wyjaśnienia przyczyn tworzenia zwiększonej ilości biofilmów w obecności jonów Ln^{3+} . Tę część badań prowadzono już na 5 wybranych (tj., Ce^{3+} , Er^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Yb^{3+}) spośród 13 jonów Ln^{3+} , dla których uzyskano największe różnice w stosunku do próby kontrolnej. Doktorantka wykazała znaczące zwiększenie hydrofobowości komórek PAO1 i ATCC27853 w obecności 0,5 MIC lantanowców (statystycznie istotne różnice dla Er^{3+} i Yb^{3+}). Kolejnym ważnym spostrzeżeniem było wykazanie wzrostu potencjału zeta w obecności jonów tych metali (szczególnie Er^{3+} , Eu^{3+} i Gd^{3+}) oraz zmniejszenia przepuszczalności osłon komórkowych (w przypadku PAO1 dla wszystkich jonów, dla ATCC27853 tylko w obecności Er^{3+} i Yb^{3+}). W związku z tym, chciałam zapytać Doktorantkę czy zmiana własności powierzchniowych komórek *P. aeruginosa* mogła być spowodowana zmianą ilości lub struktury polisacharydów powierzchniowych (np. alginianu czy LPS) syntetyzowanych w obecności jonów lantanowców? W mojej ocenie za ten efekt, przynajmniej w pewnym stopniu, mogą być odpowiedzialne zewnątrzkomórkowe i/lub powierzchniowe polisacharydy. Warto w przyszłości rozszerzyć badania o ten wątek badawczy.

W kolejnych etapach pracy Doktorantka sprawdziła wpływ lantanowców (0,25 i 0,5 MIC) na poziom produkcji trzech wybranych czynników wirulencji wydzielanych do środowiska przez *P. aeruginosa* (tj. picyjaniny, piowerdyny i elastazy). W tych badaniach zastosowano techniki spektroskopowe i pomiary bezpośrednie oraz współczynnik względny RVF odnoszący się do gęstości hodowli (CFU/ml). Co ciekawe, Doktorantka zaobserwowała duże różnice w przypadku produkcji picyjaniny pomiędzy szczepami PAO1 i ATCC27853. W warunkach kontrolnych PAO1 produkował picyjaninę na znacznie wyższym poziomie od ATCC27853 i poziom tej syntezy istotnie obniżał się w obecności wszystkich badanych jonów Ln^{3+} . Obecność tych jonów jedynie w nieznacznym stopniu powodowała zwiększenie syntezy picyjaniny u ATCC27853 i efekt ten był zależny od stężenia oraz rodzaju użytego jonu metalu. Jony lantanowców (w stężeniu 0,5 MIC) powodowały także zwiększenie aktywności elastazy w hodowlach obu szczepów. Natomiast w przypadku piowerdyny, sideroforu zdolnego do fluorescencji i wiążącego jony metali (III), nie udało się jednoznacznie określić wpływu jonów Ln^{3+} na poziom produkcji tego związku, ze względu na problem metodyczny wynikający z chelatowania tych jonów. W mojej ocenie, dodatkowym potwierdzeniem tych wyników byłaby analiza ekspresji genów markerowych, odpowiedzialnych za syntezę wybranych czynników wirulencji w obecności lantanowców, takich jak: piowerdyna, picyjanina, elastaza czy proteazy. Czy Doktorantka planowała takie eksperymenty lub może znane są już takie dane literaturowe? Moje pytanie dotyczy też proteaz, dlaczego nie zbadano wpływu jonów lantanowców na produkcję tych enzymów, skoro wiadomo, że są to bardzo ważne czynniki wirulencji tych bakterii?

Kolejną bardzo ważną cechą *P. aeruginosa* zbadaną przez Doktorantkę była zdolność ruchu. Scharakteryzowano trzy typy ruchliwości komórek pod wpływem obecności pięciu jonów (Ce^{3+} , Er^{3+} , Eu^{3+} , Gd^{3+} , Yb^{3+}) w stężeniu 0,5 MIC. W przypadku ruchu typu „*swimming motility*”, zaobserwowano istotne zmniejszenie ruchliwości komórek obu szczepów w agarze zawierającym badane jony. Największe różnice wykazano dla Eu^{3+} , Yb^{3+} Er^{3+} , w zależności od szczepu i testowanego wariantu. Również w przypadku „*twitching motility*” zaobserwowano obniżenie ruchliwości komórek w obecności niektórych jonów Ln^{3+} (Eu^{3+} dla PAO1, dodatkowo Gd^{3+} i Ce^{3+} dla ATCC27853), ale różnice były znacznie mniejsze od tych wykazanych dla „*swimming motility*”. W przypadku „*swarming motility*” zaobserwowano zmianę kształtu wzrostu z typu „*circular*” na „*flower-like*” i zwiększenie strefy wzrostu bakterii w obecności jonów w podłożu. Ten efekt był najbardziej widoczny dla jonów Ce^{3+} oraz Eu^{3+} .

Doktorantka z dużą konsekwencją prowadziła dalsze badania mające na celu ustalenie czy obecność jonów Ln^{3+} wpływa na skuteczność antybiotyków wobec *P. aeruginosa*. Do tych badań wybrano dwa antybiotyki o odmiennym mechanizmie działania, tj. ciprofloksacynę i gentamycynę oraz cały zestaw 13 jonów Ln^{3+} . Doktorantka uzyskała bardzo ciekawe i ważne wyniki wskazujące, że dodatek jonów Ln^{3+} w stężeniu 125 i 250 $\mu\text{g/ml}$ powodował obniżenie efektywności działania testowanych antybiotyków i obserwowany efekt ten był zależny od rodzaju jonu, jak też typu antybiotyku (maksymalnie 4-krotny wzrost MIC leku). Zastosowane inne podejście metodyczne przez Doktorantkę i obliczenie wartości frakcyjnych stężeń hamujących (FIC) dla



szczepów referencyjnych oraz kilku izolatów klinicznych potwierdziło antagonistyczne działanie jonów lantanowców (wartość FIC powyżej 4) w przypadku ATCC27853 i 250 $\mu\text{g/ml}$ jonów Ce^{3+} , Gd^{3+} oraz Eu^{3+} dla ciprofloksacyny oraz wobec pięciu spośród sześciu badanych szczepów klinicznych w obecności jonów Gd^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} dla gentamycyny. Obserwacje poczynione przez Doktorantkę są bardzo ważne w kontekście skuteczności antybiotykoterapii, w sytuacji stosowania jonów lantanowców w biomateriałach medycznych. W celu uzyskania kompleksowych wyników, sprawdzono toksyczność jonów lantanowców wobec komórek eukariotycznych z użyciem standardowego testu hemolizy i erytrocytów. Nie zaobserwowano wycieku hemoglobiny z krwinek przy żadnym z badanych stężeń jonów, natomiast zaobserwowano zmiany w morfologii krwinek, widoczne jako fuzja erytrocytów (aglomeraty komórek w rozmazie krwi).

W kolejnym etapie badań Doktorantka rozszerzyła swoje badania o aspekt jonów metali przejściowych (srebra, miedzi i cynku). W tym celu określiła aktywność antibakteryjną tych jonów wobec *P. aeruginosa*, mając w planach wzbogacenie nanoapatytów zawierających wybrane jony Ln^{3+} dodatkowo o jony srebra, miedzi i cynku. Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną zaobserwowano dla jonów Ag^+ (MIC od 1,25 do 10 $\mu\text{g/ml}$ w pożywce pełnej i od 0,00625 do 0,125 $\mu\text{g/ml}$ w pożywce minimalnej). Znacznie wyższe wartości MIC uzyskano dla jonów Cu^{2+} (240-740 $\mu\text{g/ml}$ w bogatej i 5-100 $\mu\text{g/ml}$ w minimalnej pożywce) oraz Zn^{2+} (od 250 do >1000 w pełnej i od 160 do >1000 $\mu\text{g/ml}$ w minimalnej pożywce). Te eksperymenty były wstępem do dalszych badań, których celem było określenie aktywności biologicznej nowych materiałów, tj. pochodnych hydroksyapatytów domieszkowanych lub współdomieszkowanych jonami Cu^{2+} i Eu^{3+} wobec *P. aeruginosa* oraz sprawdzenie ich wpływu na komórki eukariotyczne. Doktorantka wykazała, że jony te wpływają negatywnie na wzrost *P. aeruginosa*, ale ich działanie najprawdopodobniej nie ma efektu addycyjnego lub ma jedynie bardzo słaby. Największe zahamowanie wzrostu zaobserwowano dla stężeń 125 $\mu\text{g/ml}$ Eu^{3+} i 25 $\mu\text{g/ml}$ Cu^{2+} (0,5 MIC). Doktorantka zaobserwowała także niespodziewane, a bardzo ciekawe zjawisko formowania się osadu w formie płatków w pożywce zawierającej jony Eu^{3+} , na których tworzył się biofilm podczas hodowli bakterii.

Podsumowując, w pierwszej części rozdziału „Wyniki”, mgr J. Rewak-Soroczyńska opisała bardzo bogaty zestaw danych, dotyczący wpływu jonów lantanowców i metali przejściowych na bakterie *P. aeruginosa* w formie planktonicznej oraz w postaci biofilmu. Dane te były niezbędne do zaprojektowania dalszych eksperymentów, mających na celu opracowanie nowych form hydroksyapatytów HAp domieszkowanych lantanowcami i metalami przejściowymi, które okazałyby się wysoce skuteczne wobec *P. aeruginosa*.

W drugiej części rozdziału „Wyniki” Doktorantka zawarła obszerny i szczegółowy opis wyników obejmujących charakterystykę aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec *P. aeruginosa* różnych form HAp domieszkowanych lantanowcami i metalami przejściowymi. Na podkreślenie zasługuje fakt przebadania przez Doktorantkę łącznie bardzo dużej liczby różnych form materiałów o strukturze apatytu: koloidów, tabletek, hydrożeli oraz kompozytów z dodatkiem PTFE, domieszkowanych jonami Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} (łącznie trzy grupy



materiałów). Większość tych materiałów została zaprojektowana, wytworzona i scharakteryzowana wcześniej pod względem własności fizyko-chemicznych przez zespół Profesora Rafała Wiglusza. Pierwsza grupa obejmowała dwie serie materiałów: serię hydroksyapatytów domieszkowanych różnymi stężeniami molowymi jonów srebra ($\text{Ag}^+:\text{HAp}$ - 1; 2,5 i 5 mol%), badaną w formie koloidów oraz serię $\text{PTFE}@\text{Ag}^+:\text{HAp}$, w skład których wchodziły kompozyty wytworzone z poli(tetrafluoroetylen) (PTFE) i hydroksyapatytów domieszkowanych 5 i 10 mol% Ag^+ (badane w formie tabletek). Druga seria materiałów ($\text{Zn}^{2+}/\text{Sr}^{2+}:\text{HAp}_\text{Si}$) została już wytworzona osobiście przez Doktorantkę i obejmowała związki różniące się zawartością cynku (0,5-3,5 mol%) i liczbą grup krzemianowych (SiO_4), które wprowadzono zamiast grup fosforanowych. Badania dotyczące tej grupy materiałów okazały się bardzo obiecujące, czego efektem było uzyskanie patentu Pat.242895, potwierdzającego aktywność materiałów krzemowych domieszkowanych jonami Ag^+ wobec patogenów grzybowych. Doktorantka jest współautorem tego patentu oraz publikacji zawierającej badania wstępne dotyczące materiałów z serii $\text{Zn}^{2+}/\text{Sr}^{2+}:\text{HAp}_\text{Si}$ (Rewak-Soroczyńska et al. 2022). Trzecią serią stanowiły materiały $\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}:\text{HAp}$ domieszkowane i współdomieszkowane jonami cynku i miedzi, których scharakteryzowanie miało dostarczyć informacji, jak zmieniają się ich właściwości w porównaniu z materiałami domieszkowanymi tylko jednym z jonów (badano koloidy, tabletki i dodatkową formę – hydrożel). Charakterystyka fizyko-chemiczna tych form materiałów i ich własności antybakteryjne w stosunku do różnych mikroorganizmów patogennych zostały opublikowane w pracy Sobierajska et al. 2021a. Natomiast w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej zawarto wyniki dotyczące wyłącznie bakterii *P. aeruginosa*. Ta część wyników w mojej ocenie ma bardzo dużą wartość aplikacyjną, co może w przyszłości zaowocować zastosowaniem tych związków lub ich zmodyfikowanych pochodnych w medycynie czy weterynarii. W przypadku jonów Ag^+ , wykazano ich bardzo dużą skuteczność w redukcji liczby bakterii w hodowli płynnej przy zastosowaniu różnych form apatytów domieszkowanych tymi jonami (najbardziej skuteczne okazały się tabletki). W przypadku materiałów drugiej serii ($\text{Zn}^{2+}/\text{Sr}^{2+}:\text{HAp}_\text{Si}$) wykazano również aktywność przeciwdrobnoustrojową, choć efekt ten był dużo słabszy w porównaniu do materiałów zawierających Ag^+ . Najlepsze rezultaty osiągnięto dla materiału zastosowanego w stężeniu 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, który zawierał 3,5 mol% Zn^{2+} i 5 grup krzemowych. Wyniki uzyskane dla trzeciej serii materiałów ($\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}:\text{HAp}$) okazały się również bardzo obiecujące. Doktorantka potwierdziła znaczące zwiększenie skuteczności materiałów wzbogaconych o jony miedzi w eliminacji *P. aeruginosa* występujących w badanym środowisku, gdyż wykazała, że liczebność tych bakterii spadała znacząco (aż o 4-log) w obecności zawiesin koloidalnych nanocząsteczek materiałów domieszkowanych i współdomieszkowanych Cu^{2+} . Takiego efektu nie zaobserwowano w przypadku jonów Zn^{2+} . Ponadto, wykazano znaczne różnice w aktywności antybakteryjnej formy koloidalnej (bardzo silny efekt) i eluatów uzyskanych z hydrożeli (znacznie słabszy efekt). Analiza mikroskopowa (jasnego pola, SEM, CLSM) oddziaływań *P. aeruginosa* z koloidami $\text{nHAp}:\text{Zn}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$ wykazała, że w tym przypadku komórki bakteryjne pozostają w bezpośrednim kontakcie z nanocząsteczkami i ich aglomeratami, czego nie obserwowano w przypadku eluatów z hydrożeli. Wykazano też zmniejszenie ilości bakterii w biofilmie na powierzchni tabletek

oraz hydrożeli z materiału zawierającego jony Cu^{2+} oraz Cu^{2+} i Zn^{2+} , co było spowodowane zmniejszoną adhezją bakterii do powierzchni tabletek.

W ostatniej części wyników opisano obszernie wyniki badań dotyczące aktywności biologicznej hydroksyapatytów domieszkowanych i współdomieszkowanych jonami Eu^{3+} i Cu^{2+} . Badania te wpisują się znakomicie w bardzo popularny w ostatnim czasie trend dotyczący materiałów współdomieszkowanych. Jon europu (Eu^{3+}) jest bardzo często wprowadzany do matrycy hydroksyapatytowej ze względu na jego wysoką zdolność do emisji luminescencji. Własności fizyko-chemiczne tych materiałów zostały już wstępnie scharakteryzowane i opublikowane w dwóch pracach, których mgr Justyna Rewak-Soroczyńska jest współautorem. W tej rozprawie przedstawiono natomiast własności biologiczne tych materiałów otrzymanych dwoma sposobami: drogą strąceniową (P) (9 związków) oraz drogą hydrotermalną (H) (9 związków) i porównano ich skuteczność. W rozdziale „**Wyniki**” przedstawiono dane uzyskane dla materiałów o najwyższej zawartości jonów (5 mol%), natomiast w „**Materiałach dodatkowych**” wyniki uzyskane dla pozostałych materiałów z tej serii. Doktorantka otrzymała bardzo cenne i kompleksowe wyniki. Określiła rzeczywistą zawartość jonów Eu^{3+} i Cu^{2+} w badanych nanomateriałach, uwalnianie tych jonów z matryc w pożywkach do hodowli bakterii i komórek eukariotycznych, jak też ich aktywność przeciwbakteryjną wobec *P. aeruginosa*. Wykazała aktywność obu wersji materiałów (P i H) o zawartości 5 mol% Cu^{2+} wobec szczepu PAO1 (po 24 godz. hodowli) oraz materiału wersji P zawierającego 5 mol% Eu^{3+} i Cu^{2+} . W przypadku szczepu ATCC27853 wszystkie 8 testowanych wariantów wykazywały działanie antybakteryjne w porównaniu z kontrolą. Następnie efektywność działania tych materiałów została sprawdzona na biofilmach tworzonych przez *P. aeruginosa*. Doktorantka poddała szczegółowej analizie biofilmy tworzone w kulturach bakterii zawierających badane warianty HAp i wykazała różnice między seriami P i H (głównie w przypadku materiału zawierającego domieszki obu jonów). Bakterie tworzyły duże agregaty złożone z żywych i martwych komórek bakterii podczas użycia materiału z serii P, natomiast w obecności materiału typu H zawierającym najwyższe stężenie obu metali (5mol%) wykazano najwyższą czerwoną fluorescencję, świadczącą o obecności licznych martwych komórek. Konsekwentnie prowadzono te badania, których celem było sprawdzenie cytotoksyczności testowanych materiałów. Analizy wykonano z użyciem erytrocytów oraz osteoblastów i zaobserwowano nieznaczną, choć statystycznie istotną cytotoksyczność w stosunku do erytrocytów (tj. wyciek hemoglobiny i agregację komórek) oraz obniżenie żywotności osteoblastów. Zmniejszenie zastosowanego stężenia materiału do 1 mg/ml znacznie zredukowało ich toksyczność. Istotny spadek przeżywalności komórek zaobserwowano w obecności materiałów otrzymanych metodą H, o zawartości 5mol% Eu^{3+} , 5mol% Eu^{3+} /5mol% Cu^{2+} oraz 5mol% Cu^{2+} . Zdaniem Doktorantki zaobserwowane różnice w cytotoksyczności wobec komórek eukariotycznych wynikają prawdopodobnie z różnic w uwalnianiu jonów metali z materiałów tworzonych drogą P i H (gdyż zaobserwowano większe uwalnianie z H niż P). Podsumowując tę część badań, uważam że Doktorantka przeprowadziła kompleksowe analizy, które są niezbędne aby dany materiał uznać za skuteczny w ograniczaniu wzrostu bakterii patogennych, a z drugiej strony za bezpieczny i nietoksyczny dla organizmu

człowieka. Z tych powodów, za najważniejsze osiągnięcia Doktorantki z tej części badań uważam wykazanie, że (i) dodatek jonów Eu^{3+} do hydroksyapatytów domieszkowanych jonami Cu^{2+} modyfikuje aktywność antibakteryjną tych materiałów; (ii) adhezja bakterii do materiału w postaci tabletek jest słaba ze względu na ich gładką powierzchnię, a nie właściwości chemiczne materiału; (iii) aktywność przeciwdrobnoustrojowa i cytotoksyczność materiałów zależy od ilości uwolnionych z matrycy jonów (materiały uzyskane drogą H wykazywały większą toksyczność wobec bakterii i było to związane z ilością wbudowanych i uwalnianych z nich jonów); (iv) skład płynu, w którym znajduje się materiał ma istotny wpływ na ilość uwalnianych jonów; (v) wszystkie badane nanomateriały nasilały uwalnianie hemoglobiny z erytrocytów i ten efekt postępował w czasie, a materiały domieszkowane jonami miedzi dodatkowo powodowały przekształcanie hemoglobiny w methemoglobinę. Wszystkie te obserwacje są bardzo ważne w kontekście przyszłego zastosowania testowanych materiałów w medycynie i pokazują jak trudna jest droga do osiągnięcia tego szczytnego celu. Tym bardziej należy docenić wysiłek włożony przez Doktorantkę w prowadzone badania, Jej pracowitość, wytrwałość i konsekwencję w osiąganiu zamierzonych celów.

Z obowiązku recenzenta mam kilka drobnych sugestii odnośnie pracy, które jednak w żadnym stopniu nie wpływają negatywnie na moją ogólną bardzo dobrą ocenę tej rozprawy. Pierwsza sugestia dotycząca prezentowanych wyników, w moim odczuciu dobrze byłoby zachować konsekwentne stosowanie stężeń związków w postaci MIC lub $\mu\text{g/ml}$ lub podawanie obu wartości jednocześnie, gdyż na rycinach podawano wartości w $\mu\text{g/ml}$, podczas gdy w tekście opisywano te wartości jako MIC. Druga sugestia dotyczy organizacji tekstu w jednym z bardzo długich rozdziałów, dobrze byłoby rozdzielić ten rozdział na kilka mniejszych podrozdziałów, zawierających opis wpływu lantanowców na (i) wzrost i żywotność komórek oraz tworzenie biofilmu, (ii) własności powierzchniowe, (iii) produkcję plicyjaniny plicyjdyny i elastazy oraz (iv) ruchliwość komórek. Trzecia uwaga dotyczy stosowania pojęć pożywka/podłoże/medium. W przypadku płynnej hodowli powinno używać się pojęcia „pożywka”, a pożywka zestalona agarom to „podłoże”. I jeszcze sugestia dotycząca zbyt małych liter w legendach wielu rycin, co utrudniało analizę wyników, warto to zmienić podczas przygotowywania manuskryptu do publikacji.

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że mgr Justyna Rewak-Soroczyńska w ramach tej dysertacji uzyskała wiele bardzo wartościowych wyników o dużym potencjale aplikacyjnym, dotyczących różnych modyfikacji nanomateriałów na bazie hydroksyapatytu i ich aktywności antibakteryjnej wobec *P. aeruginosa*. Na podstawie rozdziałów „Dyskusja” oraz „Wnioski” można było uzyskać głębokie przekonanie o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki, bardzo dobrej znajomości aktualnego stanu wiedzy w obszarze prowadzonych przez Nią badań, jak też krytycznemu spojrzeniu wobec uzyskanych przez siebie wyników w kontekście innych danych literaturowych, jak też możliwości ich praktycznego wykorzystania. Ponadto, chciałabym pokreślić szeroki zakres prac przeprowadzonych przez mgr Justynę Rewak-Soroczyńską, złożoność i czasochłonność wykonanych eksperymentów z użyciem wielu materiałów oraz szczepów bakteryjnych. Dzięki dużemu zaangażowaniu, Doktorantka zgromadziła bardzo dużą ilość wartościowych wyników oraz

poczyniła wiele ciekawych obserwacji, które przyczyniły się do zwiększenia naszej wiedzy na temat własności i aktywności biologicznej nanomateriałów na bazie hydroksyapatytów współdomieszkowanych jonami lantanowców oraz jonami metali przejściowych.

Wniosek końcowy

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Rewak-Soroczyńskiej **spełnia warunki określone w art. 187 ust.1-4 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.)** ze względu na: (i) aktualny i bardzo ważny problem naukowy, którego rozwiązanie jest istotne dla zwiększenia efektywności obecnie stosowanych materiałów wszepiennych w kontekście ograniczania wzrostu bakterii patogennych *P. aeruginosa*, (ii) dostarczenie nowej wiedzy dotyczącej aktywności antybakteryjnej jonów lantanowców i jonów metali przejściowych w stanie wolnym oraz związanych w nanomateriałach, (iii) zsyntetyzowanie i scharakteryzowanie nowych związków o potencjalnych zastosowaniach medycznych, wykazujących aktywność antybakteryjną wobec *P. aeruginosa*. Uważam, że Doktorantka udowodniła, że jest przygotowana do rozwiązywania wieloaspektowych zadań badawczych i w pełni opanowała warsztat badawczy, niezbędny do rozwiązywania problemów w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. W związku z powyższym, **składam wniosek do Rady Naukowej** Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu **o dopuszczenie Pani mgr Justyny Rewak-Soroczyńskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na szeroki zakres prowadzonych badań, bardzo bogaty materiał do analiz, dużą różnorodność stosowanych technik i metod badawczych, jak też uzyskanie nowatorskich wyników mających charakter poznawczy i aplikacyjny, z których znaczna część została już opublikowana w renomowanych czasopismach z badanego obszaru i została objęta ochroną patentową, uważam tę rozprawę za bardzo wartościową i **wnoszę o jej wyróżnienie stosowną Nagrodą przez Radę Naukową** Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.


Prof. dr hab. Monika Janczarek

