



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Kraków, dn. 28 sierpnia 2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej 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**”
przygotowanej pod opieką naukową promotora prof. dr hab. Rafała Wiglusza
oraz promotor pomocniczej dr Agaty Dorotkiewicz-Jach, zrealizowaną w
Oddziale Fizykochemii Biomedycznej Instytutu Niskich Temperatur i Badań
Strukturalnych PAN we współpracy z Zakładem Biologii Patogenów
i Immunologii na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego**

Podstawą formalną wykonania recenzji było pismo z Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk z dnia 28 czerwca 2023r.

Praca doktorska stanowi monografię będącą podsumowaniem prac badawczych nad aktywnością biologiczną jonów lantanowców i jonów metali przejściowych oraz nanomateriałów na bazie hydroksyapatytu współdomieszkowanych tymi jonami wobec *Pseudomonas aeruginosa*.

Tematyka pracy doktorskiej dotyczy szczególnie niebezpiecznego mikroorganizmu jakim jest pałeczka ropy błękitnej, będąca patogenem oportunistycznym, zdolnym wywołać ostre zapalenia płuc, zakażenia łożyska krwi, czy skóry i tkanek miękkich. Drobnoustrój ten posiada wiele różnorodnych mechanizmów oporności, szeroką gamę czynników zjadliwości oraz pojemny i plastyczny genom, przez co jest niezwykle trudny do zwalczania. Z uwagi na duże ryzyko zakażeń okołowszczepowych, narastający lawinowo problem antybiotykooporności oraz obserwowany w ostatnich latach rozwój implantologii, istnieje obecnie duża potrzeba poszukiwania nowych, innowacyjnych materiałów implantacyjnych do zastosowań w medycynie.

Doktorantka w swojej pracy podjęła się tego ambitnego zadania stawiając sobie za cel główny zbadanie aktywności biologicznej jonów lantanowców w formie wolnej oraz jako domieszek w różnych formach nanohydroksyapatytu, szeroko stosowanego w medycynie, wobec



UNIwersYTET JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

wybranych szczepów wzorcowych oraz klinicznych *P. aeruginosa*. Założenia rozprawy doktorskiej zakładały ponadto zbadanie wpływu składników podłoż microbiologicznych na aktywność wybranych jonów metali przejściowych bloku d, a także określenie wpływ preparatyki otrzymanych materiałów na aktywność antybakteryjną i cytotoksyczność nanomateriałów domieszkowanych kationami europu i miedzi.

Biorąc pod uwagę powyższe, tematyka ocenianej pracy doktorskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Jest ona bardzo ważna i odpowiada na bieżące potrzeby poszukiwania nowych materiałów do zastosowań w medycynie. Przedstawione w pracy badania wpisują się w tematykę z dziedziny nauk biologicznych.

Należy podkreślić, że wyniki prezentowane w ocenianej monografii, zostały częściowo opublikowane (w latach 2020-2022) w czterech pracach, w recenzowanych czasopismach (Biomolecules 2022; Curr. Issues Mol. Biol. 2022; Biomaterials Advances 2022; ACS Omega 2020). W dwóch publikacjach mgr Justyna Rewak-Soroczyńska jest pierwszym autorem, zaś w dwóch kolejnym należy do grona współautorów. Ponadto, wyniki zostały zaprezentowane w postaci pięciu doniesień konferencyjnych (trzy w formie prezentacji, dwie zaś w formie posterów) na krajowych i międzynarodowych zjazdach naukowych. We wszystkich tych doniesieniach zjazdowych Doktorantka była pierwszym autorem. Z kolei część teoretyczna rozprawy doktorskiej dotycząca aktywności biologicznej jonów lantanowców została opublikowana jako rozdział monografii (W: Postępy w naukach przyrodniczych: stan obecny i perspektywy. Wyd. Nauk. TYGIEL 2022). Częściowe opublikowanie wyników zawartych w rozprawie doktorskiej potwierdza ich dużą wartość naukową i istotnie wpływa na wysoką ocenę przedłożonej rozprawy.

CHARAKTERYSTYKA FORMALNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ:

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Justyny Rewak-Soroczyńskiej przygotowana została w tradycyjny sposób, tj. stanowi monografię liczącą 209 strony tekstu z uwzględnieniem literatury oraz materiałów dodatkowych. Praca została podzielona na typowe części składowe, a mianowicie: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i piśmiennictwo. Do rozprawy załączono streszczenie w języku polskim oraz angielskim. Ponadto, w pracy znalazły się: wykaz skrótów, wykaz rycin - liczący 50 pozycji oraz wykaz tabel, których jest 18. Dodatkowo na końcu rozprawy dołączone zostały materiały dodatkowe zawierające 11 rycin i 7 tabel. Doktorantka przygotowała rozprawę w oparciu o



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

210 pozycji literaturowych, z których znaczna większość to prace opublikowane w ostatnich 10 latach.

Rozprawa doktorska została napisana poprawnym językiem, bez istotnych błędów stylistycznych, czy interpunkcyjnych. Zwraca uwagę bardzo staranne opracowanie graficzne rozprawy z wielką dbałością o stronę graficzną.

CHARAKTERYSTYKA MERYTORYCZNA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ:

Wstęp do pracy liczący 37 stron przygotowany został z bardzo obszernym przedstawieniem literatury przedmiotu. Wstęp został opatrzony ośmioma rycinami oraz trzema tabelami. Doktorantka we wstępie szczegółowo scharakteryzowała patogenność *P. aeruginosa*. Ponadto omówiła nowoczesne strategie walki z zakażeniami powodowanymi przez ten drobnoustrój, uwzględniając nanotechnologię jako alternatywną terapię przeciwbakteryjną, zastosowanie hydroksyapatytu wapnia oraz właściwości fizykochemiczne i biologiczne wraz z zastosowaniem jonów lantanowców. Analiza wstępu wskazuje na bardzo szeroką i ugruntowaną wiedzę Doktorantki.

W świetle przedstawionych we wstępie do pracy problemów, Doktorantka postawiła sobie za **cel główny** zbadanie aktywności biologicznej jonów lantanowców w formie wolnej oraz jako domieszek w różnych formach nanohydroksyapatytu, szeroko stosowanego w implantologii, wobec wybranych szczepów wzorcowych oraz klinicznych *P. aeruginosa*. Dodatkowo sformułowała **pięć celów szczegółowych** zakładających poza powyższym celem głównym, (1) zbadanie właściwości antybakteryjnych jonów lantanowców i jonów metali przejściowych wobec testowanych *P. aeruginosa*, (2) zbadanie wpływu wybranych jonów na wirulencję oraz na właściwości powierzchniowe komórki bakteryjnej, (3) określenie wpływu różnych form nanoapatytu domieszkowanego jonami lantanowców i jonami metali przejściowych na formowanie biofilmu, (4) zbadanie cytotoksyczności badanych jonów na erytrocyty zwierzęce oraz linię komórkową osteoblastów mysich, (5) określenie wpływu wybranych jonów na wrażliwość badanych szczepów *P. aeruginosa* względem testowanych antybiotyków. Założenia rozprawy doktorskiej zakładały ponadto zbadanie wpływu składników podłoż mikrobiologicznych na aktywność wybranych jonów metali przejściowych bloku d, a także określenie wpływ preparatyki otrzymanych materiałów na aktywność antybakteryjną i cytotoksyczność nanomateriałów domieszkowanych kationami europu i miedzi. Należy zauważyć, że tak szeroko sprecyzowane cele rozprawy, w całości zrealizowane przez Doktorantkę, wskazują na dojrzałe i wyczerpujące opracowanie badanego zagadnienia.



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Rozdział **materiały i metody** liczy 30 strony i przedstawia bardzo szczegółowe omówienie wykorzystanych materiałów i metod, w tym: biologicznych modeli badawczych, metod badania aktywności jonów lantanowców oraz jonów metali przejściowych, badanie aktywności antybakteryjnej, ocenę ilości biofilmu, pomiaru ilości uwolnionego eDNA, poziomu produkcji pirocyaniny, piowerdyny i elastazy w hodowlach *P. aeruginosa*, badanie ruchu typu *swimming, swarming i twitching*, ocenę właściwości powierzchniowych komórki, badanie wpływu jonów na hemolizę erytrocytów, ocenę wpływu lantanowców na wrażliwość *P. aeruginosa* na substancje antybakteryjne, wyznaczenie wartości MIC i FIC. Ponadto badanie aktywności biologicznej związków na bazie hydroksyapatytu domieszkowanych jonami metali przejściowych bloku d oraz jonami europu. Rozdział ten został bardzo starannie przedstawiony. Zawiera osiem rycin opracowanych przez Doktorantkę oraz trzy tabele.

Rozdział **wyniki** jest bardzo obszernym opracowaniem i liczy 58 stron tekstu. Ta część zawiera szczegółowy i staranny opis rezultatów uzyskanych przez Doktorantkę na podstawie metodyki opisanej wcześniej. Wyniki zostały przedstawione na czytelnych, 34 kolorowych rycinach, opracowanych z dużą dbałością o szczegóły. W rozdziale tym znajduje się także 12 przejrzystych tabel, umożliwiających analizę uzyskanych wyników. Dodatkowo na końcu rozprawy doktorskiej, zamieszczone zostały materiały dodatkowe, w formie 11 rycin i 6 tabel, które wzbogacają opracowaną rozprawę o dodatkowe wyniki i analizy. Podsumowując rozdział wyniki przedstawia wnikliwą i rzetelną analizę zebranego materiału badawczego potwierdzając dużą dojrzałość naukową Doktorantki.

Rozdział **dyskusja** liczy 18 stron. W rozdziale tym Doktorantka omawia otrzymane wyniki i dyskutuje je w świetle dostępnych i aktualnych danych literaturowych. Rozdział ten jest opracowany poprawnie. Zawiera wiele ważnych wątków i ciekawych danych z piśmiennictwa. Jako podsumowanie wskazuje, iż mimo istotnego wpływu na wirulencję *P. aeruginosa* i właściwości powierzchniowe, jony lantanowców mogą być wykorzystane jako domieszki i stosowane w implantologii, gdyż ich stężenia w hydroksyapatycie są dużo mniejsze niż stężenia dla których obserwowano efekty biologiczne przedstawione w rozprawie doktorskiej. Rozdział dyskusja kończy się stwierdzeniem konieczności kontynuowania podjętych badań z uwzględnieniem innych metod, w tym analiz molekularnych. Badania takie umożliwiły by poznanie mechanizmów obserwowanych zmian zachodzących pod wpływem jonów lantanowców oraz testowanych nanomateriałów.

Katedra Mikrobiologii

31-121 Kraków, ul. Czysła 18, tel. +48 12 633 25 67, faks +48 12 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

Dysertację doktorską kończy rozdział przedstawiający wyciągnięte na podstawie przeprowadzonych analiz **wnioski**. Doktorantka sformułowała 15 szczegółowych wniosków, wynikających bezpośrednio z uzyskanych wyników. Wnioski te są prawidłowo sformułowane i merytorycznie poprawne, potwierdzając umiejętności Doktorantki w zakresie analizy wyników i wnioskowania na ich podstawie.

UWAGI DYSKUSYJNE I KOMENTARZE:

W zakresie analizy merytorycznej pracy należy poruszyć kilka poniższych kwestii:

1. Określenie cytotoksyczności badanych jonów na erytrocyty przeprowadzono na modelu zwierzęcym, wykorzystując w tym celu erytrocyty zwierzęce izolowane z krwi baraniej. Podobnie cytotoksyczność wybranych jonów określono na modelu zwierzęcym, wykorzystując linię komórkową mysich osteoblastów (7F2). Z uwagi jednak na przyszły potencjał aplikacyjny prowadzonych badań oraz możliwość wdrożenia nowych nanomateriałów do zastosowań medycznych, zasadne wydaje się w przyszłości poszerzenie badań i wykonanie podobnych oznaczeń na modelach linii komórkowych pochodzenia ludzkiego.

Pod względem uwag edycyjnych należy zwrócić uwagę na poniższe fragmenty pracy:

1. W części wstęp, w przypadku kilku rycin (Ryciny 1, 2, 3, 4, 5 i 8) podano dane źródłowe, jednakże, z uwagi na edycję rycin i zmianę opisów z języka angielskiego na język polski, zabrakło w podpisach rycin informacji co do własnego opracowania rycin na podstawie cytowanych źródeł.
2. Rycina 7 – brak informacji co do danych źródłowych lub własnego opracowania.
3. Rycina 4 – brak legendy opisującej poszczególne elementy budowy ściany komórkowej bakterii, co byłoby bardzo przydatne w interpretacji przedstawionych mechanizmów.
4. Drugi, dość obszerny akapit dyskusji zawiera skrócony opis podjętych celów i uzyskanych wyników, bez poddania ich dyskusji w oparciu o dostępne prace naukowe, dlatego bardziej pasuje, aby został uwzględniony w streszczeniu pracy niż w tym rozdziale.

Należy zaznaczyć iż powyższe uwagi wynikają z obowiązku recenzenta i mają na celu głównie pomoc przy redagowaniu opracowań naukowych pracy, nie umniejszają jednak wartości



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Lekarski

merytorycznej pracy badawczej oraz nie wpływają na pozytywną ocenę przedłożonej dysertacji doktorskiej Pani mgr Justyny Rewak-Soroczyńskiej.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam że, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz.U.2018 poz.1668 z późn. zm.) i na tej podstawie wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Justyny Rewak-Soroczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, z uwagi na wysokie walory naukowe, wagę podjętego tematu oraz fakt, iż część wyników rozprawy doktorskiej została opublikowana w recenzowanych czasopismach, składam wniosek do Rady Naukowej Instytutu o wyróżnienie przedłożonej do recenzji rozprawy.

Prof. dr hab. n. med. Monika Brzychczy-Włoch

Katedra Mikrobiologii

31-121 Kraków, ul. Czysza 18, tel. +48 12 633 25 67, faks +48 12 423 39 24

www.km.cm-uj.krakow.pl