



Rzeszów, 08.03.2026

Dr hab. n. med., inż. Anna Żaczek, prof. UR
Zakład Mikrobiologii, Wydz. Medyczny CM UR

Recenzja pracy doktorskiej mgr Karoliny Lach

pt. „Badanie właściwości przeciwbakteryjnych nanocząsteczek dendrytycznych wzmacniających działanie endolizyn fagowych przeciw bakteriom Gram-ujemnym - ocena aktywności przeciwbakteryjnej i działania cytotoksycznego w badaniach *in vitro*”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Karoliny Lach, wykonana w ramach Szkoły Doktorskiej Sekcja Nauki Ścisłe i Przyrodnicze, dyscyplina Nauki Biologiczne pod kierunkiem promotora głównego dr hab. Karola Cieplucha oraz promotor pomocniczej dr Małgorzaty Łysek-Gładysińskiej, ma postać monografii obejmującej łącznie 95 stron, opracowanej bardzo starannie i zgodnie z wymogami przyjętymi dla prac doświadczalnych.

Obecnie, ze względu na narastający problem lekooporności bakterii na antybiotyki, poszukiwane są alternatywne wobec klasycznej antybiotykoterapii metody leczenia zakażeń bakteryjnych, w tym zakażeń wywoływanych przez szczepy leko- i wielolekooporne. Nanosystemy, takie jak polimery, dendrymery oraz biogenne nanocząstki metali (srebra, złota, miedzi, platyny), są uznawane za jedne z obiecujących narzędzi w tym obszarze. Dla wzmocnienia ich działania przeciwbakteryjnego często łączy się je z białkami przeciwdrobnoustrojowymi w celu uzyskania efektu synergii.

Celem przedłożonej do recenzji pracy było scharakteryzowanie mechanizmu działania antybakteryjnego kationowych dendrymerów karbokrzemowych oraz ich kompleksów z CHAP-domeną endolizyny fagowej wobec bakterii *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Wybór zarówno rodzaju nanocząstek, jak i modelowego patogenu należy uznać za dobrze i przekonująco umotywowany. Autorka szeroko przedstawia problem oporności bakterii z grupy ESKAPE, ze szczególnym uwzględnieniem Gram-ujemnej *P. aeruginosa* jako patogenu szpitalnego o złożonych mechanizmach MDR/XDR/PDR, zdolności do tworzenia biofilmu oraz wywoływania trudno leczonych zakażeń ran i tkanek miękkich. Równie szczegółowo Doktorantka uzasadnia wybór kationowych dendrymerów karbokrzemowych, w tym metallodendrymerów z jonami srebra, jako nośników i permeabilizatorów błony zewnętrznej (OM), potencjalnie pozwalających przełamać barierę błon OM i wzmocnić działanie endolizyny fagowej.

Na tle tak szeroko zarysowanego problemu lekooporności szczepów uwagę zwraca zastosowanie w badaniach będących przedmiotem rozprawy, jedynie szczepu referencyjnego (brak eksperymentów na izolatach klinicznych MDR/XDR), co zawęża możliwość bezpośredniego wnioskowania o skuteczności wobec szczepów opornych. Z drugiej strony, opublikowane dane o kationowych dendrymerach karbokrzemowych wskazują podobną skuteczność wobec szczepów wrażliwych i MDR [Quintana-Sánchez et al. (2023), *Study of the antimicrobial activity of cationic carbosilane dendrimers...*, *Front Microbiol* 14:1269547]. Mechanizm działania badanego w rozprawie układu (metallodendrymery/dendrymery + endolizyna), oparty na permeabilizacji błony zewnętrznej, degradacji peptydoglikanu i indukcji reaktywnych form tlenu, omija klasyczne mechanizmy oporności na antybiotyki tj. pompy wypływowe, β -laktamazy, modyfikacje PBP. W związku z powyższym zwracam się z prośbą, aby podczas publicznej obrony Doktorantka odniosła się do kwestii możliwości uogólniania uzyskanych wyników na szczepy kliniczne MDR/XDR. W szczególności interesuje mnie, na ile, w ocenie Doktorantki, wolno ekstrapolować opisany w pracy mechanizm działania z modelowego szczepu PAO1 na szczepy wielolekooporne *P. aeruginosa* oraz na inne bakterie Gram-ujemne, a w jakim zakresie konieczne są tutaj osobne, ukierunkowane badania.

Na szczególne podkreślenie zasługuje dobór i zakres zastosowanej metodyki. Dla realizacji celu pracy Doktorantka wykorzystwała szeroki panel technik, które wzajemnie się uzupełniają i pozwalają prześledzić działanie badanych układów od poziomu interakcji molekularnych po efekt w złożonym modelu tkankowym. W części *in vitro* zastosowano m.in. pomiar gęstości optycznej (OD_{600}) w celu określenia aktywności przeciwbakteryjnej i

wyznaczenia minimalnych stężeń hamujących, test z sondą NPN do oceny permeabilizacji błony zewnętrznej, test degradacji peptydoglikanu z użyciem Remazol Brilliant Blue oraz oznaczanie produkcji reaktywnych form tlenu (DCFH-DA). W badaniach interakcji dendrymer–endolizyna wykorzystano wygaszanie fluorescencji z analizą Stern–Volmera i Van't Hoffa oraz dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) do oceny wielkości cząstek i agregacji, uzupełnione o obserwacje w transmisyjnej mikroskopii elektronowej.

Mechanizm działania wobec bakterii został zweryfikowany przy pomocy zestawu metod obrazowych i fluorescencyjnych: testów żywotności LIVE/DEAD BacLight, znakowania peptydoglikanu barwnikiem HADA oraz mikroskopii skaningowej elektronowej (SEM) i transmisyjnej elektronowej (TEM) do oceny uszkodzeń błony i ściany komórkowej. W analizie biofilmu zastosowano zarówno ilościowe barwienie fioletem krystalicznym, jak i zestaw FilmTracer LIVE/DEAD z mikroskopią konfokalną, co pozwoliło ocenić jednocześnie masę biofilmu i żywotność komórek w jego strukturze. Bardzo pozytywnie należy ocenić rozszerzenie tych badań na model skóry wieprzowej *ex vivo*, w którym formowano biofilm *P. aeruginosa* na powierzchni tkanki, a następnie analizowano wpływ dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną na żywotność bakterii (konfokalna mikroskopia fluorescencyjna), morfologię biofilmu (SEM) oraz histomorfologię skóry niezainfekowanej i zakażonej. Uzupełnieniem jest ocena cytotoksyczności wobec fibroblastów VH10 testem MTS. Przy większości doświadczeń podano liczbę powtórzeń, odchylenia standardowe oraz oznaczono istotność statystyczną (np. $p < 0,05$), co w kontekście prezentowanych wyników jest w dużej mierze wystarczające, niemniej osobna część poświęcona analizie statystycznej mogłaby dodatkowo wzmocnić przejrzystość pracy.

Tak zaprojektowany zestaw metod, od badań biochemicznych i biofizycznych, przez mikrobiologiczne i obrazowe, po testy na modelu skóry *ex vivo* i oceny histologiczne, świadczy o bardzo dobrym przemyśleniu i zaplanowaniu części doświadczalnej. Jest w pełni adekwatny do ambitnie postawionych zadań badawczych. Zastosowane techniki zostały opisane w sposób klarowny, co czyni je zrozumiałymi i w praktyce możliwymi do odtworzenia. Na podkreślenie zasługuje wysoki poziom opanowania przez Doktorantkę warsztatu badawczego, w tym technik obrazowania, świadczący o Jej dużych umiejętnościach eksperymentalnych.

Na etapie prezentacji wyników widać, że część analiz, szczególnie tych dotyczących agregacji dendrymerów oraz oceny biofilmu, ma w większym stopniu charakter jakościowy niż ilościowy. Przykładowo, opis tworzenia agregatów opiera się głównie na obrazach TEM i rozkładach wielkości uzyskanych metodą DLS. Podobnie, w przypadku biofilmu część,

wniosków formułowana jest na podstawie opisów zmian w obrazach LIVE/DEAD, takich jak „znaczny wzrost czerwonych sygnałów”, „sygnał czerwony dominował nad zielonym”, „nieznacznie zwiększył odsetek martwych komórek”, przy ograniczonym wykorzystaniu obiektywnych parametrów ilościowych (np. grubości biofilmu czy procentowego udziału komórek żywych i martwych wyliczonych z analizy obrazów). Trzeba jednak wyraźnie zaznaczyć, że Autorka konsekwentnie uzupełnia te obserwacje danymi z metod ilościowych, takich jak barwienie fioletem krystalicznym czy pomiary gęstości optycznej (OD₆₀₀), a komponent jakościowy pełni tu przede wszystkim rolę ilustracyjną. Ciekawi mnie jednak czy gdyby miała Pani w przyszłości pogłębić tę analizę w kierunku ilościowym, jakie podejście by Pani rozważyła?

Drugie pytanie dotyczy wyników uzyskanych na modelu skóry *ex vivo* - kompleksy dendrymerów z endolizyną wykazały wysoką selektywność wobec biofilmu *P. aeruginosa*. Faktycznie, endolizyny są opisywane w literaturze jako enzymy o wąskim spektrum działania, potencjalnie mniej zaburzające mikrobiom niż antybiotyki szerokospektralne. Czy na podstawie własnych badań i przeglądu piśmiennictwa może Pani ocenić potencjalny wpływ takich kompleksów na mikrobiotę skóry pacjenta przy zastosowaniu ich np. w opatrunkach? Czy przeważa tu ryzyko dysbiozy, czy raczej zaleta precyzyjnej eliminacji patogenu przy zachowaniu bakterii komensalnych?

Na ocenę wartości merytorycznej rozprawy korzystnie wpływa fakt, że istotna część wyników została już opublikowana w renomowanych czasopismach po pozytywnych recenzjach zewnętrznych. Dotyczy to w szczególności dwóch prac współautorstwa Doktorantki: artykułu w *Journal of Colloid and Interface Science* (2024), poświęconego mechanizmowi działania imidazoliowych dendrymerów karbokrzemowych na błonę zewnętrzną bakterii i ich roli w umożliwianiu transportu endolizyny, oraz pracy w *International Journal of Biological Macromolecules* (2024), opisującej kompleksy CHAP-domeny endolizyny z metallodendrymerami jako układy o potrójnym mechanizmie działania (permeabilizacja OM, generacja ROS, degradacja peptydoglikanu). Lektura tych publikacji stanowiła dla mnie naturalny punkt wyjścia do zapoznania się z dysertacją oraz pokazała, że prezentowana rozprawa jest logiczną kontynuacją szerszego, konsekwentnie realizowanego programu badawczego.

Dyskusja rozprawy, obejmująca 7 stron, jest doskonale osadzona w literaturze – obejmuje ponad 100 cytowanych pozycji, spośród 194 wszystkich zacytowanych w pracy, co świadczy o wysokiej dojrzałości badawczej Doktorantki. Doktorantka logicznie integruje

wyniki z wiedzą opublikowaną, wskazuje ograniczenia i podkreśla wartość aplikacyjną (opatrunki, hydrożele). Stanowi solidny materiał na publikację naukową. Poziom dyskusji oceniam bardzo wysoko.

Warto podkreślić również interdyscyplinarny charakter rozprawy, wynikający zarówno z doboru zagadnień (chemia dendrymerów, biofizyka błon, mikrobiologia, histologia skóry), jak i z samej organizacji badań – współpraca dwóch jednostek akademickich oraz udział dwóch promotorów tworzą tu swoisty efekt synergii, dobrze widoczny w połączeniu zaawansowanych narzędzi chemicznych z modelami biologicznymi *in vitro* i *ex vivo*.

Dodatkowym argumentem na rzecz wysokiej oceny dysertacji jest finansowanie badań będących przedmiotem rozprawy w ramach projektu SONATA-17 Narodowego Centrum Nauki. Uzyskanie takiego finansowania oznacza, że koncepcja i plan badań zostały już wcześniej pozytywnie ocenione w trybie konkursowym, co w mojej opinii dodatkowo podnosi rangę i wiarygodność prezentowanej w rozprawie pracy eksperymentalnej.

Język rozprawy jest bardzo poprawny i, jak na tekst naukowy, po prostu przyjemny w lekturze. Styl jest spójny, terminologia używana konsekwentnie, a dołączony wykaz skrótów i oznaczeń – bardzo pomocny. Co prawda, Doktorantka nie ustrzegła się pojedynczych drobnych uchybień redakcyjnych (np. użycie angielskiego słowa „control” zamiast „kontrola” w podpisie Ryciny 12, str. 44; brak jednoznacznego opisu osi X na Rycinie 17, str. 51; użycie w tekście formy „na Rycina 26” zamiast „na Ryc. 26” lub „na Rycinie 26”, str. 64), ale są to naprawdę nieliczne szczegóły, które w żaden sposób nie zaburzają odbioru tekstu i nie umniejszają wartości rozprawy. Ogólnie poziom językowy i redakcyjny rozprawy oceniam bardzo wysoko.

Dysertację kończą, zwięźle i precyzyjnie sformułowane wnioski:

- Interakcje między dendrymerami a endolizyną zachodzą spontanicznie i są zależne od rodzaju modyfikacji powierzchniowej dendrymeru, tworząc konglomeraty z zachowaniem aktywności biologicznej.
- Dendrymery i ich kompleksy z endolizyną wykazują właściwości antybakteryjne poprzez uszkodzenia błony i degradację peptydoglikanu komórek bakteryjnych, a także zwiększają produkcję reaktywnych form tlenu.
- Dendrymery stosowane samodzielnie nie hamują powstawania biofilmu, natomiast ich kompleksy z endolizyną znacząco redukują ilość biofilmu oraz żywych bakterii, zarówno w modelu *in vitro*, jak i na modelu skóry *ex vivo*.

- Cytotoksyczność dendrymerów jest zależna od ich stężenia i częściowo łagodzona przez obecność endolizyny.

Powyższe ustalenia wnoszą fundamentalny wkład do nanomedycyny, wykazując po raz pierwszy w warunkach polskich spontaniczne tworzenie aktywnych biologicznie konglomeratów dendrymer-endolizyna oraz ich wyjątkową skuteczność w eradykacji biofilmów *Pseudomonas aeruginosa* – kluczowego patogenu w infekcjach szpitalnych. Szczególnie przełomowe jest udowodnienie synergii antybiofilmowej w modelach *ex vivo*, otwierające drogę do nowych strategii terapeutycznych antybiotykooporności, oraz zidentyfikowanie czynników modulujących cytotoksyczność, co ma znaczenie praktyczne dla projektowania przyszłych nanosystemów. Rozprawa wzbogaca literaturę przedmiotu o rzetelne dane doświadczalne i nowatorskie podejście interdyscyplinarne (mikrobiologia + nanotechnologia).

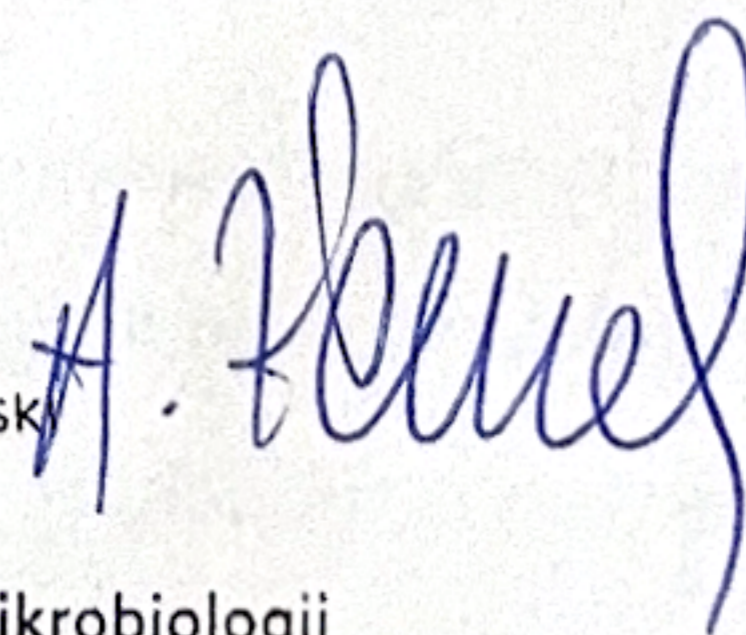
Rezultaty badań są w pełni oryginalnymi osiągnięciami naukowymi o charakterze twórczym. Wyrazy uznania kieruję zarówno do Doktorantki, pani mgr Karoliny Lach, jak i do promotorów – pana prof. Urad Karola Cieplucha, oraz pani dr Małgorzaty Łysek-Gładysińskiej.

Niniejszym stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Karoliny Lach pt. „Badanie właściwości przeciwbakteryjnych nanocząsteczek dendrytycznych wzmacniających działanie endolizyn fagowych przeciw bakteriom Gram-ujemnym - ocena aktywności przeciwbakteryjnej i działania cytotoksycznego w badaniach *in vitro*” spełnia wymagania określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571 ze zm.) stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora.

Z pełnym przekonaniem wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Biologii, Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie pani mgr Karoliny Lach do dalszych etapów rozprawy doktorskiej.

Jednocześnie, ze względu na wysoki poziom pracy, istotny wkład w rozwój dyscypliny nauki biologiczne oraz potencjał aplikacyjny wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Lach.

Uniwersytet Rzeszowski
Collegium Medicum
Wydział Medyczny
Kierownik Zakładu Mikrobiologii



dr hab. n. med., inż. Anna Żaczek, prof. UR