

prof.dr hab.n.med. Krystyna Olczyk
Katedra i Zakład Chemii Klinicznej
i Diagnostyki Laboratoryjnej
Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu

Recenzja

rozprawy doktorskiej p.t.: „Badanie właściwości biologicznych elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych nanocząstkami i białkami przeciwbakteryjnymi – ocena działania cytotoksycznego oraz aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej w badaniach *in vitro*” („Investigation of biological properties of electorospun PL-b-CL/PVP nanofibers modified with nanoparticles and antibacterial proteins – evaluation of cytotoxic effect as well as *in vitro* antibacterial and anticancer activities ”), wykonanej przez Panią mgr Magdalenę Agnieszkę Lasak, pod kierunkiem Promotora – Pana dr hab. Karola Cieplucha, prof. Uniwersytetu Radomskiego.

Rozwijana od wczesnych lat XX wieku technika elektroprzędzenia stanowi obecnie najpowszechniej stosowaną metodę uzyskiwania nanowłókien polimerowych o pożądanych właściwościach fizykochemicznych, takich jak duży stosunek powierzchni do objętości, duża porowatość, właściwości mechaniczne, termiczne i optyczne, a także właściwości biologicznych, takich jak biokompatybilność, możliwość modyfikacji powierzchni, podobieństwo do macierzy pozakomórkowej, czy właściwości przeciwdrobnoustrojowe – zwłaszcza w połączeniu z specyficznymi modyfikacjami chemicznymi. Wymienione unikalne właściwości elektroprzędzonych włókien polimerowych stanowią o ich dużym potencjale do stosowania w wielu procesach technologicznych, w tym wykorzystywanych w farmacji i medycynie, a obejmujących zastosowania w systemach uwalniania leków, inżynierii tkankowej, diagnostyce medycznej czy medycynie regeneracyjnej.

Powyższemu zagadnieniu poświęcona jest przedstawiona do oceny praca doktorska, dlatego też wybór jej tematu, będącego rozwinięciem wyżej przedstawionej problematyki badawczej, uważam za trafny, zgodny z aktualnym stanem wiedzy i kierunkiem współczesnych badań biomedycznych.

Rozprawę doktorską stanowią trzy publikacje eksperymentalne, powiązane tematycznie, odpowiednio: cztero -, ośmio, – i dziewięcioautorskie, zamieszczone na łamach prestiżowych, o międzynarodowym zasięgu czasopism, takich jak *Nanomaterials*, *Macromolecular Bioscience* i *Nanotechnology*, znajdujących się na tzw. Liście Filadelfijskiej, opublikowane w latach 2023 – 2025. Ich łączny współczynnik oddziaływania (IF) wynosi 13,7, zaś punktacja ministerialna: 400. Doktorantka jest pierwszym Autorem dwóch publikacji, zaś drugim Autorem w publikacji trzeciej.

Wymienione wyżej publikacje opatrzone są *Streszczeniem* w języku polskim i angielskim, oraz kolejnymi rozdziałami, takimi jak *Wstęp*, *Cel pracy*, *Omówienie publikacji*, *Wnioski końcowe* i *Literatura uzupełniająca*. Opracowanie zawiera ponadto rozdziały pn. *Dorobek naukowy* oraz *Oświadczenia Współautorów Publikacji*, wśród których znajdują się 3 Oświadczenia Doktorantki,

wskazujące na Jej znaczący udział w przygotowaniu i wykonaniu badań, w opracowaniu ich wyników, po czym – w zredagowaniu manuskryptów.

Streszczenie (odpowiednio – polskojęzyczne i anglojęzyczne) wprowadza czytelnika w tematykę pracy doktorskiej, rozwinięcie której zamieszczone jest na kilkunastu stronach rozdziału *Wstęp*, dotycząc charakterystyki nanowłókien polimerowych i ich biomedycznych zastosowań, takich jak w formie biosensorów, materiałów opatrunkowych, w inżynierii tkankowej i medycynie regeneracyjnej, w systemach transportu leków i związków bioaktywnych, jak i koncentrując się na zagadnieniu elektroprzędzenia, jako metody wytwarzania nanowłókien. Z treścią powyższego rozdziału dysertacji koresponduje przedstawiony przez Autorkę cel pracy doktorskiej. W dalszej części opracowania znajduje się wyczerpujące omówienie – w odniesieniu do każdej z trzech prac – przedmiotu publikacji, materiałów i metod, kolejnych etapów prac eksperymentalnych, po czym – uzyskanych wyników i ich podsumowania w rozdziale *Wnioski*. dopełnieniem przedstawionej części dysertacji jest zestawienie 83 pozycji piśmiennictwa, w zdecydowanej większości z ostatnich pięciu lat. Wymienione rozdziały dysertacji pozwalają na wdrożenie się czytającego do problematyki załączonych publikacji, opartych na nowoczesnym i różnorodnym układzie doświadczalnym, który w swej złożoności umożliwił realizację zamierzeń badawczych.

Dorobek naukowy Doktorantki, zestawiony w odrębnym rozdziale opracowania, poprzedzającym kopie publikacji, obejmuje – poza pracami wchodzącymi w skład rozprawy doktorskiej, 3 publikacje znajdujące się na tzw. Liście Filadelfijskiej, o łącznym IF wynoszącym 13,8 i punktacji ministerialnej o wartości 340, oraz 6 komunikatów, prezentowanych na konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Doktorantka odbyła ponadto 2 zagraniczne staże naukowe, uczestniczyła w realizacji 3 projektów naukowych i odbyła 5 szkoleń, podnoszących Jej zawodowe kompetencje. Jest Laureatką dwóch nagród, wyróżniającą się ponadto w swojej działalności organizacyjnej na rzecz macierzystej Uczelni.

Przedmiotem dysertacji doktorskiej było opracowanie nowych nanomateriałów na bazie elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP, modyfikowanych nanocząstkami i białkami przeciwbakteryjnymi oraz ocena ich właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Dla realizacji tego ambitnego celu pracy, Doktorantka podjęła szereg zadań badawczych, obejmujących: **1.** Wytworzenie nanomateriałów, za pomocą elektroprzędzenia oraz przeprowadzenie ich modyfikacji, zmierzających do opracowania poszczególnych nanowłókien: PL-b-CL/PVP-CdSe QDs; - PL-b-CL/PVP-AuNPs; - PL-b-CL/PVP-AuNPs + Dend-AgNPs i PL-b-CL/PVP+ Dend-AgNPs + endolizyna. **2.** Wykonanie kompleksowej charakterystyki fizykochemicznej otrzymanych nanowłókien **3.** Wskazanie możliwości aplikacyjnych opracowanych nanomateriałów na podstawie oceny ich właściwości biologicznych, tj. przeciwbakteryjnych, przeciwnowotworowych oraz cytotoksycznych.

Publikacja 1: „Hybrid Nanomat: Copolymer Template CdSe Quantum Dots In Situ Stabilized and Immobilized within Nanofiber Matrix”. *Nanomaterials*, 2023.

Zadaniami badawczymi, przyjętymi do realizacji w zaplanowanym nadrzędnym celu pracy były: - synteza CdSe QDs (kropki kwantowe selenku kadmu) stabilizowanych in situ PVP (poliwinylolopirolidon), przeprowadzona w kooperacji z Rhein-Waal University of Applied Science w Niemczech; - synteza nanowłókien PL-b-CL/PVP (PL-b-CL: kopolimer L-laktydu i ε-kaprolaktonu), modyfikowanych CdSe QDs ; - charakterystyka fizykochemiczna, obejmująca kropki kwantowe

CdSe i nanowłókna PL-b-CL/PVP-CdSe QDs; - charakterystyka właściwości biologicznych nanowłókien, obejmująca ocenę ich aktywności przeciwbakteryjnej (wobec szczepu *P. aeruginosa*), cytotoksyczności (wobec nienowotworowej linii komórkowej BEAS-2B oraz nowotworowej A549) i wpływu na proliferację komórek nowotworowych (A549).

Publikacja 2. „Dendronized Ag/Au Nanomats: Antimicrobial Scaffold for Wound Healing Bandages”. *Macromolecular Bioscience*, 2024.

Zadaniami badawczymi, podjętymi w zaplanowanym nadrzędnym celu pracy były: - synteza i charakterystyka nanocząstek złota (AuNPs) stabilizowanych PVP, przeprowadzona w kooperacji z Rhein-Waal University of Applied Science w Niemczech; - synteza nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych AuNPs; - charakterystyka fizykochemiczna nanowłókien PL-b-CL/PVP - AuNPs; - charakterystyka właściwości biologicznych nanowłókien PL-b-CL/PVP - AuNPs, obejmująca ocenę ich cytotoksyczności (wobec komórek eukariotycznych: BEAS-2B i A549), ocenę aktywności przeciwbakteryjnej (wobec szczepu *P. aeruginosa*), jak i ocenę aktywności przeciwbakteryjnej nanowłókien PL-b-CL/PVP - AuNPs modyfikowanych Dend-AgNPs (Dend-AgNPs: dendronizowane nanocząstki srebra, pozyskane w ramach współpracy z University of Alacala, Hiszpania); - analiza mechanizmu uwalniania Dend-AgNPs z nanowłókien; - ocena żywotności i proliferacji fibroblastów VH10 w obecności nanowłókien PL-b-CL/PVP, PL-b-CL/PVP+ Dend-AgNPs, PL-b-CL/PVP - AuNPs i PL-b-CL/PVP-AuNPs + Dend-AgNPs; - ocena żywotności komórek THP-1 (THP-1: ludzka linia komórek monocytarnych) traktowanych nanowłóknami (PL-b-CL/PVP, PL-b-CL/PVP+ Dend-AgNPs, PL-b-CL/PVP-AuNPs i PL-b-CL/PVP-AuNPs+Dend-AgNPs) i ocena wpływu wspomnianych nanowłókien na poziom ekspresji IL-1 β w komórkach.

Publikacja 3. „Electrospun Nanofibers for the Delivery of Endolysin/Dendronized Ag-NPs Complex Against *Pseudomonas aeruginosa*”. *Nanotechnology, Science and Applications*, 2025.

Zadaniami badawczymi, przyjętymi do realizacji w zaplanowanym nadrzędnym celu pracy były: - przygotowanie nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych Dend-AgNPs oraz endolizyną; - ocena morfologii niemodyfikowanych (PL-b-CL/PVP) i modyfikowanych (PL-b-CL/PVP + Dend-AgNPs, PL-b-CL/PVP + Dend-AgNPs + endolizyna) nanowłókien; - charakterystyka biologiczna nanowłókien (PL-b-CL/PVP, PL-b-CL/PVP + Dend-AgNPs, PL-b-CL/PVP + endolizyna, PL-b-CL/PVP+ Dend-AgNPs + endolizyna) obejmująca ocenę ich aktywności przeciwbakteryjnej wobec *Pseudomonas aeruginosa*, oraz działania cytotoksycznego wobec fibroblastów.

Przeprowadzone badania wykazały, że:

publikacja 1: hybrydowe nanowłókna PL-b-CL/PVP-CdSe QDs cechuje: - działanie przeciwbakteryjne wobec opornego na antybiotyki *Pseudomonas aeruginosa*; - wysoka cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych, stwarzająca możliwość zastosowania omawianych nanowłókien jako nanomateriałów przeciwnowotworowych do stosowania miejscowego, pozwalającego jednocześnie ograniczyć ich toksyczność wobec tkanek nieobjętych zmianą chorobową; - możliwość wykorzystania nanowłókien PL-b-CL/PVP-CdSe QDs w terapii fotodynamicznej, a także – zastosowania ich jako biosensorów do identyfikacji biomolekuł w płynach biologicznych.

publikacja 2: opracowane nanowłókna PL-b-CL/PVP-AuNPs cechuje: - znacząca aktywność przeciwbakteryjna wobec opornego na antybiotyki szczepu bakteryjnego *Pseudomonas aeruginosa*; - niska toksyczność wobec ludzkich fibroblastów; - nieznacznie zwiększona immunoreaktywność; -

potencjalna przydatność jako platformy do transportowania substancji aktywnych. Wg Autorki badań, wymienione właściwości nanowłókien PL-b-CL/PVP-AuNPs wskazują na możliwość ich zastosowania jako nowatorskich, efektywnych, spełniających terapeutyczne wymagania, opatrunków przeciwbakteryjnych.

publikacja 3: modyfikowane powierzchniowo Dend-AgNPs i endolizyną, elektroprzędzone nanowłókna PL-b-CL/PVP wykazują skuteczną aktywność przeciwbakteryjną wobec lekoopornego szczepu bakteryjnego *Pseudomonas aeruginosa*, wynikającą z współdziałania każdego z zastosowanych czynników modyfikujących, stwarzającego możliwość utworzenia innowacyjnego opatrunku, zapobiegającego zakażeniom wywoływanym przez lekooporne bakterie, zaś z drugiej strony – wspomagającego regenerację uszkodzeń tkankowych.

Reasumując, przeprowadzone badania pozwoliły na zrealizowanie założonego celu pracy. Wyrazem ich nowatorskiego charakteru i naukowej wartości było ich opublikowanie w renomowanych czasopismach, poprzedzone szczegółową oceną międzynarodowego zespołu Recenzentów, gwarantującą wysoki poziom naukowy i oryginalność publikowanych przez te czasopisma prac.

Jako Recenzent, zwracam uwagę na pewne niejasności występujące w polskojęzycznym tekście opracowania.

1. Brak precyzyjnego uzasadnienia wyboru zastosowanego w badaniach szczepu bakteryjnego *Pseudomonas aeruginosa*, (PAO1) (ATCC15692), pochodzącego z kolekcji Zakładu Biologii Medycznej UJK
2. Uściślenia wymaga stwierdzenie Autorki (str. 21 opracowania): „Tradycyjna metoda leczenia opryszczki wargowej polega na wykorzystaniu acyklowiru w postaci kremu, co ze względu na sposób aplikacji wykazuje niską skuteczność jego dostarczania i wchłaniania oraz wymusza konieczność jego stosowania w zwiększonych dawkach”, bowiem, wg źródła: [Kompleksowe leczenie opryszczki wargowej; Forum Dermatologicum 2017, tom 3, nr 4, 147–151]: „*W leczeniu opryszczki wargowej lekarz musi podjąć decyzję, jaki schemat leczenia wybierze w konkretnym przypadku. Czy u pacjenta zastosować leczenie objawowe, tzw. epizodyczne, tylko w momencie występowania czynnej choroby, czy zastosować leczenie przewlekłe, tzw. supresyjne. Leczenie objawowe doustnym lekiem przeciwwirusowym zawsze powinno być uzupełnione o leczenie miejscowe, a leczenie supresyjne z reguły polega na przewlekłym stosowaniu leków doustnych (4-6 miesięcy)*”
3. Objaśnienia do rycin, zamieszczonych w opracowaniu polskojęzycznym, powinny być podane w języku ojczystym. Doktorantka udowodniła, iż posiada taką umiejętność, za przykład czego posłużyć mogą opisy rycin nr 1 – 5.
4. Czy Doktorantka przeprowadziła, bądź planuje przeprowadzenie oceny zwilżalności opracowanych przez siebie nanowłókien? Jeśli tak, to jaką metodą.
5. Czy oprócz wymienionych zastosowań, opracowanych przez siebie nanowłókien, Doktorantka dostrzega jeszcze inne możliwości ich wykorzystania?

6. W odniesieniu do sformułowania (str. 21 opracowania): „Poza tym, nanowłókna były także wykorzystywane do transportu antybiotyków, np. cyprofloksacyny, gentamycyny [66], metronidazolu [76]....” zwracam uwagę, iż z punktu widzenia farmakologii i chemii leków:

- cyprofloksacyna to syntetyczny chemioterapeutyk z grupy fluorochinolonów, pochodna kwasu nalidyksowego, o szerokim spektrum przeciwbakteryjnym [<https://indeks.mp.pl/leki/desc.php?id=184>]

- gentamycyna to antybiotyk aminoglikozydowy wyizolowany z *Micromonospora purpurea*. Wykazuje działanie bakteriobójcze wobec bakterii tlenowych [<https://indeks.mp.pl/leki/desc.php?id=338>]

- metronidazol to chemioterapeutyk z grupy pochodnych nitroimidazolu. Wykazuje działanie pierwotniakobójcze oraz bakteriobójcze wobec drobnoustrojów beztlenowych [<https://indeks.mp.pl/leki/desc.php?id=545>]

Zgodnie z zapisami podręcznika Farmakologia (Mechanizmy/Leki/Farmakoterapia Oparta na faktach, PZWL 2023), cyt: „Według dawnej klasyfikacji związków o działaniu przeciwbakteryjnym, chemioterapeutyki to leki syntetyczne, natomiast antybiotyki to substancje pochodzenia naturalnego” (Tom I, str. 151). Doktorantka użyła wspólnego mianownika dla wymienionych API, określając je łącznie jako antybiotyki. Proponowałabym stosowanie „bezpieczniejszego” terminu: leki przeciwbakteryjne.

Lektura pracy nasuwa pewne sugestie, które poniżej – do przemyślenia przedstawiam, biorąc pod uwagę, że tak interesujący i ważny z biomedycznego punktu widzenia temat, będzie z pewnością kontynuowany:

1. Zważywszy postępujący w zastraszającym tempie rozwój oporności mikroorganizmów na przeciwdrobnoustrojowe substancje czynne, wpływający znacząco na efektywność profilaktyki i kontroli zakażeń w środowisku szpitalnym – ze szczególnym uwzględnieniem transplantologii, chirurgii, onkologii i hematologii, proponuję ocenę opracowanych przez Doktorantkę nanowłókien także wobec mikroorganizmów opornych na wiele antybiotyków, określanych mianem bakterii alarmowych, takich jak:
 - MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) – *Staphylococcus aureus* oporny na metycylinę,
 - VRSA (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*) – *Staphylococcus aureus* oporny na wankomycynę,
 - VRE (vancomycin-resistant *Enterococcus*) – *Enterococcus* oporny na wankomycynę,
 - HLAR (high-level aminoglycoside resistance) – *Enterococcus* oporny na wysokie stężenia aminoglikozydów
 - PRP (penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*) – *Streptococcus pneumoniae* oporny na penicylinę
 - CPE (carbapenemase-producing *Enterobacterales*) – pałeczki *Enterobacterales* wytwarzające β -laktamazy o aktywności karbapenemaz typu KPC, MBL lub OXA-48
2. Jeżeli Doktorantka pragnęłaby w przyszłości pokusić się o opracowania skutecznego produktu regeneracyjnego, który jednocześnie skutecznie przeciwdziałałby zakażeniom miejsca operowanego, to proponowałabym – dla weryfikacji jego aktywności przeciwdrobnoustrojowej, uwzględnienie w procedurze doświadczalnej takich

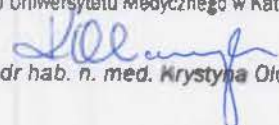
patogenów jak: *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* lub *Enterococcus faecium*, obok ich gram-ujemnych odpowiedników, w tym *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* lub *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella spp.* i *Pseudomonas aeruginosa* [<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10801486/>]

Reasumując stwierdzam, iż praca Pani mgr Magdaleny Agnieszki Lasak, nosząca tytuł: „Badanie właściwości biologicznych elektroprzędzonych nanowłókien PL-b-CL/PVP modyfikowanych nanocząstkami i białkami przeciwbakteryjnymi – ocena działania cytotoksycznego oraz aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej w badaniach *in vitro*” („Investigation of biological properties of electorospun PL-b-CL/PVP nanofibers modified with nanoparticles and antibacterial proteins – evaluation of cytotoxic effect as well as *in vitro* antibacterial and anticancer activities”), w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, spełniając warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r., poz. 1571). Ma charakter zarówno poznawczy jak i aplikacyjny. Świadczy o dużej wiedzy Doktorantki, Jej manualnych umiejętnościach i znajomości nowoczesnych technik laboratoryjnych.

Z pełnym więc przekonaniem przedkładam Pani dr hab. Joannie Czerwik-Marcinkowskiej, prof. UJK – Przewodniczącej Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Magdaleny Agnieszki Lasak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, uprzejmie przedkładam wniosek o wyróżnienie ocenianej dysertacji. Głównym walorem rozprawy jest jej wartość aplikacyjna, jako opracowania wnoszącego oryginalny i znaczący wkład do współczesnej wiedzy na temat biologicznych właściwości elektroprzędzonych nanowłókien. Oceniana dysertacja, oparta na wieloprofilowym, złożonym warsztacie laboratoryjnym, obejmującym nowoczesne techniki badawcze, jest dobrze zaplanowanym, oryginalnym i opartym na rzetelnej analizie piśmiennictwa opracowaniem naukowym, realizowanym we współpracy z zagranicznymi ośrodkami badawczymi, takimi jak Rhein-Waal University of Applied Science w Niemczech oraz University of Alacala, Hiszpania, którego wyniki zamieszczone zostały w formie 3 publikacji w renomowanych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu oraz wysokim współczynnikiem oddziaływania (łączna wartość IF dla trzech publikacji = 13,7).

PROFESOR BADAWCZO-DYDAKTYCZNY
Katedry i Zakładu Chemii Klinicznej
i Diagnostyki Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach


prof. dr hab. n. med. Krystyna Olczyk