

Prof. dr hab. Janusz Szemraj  
ul. Mazowiecka 6/8  
92-215 Łódź  
tel/fax: 042678-24-65  
e mail: Janusz.szemraj@umed.lodz.pl

Łódź, 21.08.2023 r.

### Recenzja pracy doktorskiej

pt. „**Metody permeabilizacji błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych wspomagające działanie óójcze rekombinowanej endolizyny fagowej.**” wykonaną przez mgr. Dorotę Kuc-Ciepluch w ramach Szkoły Doktorskiej, Sekcji Nauki Ścisłe i Przyrodnicze, Dyscyplina Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach pod kierunkiem dr hab. prof UJK Michała Arabskiego.

Antybiotykooporność bakterii jest jednym z najważniejszych zagrożeń zdrowia publicznego. Coraz większa oporność drobnoustrojów na antybiotyki skutkuje wyczerpywaniem się opcji terapeutycznych, większym ryzykiem rozprzestrzeniania się bakterii, wydłużonym czasem infekcji co przekłada się na zwiększone koszty leczenia, wyższą śmiertelność. Trwają poszukiwania nowych, alternatywnych w stosunku do antybiotykoterapii metod pozwalających na walkę między innymi z bakteriami Gram- ujemnymi. Jednym z analizowanych sposobów walki z opornymi szczepami bakterii jest permeabilizacja zewnętrznej błony bakterii w tym bakterii Gram-ujemnych wykorzystując proces pyroptozy.

Proces pyroptozy jest przykładem prozapalnej, zaprogramowanej śmierci komórki, powstającej w odpowiedzi głównie na infekcje patogenami wewnątrzkomórkowymi, prowadząc do reakcji przeciwbakteryjnej, indukując odpowiedź immunologiczną.

Tego rodzaju badania mają olbrzymie znaczenie kliniczne, stąd też wiele badań doświadczalnych i klinicznych jest poświęconych temu zagadnieniu. Doktorantka mgr Dorota Kuc-Ciepluch w swojej pracy doktorskiej przyjęła za cel ocenę nowych metod permeabilizacji zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych, wspomagających działanie bakteriobójcze rekombinowanej endolizyny fagowej KP27 faga Klebsiella.

W związku z tym, wybór przez Pana Promotora i Doktorantkę tej tematyki badań uważam za bardzo aktualny, interesujący i w pełni uzasadniony.

Recenzowana praca doktorska jest dysertacją liczącą 81 stron zawierającą 26 rycin, 7 tabel i 117 pozycji literaturowych w większości pochodzących z ostatniego okresu czasu, które

posłużyły do przygotowania monograficznej części poglądowej, doświadczalnej oraz dyskusji nad wynikami badań własnych. Dobór pozycji literaturowych nie budzi zastrzeżeń i wskazuje na to, że tematyka badań jest bardzo aktualna.

Praca doktorska ma typowy układ. Rozpoczyna się częścią teoretyczną liczącą 12 stron; zawiera 4 dobrze dobrane ryciny. Osobne rozdziały części teoretycznej stanowią zamierzone przejście do obszernego omówienia badań które mają na celu poszukiwanie nowych narzędzi walki z patogenami, alternatywnymi wobec klasycznej antybiotykoterapii. Po krótkim wprowadzeniu, mgr Dorota Kuc-Ciepluch w czytelny sposób omówiła budowę ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. W dalszej kolejności przedstawiona została rola endolizyn fagowych w eradykacji bakterii Gram-ujemnych zwracając uwagę na zastosowanie permeabilizatorów błony takich jak EDTA, kwasy organiczne czy jonofory jako obiecującego narzędzia przeciw oporności bakteryjnej. W kolejnym rozdziale omówiona została aktywność dendrymerów polikationowych jako związków przeciwbakteryjnych w szczególności możliwość ich interakcji z błoną komórkową w celu zaburzenia jej integralności. W dalszej kolejności Doktorantka omówiła możliwość wykorzystania modyfikacji nanoczątek metali kationowymi w tym złota dendromerami w zwiększeniu ich aktywności bakteriobójczej. Osobny końcowy rozdział tej części dysertacji poświęcony został pyroptozie jako mechanizmowi permeabilizacji błony komórkowej. Przygotowany przez Panią mgr Dorota Kuc-Ciepluch przegląd piśmiennictwa stanowi oryginalnie przemyślany, interesujący i dobrze zilustrowany wykład na temat aktualnej wiedzy o omawianych zagadnieniach. Autorka dowiodła, że potrafi wykorzystywać dostępne dane literaturowe, twórczo je opracowywać, systematyzować i komentować.

Część doświadczalna pracy obejmuje 41 stron. Poświęcona jest ocenie nowych metod permeabilizacji zewnętrznej błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych, wspomagających działanie bakteriobójcze rekombinowanej endolizyny fagowej. jako metody alternatywnej do antybiotykoodporności, opisie procedur metodycznych zastosowanych w prezentowanych badaniach, przedstawieniu uzyskanych wyników oraz ich interpretacji w kontekście danych opublikowanych przez innych autorów. Rozdział „Założenia i cele pracy” wskazuje, iż Autorka postanowiła, w ramach założonego nurtu badań i w oparciu o zreferowane wcześniej przesłanki teoretyczne, w praktyce wypełnić trzy konkretne zadania dotyczących strategii permeabilizacji: tj. zastosowanie dendrymerów polikationowych jako egzogennych czynników permeabilizujących błonę komórkową mutantów szorstkich i gładkich *P. aeruginosa* PAO1;

indukcja pyroptozy przez dendrytyczne nanocząstki złota w obecności bakteryjnego lipopolisacharydu; aktywacja pyroptozy przez bakteryjny lipopolisacharyd jako endogenne mechanizm wspomagający permeabilizację zewnętrznej błony bakteryjnej dla rekombinowanej endolizyny faga KP27.

Kolejne rozdziały pokazują, jak te zamierzenia zostały zrealizowane.

Przystępując do oceny merytorycznej tej części recenzowanej rozprawy, muszę podkreślić, że prezentowane w niej badania zostały zaplanowane wszechstronnie, z uwzględnieniem doświadczeń analizujących różne uwarunkowania poszczególnych zagadnień. Oparto je o nowoczesne dobrze dobrane techniki eksperymentalne takie jak: dichroizm kołowy, analiza aktywności enzymatycznej endolizyny w obecności dendrymerów PPI, aktywności przeciwbakteryjnej glikodendrymerów w obecności endolizyny, permeabilizacja zewnętrznej błony bakteryjnej, analiza mikromacierzowa ekspresji genów, ilościowy PCR z odwrotną transkrypcją (RT-qPCR), ocena aktywności kaspaz, metody ELISA, Western blot.

Ich opis stanowi rodzaj swoistego laboratoryjnego „manualu”.

Wszystkie użyte metody charakteryzuje wysoki stopień obiektywizacji danych, a wykorzystane analizy statystyczne z wykorzystaniem programu STATISTICA wersja 13.3 (StatSoft, Polska) nie budzą zastrzeżeń. Dokumentacja wyników uzyskanych w recenzowanej pracy obejmuje 20 rycin, 7 zestawień tabelarycznych. Przekonuje ona, że wszystkie doświadczenia przeprowadzone zostały ze skrupulatnością i obejmuje założone aspekty prowadzonych badań. Sposób ich prezentacji jest przemyślany, co pozwala śledzić postępy pracy i rejestrować realizację jej kolejnych celów i zadań.

Badania przeprowadzono na sześciu różnych liniach komórkowych wykorzystując między innymi dendrymery poli(propylenoiminowe) modyfikowane maltozą, rekombinowaną endolizynę faga KP27, szczep bakteryjny *P. aeruginosa* PAO1.

Prezentacja wyników udokumentowana zestawieniami tabelarycznymi, rycinami została przedstawiona w przejrzysty sposób na 30 stronach pracy doktorskiej.

W części Dyskusja Doktorantka przedstawiła i omówiła właściwości przeciwbakteryjne endolizyny faga KP27 wobec szczepów bakterii Gram-ujemnych *P. aeruginosa* w obecności dendrymerów polikationowych zmodyfikowanych maltozą – glikodendrymerów wskazując na udział składu powierzchniowego dendrymerów, ich stężenia w powstawaniu i wzmacnianiu tego rodzaju aktywności. Dendrymery polikationowe zmodyfikowane maltozą wzmacniały działanie przeciwbakteryjne endolizyny w porównaniu z niemodyfikowanymi. Za tego rodzaju



modyfikacją dendrymerów przemawia fakt, zwiększenia ich hydrofilności, braku zmian ładunku, zwiększenia przepuszczalności OM ściany komórkowej bakterii. W stężeniu  $50\mu\text{M}$  modyfikowane dendrymery nie wykazywały działania toksycznego w stosunku do komórek eukariotycznych, czy utraty interakcji dendrymer-białko w przeciwieństwie do dendrymerów bez modyfikacji maltozą. Uzyskane wyniki pozwoliły na wysunięcie hipotezy, że modyfikowane maltozą dendrymery mogą być wykorzystane w destabilizacji zewnętrznej błony bakteryjnej pozwalającej na dotarcie endolizyny do peptydoglikanu. Mam pytanie czy w pracach badawczych nad modyfikacją dendrymerów cukrami: maltozą, chitozazaniem wykorzystuje się także inne pochodne glukozy?. Proszę doktorantkę o krótkie omówienie co jest bardzo istotne w przedstawionej pracy - jak modyfikacja dendrymerów maltozą wpływa na oddziaływanie elektrostatyczne z błoną komórkową. W dalszej części dyskusji Doktorantka omówiła mechanizm w jaki kationowe dendronizowane nanocząstki złota wpływają na aktywację odpowiedzi immunologicznej w komórkach THP-1. Przeprowadzone badania wykazały, że dendrytyczne nanocząstki złota mogą wywoływać reakcje zapalne podobne pyroptozy wzmacniając odpowiedź immunologiczną w obecności lipopolisacharydu pochodzenia bakteryjnego. W tej części dyskusji Doktorantka omówiła i przedyskutowała wyniki dotyczące wpływu modyfikacji nanocząstek jakim jest PEGylacja na aktywację odpowiedzi immunologicznej. Nanocząsteczki metali które są zdolne do aktywacji pyroptozy próbuje się między innymi wykorzystać w niszczeniu komórek nowotworowych. Analiza wyników uzyskanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej wykazała brak aktywacji gazderminy co nie pozwala na wykorzystanie pyroptozy w celu zwiększenia aktywności bójczej endolizyny. Doktorantka zaproponowała mechanizm działania dendrytycznych nanocząsteczek złota w obecności lipopolisacharydu poprzez aktywację uwalniania cytokin prozapalnych biorących udział w indukcji pyroptozy bez rozczepienia gazderminy D. W kolejnej części dyskusji została omówiona ocena indukcji pyroptozy jako potencjalnego mechanizmu przeciwbakteryjnego prowadzącego do zwiększenia aktywności enzymatycznej endolizyny za pośrednictwem podstawowego białka pyroptozy, gazderminę D, N-komiec białka GSDMD. Doktorantka analizując wyniki badań wykazała zmianę przepuszczalności błony komórkowej w wyniku tworzenia się w niej porów pozwalających na degradację peptydoglikanu przez wnikałą endolizynę. Wyniki badań autorów cytowanych w Dyskusji wskazywały na obecność białka GSDMD w supernatantach komórek pyroptotycznych co pośrednio związane było perforacją błony bakteryjnej przez gazderminę D. W kolejnej części

dysertacji Doktorantka przeanalizowała możliwość uzyskania podobnego efektu poprzez aktywację pyrozy wykorzystując różne formy strukturalne LPS *P. aeruginosa* w stosunku do eukariotycznych linii komórkowych. Analiza transkryptomyczna działania cząsteczek LPS na różne linie komórkowe wykazała wzrost ekspresji genów związanych z odpowiedzią immunologiczną: komórkową i zapalną na bakteryjny lipopolisacharyd w przypadku jednej linii THP1-Xblue. Wysoki poziom ekspresji dotyczył interleukiny IL-1 $\beta$  specyficznej dla pyroptozy. Analiza wyników wykazała, że gazdermina D umożliwia permabilizację błony komórkowej wzmacniając aktywność bójczą endolizyny natomiast naturalna indukcja gazderminy drogą pyroptozy nie wykazuje tego efektu. Zbyt duża indukcja białek permeabilizujących w wyniku odpowiedzi immunologicznej drogą pyroptozy w obecności LPS może być cytotoksyczna dla komórek

Na podstawie uzyskanych wyników Pani mgr Kuc-Ciepluch sformułowała 3 końcowe wnioski, uogólniające zreferowane i przedyskutowane dane.

Wnioski te są jednocześnie dowodem na zrealizowanie w pełni przez Doktorantkę celów jej dysertacji. Wyniki badań przedstawionych w pracy doktorskiej zostały przedstawione częściowo w postaci dwóch opublikowanych artykułów w których Pani Magister jest 1 autorem: eksperymentalnej (Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2022; 217: 112652 IF=5.999, przeglądowej (Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2021; 75: 337-344), dwóch współautorskich (International Journal of Pharmaceutics, 2020; 573: 118867 IF=5,875, Bioorganic Chemistry, 2019; 91: 103121). Łączny IF prac wynosi 17,062, suma punktów MNISW = 340. Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej Pani mgr Kuc-Ciepluch były finansowane z funduszy 2 projektów badawczych: „AKCELERATOR ROZWOJU Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach”, nr POWR.03.05.00-00-Z212/18, OPUS UMO-2017/27/B/NZ6/ (kierownik dr hab. Michał Arabski, prof. UJK).

. Podsumowując, z pełnym przekonaniem uważam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr Kuc-Ciepluch pod każdym względem spełnia wymogi stawiane takim dysertacjom. Stanowi ona samodzielne i oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wnosi nowe, ważne poznawczo informacje min. na temat metod permeabilizacji błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych we wspomaganie działania bojczego rekombinowanej endolizyny fagowej.

Tym samym praca ta otwiera nowe możliwości badawcze w tym kierunku i zapowiada potencjalne możliwości wykorzystania tych badań w działaniach klinicznych. Przygotowana



została w sposób właściwy, zarówno pod względem merytorycznym, jak i edycyjnym. Kilka drobnych uchybień stylistycznych i tzw. literówek, które udało mi się zauważyć nie ma istotnego znaczenia.

W podsumowaniu uważam, że praca doktorska mgr Kuc-Ciepluch zatytułowana „Metody permeabilizacji błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych wspomagające działanie bójcze rekombinowanej endolizyny fagowej” oceniona została pozytywnie, spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20.07.2018r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce dla rozprawy na stopień doktora, ze względu na bardzo duży walor aplikacyjny zwracam się z wnioskiem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie mgr do dalszych etapów przewodu doktorskiego jednocześnie wnioskując o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą Rektorską.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Biochemii Medycznej  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
*Janusz Szemraj*  
Prof. dr hab. n. med. Janusz Szemraj

Janusz Szemraj

Uniwersytet Medyczny w Łodzi