

Łódź 12 marca, 2026 r.

Prof. dr hab. Maksim Ionov  
Uniwersytet Łódzki  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Katedra Biofizyki Ogólnej  
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź  
E: maksim.ionov@biol.uni.lodz.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej **mgr Karoliny Lach** pt.

**„Badanie właściwości przeciwbakteryjnych nanocząstek dendrytycznych wzmacniających działanie endolizyn fagowych przeciwko bakteriom Gram-ujemnym – ocena aktywności przeciwbakteryjnej i działania cytotoksycznego w badaniach *in vitro*”**

wykonanej w Szkole Doktorskiej Sekcji Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, w dyscyplinie Nauki Biologiczne pod kierunkiem promotora dr. hab. Karola Cieplucha, profesora Urad.

Narastający problem antybiotykooporności stanowi jedno z najpoważniejszych wyzwań współczesnej medycyny i mikrobiologii klinicznej. W świetle danych przedstawionych w recenzowanej pracy, w 2019 roku z zakażeniami wywoływanymi przez drobnoustroje wielolekooporne powiązano niemal 5 milionów zgonów, a prognozy wskazują na możliwy wzrost tej liczby do 10 milionów rocznie do 2050 roku. Szczególnie istotnym zagrożeniem spośród bakterii Gram-ujemnych należących do grupy ESKAPE pozostaje pałeczka *Pseudomonas aeruginosa*, która charakteryzuje się wielopoziomowymi mechanizmami oporności na antybiotyki. Skuteczna walka z tym patogenem wymaga strategii terapeutycznych o charakterze wielokierunkowym, działających jednocześnie na kilka elementów strukturalnych komórki bakteryjnej. Pomysł połączenia dendrymerów karbokrzemowych z endolizyną fagową, realizowany w ramach pracy doktorskiej wpisuje się precyzyjnie w tę lukę terapeutyczną. Hipoteza pracy zakłada, że dendrymery karbokrzemowe, dzięki swoim kationowym grupom funkcyjnym, mogą destabilizować ujemnie naładowaną błonę zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych, torując drogę endolizynie, enzymowi fagowemu ukierunkowanemu na

peptydoglikan. Próby wykorzystania synergistycznego efektu dendrymeru i endolizyny stanowią nowatorskie podejście, a podjęta tematyka jest aktualna i w pełni uzasadniona naukowo.

Wyniki opublikowane zostały w dwóch pracach doświadczalnych w czasopismach z listy Journal Citation Reports. W pierwszej publikacji Doktorantka figuruje jako współautorka: Kinga Skrzyniarz, Samuel Takvor-Mena, Karolina Lach, Małgorzata Łysek-Gładysińska, Óscar Barrios-Gumiel, Jesús Cano, Karol Ciepluch, Molecular mechanism of action of imidazolium carbosilane dendrimers on the outer bacterial membrane – From membrane damage to permeability to antimicrobial endolysin, *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 665, 2024, s. 814–824, ISSN 0021-9797, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2024.03.130> (IF = 9,7). W drugiej publikacji Doktorantką pełni funkcję pierwszego autora: Karolina Lach, Kinga Skrzyniarz, Samuel Takvor-Mena, Małgorzata Łysek-Gładysińska, Piotr Furmańczyk, Oscar Barrios-Gumiel, Javier Sanchez-Nieves, Karol Ciepluch, Endolysin CHAP domain-carbosilane metallodendrimer complexes with triple action on Gram-negative bacteria: Membrane destabilization, reactive oxygen species production and peptidoglycan degradation, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 278, 2024, 134634, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.134634> (IF = 8,5). Łączny Impact Factor obu publikacji wynosi 18,2, a sumaryczna punktacja MEiN osiąga 200 punktów. W rozprawie doktorskiej zaprezentowano również pozostały dorobek naukowy, obejmujący 4 publikacji o zasięgu międzynarodowym. Doktorantka prezentowała swoje wyniki badań na konferencjach. Brała udział w realizacji czterech projektów badawczych. W latach 2022–2023 odbyła dwa staże naukowe, jeden w zagranicznym, a drugi w krajowym ośrodku badawczym. Uczestniczyła w licznych kursach i warsztatach służących podnoszeniu kwalifikacji naukowych. Dwukrotnie otrzymała nagrodę za wystąpienie ustne na forach studenckich. Warto również podkreślić aktywność doktorantki w zakresie działalności organizacyjnej i promocyjnej. Całokształt dorobku naukowego Pani mgr Lach oceniam bardzo wysoko, zwłaszcza biorąc pod uwagę wczesny etap rozwoju jej kariery naukowej.

Rozprawa doktorska została przedstawiona w formie opracowanego maszynopisu i obejmuje wstęp teoretyczny, precyzyjnie sformułowany cel pracy, opis materiałów i metod, wyniki, dyskusję oraz wnioski końcowe. Zawiera również streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, bibliografię, część poświęconą dorobkowi naukowemu doktorantki oraz oświadczenie formalne.

We wstępie teoretycznym wiele uwagi poświęcono omówieniu budowy ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, ze szczególnym uwzględnieniem struktury lipopolisacharydu oraz peptydoglikanu jako celów terapeutycznych. *Pseudomonas aeruginosa* została przedstawiona nie tylko

jako szczep modelowy, ale przede wszystkim jako patogen o wysokim priorytecie klinicznym. Rozdział poświęcony biofilmowi bakteryjnemu obejmuje opis etapów jego tworzenia, skład matrycy oraz mechanizmy odpowiedzialne za oporność bakterii biofilmowych na antybiotyki. Rozdział przedstawiający tkankę skórną opisuje budowę naskórka i skóry właściwej oraz mechanizmy obrony przed bakteriami, uzasadniając wybór odpowiedniego modelu *ex vivo*. Rozdziały o dendrymerach kationowych i endolizynie fagowej stanowią właściwą podstawę merytoryczną dla przeprowadzonych eksperymentów.

Celem pracy było scharakteryzowanie mechanizmu działania antybakteryjnego dendrymerów karbochromowych i ich kompleksów z endolizyną fagową wobec *Pseudomonas aeruginosa*. W pracy zaplanowano wykonanie charakterystyki koniugowania dendrymerów z endolizyną, ocenę permeabilizacji błony, degradacji peptydoglikanu, a także zbadanie właściwości badanych kompleksów na hamowanie powstawania biofilmu w warunkach *ex vivo* oraz analiza cytotoksyczności dendrymerów oraz kompleksów dendrymer/endolizyna wobec komórek eukariotycznych. Przyjęty układ badań jest logiczny i wielowymiarowy.

Dobór metod badawczych jest przemyślany i adekwatny do postawionych zadań naukowych. Doktorantka zastosowała komplementarny zestaw technik obejmujący zarówno metody klasyczne, jak i zaawansowane techniki spektroskopowe oraz mikroskopowe. Aktywność antybakteryjną określono na podstawie standardowych testów mikrobiologicznych. Permeabilizację błony zewnętrznej i degradację peptydoglikanu oceniono metodą fluorescencyjną. Charakterystykę interakcji dendrymerów z endolizyną przeprowadzono metodą wygaszania fluorescencji, co pozwoliło na ilościowy opis oddziaływań. Morfologię dendrymerów, ich kompleksów z endolizyną oraz komórek bakteryjnych oceniano technikami transmisyjnej i skaningowej mikroskopii elektronowej. Żywotność bakterii, analizowano metodami fluorescencyjnymi, w tym z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej. Cytotoksyczność wobec ludzkich fibroblastów oceniono testem MTS.

Opis badań obejmuje cztery spójne etapy. W pierwszym etapie oceniono właściwości przeciwbakteryjne dendrymerów. Wykazano, że z spośród czterech badanych dendrymerów Dend, DendAg i DendAgCh hamują wzrost *P. aeruginosa*, natomiast DendCh nie wykazał oczekiwanego efektu. Test permeabilizacji wykazał, że Dend i DendCh skutecznie zwiększają przepuszczalność błony zewnętrznej, natomiast DendAg i DendAgCh wykazywały słabsze działanie, co autorka interpretuje jako efekt tendencji tych związków do agregacji, potwierdzonej analizami TEM i DLS.

W kolejnym etapie przeprowadzono fizykochemiczną charakterystykę interakcji dendrymer - endolizyna. Stwierdzono, że dominującym mechanizmem są oddziaływania elektrostatyczne, wynikające z ujemnego ładunku domeny CHAP endolizyny i kationowego ładunku powierzchniowego dendrymerów. Najwyższą stałą powinowactwa wykazał DendAg, co Doktorantka wiąże z większą ekspozycją ładunku dodatniego w porównaniu z pozostałymi dendrymerami. Analizy DLS i TEM potwierdziły tendencje kompleksów do agregacji, przy czym obecność endolizyny redukowała rozmiar agregatów jedynie dla DendCh.

Etap trzeci poświęcony został analizie aktywności przeciwbakteryjnej kompleksów. Decyzja o wykluczeniu dendrymeru Dend z dalszych badań została uzasadniona brakiem efektu synergistycznego z endolizyną. Wyniki testu żywotności, obserwacje morfologii technikami SEM i TEM potwierdzają wielokierunkowe działanie badanych układów. Dendrymery zawierające jony srebra dodatkowo indukowały zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu.

W czwartym etapie zbadano aktywność przeciwbiofilmową *in vitro* i *ex vivo*. Dendrymery nie hamowały powstawania biofilmu. Obserwowany wzrost masy biofilmu Doktorantka wyjaśnia kondensacją struktury biofilmu wywołaną przez dodatni ładunek dendrymerów. Połączenie dendrymerów z endolizyną powodowało istotne zmniejszenie masy biofilmu. W modelu *ex vivo* skóry najskuteczniejszą aktywność wykazywały DendAg i DendAgCh. Analiza histologiczna skóry niezainfekowanej ujawniła zróżnicowany wpływ dendrymerów na warstwy naskórka. W skórze zainfekowanej naskórek był całkowicie zdegradowany przez *P. aeruginosa*, co uniemożliwiło ocenę efektu terapeutycznego.

Badanie cytotoksyczności dendrymerów i ich kompleksów z endolizyną wobec ludzkich fibroblastów wykazało istotną toksyczność dendrymerów, podczas gdy DendCh i DendAgCh były lepiej tolerowane przez komórki. Ważną obserwacją było częściowe złagodzenie cytotoksycznego działania dendrymerów po ich kompleksowaniu z endolizyną.

Wyniki pracy otwierają realne perspektywy translacyjne, szczególnie w kontekście trudno gojących się ran zakażonych wieloopornymi szczepami *P. aeruginosa*. Dane dotyczące częściowego złagodzenia cytotoksyczności dendrymerów przez endolizynę są istotne z punktu widzenia dalszego projektowania formułacji terapeutycznych.

Dyskusja została opracowana w sposób merytoryczny i wnikliwy. Wskazuje ona pełne zrozumienie i dobrą znajomość przez doktorantkę aktualnego stanu wiedzy w zakresie badanego

problemu. Na podstawie przedstawionych wyników sformułowano cztery wnioski, które w sposób logiczny wynikają z wykonanych badań i wskazują na potencjalne możliwości praktycznego zastosowania uzyskanych rezultatów.

Rozprawa napisana jest w sposób przejrzysty, co sprawia, że jej lektura jest przyjemna. Praca prezentuje wysoki poziom merytoryczny, jednak niektóre zagadnienia wymagają bardziej szczegółowego i pogłębionego omówienia, aby w pełni wyeksponować przedstawione wyniki.

W trakcie lektury stwierdzono kilka błędów edytorskich i gramatycznych. W opisie wyników barwienia HADA na str. 53: pojawia się odesłanie do ryc. 17D, podczas gdy Rycina 17 dotyczy reaktywnych form tlenu i nie zawiera panelu D. Prawidłowe odwołanie powinno wskazywać ryc. 19D. Analogicznie na str. 58, gdzie zamiast ryc. 23E podano ryc. 20E. Powtarzającym się błędem gramatycznym jest forma „na Rycina [nr]” zamiast „na Rycinie [nr]”, str. 43, 60, 64, 66 i 69. Podpis Ryciny 21 wymaga uzupełnienia o przypisanie wartości skali do poszczególnych paneli. Na wykresach przedstawionych w Ryc. 12 i 17 zabrakło oznaczeń osi X. W podpisach do rycin 11, 13, 16 i 17 nie uwzględniono liczby powtórzeń eksperymentalnych, natomiast w podpisach do rycin 22 i 29 nie wskazano zastosowanego testu statystycznego. Na osi X w Ryc. 15, przedstawiającej rozmiar kompleksów, jednostka została niepoprawnie oznaczona, zamiast „ $\mu\text{m}$ ” widnieje „nm”. Nie dokonano opisu parametrów zawartych w Tabeli 1.

Wymienione drobne niedociągnięcia nie umniejszają w żadnym stopniu wysokiej oceny, jaką przyznaje rozprawie. W odniesieniu do dyskusji naukowej i potencjalnych kierunków dalszych badań, chciałbym przedstawić doktorantce kilka pytań oraz uwag, które mogą być pomocne w dalszej pracy.

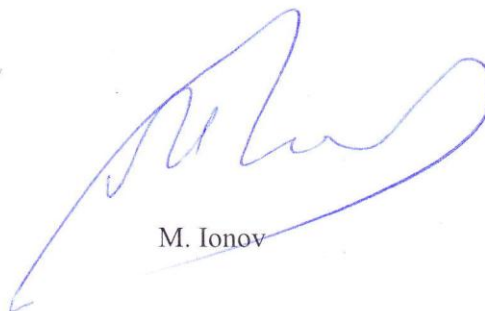
- Dendrymer DendCh wykazał najwyższą zdolność permeabilizacji błony zewnętrznej, co potwierdzał rosnący sygnał barwnika NPN proporcjonalny do stężenia związku. Jednocześnie nie wykazywał on aktywności w oznaczeniu MIC (Minimal Inhibitory Concentration), natomiast jako jedyny dendrymer niewykazujący samodzielnej aktywności antybakteryjnej ujawnił wyraźną aktywność w kompleksie z endolizyną. Jakie strukturalne cechy DendCh mogą wyjaśniać różnicę między jego słabą aktywnością, a wysoką efektywnością w układzie z endolizyną?
- Jakie kryteria uwzględniono przy określaniu stosunków dendrymer/endolizyna zastosowanych w analizach? Czy przeprowadzono pomiar potencjału powierzchniowego utworzonych kompleksów dendrymer-endolizyna?
- Z czego mogą wynikać różnice między efektem egzotermicznym a endotermicznym obserwowanym podczas oddziaływań dendrymerów z endolizyną?

- Autorka wyjaśnia obserwowany wzrost masy biofilmu agregacją komórek i kondensacją struktury biofilmu. Czy przeprowadzono lub planuje się przeprowadzenie dodatkowych obserwacji które pozwoliłyby oddzielić wzrost masy biofilmu od zmian jego gęstości wykrywanych przez barwnik CV?
- Doktorantka wskazuje, że w skórze zainfekowanej *P. aeruginosa* naskórek był całkowicie zdegradowany, co uniemożliwiło ocenę efektu terapeutycznego. Jakie modyfikacje protokołu np. skrócenie czasu infekcji lub niższa dawka inoculum, pozwoliłyby na uzyskanie umiarkowanego modelu zakażenia, umożliwiającego ocenę potencjału terapeutycznego badanych układów?
- Wyniki testu żywotności wskazują na istotną cytotoksyczność dendrymerów wobec fibroblastów VH10. Jak Doktorantka ocenia stosunek stężenia skutecznego przeciwbakteryjnie do stężenia cytotoksycznego? Czy planowane są badania selektywności wobec innych linii komórkowych lub bardziej zróżnicowanych modeli tkankowych?
- Który z trzech dendrymerów wybranych do analiz w niniejszej pracy wykazuje największy potencjał w kontekście przyszłych badań?

Problem badawczy podjęty przez Doktorantkę jest niezwykle istotny. Oporność bakterii na antybiotyki, stanowi jedno z ważnych wyzwań współczesnej medycyny. Wobec ograniczonej skuteczności standardowych terapii coraz większe znaczenie zyskują alternatywne strategie przeciwdrobnoustrojowe, takie jak połączenie nanomateriałów z enzymami np. endolizynami fagowymi. Analiza synergistycznego działania tych układów oraz ich wpływu na biofilm i mechanizmy bakteriobójcze ma kluczowe znaczenie zarówno dla pogłębiania wiedzy biologicznej, jak i dla opracowywania nowych, skutecznych terapii wobec szczepów opornych, w tym *Pseudomonas aeruginosa*. Wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy stanowią istotny wkład w dotychczasowy dorobek naukowy. Wnoszą one istotną wartość poznawczą, pozwalając lepiej zrozumieć mechanizmy permeabilizacji błony komórkowej, degradacji peptydoglikanu oraz działania przeciwbiofilmowego. Mają także wymiar aplikacyjny, wskazując potencjalne strategie wykorzystania badanych układów w projektowaniu nowoczesnych czynników terapeutycznych przeciwko bakteriom opornym na antybiotyki. Praca stanowi rzetelne, logicznie skonstruowane i wartościowe opracowanie naukowe o charakterze interdyscyplinarnym, łączące narzędzia mikrobiologii, nanotechnologii i biofizyki. Postawione cele zostały zrealizowane, a uzyskane wyniki wzbogacają wiedzę na temat mechanizmów działania kompleksów dendrymer/endolizyna wobec opornego patogenu *Pseudomonas aeruginosa*.

Doktorantka wykazała samodzielność i dojrzałość naukową w projektowaniu badań, interpretacji wyników oraz formułowaniu wniosków popartych danymi literaturowymi. Prezentowana rozprawa doktorska świadczy o solidnym przygotowaniu teoretycznym doktorantki oraz o jej biegłości w stosowaniu warsztatu badawczego.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Karoliny Lach pt. „Badanie właściwości przeciwbakteryjnych nanocząstek dendrytycznych wzmacniających działanie endolizyn fagowych przeciwko bakteriom Gram-ujemnym – ocena aktywności przeciwbakteryjnej i działania cytotoksycznego w badaniach *in vitro*” spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. 2023 poz. 742). Wnoszę o dopuszczenie mgr Karoliny Lach do publicznej obrony rozprawy doktorskiej oraz do kolejnych etapów postępowania doktorskiego.



M. Ionov