



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA**

Uniwersytet Łódzki

dr hab. Katarzyna Miłowska, prof. UŁ
Katedra Biofizyki Ogólnej
ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź
e-mail: katarzyna.milowska@biol.uni.lodz.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Jarosława Rachuny
pt.: „Optymalizacja systemu interferometrycznego do badań właściwości
przeciwdrobnoustrojowych bakteriofagów i wybranych związków chemicznych”**

Promotor: dr hab. Michał Arabski, prof. UJK

Promotor pomocniczy: dr Sławomir Wąsik

Problematyka badawcza, którą mgr Jarosław Rachuna podjął w pracy jest bardzo ważna i interesująca zarówno z punktu widzenia poznawczego jak i aplikacyjnego. Antybiotykooporność to problem globalny i jest jednym z największych współczesnych zagrożeń. Jeśli antybiotyki przestaną działać, nie będziemy mieli jak bronić się przed infekcjami bakteryjnymi, a to w dłuższej perspektywie oznacza, że nawet zapalenie płuc może okazać się znów śmiertelne. Z tego powodu wzrost antybiotykooporności skłania badaczy do poszukiwania nowych metod leczenia oraz narzędzi badawczych do analizy nowych, skutecznych leków przeciwbakteryjnych. Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Jarosława Rachuny wpisuje się w zakres zainteresowań badaczy związanych z poszukiwaniem nowych terapii antybakteryjnych niezwiązanych z klasycznymi antybiotykami jak i w poszukiwanie narzędzi do analizy nowych preparatów.

Ważnym aspektem analizy farmakologicznej nowych substancji bakteriobójczych jest możliwość oceny dyfuzji tych związków przez struktury naturalnie ograniczające biodostępność antyseptyków. Pan mgr Rachuna w swojej pracy przystosował i zoptymalizował interferometr laserowy Macha-Zehndera do oceny dyfuzji i uwalniania substancji chemicznych o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Zbadał również właściwości przeciwdrobnoustrojowe bakteriofagów o raz wybranych związków chemicznych.

Praca ma typowy układ dla rozprawy doktorskiej, zawiera 90 stron maszynopisu, wstęp jest poprzedzony wykazem skrótów, następnie określono cel pracy, po czym następuje spis zastosowanych materiałów, metod, opis wyników, ich dyskusja i wnioski oraz spis cytowanego piśmiennictwa. Na końcu umieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim. Praca zawiera 36 rycin, 8 tabel i 128 pozycji piśmiennictwa.

Wstęp do rozprawy napisany jest bardzo interesująco i świadczy o znajomości tematu. Część ta zaczyna się od omówienia w kolejnych podrozdziałach natury światła, zjawiska interferometrii, zjawiska dyfuzji substancji i dyfuzyjnego transportu przez membranę. Następnie Autor skupia się na zastosowaniu interferometrii w naukach fizycznych oraz zastosowaniu metody interferometrii laserowej w badaniach mikrobiologicznych opartych na procesie dyfuzji. Wstęp teoretyczny stanowi dobre wprowadzenie do tematu pracy, a przedstawione ryciny i wzory ułatwiają czytelnikowi lepsze zrozumienie i zobrazowanie omawianych zjawisk fizycznych.

Celem pracy była optymalizacja systemu interferometrycznego poprzez wprowadzenie rozwiązań technicznych w systemie interferometrycznym umożliwiających prowadzenie badań dotyczących oceny właściwości przeciwdrobnoustrojowych bakteriofagów i wybranych związków chemicznych w warunkach biologicznych oraz ocena właściwości przeciwbakteryjnych tych związków i bakteriofagów z wykorzystaniem mikrobiologicznych technik hodowlanych, metod biofizycznych i technik biologii molekularnej.

W części „Materiały” Doktorant przedstawił opisy lub wzory i pochodzenie wykorzystanych w pracy bakterii, bakteriofagów, tiocukrów, dendrymerów karboksykrzemianowych oraz modyfikowanego flukonazolem polimeru hydroksyapatyt/6-anhydro- α -L-galakto- β -D-galaktanowego. W części tej brakuje mi wskazania symbolicznych skrótów przy wzorach dendrymerów, którymi Autor operuje w dalszej części pracy. Uważam, że stwierdzenie „zawierały dodatkowe grupy amonowe” dotyczące opisu dendrymerów, nie jest odpowiednie. Badane dendrymery zawierają grupy amonowe na powierzchni, jako grupy funkcyjne, a obecność grup funkcyjnych na powierzchni dendrymeru jest charakterystyczna dla tych związków. Nie są to dodatkowe grupy, tylko po prostu grupy funkcyjne. Stwierdzenie „dodatkowe” sugeruje, że było ich więcej niż np. w innym dendrymerze. Wystarczyło napisać, „z grupami amonowymi na powierzchni” a przy drugim dendrymerze, że jest modyfikowany grupą polietylenoglikolową lub, że jedna z grup amonowych została zastąpiona grupą polietylenoglikolową (PEG800).

W swojej pracy doświadczalnej Doktorant wykorzystał metody badawcze obejmujące techniki z zakresu interferometrii laserowej, mikrobiologii, biofizyki i biologii molekularnej. Zastosowane metody pozwoliły na ocenę wpływu bakteriofagów na biofilm bakterii

Pseudomonas aeruginosa PAO1, analizę dyfuzji związków bakteriobójczych przez biofilm, analizę degradacji hydrożelu przez lizozym i uwalniania flukonazolu z hydrożelu. Dobór metod świadczy o dojrzałości naukowej i pracowitości Doktoranta oraz o wielokierunkowym podejściu do postawionego problemu badawczego. *Mam jednak pewną wątpliwość dotyczącą opisu przedstawienia wyników w podrozdziale „Analiza statystyczna wyników”. Autor podaje, że „Dane wyrażono jako odchylenie standardowe obliczone z trzech niezależnych eksperymentów”. Czy nie powinno być napisane: „... jako średnia arytmetyczna wraz z odchyleniem standardowym”?*

Kolejny rozdział Doktorant rozpoczyna od opisu modernizacji układu pomiarowego. Układ pomiarowy składający się z interferometru laserowego oraz układ dyfuzyjny (opisany w rozdziale „Metody”) został zmodernizowany we współpracy z firmą OPTEL OPOLE sp. z o.o., aby umożliwić prowadzenie doświadczeń na materiale biologicznym. Modernizacja polegała na wymianie płyty bazowej, do której przymocowane są elementy układu doświadczalnego, aby zwiększyć stabilność układu. Ponadto układ zamknięto w szczelnej osłonie ze szkła akrylowego z zasłoniętymi bokami w celu ulepszenia kontroli warunków temperaturowych oraz ograniczenia ilości światła pochodzącego z otoczenia, co wpłynęło na zwiększenie kontrastu prążków interferometrycznych. Na potrzeby badań biologicznych zmodernizowano także układ dyfuzyjny, zastosowano nowe statywy i kuwety pomiarowe. Wprowadzone zmiany oraz cel w jakim je dokonano zostały szczegółowo opisane oraz przedstawione na zdjęciach. Zmodernizowany układ pomiarowy zastosowano w badaniach interferometrycznych przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej.

Interesuje mnie jednak jaka była rola Doktoranta w modernizacji tego układu? Czyja była koncepcja modernizacji układu itp.?

Z przeprowadzonych badań biologicznych wynika, że wszystkie badane bakteriofagi skutecznie uwalniały się z żelu agarowego, degradowały dojrzały biofilm *P. aeruginosa* i hamowały wzrost bakterii PAO1 oraz produkcję piocyjaniny i piowerdyny. Wpływały również na ekspresję genów. Zmiany ekspresji genów zależały od rodzaju zastosowanego bakteriofagu.

W kolejnym etapie badań mgr Rachuna oceniał właściwości przeciwbakteryjne kationowych dendrymerów karboksykrzemianowych. Analiza interferometryczna wykazała, że dendrymer modyfikowany polietylenoglikolem dyfundował przez biofilm badanych bakterii, co potwierdzono obserwacją mikroskopową. Natomiast drugi z dendrymerów (niemodyfikowany) nie dyfundował przez biofilm, ale wykazywał silne właściwości bakteriobójcze.

Mgr Rachuna przeprowadził również analizę właściwości przeciwbakteryjnych 9 tiocukrów. Zaobserwował spadek produkcji piocyjaniny oraz piowerdyny w obecności trzech z badanych tiocukrów oznaczonych 16a, 20 i 23. Cukry te zostały wybrane także do dalszych badań, w których wykazano, że dyfundują przez dojrzały biofilm *P. aeruginosa* PAO1 i w różny sposób wpływają na ekspresje badanych genów.

Ostatnim etapem pracy była analiza degradacji modyfikowanego nanohydroksyapatytem 6-anhydro- α -L-galakto- β -D-galaktanu przez lizozym oraz analiza uwalniania flukonazolu z 6-anhydro- α -L-galakto- β -D-galaktanu. Z przeprowadzonych badań wynika, że lizozym degradowuje modyfikowany nanohydroksyapatytem 6-anhydro- α -L-galakto- β -D-galaktan oraz zaobserwowano uwalnianie flukonazolu z 6-anhydro- α -L-galakto- β -D-galaktanu.

W podsumowaniu tej części mam kilka uwag i pytań do Doktoranta:

1. Na str. 60 Doktorant napisał: „Dendrymer KDK-PEG800 poprzez zniesiony ładunek ujemny w wyniku PEGylacji, dyfunduje przez struktury biofilmu...”. Czy badany dendrymer posiadał ładunek ujemny? Z wzorów wynika, że miał ładunek dodatni na powierzchni.
2. W podpisie pod Ryc. 32 (str. 64) jest zapis: „Efekt tiocukrów 16a, 20 i 23 na tworzenie biofilmu...”. Na wykresach przedstawiono jednak także inne badane tiocukry, nie tylko te wymienione w opisie. Warto byłoby też zaznaczyć w podpisie pod ryciną, co oznacza G na wykresach. Z dalszej części tekstu można się tylko domyślić, że jest to gentamycyna.
3. Na str. 64 oraz 74 napisano: „osiągając stężenie $6,49 \cdot 10^{-9}$ mol” Mol jest jednostką liczności materii, a nie stężenia. Stężenie molowe wyraża się w mol/l.
4. W podpisach pod rycinami, warto byłoby podać stężenia stosowanych dendrymerów lub tiocukrów oraz czas inkubacji z badanymi związkami. W opisie metody rozdziale 4.3 podane są 4 różne stężenia, ale trudno wywnioskować z przedstawionych rycin i ich opisów jakie stężenie w danym eksperymencie było zastosowane.

Uzyskane w pracy wyniki zostały wnikliwie przedyskutowane konfrontując je z doniesieniami innych autorów, co świadczy o głębokiej znajomości problemów, których dotyczyła rozprawa doktorska. W podsumowaniu dyskusji mgr Rachuna stwierdził, że zastosowane w pracy modele badawcze oparte na zoptymalizowanym systemie interferometrycznym wskazują na jego użyteczność w badaniach biologicznych zarówno w charakterze badań podstawowych, jak również aplikacyjnych. Moim zdaniem zrealizowanie tego celu pracy stanowi największą wartość pracy, gdyż zmodernizowany i przetestowany pod różnym kątem układ badawczy może być wykorzystywany w wielu innych badaniach na układach biologicznych.

Praca jest starannie opracowana od względem edytorskim, układ graficzny pracy, wykresy i rysunki są bardzo dobrej jakości, oznaczenia rozdziałów i inne elementy technicznego przygotowania tekstu – prawidłowe, jednakże Doktorant nie ustrzegł się drobnych błędów, tzw. literówek i kilku skrótów myślowych oraz niezbyt poprawnych stylistycznie sformułowań. Nie sądzę, aby było wskazane wymienianie ich w tym miejscu, bowiem nie mają wpływu na moją ocenę rozprawy.

Praca została wykonana w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki OPUS nr 2016/21/B/NZ6/01157. Część wyników przedstawionych w pracy mgr. Jarosława Rachuny została opublikowana w dwóch artykułach naukowych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (International Journal of Molecular Science, IF = 6,208). Na uwagę zasługuje szeroka współpraca Doktoranta z krajowymi i zagranicznymi ośrodkami naukowymi.

Na koniec pozwolę sobie na pytanie, które wiąże się z zastosowaniem zmodyfikowanego układu interferometrycznego w szerszym zakresie badań biologicznych. *Czy możliwe jest wykorzystanie interferometru do badania dyfuzji czy transportu różnych leków przez modelowe bariery biologiczne np. śródbłonkową czy barierę krew-mózg? Jeśli tak, to jak takie badanie powinno przebiegać?*

Podsumowując, rozprawa „Optymalizacja systemu interferometrycznego do badań właściwości przeciwdrobnoustrojowych bakteriofagów i wybranych związków chemicznych” mgr. Jarosława Rachuny jest tematycznie spójna, zawiera nowe, oryginalne i cenne pod względem naukowym rezultaty. Na szczególną uwagę zasługuje przystosowanie układu interferometrycznego do badań biologicznych. Wszelkie podniesione w recenzji uwagi nie obniżają wartości przedstawionej do oceny pracy. W trakcie jej realizacji Doktorant wykazał się znajomością szeregu technik badawczych, umiejętnością krytycznej analizy i interpretacji wyników oraz ich publikacji w czasopismach z listy JCR, a także umiejętnością efektywnej pracy w zespole naukowym.

Uważam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr. Jarosława Rachuny spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) i wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie Jarosława Rachuny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Katarzyna Miłowska, prof. UŁ