

Dr hab. Magdalena Płotka  
Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR JAROSŁAWA RACHUNY ZATYTUŁOWANEJ:

„Optymalizacja systemu interferometrycznego do badań właściwości przeciwdrobnoustrojowych bakteriofagów i wybranych związków chemicznych”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Jarosława Rachuny została wykonana pod kierunkiem dr hab. Michała Arabskiego, prof. UJK oraz pod opieką promotora pomocniczego Pana dr Sławomira Wąsika w Instytucie Biologii Wydziału Nauk Ścisłych i Przyrodniczych Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach.

Rozprawa doktorska była realizowana w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki OPUS nr 2016/21/B/NZ6/01157 pt.: „Opracowanie i charakterystyka biokompozytów o właściwościach antywirulentnych i anty-bakteryjnych wobec biofilmu *Pseudomonas aeruginosa*”.

Wyniki przedstawione w dysertacji zostały opublikowane w 2021 oraz w 2022 roku w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences w artykułach zatytułowanych „The antibacterial effect of PEGylate carbosilane dendrimers on *P. aeruginosa* alone and in combination with phage-derived endolysin” oraz „New approach to antifungal activity of fluconazole incorporated into the porous 6-anhydro-alfa-L-galacto-beta-D-galactan structures modified with nanohydroxyapatite for chronic wound treatments – *in vitro* evaluation”. W pierwszej z prac Pan mgr Jarosław Rachuna jest piątym, a w kolejnej szóstym autorem. Czasopismo IJMS posiada wysoki impact factor = 6.208. Na uwagę zasługuje również współpraca Pana mgr Jarosława Rachuny z naukowcami z Department of Organic and Inorganic Chemistry, University of Alcalá, Madrit, Spain oraz z Department of Pharmaceutical Sciences, Wilkes University, USA.

Rozprawa doktorska Pana mgr Jarosława Rachuny została opracowana w sposób typowy dla prezentacji wyników doświadczalnych i obejmuje 90 stron. Obszerny Wstęp poprzedza Spis treści oraz Wykaz skrótów i oznaczeń. Drobną uwagą dotyczy umieszczenie Streszczenia na końcu pracy po rozdziale Piśmiennictwo. Bardziej logiczną byłaby lokalizacja Streszczenia w języku polskim i angielskim na początku pracy, a pozostawienie na końcu tylko krótkiego Podsumowania (takiego jak Rozdział 7 tej pracy Wnioski).

We wstępie zawarto wszystkie niezbędne informacje dla wprowadzenia czytelnika w zagadnienia poruszane w rozprawie doktorskiej. W oparciu o adekwatną do tematyki literaturę Doktorant dokonał opisu zjawisk i aktualnego stanu wiedzy dotyczącego m. in., natury korpuskularno-falowej światła, zjawiska interferencji, podstaw dyfuzji substancji, czy zastosowania interferometrii w naukach fizycznych oraz w badaniach mikrobiologicznych opartych na procesie dyfuzji. Wykorzystanie interferometrii laserowej do oceny przepuszczalności membran, analizy ewolucji warstwy stężeniowej

w obszarach przymembranowych, dyfuzji anomalnej substancji w strukturze żelu czy też oceny zaburzeń hydrodynamicznych na efektywność procesu dyfuzji jest wnikliwie opisane przez Doktoranta. Najciekawsza część wstępu dotyczy jednak wykorzystania interferometrii laserowej do badań biologicznych, takich jak degradacja biofilmów bakteryjnych przez antybiotyki czy bakteriofagi. W prowadzonych badaniach jako organizm modelowy Doktorant wykorzystał pałeczkę ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Bakteria ta wywołuje wiele zakażeń u osób z obniżoną odpornością, w tym zakażenia płuc u osób chorych na mukowiscydozę. Doktorant bardzo dobrze opisuje też strukturę i proces tworzenia biofilmu bakteryjnego co obrazują dwie ryciny nr 13 i 14, jak i metodykę zwalczania biofilmu *P. aeruginosa*. Jedyna moja uwaga dotyczy opisu „molekularnej analizy zmian ekspresji genów”. jako metodą wykorzystywaną w analizie degradacji biofilmów. Mgr Jarosław Rachuna opisuje w pracy, że metoda ta oparta jest o reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) co pozwala na analizę zmian poziomu ekspresji genów kodujących białka związane z tworzeniem biofilmu. Myślę, że jest to daleko idące uproszczenie, jako że sama technika PCR nie pozwala na określenie „zmiany” ekspresji genów, a jedynie obecność w genomie bakterii danego genu lub jego brak. Lepszym określeniem byłoby tu sformułowanie „PCR w czasie rzeczywistym”. Na stronie 45 w rozdziale Metody Doktorant umieszcza bardziej precyzyjne sformułowanie: RT-PCR, choć również ono nie jest do końca jednoznaczne i może oznaczać Reverse transcription PCR, jak również Real-time PCR.

Jak już wspomniałam, niezmiernie ciekawe jest wykorzystanie interferometrii laserowej do oceny degradacji biofilmu *P. aeruginosa* i zestawienie wyników interferometrii z wynikami innych metod jak choćby pomiaru fluorescencji piowerdyny i absorbancji picyjaniny, barwników *P. aeruginosa* odpowiadających odpowiednio za wychwytywanie jonów żelaza i tworzenie reaktywnych form tlenu.

Ocena dyfuzji antybiotyków przez biofilm bakteryjny, oddziaływanie lipopolisacharydu (LPS) ze związkami aktywnymi biologicznie, badania hydrofobowości roztworów LPS, czy analiza dyfuzji kompleksów metali przez monowarstwę komórek eukariotycznych, a także wykorzystanie interferometrii laserowej do ich badania zostały skrupulatnie opisane przez Doktoranta. Świadczy to o dobrej znajomości literatury w danym zakresie. Wstęp wzbogaca 15 Rycin, każda dokładnie przedstawiona z dbałością o szczegóły.

Cel pracy jest jasno sformułowany Zastosowane metody badań są całkowicie adekwatne do postawionych zadań. Techniczna optymalizacja systemu interferometrycznego do prowadzenia wyżej wymienionych analiz nie jest może „celem naukowym” samym w sobie, ale przyczynia się do rozwoju metodologii badawczej i w tym sensie zasługuje na pełne uznanie. Zwłaszcza, że Autor w swojej pracy wykorzystał również szereg metod biologicznych takich jak np. mikroskopia fluorescencyjna. W prowadzonych badaniach Mgr Jarosław Rachuna zastosował też poprawne metody analizy statystycznej.

Techniczna modernizacja układu pomiarowego budzi szacunek zwłaszcza u osoby, która podczas pracy naukowej optymalizowała wyłącznie metodykę biologiczną. Na uwagę zasługuje również fakt wykorzystania do badań nie tylko interferometrii laserowej, ale korelacja wyników z ilością picyjaniny i piowerdyny, poziomem redukcji masy biofilmu (poprzez barwienie fioletem krystalicznym), obserwacją żywych i martwych komórek w strukturze biofilmu, czy poziomem ekspresji genów związanych z tworzeniem biofilmu. Wyciągnięte przez Doktoranta wnioski są jak najbardziej poprawne i świadczą o aktywności bakteriofagów KTN4, KT28 oraz LUZ19 wobec dojrzałego biofilmu *P. aeruginosa*. Szczególnie widać to na przykładzie komórek traktowanych bakteriofagami w stosunku do nietraktowanej kontroli, barwionych z użyciem zestawu Filmtracker™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit, w którym zielone komórki są żywe, a czerwone martwe. Rzeczywiście poziom redukcji masy biofilmu poprzez barwienie fioletem krystalicznym nie do końca odpowiada obrazom jakie Autor uzyskał w mikroskopii fluorescencyjnej. Autor dobrze tłumaczy zaistniałe zjawisko we Wstępie, gdzie sugeruje wiązanie fioletu krystalicznego do zdegradowanego egzopolisacharydu macierzy biofilmu, co może wpływać na zaburzenie wyników. Moje pytanie dotyczy jednak Tabel 5 i 7, gdzie przedstawione są wyniki relatywnej ekspresji wybranych genów. Na odpowiadającym im Ryc. 27 i 30 znajdują się krzywe dotyczące analizy trzech dodatkowych genów: *phzM*, *rhIR* oraz *chiC*, które nie zostały uwzględnione w opisie wyników ani w rozdziale Metody. Czy Autor może udzielić komentarza odnośnie tej rozbieżności?

Kolejne moje pytanie dotyczy mikroskopii fluorescencyjnej. Zdjęcia kontrolne na Ryc. 26 i Ryc. 29 są zbieżne i przedstawiają zwarty biofilm bakterii *P. aeruginosa* PAO1, gdzie większość komórek ma kolor zielony. Kontrole biofilmu tej samej bakterii na Ryc. 31B i Ryc. 33B wyglądają już nieco inaczej i na przykład na Ryc. 31B komórki są dużo bardziej rozproszone. Czy zdjęcia kontrolne biofilmu tej samej bakterii nie powinny wyglądać podobnie? Poprosiłabym o komentarz Doktoranta w tej kwestii?

Niezmiernie ciekawymi badaniami była analiza właściwości dyfuzyjnych i przeciwbakteryjnych dendrymerów. Autor wykorzystał dwa kationowe dendrymery karboksykrzemianowe KDK-NH<sub>2</sub> oraz KDK-PEG800, a wyniki tej części badań weszły w skład jednej z dwóch opublikowanych przez Doktoranta prac. Wnioski z tej części eksperymentalnej Doktorant wysnuł prawidłowo, a dotyczyły one niższego powinowactwa dendrymeru KDK-PEG800 do struktur biofilmu co przełożyło się na jego niższy efekt bakteriobójczy. Moje pytanie dotyczy jednak innych potencjalnych modyfikacji dendrymerów. Czy Doktorant może podać przykłady modyfikacji wymienionych w literaturze, które zwiększają ich efekt bakteriobójczy? Kolejne nasuwające się pytanie to: Na jakiej podstawie do dalszych analiz wybrany został konkretny dendrymer KDK-PEG800? Czy testowane były inne, podobne modyfikacje?

W pracy Doktorant przedstawił również ocenę właściwości dziewięciu tiocukrów na hamowanie tworzenia biofilmu *P. aeruginosa* PAO1. Drobna uwaga dotyczy podpisu pod Ryc. 32. gdzie

Autor wymienia tylko trzy tiocukry 16a, 20 oraz 23, natomiast na wykresach ujęto wszystkie badane związki, a nie tylko wybrane. Podpis pod Ryc. 32 powinien zatem zostać zmieniony. W opisie Ryciny powinna zostać ujęta również gentamycyna jako kontrola pozytywna. Część eksperymentalna została przeprowadzona rzetelnie z dbałością o szczegóły. **Czy planowana jest zatem publikacja uzyskanych wyników i jakie są dalsze plany badawcze w tej kwestii, np. badania dotyczące komórek planktonicznych? Czy prowadzone były również badania wpływu wybranych tiocukrów na dojrzały biofilm *P. aeruginosa*? W Dyskusji Autor stwierdza, że tiocukry 16a, 20 oraz 23 dyfundują przez dojrzały biofilm *P. aeruginosa*, jaka jest zatem korelacja wyników interferometrii z metodami biologicznymi odnośnie dojrzałego biofilmu?** Przykładowo, w badaniach odnośnie zastosowania bakteriofagów Doktorant wyodrębnił dwa podrozdziały 5.2.2. Degradacja dojrzałego biofilmu *P. aeruginosa* oraz 5.2.3. Hamowanie tworzenia biofilmu PAO1 przez bakteriofagi. Czy nie logicznie byłoby, aby w przypadku tiocukrów postąpić podobnie?

Kolejnym przykładem wykorzystania interferometrii laserowej była ocena degradacji modyfikowanego 6-anhydro- $\alpha$ -L-galakto- $\beta$ -D-galaktanu przez lizozym. Dzięki wykorzystaniu wyżej wymienionej metodyki możliwe było ustalenie kinetyki tej reakcji. W tej części pracy brakuje mi jednak określenia szerszego kontekstu badań. Jakie są produkty degradacji 6-anhydro- $\alpha$ -L-galakto- $\beta$ -D-galaktanu modyfikowanego nanohydroksypatytem? Przykładowo, co oznacza skrót SCRI? (Ryc. 35A i 35B). Wzór określający SCRI Doktorant podał w Rozdziale 4.5. Dobrze by było wytłumaczyć go również pod Ryciną lub podać odnośnik do Metod. Ponadto, w jakim celu analizowano uwalnianie flukonazolu z 6-anhydro- $\alpha$ -L-galakto- $\beta$ -D-galaktanu? Krótkie wyjaśnienie wzbogaciłoby pracę. W dyskusji Autor stwierdza jedynie, że uzyskane wyniki wskazują na możliwość wykorzystania modyfikowanego 6-anhydro- $\alpha$ -L-galakto- $\beta$ -D-galaktanu jako nośnika dla flukonazolu, nie wskazując na jego przeciwwgrzybicze właściwości co z kolei bardzo dobrze opisane jest w pracy Rewak-Soroczynska i in., IJMS, 2021, której Doktorant jest autorem. Rozumiem, że Doktorant sam nie prowadził tych badań, dlatego cennym byłoby przedyskutowanie ich w rozdziale Dyskusja.

Drobna uwaga dotyczy również związków chemicznych stosowanych w prowadzonych badaniach. Rozumiem, że głównym celem pracy była optymalizacja i wykorzystanie układu interferometrii laserowej w badaniach biologicznych. We Wstępie Doktorant opisuje na przykład zastosowanie liposomów, jako nośników substancji o znaczeniu leczniczym, **co wiadomo na temat dendrymerów, czy hydrożeli polimerowych jako np. nośników leków?**

Podsumowując, wysoko oceniam pracę mgr Jarosława Rachuny. Możliwości wykorzystania interferometrii laserowej w badaniach związków o znaczeniu klinicznym zostały wyczerpująco przedstawione przez Doktoranta. Techniczna modyfikacja aparatury, jak i przedstawione przykłady jej wykorzystania otwierają nowe pole do badań takich jak choćby działanie przeciwbakteryjne

bakteriofagów, czy enzymów litycznych uwalnianych z hydrożelu agarozowego wobec biofilmów bakterii Gram-ujemnych. Praca przedstawia szereg spójnych tematycznie badań, ułożonych w logiczną sekwencję. Oprócz drobnej uwagi umieszczonej powyżej dotyczącej rozdziału Dyskusja, wyniki są rzetelnie przedyskutowane co świadczy o dogłębnej znajomości literatury w danym zakresie.

Uzupełnieniem pracy jest bogaty wykaz piśmiennictwa zawierający 128 pozycji, świadczący o zdolności Doktoranta do prawidłowego doboru literatury odpowiedniej do analizy otrzymanych wyników w ramach tematyki będącej przedmiotem badań. Pozytywna korelacja wyników interferometrii laserowej z wynikami innych metod badania biofilmów zachęca do rozpowszechniania tej techniki badań.

Rozprawa doktorska przygotowana została starannie, związłym językiem naukowym. Z obowiązku recenzenta pragnę jednak zwrócić uwagę głównie na drobne niedociągnięcia językowe:

1. powinno być peptydoglikan oraz wiązaniem  $\beta(1\rightarrow4)$  -glikozydowym; Rozdział 1.5.1.
2. oporność nie odporność; Rozdział 1.5.2.
3. Doktorantowi zdarza się pisanie nazwy bakterii *P. aeruginosa* PAO1 bez kursywy, np. w tytule Rozdziału 5.2.2., czy legendzie do Ryc. 25, Ryc. 33, Ryc. 34,
4. czasem zdarza się spacja w środku wyrazu np. od płukano, w chodzi, w śród, przeciw bakteryjne.
5. oraz zjadanie liter np. powinno być: technika oparta na, nie technik oparta na; została zobrazowana, a nie został zobrazowana

Wymienione drobne nieścisłości i kilka tu nieprzytoczonych w żaden jednak sposób nie umniejszają wartości pracy Pana mgr Jarosława Rachuny.

### Wniosek końcowy

W podsumowaniu wysoko oceniam przedstawioną rozprawę doktorską Pana Jarosława Rachuny oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku, Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 roku, poz. 1668), jak również Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 20 września 2018 roku w sprawie dziedzin nauki i dyscyplin naukowych oraz dyscyplin artystycznych – Dziennik Ustaw z 2018 roku, poz. 1818.

Wniosuję do Rady Naukowej Instytutu Biologii UJK o dopuszczenie Pana mgr Jarosława Rachuny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

UNIwersytet GDAŃSKI  
KATEDRA MIKROBIOLOGII

  
dr Magdalena Płotka

Dr hab. Magdalena Płotka

Gdańsk, 2023-01-30

