



dr hab. inż. Joanna Depciuch-Czarny

Kraków 04.01.2025 r.

Zakład Nanomateriałów Funkcjonalnych

Instytut Fizyki Jądrowej PAN

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Sebastiana Janika zatytułowanej *“Badania mechanizmów molekularnych związanych z aktywnością biologiczną antybiotyku amfoterycyny B”* wykonanej pod kierunkiem promotora dr hab. Wojciecha Grudzińskiego, prof. UMCS oraz promotora pomocniczego dr Sylwii Stączek w Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Temat podjęty przez Doktoranta wpisuje się w bardzo ważny nurt naukowy z zakresu biologii, biotechnologii, mikrobiologii a nawet medycyny. Infekcje grzybicze zabijają każdego roku 1,7 mln osób na całym świecie. Niestety zasięg grzybów i ich odporność na leki przeciwgrzybicze zwiększyły się podczas pandemii COVID-19. Problem pogłębiają skutki zmian klimatu. Biorąc powyższe pod uwagę, badania nad mechanizmami molekularnymi antybiotyków przeciwgrzybiczych są kluczowe dla skutecznego zwalczania infekcji grzybiczych, ograniczania oporności patogenów i rozwijania nowych, bezpiecznych oraz skutecznych leków. Dlatego też badania, które Doktorant podjął w ramach swojej pracy doktorskiej mają znaczenie nie tylko poznawcze, ale również aplikacyjne, co należy podkreślić i pochwalić. Wykorzystując, z jednej strony, dobrze znany antybiotyk, z drugiej strony jego immobilizację z nanocząstkami srebra (Ag NPs), Doktorant połączył wiedzę odkrytą ponad 50 lat temu z najnowszymi trendami wykorzystania osiągnięć nanotechnologii. Ponadto, wykorzystując techniki spektroskopowe w połączeniu z technikami mikroskopowymi (wysokorozdzielczymi), Doktorant wpisał się w nurt światowej nauki, gdzie spektroskopia ramanowska oraz mikroskopia sił atomowych wykorzystywane są coraz częściej w badaniach oddziaływań leków z materią biologiczną. Co należy podkreślić, rozwinięcie przedstawionych w ramach dysertacji badań, zostało docenione przez ekspertów oceniających wnioski granowe finansowane przez Narodowe Centrum Nauki (Doktorant jest laureatem konkursu PRELUDIUM 23), co stanowi kolejny argument przemawiający za tym, że podjęty temat jest bardzo ważny i ciągle jeszcze mało poznany.



Formalna ocena pracy

Recenzowana praca magistra Sebastiana Janika została opracowana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami dla prac doktorskich ze zbioru publikacji. Praca składa się łącznie z 60-ciu stron oraz dołączonych dwóch publikacji naukowych. Pierwsze 22 strony stanowią część wprowadzającą, gdzie Doktorant przedstawia motywacje podjętych badań, zakres prac oraz wprowadzenie do tematu dysertacji. Kolejne 10 stron stanowi opis metod eksperymentalnych. Szkoda, że opis ten jest ogólny, nie znajdujemy w nim informacji do czego dokładnie dana metoda eksperymentalna została wykorzystana w badaniach i jaki problem badawczy pomogła rozwiązać. Kolejne 8 stron to bardzo zwięzły opis publikacji naukowych stanowiących główną część dysertacji.

Dysertacja oparta jest na 2 pracach eksperymentalnych: *"Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes"* oraz *"How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?"*. Należy podkreślić, że w obu pracach Doktorant jest pierwszym autorem, co świadczy o jego bardzo dużym wkładzie w powstanie załączonych publikacji. Ponadto, wkład ten został potwierdzony oświadczeniami współautorów, które możemy znaleźć w końcowej części dysertacji. Artykuły opublikowane zostały w czasopismach naukowych (kolejno): *Molecules* oraz *The Journal of Physical Chemistry Letters*, o łącznym współczynniku wpływu Impact Factor (IF) równym 9.00. Warto zaznaczyć, że praca *How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?* została doceniona przez Edytora i jedna z grafik stanowi okładkę numeru czasopisma.

Cele niniejszej dysertacji zostały podzielone na dwie części. Pierwszą część stanowiła analiza oddziaływania hybrydowych nanocząstek amfoterycyny B ze srebrem (AmB-Ag) z komórkami *Candida albicans* oraz analiza mechanizmu działania AmB-Ag na błony komórkowe grzybów. Drugim celem natomiast była analiza procesu wnikania AmB do modelowych błon lipidowych zawierających ergosterol.

Dla osiągnięcia pierwszego celu, Doktorant zsyntetyzował nanocząstki AmB-Ag o średnicy 7 nm, w których to cząstki amfoterycyny odgrywały rolę zarówno reduktora, jak również stabilizatora, w związku z czym Doktorant w rzeczywistości badał wpływ układu AmB-Ag, nie natomiast układu, w skład którego wchodziły inne reagenty, co skutkowałoby niepewnością, czy dany efekt pochodzi tylko od badanego układu, czy też od interakcji układ-



reagent bądź od samego reagentu. Tak zaprojektowany układ dowodzi o dojrzałości naukowej Doktoranta. Sam układ oraz efekt grzybobójczy badany był za pomocą szeregu technik: spektroskopii ramanowskiej, mikroskopii obrazowania czasów życia fluorescencji, procent przeżywalności komórek grzyba *C. albicans*.

Natomiast drugi cel badań został zrealizowany za pomocą modelowych monowarstw lipidowych zawierających lub niezawierających (kontrola) ergosterol. W badaniach tych Doktorant wykorzystał mikroskopię sił atomowych, mikroskopię obrazowania czasów życia fluorescencji. Wyniki otrzymanych badań zostały opublikowane w dwóch eksperymentalnych artykułach czasopism z listy filadelfijskiej. W każdej z publikacji znaleźć można wstęp, jasno określony cel, metodykę oraz wyniki wraz z dyskusją i wnioskami. W pracach tych widać dociekliwość Doktoranta, jego umiejętności zarówno manualne, jak i analityczne.

Po przeczytaniu całości nasuwa mi się jednak kilka uwag oraz pytań, na których udzielenie odpowiedzi prosiłabym Doktoranta podczas publicznej obrony pracy doktorskiej:

Praca „*Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes*”:

1. W referencji 10, którą Doktorant podaje jako wyjściową dla metody otrzymania układu AmB-Ag, w sekcji metody dotyczącej syntezy w/w układu jest wyraźnie napisane, że cząstki AmB przed “zmieszaniem” z roztworem AgNO_3 były zawieszone w mieszaninie 2-propanol-woda z dodatkiem KOH. Czy wytworzony finalny układ AmB-Ag był następnie oczyszczany przed wykonaniem badań mikrobiologicznych? Jeśli tak, czy została zbadana czystość układu? Ma to kluczowe znaczenie dla prawidłowości wniosków.
2. Rycina 9 przedstawia widma ramanowskie dla pojedynczych elementów układów modelowych. Czy w przypadku układu GUV (DMPC) nanocząstki AmB-Ag oraz GUV (DMPC+Ergosterol) Nanocząstki AmB-Ag użyto takiego samego stężenia AmB-Ag? Z czego wynikają tak duże różnice w intensywności i jakie zjawisko obserwowane jest dla w/w widm?
3. Rycina 10 (Figura S3 artykułu) przedstawia widma ramanowskie dla AmB oraz AmB-Ag wraz z widmem różnicowym. Zauważono przesunięcia ramanowskie na widmach AmB-Ag w stronę niższych wartości oraz brak pasma przy około 1450 cm^{-1} . Doktorant jednak nie wytłumaczył czym te różnice są spowodowane. Analiza tych widm ramanowskich może mieć kluczową rolę dla zrozumienia mechanizmu wzrostu aktywności przeciwgrzybiczej AmB-Ag



w stosunku do AmB? Czy zmiana uległa konformacja AmB podczas procesu tworzenia AmB-Ag? Prosiłabym Doktoranta o przedstawianie analizy oraz interpretacji w/w ryciny podczas publicznej obrony.

4. Doktorant wykorzystał do otrzymania widm ramanowskich falę elektromagnetyczną o długości 458 nm? Skąd dobór takiej długości fali elektromagnetycznej?

5. Czy nie miał Doktorant problemów z pomiarami układu biologicznego za pomocą fali elektromagnetycznej o długości 458 nm?

6. W zastosowaniach aplikacyjnych nowych systemów leczniczych bardzo ważna jest ich stabilność. Czy doktorant wie jaka jest stabilność termiczna i czasowa badanego układu? Jeśli takie badania nie były przeprowadzone, jakich technik Doktorant by użył, aby otrzymać dane mogące zweryfikować stabilność?

Praca "*How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?*":

7. Brak sekcji w metodyce dotyczącej modelowania molekularnego pozwala mi stwierdzić, że Figura 4 jest to interpretacja wykonana na podstawie wyników eksperymentalnych. Myślę, że modelowanie molekularne z pewnością byłoby wartością dodaną w tę pracę, gdyż pozwoliłoby sprawdzić inne możliwe mechanizmy oddziaływania AmB z błoną. Czy Doktorant ma w planie wykonać obliczenia teoretyczne dla badanego układu?

Na koniec chciałabym podkreślić całokształt pracy Doktoranta. Oprócz dorobku związanego bezpośrednio z tematyką pracy doktorskiej (2 prace o łącznym IF = 9.00), Pan mgr Sebastian Janik jest współautorem również jednej, innej pracy, która również związana jest z tematem dysertacji. Ponadto, na ostatnich stronach dysertacji można znaleźć informacje o udziale Doktoranta w licznych konferencjach, w tym również międzynarodowych. Doktorant bierze również czynny udział w popularyzacji nauki. Był również wykonawcą w dwóch grantach finansowanych przez Narodowe centrum Nauki, a od niedawna, jak zostało wspomniane we wstępie recenzji, jest kierownikiem projektu PRELUDIUM 23.

Podsumowując, stwierdzam, że treść recenzowanej pracy odpowiada tytułowi, a sposób jej zredagowania oceniam jako bardzo dobry. Badania przeprowadzone przez Doktoranta stanowią nowoczesny i oryginalny wkład w rozwój szeroko pojętych nauk biologicznych. Doktorant wykazała się odpowiednią wiedzą teoretyczną oraz posiadaniem



INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

umiejętności do samodzielnego prowadzenia eksperymentów naukowych i prawidłowego interpretowania wyników. W mojej opinii, przedstawioną pracę doktorską należy ocenić wysoko. Wobec szerokiego zakresu prezentowanych badań i bardzo wartościowych wyników, które zostały opublikowane w czasopiśmie naukowych, przedstawione powyżej krytyczne uwagi w żaden sposób nie umniejszają wartości całej pracy i nie mają istotnego znaczenia dla mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej Pana mgr Sebastiana Janika.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Sebastiana Janika zatytułowana „*Badania mechanizmów molekularnych związanych z aktywnością biologiczną antybiotyku amfoterycyny B*” spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane kandydatom w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023 poz. 742 z późn.zm). Na tej podstawie wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych UMCS w Lublinie o dopuszczenie Pana mgr Sebastiana Janika do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką jakość wykonanych badań, dociekliwość Doktoranta, dogłębne przedstawienie otrzymanych wyników, a przede wszystkim niezwykle ważny podjęty temat, wnioskuję o wyróżnienie przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej.

Joanna Depina-
Gorny