

Warszawa, dn. 16 stycznia 2025 r.

Dr hab. Piotr Bednarczyk, prof. SGGW
Katedra Fizyki i Biofizyki
Instytut Biologii/SGGW
ul. Nowoursynowska 159, bud. 34, pok. 74
02-776 Warszawa

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pana mgr Sebastiana Janika
pt. „Badania mechanizmów molekularnych związanych
z aktywnością biologiczną antybiotyku amfoterycyny B (Study
of molecular mechanisms associated with the biological activity
of the antibiotic amphotericin B)”

wykonanej pod kierunkiem dra hab. Wojciecha Grudzińskiego,
prof. UMCS (Instytut Fizyki) oraz dr Sylwii Stączek (Instytut
Nauk Biologicznych) jako promotora pomocniczego.

Rozprawa opiera się na dwóch spójnych artykułach
opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych,
znajdujących się na liście JCR i wysoko punktowanych w oparciu
o listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Doktorant
jest pierwszym autorem obu prac:

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Biologii
Katedra Fizyki i Biofizyki

ul. Nowoursynowska 159
02-776 Warszawa
+48 22 59 386 20

piotr_bednarczyk@
sggw.edu.pl
kfb@sggw.edu.pl
www.sggw.edu.pl
www.kf.sggw.pl

1. Janik Sebastian, Grela Ewa, Stączek Sylwia, Zdybicka-Barabas Agnieszka, Luchowski Rafał, Gruszecki Wiesław Ignacy, Grudziński Wojciech. *Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes*. *Molecules*, 2023 Jun; 28(12):4687. doi: 10.3390/molecules28124687. Punkty MNiSW: 140 i IF: 4.2
2. Janik Sebastian, Luchowski Rafał, Grela Ewa, Grudziński Wojciech, Gruszecki Wiesław Ignacy. *How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It*

Do There? The Journal of Physical Chemistry Letters, 2024 Apr; 15(18):4823-4827. doi: 10.1021/acs.jpcllett.4c00496. Punkty MNiSW: 200 i IF: 4.8

Obie publikacje zawierają uzupełnienie w formie „Supporting information”.

Rozprawa posiada formę zszywki, w której obie z wyżej wymienionych publikacji zostały szczegółowo omówione.

Poniższa recenzja zawiera ocenę merytoryczną całości pracy doktorskiej z uwzględnieniem zgodności celu i tematu z osiągnięciami końcowymi, metod badawczych, uzyskanych wyników oraz ich analizy czy doboru literatury.

Tematyka przedstawionej do recenzji rozprawy koncentruje się na badaniu mechanizmów działania amfoterycyny B (AmB), popularnego antybiotyku przeciwgrzybiczego, ze szczególnym uwzględnieniem jego oddziaływania na struktury błon komórkowych. Głównym celem badań było szczegółowe wyjaśnienie molekularnych podstaw aktywności AmB oraz analiza potencjału przeciwgrzybowego hybrydowych nanocząstek AmB ze srebrem (AmB-Ag). Wykorzystując zaawansowane techniki spektroskopii molekularnej i obrazowania, oraz spektroskopię ramanowską, poddano analizie interakcje nanocząstek AmB-Ag z komórkami grzyba *Candida albicans*. W badaniach wykazano, że nanocząstki AmB-Ag wykazują wyjątkowo wysoką skuteczność przeciwgrzybiczą przy jednoczesnej niskiej toksyczności dla badanych komórek. Kluczowym odkryciem było wykazanie, że AmB wnika do błon lipidowych tylko w obecności ergosterolu, głównego sterolu błon komórkowych grzybów. W błonach zawierających ergosterol, AmB tworzy różne struktury molekularne, w tym wewnątrz błonowe skupiska o średnicy w zakresie od 20 do 50 nm oraz pory o średnicy około 15 nm. Badania wskazują, że AmB nie występuje w błonach jako monomer, lecz przyjmuje bardziej złożone formy organizacji molekularnej, w których podstawową jednostką są dimery. Przedstawiona do oceny praca zawiera szereg nowych informacji na temat molekularnego mechanizmu działania amfoterycyny B, przede wszystkim wskazując na rolę permeabilizacji błony komórkowej jako kluczowego czynnika w jej aktywności przeciwgrzybiczej. Wykorzystanie nanocząstek AmB-Ag okazało się skutecznym sposobem na zwiększenie efektywności dostarczania antybiotyku do komórek grzybów. Wyniki badań mają istotne znaczenie dla zrozumienia złożonych mechanizmów działania AmB i mogą przyczynić się do opracowania skuteczniejszych i bezpieczniejszych formułacji tego leku w przyszłości, co jest szczególnie ważne w kontekście rosnącej oporności grzybów na leki przeciwgrzybicze.

Przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi zszywkę opracowaną zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych w zakresie nauk biologicznych. Zawiera 100 stron i klasyczny podział na: Stronę tytułową, Wykaz prac naukowych stanowiących cykl, Spis treści, Wykaz skrótów, Streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim i angielskim, Wstęp, Wprowadzenie, Metody eksperymentalne, Kopie opublikowanych prac, Dyskusję, Podsumowanie i Wnioski, Bibliografię, Źródła internetowe, Naukowe CV oraz

Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny udział każdego z nich w powstaniu publikacji.

Struktura podziału treści pracy, jak również kolejność rozdziałów nie budzą wątpliwości. Tekst jest napisany poprawnie i starannie edytowany. Dodanie numeracji stron w załączonych publikacjach (dodatkowo oprócz oryginalnej numeracji wydawniczej) znacznie ułatwia odszukiwanie opisywanych zagadnień.

Tematyka badawcza, bez wątpienia, podejmuje aktualne trendy badawcze. Zamieszczone streszczenie przedstawione jest w sposób zwięzły i komunikatywny, co pozwala na łatwe zapoznanie się z tematyką i otrzymanymi wynikami.

Tytuł rozprawy doktorskiej jest sformułowany poprawnie i w pełni odzwierciedla cel badań przeprowadzonych przez doktoranta.

We wstępie doktorant skupia się na przedstawieniu podstaw infekcji grzybiczych ze wskazaniem głównych czynników zwiększających częstość ich występowania czy wpływu chorób grzybiczych na zdrowie człowieka. Bardzo cennym elementem tej części pracy jest określenie motywacji do podjęcia tego typu badań. W podrozdziale 1.1. Motywacja wskazuje na główne powody podjęcia badań:

„Mimo wieloletniego stosowania w medycynie i wysokiej skuteczności przeciwko infekcjom grzybiczym, dokładne mechanizmy działania biologicznego AmB nie były dotychczas w pełni wyjaśnione i pozostawały przedmiotem dyskusji”,

czy

„Zrozumienie precyzyjnych interakcji molekularnych między AmB a błonami lipidowymi jest kluczowe dla opracowania ulepszonych formułacji leku o zmniejszonych toksycznych skutkach ubocznych dla pacjentów”.

W następnym kroku zostały sformułowane etapy badań. Pierwszy etap badań dotyczy mechanizmów działania amfoterycyny B, w oparciu o modelowe błony lipidowe oraz komórki *Candida albicans*. Wyniki tego etapu zostały zawarte w opublikowanym artykule: “Amphotericin B-Silver Hybrid Nanoparticles Help to Unveil the Mechanism of Biological Activity of the Antibiotic: Disintegration of Cell Membranes”.

Celem tej pracy była analiza oddziaływania hybrydowych nanocząstek amfoterycyny B ze srebrem (AmB-Ag) z komórkami *Candida albicans* oraz analiza mechanizmu działania AmB-Ag na błony komórkowe grzybów.

Cele zostały zrealizowane przy zastosowaniu techniki mikroskopii i spektroskopii molekularnej, w tym obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) i spektroskopii ramanowskiej.

Wyniki i wnioski płynące z tej części to:

- AmB-Ag skutecznie przenika przez ścianę komórkową i dostarcza cząsteczki antybiotyku do błon komórkowych;
- Dezintegracji błon komórkowych następuje w ciągu kilku minut po ekspozycji na AmB-Ag;
- AmB-Ag wykazuje większą skuteczność grzybobójczą w porównaniu do wolnej AmB w badaniu przeżywalności komórek *C. albicans*. AmB-Ag w stężeniu 0,031 µg/ml wykazuje 2,74-krotnie wyższą aktywność, natomiast w stężeniu 0,062 µg/ml aż 74,3-krotnie wyższą.

Drugi etap stanowi artykuł 2. How Does the Antibiotic Amphotericin B Enter Membranes and What Does It Do There?

Celem tej pracy była analiza procesu wnikania AmB do modelowych błon lipidowych zawierających ergosterol.

Cel został osiągnięty przy zastosowaniu technik badawczych takich jak tworzenie monowarstw fosfolipidowych jako modelu błon grzybów; zastosowanie mikroskopii sił atomowych (AFM) czy mikroskopia czasów życia fluorescencji (FLIM) wykorzystana do analizy organizacji molekularnej AmB w błonach.

Na podstawie otrzymanych danych można sformułować wnioski dotyczące formowania wewnątrz błonowych skupisk AmB o różnych rozmiarach oraz porów błonowych w obrębie pojedynczej próbki czy identyfikacji różnych form organizacji molekularnej AmB w błonach takich jak dimery oraz małe agregaty.

Wstęp do rozprawy doktorskiej został napisany poprawnie zarówno pod względem merytorycznym jak i językowym. Jego forma i treść świadczą o dobrym przygotowaniu teoretycznym doktoranta do realizacji postawionych celów rozprawy doktorskiej.

Rozdział 3. Metody eksperymentalne zawiera szczegółowy opis technik wykorzystanych przy realizacji postawionych celów badawczych. Bardzo szeroko zostały zaprezentowane trudne techniki mikroskopowe w tym mikroskopia konfokalna, mikroskopia Ramana jako metoda analityczna, mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM), mikroskopia sił atomowych (AFM - Atomic Force Microscopy) jako technika obrazowania powierzchni materiałów z rozdzielczością na poziomie atomowym czy technika Langmuir-Blodgett (LB) będąca cennym narzędziem w badaniach biologicznych, umożliwiającą tworzenie i analizę modelowych błon biologicznych. Bardzo przydatne jest zamieszczenie, w tym rozdziale schematów, które ułatwiają zrozumienie starannie zaplanowanych i wykonanych doświadczeń.

Przedstawiony opis metodologii i technik wskazuje na bogaty warsztat badawczy doktoranta co wskazuje na znakomite przygotowanie merytoryczne jaki i techniczne do realizacji postawionych celów rozprawy.

Kolejno, w rozdziale 4 i 5 doktorant opisał chronologicznie oraz udokumentował otrzymane wyniki w formie opisowej oraz graficznej. Rozdział ten zawiera ryciny, które przedstawiają wykresy i zdjęcia. Tak zorganizowany tekst rozdziałów ułatwia usystematyzowanie oraz zrozumienie otrzymanych wyników.

Opis metodologii i przedstawione wyniki są ultra dokładne i umożliwiają innym badaczom powtórzenie badań w celu przeprowadzenia badań na innych materiałach. Sposób opisu wyników oraz dalsza ich interpretacja wskazuje, że doktorant swobodnie i z dużą wiedzą porusza się w tej dziedzinie.

W rozdziale 6. Dyskusja doktorant uzasadnił dobór modelu badawczego oraz skomentował poszczególne obszary badań i uzyskane wyniki. Dyskusja została przeprowadzona w oparciu o dane już opublikowane. Taka forma świadczy o wszechstronnej znajomości tematu oraz dobrym przygotowaniu merytorycznym doktoranta. Doktorant konsekwentnie stosuje w tekście określone formatowanie cytowań co ułatwia poruszanie się po liście bibliografii.

Rozprawa doktorska kończy się wnioskami, które korelują uzyskane wyniki z postawionym celem badawczym oraz wskazują na oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Podsumowując, rozprawa doktorska dostarcza nowych informacji na temat molekularnego mechanizmu działania AmB, podkreślając rolę dezintegracji błony komórkowej jako kluczowego czynnika w jej aktywności przeciwgrzybiczej, a wykorzystanie nanocząstek AmB-Ag okazało się skutecznym sposobem na zwiększenie efektywności dostarczania antybiotyku do komórek grzybów.

Po drugie, badania wykazały, że mechanizm działania AmB jest złożony i obejmuje wiele różnych efektów na poziomie molekularnym. Obejmują one tworzenie skupisk wewnątrz błonowych, porów oraz prawdopodobnie struktur pozabłonowych. Wszystkie te efekty mogą przyczyniać się do aktywności przeciwgrzybiczej AmB poprzez zaburzenie integralności i funkcji błon komórkowych grzybów. Wyniki te sugerują, że skuteczność AmB wynika z jednoczesnego działania kilku mechanizmów, a nie jednego dominującego efektu.

Pod kątem merytorycznym, przedstawiona rozprawa doktorska zasługuje na wysoką ocenę, jednak chciałbym zwrócić uwagę na pewne ogólne pytania czy nie zaspokoja ciekawość:

Jakie są ograniczenia stosowania mikroskopii obrazowania czasów życia fluorescencji (FLIM) i jaka jest pewność oceny amplitudy składowych czasu życia fluorescencji AmB?

Czy obecnie, z tak dużym bagażem wiedzy zdobytej w toku prowadzenia badań, skusił by się Pan do wykorzystania/zaplanowania badań z wykorzystaniem innych technik, metod do potwierdzenia postawionych celów badawczych?

Jakie są możliwości transportu jonów przez AmB, a tym samym czy jesteśmy w stanie kontrolować permeabilizację błon biologicznych w obecności AmB?

Wymienione powyżej pytania nie wpływają na wysoką ocenę wartości merytorycznej rozprawy. Pragnę podkreślić, że Pan mgr Sebastian Janik znakomicie wywiązał się z postawionych zadań z wykorzystaniem szerokiego spektrum technik biofizycznych i zaawansowanych metod mikroskopowych. Wydaje się, że praca wypełnia lukę badawczą a podjęta tematyka jest aktualna i ma potencjał aplikacyjny.

Stwierdzam z całym przekonaniem, że rozprawa doktorska Pana mgr Sebastiana Janika pt. „Badania mechanizmów molekularnych związanych z aktywnością biologiczną antybiotyku amfoterycyny B” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478, 619, 1630). Zatem zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr Sebastiana Janika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, znaczącą wartość naukową otrzymanych wyników, wyjątkową staranność w opracowaniu, zastosowanie ultra trudnych metod mikroskopowych oraz przedstawieniu tak dużego materiału badawczego wnoszę o wyróżnienie przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej.



Dr hab. Piotr Bednarczyk, prof. SGGW