



Poznań, dn. 31.08.2024 r.

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr. inż. Jakuba Michalskiego pt.: „Wykorzystanie wybranych cieczy jonowych do zwalczania lekoopornych bakterii z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*”.

Promotor: prof. UPP dr hab. Dorota Narożna

Promotor pomocniczy: dr inż. Tomasz Cłapa

Praca została zrealizowana w Katedrze Biochemii i Biotechnologii, Wydziału Rolnictwa, Ogrodnictwa i Biotechnologii, Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

Niewrażliwość bakterii na antybiotyki, antybiotykooporność może mieć charakter naturalny lub nabyty. Niewrażliwość bakterii na antybiotyki stanowi obecnie rosnący problem w grupie pacjentów poddanych antybiotykoterapii. Nabyta lekooporność jest najczęściej spowodowana spontanicznymi mutacjami lub przeniesieniem genów lekooporności między mikroorganizmami. Obserwowany wzrost antybiotykooporności ma również ścisły związek z powszechnym wykorzystaniem antybiotyków w przemyśle oraz rolnictwie prowadząc do ich powszechnej obecności w otaczającym nas środowisku. Niskie stężenia antybiotyków w środowisku mogą powodować przeżywanie oraz namnażania się szczepów bakterii niewrażliwych na ich działanie. Zjawisko to zwiększyło znacząco ryzyko zakażenia człowieka niewrażliwymi na antybiotyki patogennymi szczepami bakterii, stwarzając jeden z najpoważniejszych problemów współczesnej medycyny.

Największe zagrożenie dla pacjentów, ale również pracowników służby zdrowia stanowią szczepy patogenów o szerokim spektrum niewrażliwości na antybiotyki. Infekcje wywołane przez wielolekooporne szczepy patogennych bakterii powodują wysokie koszty leczenia pacjentów, ich wyższą śmiertelność oraz również stanowią ogromne zagrożenie dla pracowników służby zdrowia. Wg. najnowszych raportów opublikowanych w czasopiśmie

naukowym „Lancet” co roku na świecie z powodu infekcji niewrażliwych na antybiotyki bakterii umiera ponad 1,2 mln osób.

Obecnie uważa się, że szczepy najbardziej lekoopornych bakterii występują w obrębie sześciu gatunków bakterii patogennych *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterobacter spp.*

Pseudomonas aeruginosa, pałeczka ropy błękitnej jest jedną z najczęstszych przyczyn zakażeń wewnątrzszpitalnych podczas przeciągającej się hospitalizacji. Patogen ten często infekuje osoby z osłabionym układem odpornościowym lub osoby z chorobami przewlekłymi np. z cukrzycą, chorobami nowotworowymi lub mukowiscydozą.

W zakresie zainteresowań doktoranta znalazły się również zróżnicowane strukturalnie ciecze jonowe, które mogłyby być wykorzystane do zahamowania zakażeń lekoopornymi szczepami bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Ciecze jonowe są substancjami ciekłymi zawierającymi w składzie wyłącznie jony. Substancje te zawierają najczęściej organiczny kation połączony z organicznym lub nieorganicznym anionem. Możliwość kombinacji różnych kationów z różnymi anionami czyni z cieczy jonowych grupę substancji o szerokich, swoistych możliwościach. Ciecze jonowe wykazujące aktywność biologiczną mogą być wykorzystane do zahamowania wzrostu bakterii, replikacji wirusów, infekcji grzybiczych, a także wykazywać właściwości przeciwwzkrzepowe, przeciwzapalne oraz znieczulające.

Przeciwbakteryjne działanie cieczy jonowych jest ściśle powiązane z ich strukturą głównie budową kationu, długością oraz ilością bocznych łańcuchów alkilowych przyłączonych do kationu.

Właściwości przeciwbakteryjne cieczy jonowych są również zależne od budowy ściany komórkowej bakterii. Zauważono, że bakterie Gram-ujemne są znacznie mniej wrażliwe na ciecze jonowe niż bakterie Gram-dodatnie. Ciecze jonowe mogą powodować denaturację białek oraz uszkadzać trwale ściany komórkowe bakterii. Działanie przeciwbakteryjne cieczy jonowych może także być wywołane zaburzeniem replikacji DNA, transkrypcji genów, translacji mRNA, oraz indukcją stresu oksydacyjnego, powodując śmierć bakterii. W ostatnich latach zaobserwowano, że ciecze jonowe mogą również skutecznie uniemożliwiać adhezję bakterii Gram-dodatnich, a w mniejszym stopniu Gram-ujemnych do powierzchni, hamując tworzenie się biofilmu bakteryjnego. Ze względu na swoje właściwości substancje te w przyszłości mogą stać się materiałem, który posłuży do produkcji powłok uniemożliwiających przyleganiu patogennych szczepów bakterii, do różnych powierzchni.

Blokowanie tworzenia się biofilmu bakteryjnego wykazują przede wszystkim ciecze jonowe zawierające kationowe pochodne piperydyny, choliny czy imidazolu.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Jakuba Michalskiego dotyczy oceny właściwości antibakteryjnych wybranych morfoliniowych cieczy jonowych opracowanych na bazie herbicydów, w szczególności możliwość ich wykorzystania w hamowaniu wzrostu lekoopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Wyniki badań wykonanych przez Doktoranta zawierają cenne dane charakteryzujące się dużym potencjałem aplikacyjnym cieczy jonowych jako substancje przeciwbakteryjne lub jako adjuwanty w antybiotykoterapii. Poznanie właściwości przeciwbakteryjnych wybranych cieczy jonowych będzie miała ogromny wpływ na opracowanie nowych procedur ograniczających udział *Pseudomonas aeruginosa* w zakażeniach wewnątrz szpitalnych.

Ocena rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska mgr inż. Jakuba Michalskiego została przygotowana jako cykl 3 publikacji, pracy przeglądowej i 2 prac oryginalnych. Wszystkie prace składające się na cykl zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR o wysokim współczynniku oddziaływania (IF) i wysokiej wartości punktów Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW). Łączna wartość IF tych prac wyniosła 13,946 co odpowiada łącznej wartości punktów MNiSW=210.

Praca przeglądowa została opublikowana w 2022 r. w czasopiśmie *The Journal of Molecular Liquids* (IF=5,3; MNiSW=100). Prace oryginalne zostały opublikowane w latach 2021 r.-2024 r. w czasopiśmie *Research in Microbiology* (IF=3,946; MNiSW=70), oraz *Journal of Molecular Biology* (IF=4,7; MNiSW=140). W dwóch publikacjach wchodzących w skład cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską mgr inż. Jakub Michalski jest pierwszym autorem a w trzeciej drugim autorem, co świadczy o zaangażowaniu i samodzielności Doktoranta.

Celem głównym rozprawy doktorskiej było przeprowadzenie badań, które pozwoliły ocenić potencjał morfoliniowych cieczy jonowych syntetyzowanych na bazie herbicydów w zwalczaniu lekoopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Doktorat postanowił osiągnąć główny cel poprzez zbadanie wpływu cieczy jonowych na wzrost, przeżywalność, produkcję pirocyjminy oraz ocenić wpływ cieczy jonowych na formowanie i aktywność metaboliczną biofilmów bakteryjnych dla czterech lekoopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Zaplanowano również ocenę synergicznego efektu działania morfoliniowych

cieczy jonowych na bazie herbicydów z wybranymi antybiotykami w zwalczaniu lekoopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Doktorant postanowił również ocenić efekt badanych cieczy jonowych na hemolizę ludzkich erytrocytów.

Pan mgr inż. Jakub Michalski osiągnął założone cele badań, wywiązał się całkowicie z zadań, jakie zostały postawione w celu pracy.

Wykonane badania dostarczyły cennych wyników charakteryzujących przeciwbakteryjne możliwości morfoliniowych cieczy jonowych na zatrzymanie wzrostu oraz przeżywalność *Pseudomonas aeruginosa*. Doktorant wykazał, że antibakteryjne działanie badanych cieczy jonowych jest zależne od struktury kationu, ich efekt przeciwbakteryjny obserwowano tylko dla kationów zawierających dwa długie podstawniki alkilowe. Wykazano również, że badane ciecze jonowe wykazują działanie bakteriobójcze na niektóre szczepy *Pseudomonas aeruginosa*, Doktorat zidentyfikował szczep *Pseudomonas aeruginosa* oporny na działanie badanych cieczy jonowych. Zaobserwowano również, że stosowanie stężeń niższych niż minimalne stężenie hamujące ogranicza aktywność metaboliczną bakterii niezależnie od hamowania wzrostu bakterii. Doktorant wykazał, że subinhibicyjne stężenia cieczy jonowych jest zależne od struktury kationu i nie ma związku z redukcją gęstości hodowli bakteryjnej. Zaobserwowano również, że badane związki redukują produkcję pirocyjminy, ograniczając patogeniczność *Pseudomonas aeruginosa*. Pan mgr inż. Jakuba Michalski zidentyfikował cztery ciecze jonowe, które hamowały formowanie biofilmu bakteryjnego dla czterech badanych szczepów *P. aeruginosa*. Zaobserwowano również, że badane ciecze jonowe mogą z antybiotykami działać addytywnie lub synergistycznie w hamowaniu wzrostu *Pseudomonas aeruginosa*. Doktorat jako pierwszy zidentyfikował zjawisko, że wysokie stężenia morfoliniowych cieczy jonowych zawierające przy kationie dwa długie podstawniki alkilowe mogą nasilać agregacje bakterii, wspomagając tworzenie się biofilmu. Pan mgr inż. Jakub Michalski jako pierwszy badacz na świecie wykazał, że niektóre ciecze jonowe mogą funkcjonować jako adjuwanty, uwrażliwiając lekooporne szczepy *Pseudomonas aeruginosa* na działanie antybiotyków. Przeprowadzone testy hemolizy ludzkich erytrocytów wskazały, że wszystkie badane ciecze jonowe powodują ich hemolizę, co ogranicza ich praktyczne wykorzystanie do pozaustrojowego zwalczania infekcji *Pseudomonas aeruginosa*.

Podsumowując, uzyskane wyniki przez mgr. inż. Jakuba Michalskiego wskazują na duży potencjał praktyczny badanych cieczy jonowych w pozaustrojowym zwalczaniu lekoopornych bakterii z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*.

Dla osiągnięcia założonych celów Doktorant zastosował szereg nowoczesnych narzędzi badawczych z dziedziny mikrobiologii oraz biologii komórki, właściwie dobranych i zaadoptowanych na potrzeby badań własnych. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska zawiera oryginalne i wartościowe wyniki, które zostały opisane w opublikowanych artykułach będących podstawą rozprawy doktorskiej.

Pan mgr inż. Jakub Michalski opanował bardzo nowoczesny warsztat pracy, który między innymi obejmował syntezę 12 morfoliniowych cieczy jonowych, hodowle kultur bakteryjnych, oznaczenie ich minimalnego stężenia hamującego i bakteriobójczego. Doktorant opanował oznaczenie ilościowe picyjaminy, oznaczenie biofilmu bakteryjnego, a także ocenę aktywności hemolitycznej różnych cieczy jonowych. Kandydat zaadoptował pomiar aktywności dehydrogenaz dla oceny aktywności metabolicznej oraz żywotność bakterii.

Pan mgr inż. Jakuba Michalski posiada dużą wiedzę teoretyczną, jest dojrzałym naukowcem, o czym świadczą wnikliwe oraz twórcze dyskusje znajdujące się w publikacjach wchodzących w skład cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską.

Przedstawiona rozprawa doktorska ma również dużą wartość aplikacyjną, syntetyzowane przez Doktoranta cieczy jonowe charakteryzują się dużym potencjałem w pozaustrojowym hamowaniu lekoopornych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Związki tego typu mogłyby w przyszłości znacząco ograniczyć zjawisko lekooporności powszechnie spotykane w placówkach medycznych.

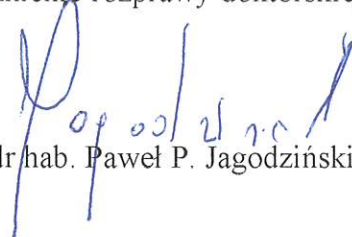
W trakcie czytania pracy nasuwają się drobne pytania.

Czy uzyskane wyniki można odnieść również do innych gatunków bakterii niewrażliwych na antybiotyki, czy należałoby powtórzyć eksperymenty z tymi gatunkami bakterii? Czytając rozprawę doktorską, można zauważyć drobne błędy interpunkcyjne. Praca doktorska jest jednak napisana bardzo dobrze, a drobne błędy interpunkcyjne w żaden sposób nie umniejszają jej wyjątkowej wartości.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Jakuba Michalskiego jest opracowaniem spełniającym wszystkie warunki wymagane odpowiednią ustawą dla dysertacji doktorskich.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr. inż. Jakuba Michalskiego zatytułowana „Wykorzystanie wybranych cieczy jonowych do zwalczania lekoopornych bakterii z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*”, stanowi

oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego oraz spełnia wymogi art. 13 ust. Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z póź. zm). W związku z powyższym przedstawiam Radzie Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu wnioski o dopuszczenie Pana mgr. inż. Jakuba Michalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy, wartość naukową przeprowadzonych badań oraz dorobek naukowy autora, wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Rolnictwo i Ogrodnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr. inż. Jakuba Michalskiego.


Prof. dr hab. Paweł P. Jagodziński