



Samodzielna Pracownia
Chemii Produktów Pochodzenia Naturalnego
Katedra i Zakład Farmakognozji
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE

ul. Chodźki 1, 20-093 LUBLIN
tel./fax +48 81448 7080 e-mail: kskalicka@pharmacognosy.org

Lublin, 14.07.2020

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora mgr Agnieszki Rogowskiej z tytułem „*Badanie zdolności oraz mechanizmów sorpcyjnych układów biokoloidalnych*” wykonanej pod kierunkiem Prof. zw. dra hab., dra h. c. Bogusława Buszewskiego w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalizy, Wydział Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

W skład recenzowanej pracy doktorskiej wchodzi osiem publikacji z listy A czasopism punktowanych MNiSW. Sumaryczny IF (ISI Journal Citation Reports) cyklu jest równy **23.165**, zaś punktacja MNiSW wynosi **710**. Są to następujące pozycje:

- 1) Agnieszka Rogowska, Paweł Pomastowski, Michał Złoch, Viorica Railean-Plugaru, Anna Król, Katarzyna Rafińska, Małgorzata Szultka-Młyńska, Bogusław Buszewski. *Scientific Reports*, **2018**, 8, 7261
- 2) Bogusław Buszewski, Agnieszka Rogowska, Viorica Railean-Plugaru, Michał Złoch, Justyna Walczak-Skierska, Paweł Pomastowski. *Materials*, **2020**, 13, 2403
- 3) Agnieszka Rogowska, Katarzyna Rafińska, Paweł Pomastowski, Justyna Walczak, Viorica Railean-Plugaru, Magdalena Buszewska-Forajta, Bogusław Buszewski. *Electrophoresis*, **2017**, 8, 2757
- 4) Michał Złoch, Agnieszka Rogowska, Paweł Pomastowski, Viorica Railean-Plugaru, Justyna Walczak-Skierska, Joanna Rudnicka, Bogusław Buszewski. *Toxicon*, **2020**, 181, 9
- 5) Agnieszka Rogowska, Paweł Pomastowski, Katarzyna Rafińska, Viorica Railean-Plugaru, Michał Złoch, Justyna Walczak, Bogusław Buszewski. *Toxicon*, **2019**, 169, 81
- 6) Agnieszka Rogowska, Paweł Pomastowski, Justyna Walczak, Viorica Railean-Plugaru, Joanna Rudnicka, Bogusław Buszewski. *Toxins*, **2019**, 11, 463
- 7) Bogusław Buszewski, Agnieszka Rogowska, Paweł Pomastowski, Michał Złoch, Viorica Railean-Plugaru, *Journal of AOAC International*, **2017**, 100, 1607
- 8) Agnieszka Rogowska, Paweł Pomastowski, G. Sagandykova, Bogusław Buszewski. *Toxicon*, **2019**, 162, 46.

Oceniana rozprawa doktorska to praca wysoce interdyscyplinarna. Autorka, stosując metody zarówno biologiczne, jak i zaawansowane techniki analityczne, za cel postawiła sobie ocenę mechanizmów uczestniczących w procesach sorpcyjnych zachodzących na powierzchni biokoloidów – żywych mikroorganizmów (bakterie i drożdże do oceny biosorpcji zearalenonu oraz jonów metali dwuwartościowych) oraz biologicznie syntetyzowanych nanocząsteczek srebra (poznanie mechanizmu wiązania na ich powierzchni ampicyliny i tetracykliny). Zadanie to jest niezwykle ambitne. Biokoloidy cechuje złożona topografia powierzchni i heterogenne rozmieszczenie ładunku elektrycznego. Układ biokoloidalny wchodzi w reakcje z otoczeniem np. jonami metali. Niekłania nadal jest wiedza dotycząca właściwości powierzchniowych biokoloidów oraz procesów sorpcji zachodzących na ich powierzchni.

Autorka skupiła się na ocenie powierzchniowego ładunku elektrycznego stosując nowoczesną technikę elektroforetycznego rozpraszania światła ELS, pozwalającą na szybkie oszacowanie potencjału zeta komórek drożdży, w zależności od pH, czy też nanocząsteczek srebra.

Przyglądając się bliżej procesom biosorpcji Autorka zainteresowała się mykotoksyną zearalenon, wykazując, iż mechanizm tego zjawiska jest inny u różnych gatunków bakterii kwasu mlekowego. Dodatkowo na efektywność procesu wpływają warunki hodowli oraz proces liofilizacji. Sam proces biosorpcji związku zmienia metabolizm komórek bakteryjnych, co prowadzi w konsekwencji do zmiany zarówno ekspresji białek, jak i emisji związków lotnych, co określono stosując techniki HS-SPME/GC-MS. Doktorantka wykazała po raz pierwszy wysoki potencjał bakterii kwasu mlekowego do neutralizacji badanej mykotoksyny.

Celem zrozumienia mechanizmów biosorpcji Doktorantka oceniła wpływ parametrów takich jak temperatura czy pH na proces biosorpcji ampicyliny i tetracykliny przez biologicznie syntetyzowane nanocząsteczki srebra. Wykazała też, iż oba antybiotyki biosorbują się z innym mechanizmem na powierzchni tego samego biokoloidu, jednak mechanizm ten jest zbliżony dla tego samego antybiotyku sorbowanego na różnych biologicznie syntetyzowanych nanocząsteczkach (bakterie kwasu mlekowego i promieniowce). Funkcjonalizacja powierzchni biokoloidu nie wpływała negatywnie na jego stabilność, w niektórych przypadkach wzmacniała to natomiast aktywność przeciwbakteryjną nanocząsteczek.

Celem wyjaśnienia natury sorpcji zearalenu przez żywe komórki bakterii probiotycznych oraz antybiotyków na powierzchni biologicznie zsyntetyzowanych nanocząsteczek srebra, Doktorantka zastosowała także modele kinetyczne oraz określiła izotermy adsorpcji. Dane otrzymane po zastosowaniu modeli klasycznych zestawiała następnie z wynikami uzyskanymi po zastosowaniu spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR). Dzięki temu po raz pierwszy scharakteryzowała ona powierzchniowe grupy funkcyjne mikroorganizmów wiążących zearalenon oraz charakter tego wiązania. Opisała także charakter wiązania pomiędzy wapniem a powierzchnią komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz mechanizm wiązania ampicyliny i tetracykliny z powierzchnią bionanocząsteczek srebra. Monitorowanie procesów biosorpcji wspomagane było także poprzez zastosowanie technik

dynamicznego rozpraszania światła, mikroskopii fluorescencyjnej czy MALDI-TOF-MS. Ta ostatnia technika pozwoliła na śledzenie zmian profilów białkowych bakterii na skutek biosorpcji.

Doktorantka wykazała także, iż technika MALDI-TOF-MS zastosowana być może do identyfikacji mikroorganizmów, jako metoda alternatywna dla biologii molekularnej w diagnostyce laboratoryjnej. Poszukując kolejnych rozwiązań pozwalających pokonać ograniczenia takie jak np. konieczność wysokiego stężenia komórek w próbce do analizy Doktorantka opracowała sposób zateżania próbki za pomocą sferowej elektroforezy kapilarnej dla mikroorganizmów o powierzchniach zmodyfikowanych za pomocą dwuwartościowych jonów metali. Zaproponowała w ten sposób nową metodę przygotowywania próbki mikrobiologicznej (zagęszczania) przed analizą MALDI. Po raz pierwszy wyjaśniła też zachodzący mechanizm agregacji komórek pod wpływem wspomnianych jonów wapnia.

Podkreślić należy znakomity warsztat badawczy Doktorantki. Bez wątpienia jest Ona specjalistką w zastosowaniu nowoczesnych metod instrumentalnych jak MALDI-TOF-MS, dyfrakcja laserowa, GC-MS, FT-IR, sferowa elektroforeza kapilarna i inne.

Temat pracy podjęty przez Doktorantkę uważam za niezwykle ciekawy oraz ważny. Znakomicie wpasuje się on w aktualne trendy. Doktorantka po dokładnym przestudiowaniu literatury wykazała braki w istniejącym stanie wiedzy, postawiła odpowiednie pytania naukowe, zdefiniowała problem badawczy, a następnie zaplanowała eksperymenty mające na celu uzupełnienie tychże luk.

Praca doktorska ma układ typowy dla tego rodzaju opracowań. Krótkie wprowadzenie nakreśla nam podjęte problemy badawcze, które następnie szerzej opisane są na 21-stronach opracowania. Doktorantka charakteryzuje biokolidy, opisuje procesy biosorpcji, sposoby identyfikacji mikroorganizmów oraz sposoby badania mechanizmów bisorpcji. Każdorazowo przedstawiony mamy dokładny stan literaturowy, nakreślone problemy badawcze oraz przedyskutowane krótko wyniki własne. Ta część pracy zwieńczona jest spisem literatury. Piśmiennictwo jest dobrane odpowiednio i liczy 144 pozycje, w przeważającej części pochodzące z ostatnich lat. Jest to głównie literatura fachowa, anglojęzyczna, publikowana w znanych, liczących się czasopismach. Dobór literatury uważam za niezwykle trafny, a jej wykorzystanie w pracy, zarówno we wstępie, jak i w omówieniu wyników, świadczy o umiejętności korzystania z zasobów piśmiennictwa naukowego oraz o dobrym tematycznym rozeznaniu.

Na dwóch kolejnych stronach Doktorantka charakteryzuje jasno i szczegółowo cel badawczy pracy oraz podjęte badania służące jego realizacji. Autorka dołącza też podsumowanie oraz krótkie wnioski końcowe. Do pracy dołączony jest wykaz skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Rozprawa przygotowana jest z niezwykłą starannością, napisana jest precyzyjnym, przystępnym językiem. Wszystko razem stanowi spójną całość.

Po analizie dołączonych oświadczeń stwierdzić mogę, iż udział Doktorantki w powstawaniu prac jest wiodący. Każdorazowo brała udział we współpracowaniu koncepcji i planu pracy, zaangażowana była w każdy z etapów eksperymentów, samodzielnie wykonała większość badań.

Podkreślić należy, iż na realizację części badań będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej Doktorantka pozyskała finansowanie Narodowego Centrum Nauki w ramach grantu Preludium 2017/25/N/ST4/01079 oraz Etiuda 2019/32/T/ST4/0019. Dodatkowo część funduszy pochodziła z projektów NCN Maestro 2014/14/A/ST4/00641 i Opus 2016/21/B/ST4/0213 oraz projektu NCBiR Biostrateg 2. Prace badawcze wspomagane były także finansowaniem wewnętrznym w ramach grantów wydziałowych. Dwa pierwsze projekty są projektami własnymi, w których Doktorantka jest kierownikiem. To również świadczy o bardzo dobrym doborze tematyki badawczej oraz wysokiej pozycji młodego naukowca, co zaskutkowało uznaniem ekspertów i przyznaniem środków finansowych.

Poszczególne publikacje przeszły już proces recenzji przed ich przyjęciem do druku. Po lekturze rozprawy, jak i analizie wspomnianych prac nasuwa się kilka pytań.

- Doktorantka wybrała dwa antybiotyki ampicylinę oraz tetracyklinę – antybiotyki o różnym mechanizmie działania. Wykazała, iż inaczej sorbuja się one na powierzchni nanocząsteczek srebra. W przypadku ampicyliny proces zarówno sorpcji jak i dyfuzji przebiegał zdecydowanie gwałtowniej i efektywniej. Stosując technikę MALDI-TOF-MS Doktorantka wykazała też różnice w mechanizmie działania przeciwbakteryjnego nanocząsteczek przed i po funkcjonalizacji. Dlaczego te dwa leki zostały wybrane, czy Doktorantka brała pod uwagę ich parametry fizykochemiczne i farmakokinetyczne, czy też sugerowała się tym, iż są to jedne ze standardowych antybiotyków. Czy Doktorantka brała pod uwagę także antybiotyki o innym mechanizmie działania np. fluorochinolony.

- Funkcjonalizacja nanocząsteczek srebra wybranymi antybiotykami nie wzmogła siły ich działania wobec testowanych szczepów bakterii. Czy Doktorantka rozważała przebadanie bakterii antybiotykoopornych? Wiadomym jest, iż nanocząsteczki mogą pomóc w przełamaniu oporności na badany lek.

- Doktorantka wykazała potencjał jednego ze szczepów bakterii kwasu mlekowego do neutralizacji badanej mykotosyny. Jaki jest realny potencjał aplikacyjny?

- Mykotosyny same w sobie są niezwykle ciekawym tematem, ale też i bardzo istotnym z punktu widzenia zagrożeń jakie powodują. Doktorantka do badań wybrała zearalenon. Czy rozważane były inne, bardzo popularne mykotosyny jak np. aflatoksyny, syntezowane przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* posiadające działanie rakotwórcze, czy też ochratoksyny?

Podsumowując stwierdzam, że cele pracy zostały zrealizowane, a osiągnięte oryginalne wyniki mają charakter poznawczy i stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny. Badania własne Doktorantka zaplanowała dobrze i konsekwentnie zrealizowała. O dużej wartości wykonanych badań świadczy opublikowanie wyników w postaci dobrej jakości artykułów w renomowanych

czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania, o czym wspomniałam na wstępie recenzji. Podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i niezwykle ważne z punktu widzenia metodologicznego i aplikacyjnego. Zaprezentowany cykl ośmiu prac niesie w sobie ogromny potencjał aplikacyjny, jest spójny i bez wątplenia porównany być może do nadsyłanych do oceny cykli habilitacyjnych. Z całą pewnością jednak na poziomie pracy doktorskiej dorobek naukowy mgr Rogowskiej jest wyjątkowy i znacznie przekracza powszechnie akceptowane normy.

Wnioski końcowe

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Na tej podstawie **wniosuję do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii UMK w Toruniu o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie mgr Agnieszki Rogowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.** Jednocześnie ze względu na wysoką wartość uzyskanych wyników wnoszę **o wyróżnienie rozprawy doktorskiej stosowną nagrodą.**

KIEROWNIK
Samodzielnej Pracowni Chemii
Produktów Pochodzenia Naturalnego
Katedry i Zakładu Farmakognozji
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
prof. dr hab. Krystyna Skalicka-Woźniak

Krystyna Skalicka-Woźniak

Wozniak

Prof. dr hab. Krystyna Skalicka-Woźniak