

**ZAKŁAD MIKROBIOLOGII**

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

Wrocław, 30.08.2024 r.

dr hab. Bożena Futoma-Kołocho
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski
Zakład Mikrobiologii
tel. +48 71 375 62 22
e-mail: bozena.futoma-koloch@uwr.edu.pl

prof. dr hab. Agnieszka Marczak
Przewodnicząca Komisji Uniwersytetu
Łódzkiego ds. Stopni Naukowych
w dyscyplinie nauki biologiczne

OCENA

**Rozprawy doktorskiej Pana mgr Mateusza Urbaniaka pt. „Proregeneracyjne,
przeciwdrobnoustrojowe i immunomodulujące właściwości piomelaniny *Pseudomonas
aeruginosa*”**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa na stopień doktora w dyscyplinie nauki biologiczne pt: „**Proregeneracyjne, przeciwdrobnoustrojowe i immunomodulujące właściwości piomelaniny *Pseudomonas aeruginosa***” została zrealizowana w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem prof. dr hab. Magdaleny Mikołajczyk-Chmiela oraz dr Karoliny Rudnickiej prof. Uniwersytetu Łódzkiego.

Opracowana przez Pana mgr Mateusza Urbaniaka rozprawa stanowi zbiór powiązanych tematycznie 4 artykułów naukowych, z których 3 zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach z listy JCR: dwie w *International Journal of Molecular Sciences* (140 pkt.), w których Kandydat jest pierwszym autorem, kolejna w *ACS Biomaterials Science & Engineering* (140 pkt.) (łącznie IF=17, sumaryczna liczba punktów MNiSW 420). Czwarta praca została wysłana do recenzji do czasopisma *International Journal of Biological Macromolecules*, gdzie

**ZAKŁAD MIKROBIOLOGII**

ul. S. Przybyszewskiego 63

51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 63 23

zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

również Pan M. Urbaniak jest pierwszym autorem.

Podlegająca recenzji rozprawa doktorska jest napisana w języku polskim, przy czym prace będące podstawą rozprawy doktorskiej zostały przygotowane w języku angielskim. Rozprawa ma klasyczny układ, typowy dla prac doświadczalnych. Zawiera niezbędne elementy takie jak: streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, cele pracy, materiały i metody, wyniki w formie 3 opublikowanych prac i jednej przygotowanej do recenzji, dyskusję, wnioski, literaturę, a także oświadczenia współautorów. Dodatkowo, Autor zamieścił inne informacje takie jak m.in.: wykaz stosowanych skrótów, udział w projektach badawczych, źródła finansowania badań, wykaz pozostałych publikacji, w których jest współautorem, wykaz zgłoszeń patentowych, listę staży badawczych, podsumowanie prac wchodzących w skład rozprawy. Reasumując, pod względem układu, pracę oceniam jako kompletną.

Cel pracy został wyraźnie wskazany i dotyczył określenia następujących właściwości piomelaniny (PyoM): przeciwbakteryjnych, cytoprotekcyjnych, przeciwapoptotycznych, immunodulujących i stymulujących regenerację tkanki kostnej w warunkach *in vitro*. Cel uważam za ambitny, który wymagał prowadzenia badań interdyscyplinarnych z zakresu mikrobiologii, immunologii czy biochemii, co również przekładało się na różnorodność zastosowanych metod badawczych. Opracowując założenia pracy doktorskiej Autor skoncentrował się na zbadaniu działania PyoM pod względem neutralizacji cytotoksycznego działania lipopolisacharydu (LPS) *H. pylori*, wspomaganie regeneracji komórek nabłonkowych żołądka oraz przywróceniu aktywności fagocytarnej komórek żernych. Drugi kierunek badań dotyczył stymulacji przez PyoM procesów regeneracji tkanki kostnej na modelu osteoblastów człowieka. Biorąc pod uwagę współczesne wyzwania cywilizacji dla zachowania dobrostanu ludzi, badania podjęte przez mgr Mateusza Urbaniaka traktuję jako ważne i potrzebne, warte dalszego kontynuowania. Przykładami, które trapią ludzkość jest kolonizacja żołądka przez *H. pylori* z klinicznymi następstwami czy słabszy kośćciec u coraz większej liczby osób.

W części „Wprowadzenie” Autor dysertacji charakteryzuje pałeczki *Pseudomonas aeruginosa*, wytwarzane przez nie metabolity, poświęcając dużą część opisów alginianom oraz barwnikom wytwarzanym przez te bakterie. Osobny podrozdział dotyczy związków melaninowych z prowadzeniem dyskursu w kierunku piomelaniny, której struktura chemiczna i funkcje fizjologiczne zostały szczegółowo przedstawione. Kolejne strony rozprawy Kandydat



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63

51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 63 23

zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

przeznacza na opisanie zagadnienia wirulencji bakterii *H. pylori*, zakańczając część teoretyczną rozprawy biologią tkanki kostnej. Kandydat zwraca uwagę na ciekawe aspekty praktyczne związane z wykorzystaniem pałeczek *P. aeruginosa*. Wytwarzane przez te mikroorganizmy alginiany znalazły szerokie zastosowanie w medycynie regeneracyjnej i inżynierii tkankowej, jak również barwniki mają duży potencjał biomedyczny. Metabolity te zostały przez Autora szczegółowo opisane. Melaniny są to substancje o szerokim zastosowaniu, takim jak m.in. substancje o działaniu antydrobnoustrojowym, nośniki leków, środki kontrastowe. Jak pisze Autor, wartym podkreślenia są możliwości zastosowania melanin bakteryjnych w przemyśle, rolnictwie, ochronie środowiska i bioelektrotechnice. Piocyjanina (PyoC) została przedstawiona m.in. pod względem działania przeciwnowotworowego oraz antybakteryjnego i przeciwgrzybiczego. Piowerdyna ukazana jest jako główny siderofor, czynnik warunkujący zjadliwość i antybiotykooporność *P. aeruginosa*, a piorubina jako siderofor chelatujący jony żelaza. Ponieważ przeprowadzone przez Kandydata badania bazowały na zastosowaniu piomelaniny (PyoM), został temu związkowi poświęcony osobny, obszerny podrozdział, w którym wskazane są aktualne kierunki badań nad jej zastosowaniem. Ciekawym wątkiem jest zastosowanie PyoM w bioremediacji zanieczyszczonej wody lub gleby, dzięki właściwościom wiązania metali ciężkich. Tak przygotowane Wprowadzenie słusznie sugeruje, że tematyka podjętych badań jest ważna i odpowiada na współczesne potrzeby ludzkości. Opracowanie w ten sposób „Wprowadzenia” wskazuje na ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata w dyscyplinie nauki biologiczne, a także sugeruje praktyczny wymiar prowadzonych badań. Świadczą o tym opisy dotyczące zastosowania alginianów m.in. jako stabilizatorów, środków żelujących czy biokompozytów, użycia PyoM jako substancji o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, przeciwnowotworowym, jako barwnika, czy nośnika antygenów szczepionkowych. Rozdział zakończony jest dokładnym opisem cyklu życiowego komórek kościotwórczych ze wskazaniem na potrzebę poszukiwania substancji stymulujących regenerację tkanki kostnej. W części, o której mowa Autor pisze „Bakterie te [*P. aeruginosa*] należą do względnie dużych pałeczek o długości około 1-5 μm ” i dalej, że *H. pylori* są małymi spiralnie skręconymi [...] drobnoustrojami o długości od 2-4 μm . **W związku z tym proszę o wyjaśnienie kwestii wielkości komórek w świecie bakterii biorąc pod uwagę różne znane rodzaje czy gatunki. Moje kolejne pytanie brzmi, dlaczego Autor koncentruje się na opisie alginianów skoro**



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63

51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 63 23

zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

nie były one przedmiotem badań? W podrozdziale „Biologia tkanki kostnej i poszukiwanie nowych stymulatorów procesów osteoindukcyjnych” Kandydat bardzo dokładnie opisuje procesy kościotwórcze, lecz stosunkowo mało miejsca poświęca innym biomimetykom niż PyoM. Proszę o poszerzenie zagadnienia poszukiwania nowych stymulatorów procesów osteoindukcyjnych” podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej. Ponadto, nie wskazano czyjego autorstwa są zamieszczone ryciny.

Osobną część pracy stanowi rozdział „Materiały i metody”, w którym Autor wskazuje na 16 różnych technik laboratoryjnych oraz na materiał badawczy który stanowiły:

- linie komórkowe fibroblastów myszy, monocytów człowieka, komórek nabłonkowych gruczołakoraka żołądka człowieka, osteoblastów człowieka;

- szczepy: *P. aeruginosa* Mel+ jako producent PyoM, a także szczepy referencyjne i kliniczne *H. pylori* i *S. aureus*;

- larwy owada barciaka większego *Galleria mellonella* (model *in vivo*);

- stymulatory takie jak: bakteryjna PyoM rozpuszczalna i nierozpuszczalna w wodzie, syntetyczna PyoM, lipopolisacharydy (LPS) *H. pylori* i *E. coli*, doksorubicyna.

Metodyka była różnorodna, co oceniam wysoko, podobnie jak użyty materiał badawczy. Biorąc pod uwagę indywidualne zaangażowanie Autora metodyka obejmowała takie techniki jak (ujęte skrótowo):

- opracowanie podłoży minimalnych PMM do hodowli *P. aeruginosa*,

- izolacja i oczyszczanie PyoM,

- ocena żywotności fibroblastów L929, monocytów THP-1, komórek nabłonka żołądka AGS i osteoblastów hFOB 1.19,

- badanie apoptozy komórek AGS traktowanych PyoM lub PyoM i LPS oraz osteoblastów traktowanych PyoM lub PyoM i doksorubicyną,

- test biokompatybilności i toksyczności układowej na modelu *Galleria mellonella*,

- test aktywacji szlaku NF- κ B w monocytach stymulowanych PyoM,

- ocena żywotności bakterii *H. pylori* i *S. aureus* po zadziałaniu PyoM,

- oznaczanie ilościowe wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu w komórkach nabłonka żołądka traktowanych PyoM w kostymulacji z LPS,

- określenie aktywności fagocytarnej monocytów względem *E. coli* pHrodo™ i *H. pylori* w



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63

51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 63 23

zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

obecności PyoM i LPS,

- test gojenia rany w środowisku PyoM,
- test hydrolizy p-NPP do oceny aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP) produkowanej przez osteoblasty poddawane działaniu PyoM,
- test ELISA do oceny stężenia cytokin wydzielanych przez osteoblasty stymulowane PyoM.

Techniki, a także szczepy użyte w badaniach zostały odpowiednio dobrane do podjętej tematyki. Zgodnie z przyjętymi zasadami naukowymi, metody powinny być opisane w taki sposób, aby można było jak najwierniej odtworzyć otrzymane w dysertacji wyniki. Jako recenzentka nie mam co do tego wątpliwości, a przemawia za tym dodatkowo fakt opublikowania większości metod w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Oceniając tę część pracy, dodam, iż dużą zaletą jest podanie, w której pracy zastosowano dany materiał czy metodę (str.60-62).

Wyniki badań zaprezentowane w dwóch pierwszych publikacjach oryginalnych (2023 r.), w których Kandydat miał swój bezpośredni udział, zostały prawidłowo opisane, zwłaszcza że zostały już opublikowane i zweryfikowane pod względem poprawności przez innych niezależnych ekspertów wytypowanych przez Redakcje czasopism. Pierwsza publikacja dowodzi (biorąc pod uwagę indywidualne zaangażowanie Autora) m. in. że: podłoża PMM I i II są przydatne do hodowli *P. aeruginosa* w celu dalszej izolacji PyoM, oczyszczone PyoM (PyoM_{sol} i PyoM_{insol}) są wysoce cytokompatybilne wobec fibroblastów L929 i monocytów THP-1 spełniając założenia normy ISO 10993-5:2009 (Biologiczna ocena wyrobów medycznych; część 5: Testy cytotoksyczności *in vitro*), PyoM wpływają na aktywację czynnika transkrypcyjnego NF-κB, a także nie są toksyczne dla larw *Galleria mellonella* (model *in vivo*). Można by stwierdzić, że syntetyczna PyoM wypadła w testach najgorzej, lecz jak to zostało podkreślone, wcale to nie wyklucza jej z dalszych eksperymentów, ponieważ może być testowana w innych układach niebiologicznych. Uzyskane wyniki są obiecujące, a ich istotność została potwierdzona odpowiednimi metodami statystycznymi. **Prosiłabym w tym miejscu o uzupełnienie informacji w jakich warunkach przebiegała sterylizacja (Rycina 7, I praca) w celu potwierdzenia czy proces ten nie wpływał na stabilność cząsteczek PyoM.**

Dруга publikacja została prawidłowo przygotowana pod względem metodycznym a wyniki zostały właściwie opisane. Scharakteryzowano właściwości przeciwdrobnoustrojowe PyoM_{sol} i PyoM_{insol} wobec szczepu referencyjnego i klinicznych *H. pylori*, udostępnionych

**ZAKŁAD MIKROBIOLOGII**

ul. S. Przybyszewskiego 63

51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 63 23

zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

dzięki uprzejmości prof. dr hab. Grażyny Gościński z Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Wykazano, że obie formy PyoM w stężeniu 16 µg/ml istotnie hamowały przeżywalność szczepów. Warto zauważyć, że substancje w tym samym stężeniu były „bezpieczne” dla linii komórkowych fibroblastów i monocytów poddawanych testom w I pracy. Ponadto PyoM_{sol} w I pracy najsilniej indukowała powstawanie NF-κB w monocytach oraz nie była toksyczna dla larw *Galleria mellonella*. Podjęto ciekawy wątek, gdzie komórki eukariotyczne (fibroblastów L929 i monocytów THP-1, komórki nabłonka żołądka AGS) poddawano działaniu LPS *E. coli* lub *H. pylori* jako czynników obniżających ich przeżywalność i sprawdzano neutralizujący wpływ obu form PyoM. W badaniach sugerowano się stężeniami ustalonymi w I publikacji, czyli 1 i 16 µg/ml. Okazało się, iż w wyniku kostymulacji komórek za pomocą PyoM i LPS ich żywotność była zbliżona jak ta uzyskana w warunkach kontrolnych, co sugeruje, że PyoM neutralizowały cytotoksyczne działanie LPS. Dowiedziono także, że PyoM_{sol} i PyoM_{insol} nie indukowały apoptozy w badanych komórkach. Jako kolejny parametr wybrano przeciwoksydacyjne działanie PyoM i ponownie wykazano na korzyść metabolitu, że oba warianty PyoM znacząco redukowały ROS w hodowlach traktowanych LPS, a efekt był widoczny już po 30 minutach. W następnym etapie wykonano eksperymenty mające na celu określenie wpływu barwników na regenerację komórek nabłonkowych żołądka w tzw. teście gojenia rany. Wykazano, że podanie samej PyoM w stężeniu 1µg/ml stymulowały migrację komórek, a ponadto niwelowały efekt przeciwny przypisywany działaniu LPS. Ostatnim etapem było zbadanie zdolności fagocytarnych monocytów w obecności samych barwników, LPS lub ich kombinacji. Nasilenie pochłaniania było większe w przypadku referencyjnych *E.coli* (pHrodo™) aniżeli fluorescencyjnie znakowanych *H. pylori*. Kostymulacja monocytów PyoM i LPS *H. pylori* skutkowała przywróceniem aktywności fagocytarnej monocytów, zahamowanej przez endotoksynę. W tych testach biologicznych preparat PyoM_{sol} wykazywał lepsze właściwości niż PyoM_{insol}. Autorzy konkludują, że PyoM_{sol} stanowi interesującą biomolekułę do zastosowania w dalszych badaniach nad odpowiedzią immunologiczną wobec pałeczek *H. pylori*.

Trzecia praca (nieopublikowana). W swoich eksperymentach Pan mgr Mateusz Urbaniak wykorzystał oprócz metod zastosowanych już we wcześniejszych pracach nowe takie jak: hodowla ludzkich osteoblastów hFOB 1.19, ocena proliferacji osteoblastów, analiza



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63

51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 63 23

zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

transkryptomoczną komórek, określenie aktywności fosfatazy alkalicznej, stężenia cytokin IL-6, IL-10, TNF- α wydzielanych do pożywki przez osteoblasty inkubowane z PyoM. W przypadku tej publikacji, aktywność antybakteryjną testowano wobec szczepów z rodzaju *Staphylococcus* wyizolowanych z tkanki kostnej. Na osiągnięcia wynikające z pracy związane z udziałem Kandydata składają się m.in. stwierdzenia, że PyoM nie wpływała na żywotność osteoblastów i nie indukowała w nich procesów apoptozy. W teście gojenia rany PyoM stymulowała migrację osteoblastów. Stwierdzono również istotnie wyższą liczbę osteoblastów w środowisku zawierającym PyoM. Jednocześnie wykazano wzrost aktywności ALP, OC, IL0-6, IL-10. Ponadto, PyoM stymulowała proces kostnienia, co dowiedziono poprzez pomiar markerów kostnienia. **Niniejsza publikacja bazuje na możliwie niskich stężeniach barwnika (1 $\mu\text{g/ml}$) a to dzięki wcześniejszej wiedzy uzyskanej z poprzednich prac. Mam jednak drobne uwagi. Autor powinien w metodach: test gojenia rany, proliferacja osteoblastów, test ELISA, podać jakich użył stężeń PyoM. W teście ELISA przeciwciała detekcyjne zostało rozcieńczone 60-krotnie, jednak jakiemu stężeniu to odpowiada? Czy test został zoptymalizowany pod względem użycia przeciwciał w określonych stężeniach, aby wykluczyć wiązania krzyżowe lub tzw. wiązania niespecyficzne? Nie przedyskutowano wartości MIC₅₀. Czy według autora są to wysokie czy niskie wartości? W porównaniu do wyników uzyskanych dla *H. pylori* są dużo wyższe. Proszę o podjęcie tego tematu podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej. W manuskrypcie powinna znaleźć się informacja o szczepach *Staphylococcus*, ich źródle pochodzenia i sposobie hodowli.**

Podsumowując, trzy prace oryginalne układają się w ciąg logiczny i prezentują innowacyjne podejście badawcze. Uzyskane wyniki są bardzo interesujące i wartościowe poznawczo, w istotny sposób poszerzając wiedzę o zastosowaniu PyoM w medycynie. Jestem przekonana, że w niedalekiej przyszłości wyniki uzyskane w III manuskrypcie staną się podstawą bardzo dobrej publikacji.

Ostatnia zaproponowana, praca przeglądowa, wieloautorska (14 autorów) to obszerne opracowanie na temat bioaktywnych materiałów stosowanych w regeneracji kości. Istotne jest to, że w szerszym kontekście pokazuje badania prowadzone przez Doktoranta. Celem artykułu zatytułowanego „Bioactive Materials for Bone Regeneration: Biomolecules and Delivery



Systems” było przeanalizowanie postępów w dziedzinie biomateriałów stosowanych w regeneracji kości. Autorzy skupili się na zrozumieniu, jak te innowacje mogą poprawić procesy naprawy kości, a także na identyfikacji kluczowych czynników wzrostu, peptydów i genów, które wspierają osteogenezę.

Kolejną częścią dysertacji jest dyskusja, która według mojej opinii została bardzo dobrze poprowadzona. Autor przedstawia najważniejsze osiągnięcia wynikające z publikacji i ich znaczenie w rozwoju medycyny. Do celów dokonania oceny wybrałam te, które są według mnie najbardziej ciekawe pod względem naukowym. Jako kontynuację badań, Kandydat widzi ustalenie profilu cytokin prozapalnych i/lub przeciwzapalnych oraz czynników wzrostowych wytwarzanych przez monocyty pod wpływem PyoM. W kontekście zakażeń wywoływanych przez *H. pylori* i związanych z nimi uszkodzeń nabłonka żołądka i dwunastnicy PyoM może mieć zastosowanie w ograniczeniu apoptozy komórek i ich regeneracji. Testy przeprowadzone na bakteriach z rodzaju *Staphylococcus* pozwalają przypuszczać, że PyoM może być rozważana w przyszłości jako substancja ograniczająca ryzyko wystąpienia zakażenia pooperacyjnego związanego z implantacją lub złamań otwartych. Ciekawym elementem dyskusji jest wpływ TNF- α na funkcję osteoblastów zależny od dawki. Zaobserwowano wyższy poziom TNF- α w hodowlach osteoblastów stymulowanych PyoM_{insol}, a niższy, gdy użyto PyoM_{sol}. Wydawałoby się w tej sytuacji, że bardziej pożądanym jest pierwszy efekt, lecz jak wskazuje Autor słabsze wydzielanie cytokiny może być bardziej korzystne dla procesu tworzenia kości.

Na podstawie przeprowadzonych badań mgr Mateusz Urbaniak wysunął 10 wniosków szczegółowych i jeden końcowy. Wnioski są przekonujące i bardzo cenne. Potwierdzają realizację założonych celów pracy. **Prosiłabym jednak o doprecyzowanie wniosku nr 3. Jaka jest interpretacja Autora w kontekście wysokiej termoodporności PyoM?**

Za najważniejsze wnioski uważam te, które uświadamiają, że substancja – barwnik wytwarzany przez bakterie *P. aeruginosa*, u których ma za zadanie chronić przed szkodliwym działaniem UV może mieć tak różne, wydawałoby się niepowiązane i odległe zastosowania, czyli pozytywnie wpływać na komórki eukariotyczne poprzez: neutralizację ROS, zahamowanie apoptozy, neutralizację szkodliwego wpływu LPS innych bakterii na komórki ludzkie, nasilenie fagocytozy przez komórki żerne, wspomaganie migracji komórek nabłonka żołądka oraz osteoblastów. Jest to przykład pokazujący, ile dobra może cywilizacja/medycyna

**ZAKŁAD MIKROBIOLOGII**

ul. S. Przybyszewskiego 63

51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 63 23

zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

czerpać z wiedzy o biologii drobnoustrojów.

Zaangażowanie Autora w realizację zadań związanych z 3 przedstawionymi do oceny pracami oryginalnymi uważam za znaczące i świadczy o niewątpliwym, przeważającym wkładzie w rozwiązanie problemu naukowego. Znajomość wielu technik laboratoryjnych przez Kandydata i umiejętność opisywania uzyskiwanych wyników sugeruje samodzielność w prowadzeniu pracy naukowej. Ponadto, praca czwarta (2023 r.) – przeglądowa, opublikowana w czasopiśmie o współczynniku Impact Factor=5,4 utwierdza w przekonaniu, iż Doktorant prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauk biologicznych.

Rozprawa liczy łącznie 105 stron, plus publikacje wchodzące w skład rozprawy, które zajmują kolejne 114 stron. Wprowadzenie stanowią 26 strony, założenia i cel pracy 2 strony, materiały i metody 3 strony, podsumowanie artykułów 8 stron, dyskusja wraz z wnioskami 7 stron, literatura 19 stron, oświadczenia współautorów 20 stron. Kandydat we Wprowadzeniu zamieścił 6 rycin i 1 tabelę. Autor odwołuje się do 230 pozycji literaturowych, które ściśle nawiązują do podjętej tematyki.

W pracy znajduje się informacja o tym, że badania wykonano dzięki realizacji dwóch projektów w ramach konkursu Inkubator innowacyjności + oraz jednego ufundowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, co bez wątpienia wskazuje na aplikacyjny charakter badań. Dowodem na pionierski charakter badań są 2 zgłoszenia patentowe dotyczące optymalizacji warunków hodowli *P. aeruginosa* do izolacji PyoM oraz sposobu otrzymywania tej substancji i jej zastosowania w celu ograniczenia zakażenia bakteriami *H. pylori* u ludzi.

Na uwagę zasługuje współautorstwo Kandydata także w 8 innych publikacjach z listy JCR, z których 3 ukazały się w 2023 roku. Biorąc pod uwagę przygotowanie rozprawy doktorskiej w tym czasie, wymagało to od Kandydata godnego pochwały zaangażowania.

Mam jeszcze niewielkie uwagi co do przygotowania pracy pod względem edytorskim. Warto byłoby wyróżnić w spisie treści rozdziały i podrozdziały, w celu lepszego rozeznania co do hierarchii treści. Przy źródłach finansowania przydatnym byłoby wskazanie kierownika projektu, co w sposób wyraźny umiejscawiałoby realizowaną pracę doktorską w wieloletnim dorobku pracowników Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pana



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63

51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 63 23

zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

mgr Mateusza Urbaniaka pt. „Proregeneracyjne, przeciwdrobnoustrojowe i immunomodulujące właściwości piomelaniny *Pseudomonas aeruginosa*” stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego i potwierdza ogólną wiedzę teoretyczną Kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Doktorant zrealizował założone cele rozprawy. Podjął się tematu bardzo istotnego i aktualnego nie tylko ze względów naukowych, ale też praktycznych, wykazując się przy tym znajomością warsztatu badawczego oraz umiejętnością interpretacji uzyskanych wyników.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana mgr Mateusza Urbaniaka spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określonym w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (aktualne odniesienie do ustawy - tekst jednolity: Dz. U. z 2023 r. poz. 742) i wnioskuję o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie rozprawy, gdyż przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska cechuje się:

- a) wyróżniającą jakością badań: scharakteryzowano właściwości biologiczne PyoM na modelu linii komórkowych, wykazano działanie przeciwbakteryjne naturalnych PyoM wobec *H. pylori* oraz ochronne działanie wobec komórek żołądka;
- b) posiada liczne walory aplikacyjne: PyoM_{sol} i PyoM_{insol} pozytywnie przeszły testy cytotoksyczności *in vitro* i *in vivo*, więc w przyszłości mogą stanowić wyroby medyczne, PyoM może być stosowana jako środek immunomodulujący, bakteriobójczy, proregeneracyjny, a także suplement diety w celu ograniczenia zakażenia bakteriami *H. pylori*;
- c) wyniki zaprezentowane w rozprawie zostały opublikowane w czasopiśmie naukowym z listy JCR, posiadającym punktację 140 pkt. MEiN i w obu artykułach Doktorant jest pierwszym autorem;
- d) dodatkowo Pan mgr Mateusz Urbaniak jest pierwszym autorem dwóch zgłoszeń patentowych.

Z wyrazami szacunku,

dr hab. Bożena Futoma-Kołocho