

Katowice, 28.08.2024 r.

Dr hab. Katarzyna Kasperkiewicz
Uniwersytet Śląski
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
ul. Jagiellońska 28
40-032 Katowice
email: katarzyna.kasperkiewicz@us.edu.pl

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

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pt. „Proregeneracyjne, przeciwdrobnoustrojowe i immunomodulujące właściwości piomelaniny *Pseudomonas aeruginosa*” została wykonana przez Pana mgr Mateusza Urbaniaka pod opieką Pani Prof. dr hab. Magdaleny Mikołajczyk – Chmieli oraz promotora pomocniczego Pani dr Karoliny Rudnickiej, prof. UŁ.

Przedmiotem rozprawy były badania mające na celu charakterystykę właściwości fizykochemicznych i biologicznych piomelaniny (PyoM) wytwarzanej przez bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Tematyka badań podjętych przez Pana mgr Urbaniaka jest uzasadniona, gdyż metabolity bakteryjne jako źródło substancji bioaktywnych wzbudzają zainteresowanie naukowców w wielu renomowanych ośrodkach naukowych na świecie i stanowią prężnie rozwijającą się gałąź nauki.

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowią cztery publikacje naukowe, z których trzy to prace doświadczalne, a jedna to artykuł przeglądowy. Przedstawione do oceny artykuły naukowe są pracami zbiorowymi, jednak na podstawie zamieszczonych oświadczeń współautorów można jednoznacznie ocenić indywidualny wkład mgr Urbaniaka w powstanie tychże publikacji. W przypadku prac: „*In vitro and in vivo Biocompatibility of Natural and Synthetic Pseudomonas aeruginosa pyomelanin for Potential Biomedical Applications*” oraz “*Can pyomelanin produced by*



Pseudomonas aeruginosa promote the regeneration of gastric epithelial cells and enhance *Helicobacter pylori* phagocytosis?”, a także “Exploring the osteoinductive potential of bacterial pyomelanin derived from *Pseudomonas aeruginosa* on human osteoblasts model” Doktorant jest autorem koncepcji badań, przygotował i przeprowadził doświadczenia, w tym izolację i oczyszczenie bakteryjnych piomelanin (materiał do badań), odpowiadał za wykonanie testów cytotoksyczności w stosunku do fibroblastów i monocytów, koncepcję i przeprowadzenie testów toksyczności na modelu *Galleria mellonella*, ocenę wpływu piomelanin na żywotność bakterii *Helicobacter pylori*, wyznaczenie minimalnych stężeń hamujących (MIC₅₀ i MIC₉₉), ocenę żywotności i apoptozy fibroblastów, monocytów i komórek nabłonka żołądka AGS traktowanych piomelaninami oraz lipopolisacharydami, wykonanie testów oceniających pochłanianie referencyjnych pałeczek *E. coli*, ocenie żywotności i migracji osteoblastów po traktowaniu metabolitem bakteryjnym i doksorubicyną, wykazaniu właściwości antybakteryjnych w stosunku do szczepów klinicznych *Staphylococcus* sp. Jednocześnie należy podkreślić, iż Pan mgr Urbaniak opracował, interpretował, dyskutował uzyskane wyniki oraz przygotował manuskrypty prac. Wspólnie z Panią Profesor dr hab. Magdaleną Mikołajczyk – Chmiela pełnił rolę autora korespondującego. Wykonanie i koordynowanie wymienionych powyżej zadań jednoznacznie wskazują na **wiodącą rolę** mgr Urbaniaka w powstaniu 3 prac naukowych przedstawionych jako część rozprawy doktorskiej. W pracy pt:” *Biomolecules and delivery systems*” Doktorant jest autorem podrozdziału *Microbial Biopolymers*, co wskazuje na posiadanie aktualnej wiedzy z zakresu zastosowania bakteryjnych polimerów w biotechnologii.

Recenzowana rozprawa doktorska, oprócz wydruków oryginalnych publikacji naukowych zawiera również następujące rozdziały: *Wprowadzenie, Założenia i Cele pracy, Materiał i Metody, Podsumowanie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Dyskusję, Wnioski szczegółowe i wniosek końcowy*, wykaz *Literatury, Streszczenie pracy w języku polskim i angielskim* oraz *Wykaz skrótów* stosowanych w dysertacji. Dodatkowo w opracowaniu zamieszczono: źródła finansowania, wykaz publikacji ze współautorstwem Doktoranta, udział w projektach badawczych, wykaz staży naukowych i oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach.

W części *Wprowadzenie* Autor dokonał obszernej charakterystyki fizjologicznej, metabolicznej i genetycznej pałeczek *Pseudomonas*. Niezwykle interesująco zredagowana została część dotycząca charakterystyki różnorodnych pod względem budowy chemicznej i aktywności

biologicznej barwników produkowanych przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. Wyczerpująco Doktorant scharakteryzował również piomelaninę – główny obiekt badań. Została szczegółowo przedstawiona budowa chemiczna, biosynteza oraz możliwości jej zastosowania w różnych gałęziach przemysłu i medycyny. Ze względu na wysoki poziom merytoryczny, a jednocześnie syntetyczny charakter tej części opracowania w mojej opinii warto go udostępnić większej liczbie czytelników, np. w postaci pracy przeglądowej. W części *Wprowadzenie* znajduje się również rozdział poświęcony charakterystyce *Helicobacter pylori*, który zawiera opis fizjologii bakterii, czynników wirulencji oraz chorobotwórczość. Ostatnia część *Wprowadzenia* poświęcona została biologii tkanki kostnej. Przedstawia również strategie poszukiwania nowych stymulatorów procesów osteoindukcyjnych. Pragnę podkreślić, iż przygotowane przez mgr Urbaniaka *Wprowadzenie* stanowi syntetyczne kompendium wiedzy, które doskonale wprowadza czytelnika w podjęte przez Doktoranta problemy badawcze.

W kolejnej części rozprawy doktorskiej zostały bardzo dobrze sformułowane założenia i cele pracy. Zaproponowane dwa nadrzędne cele dotyczyły badań bakteryjnej piomelaniny i jej prozdrowotnych właściwości, a także potencjalnych zastosowań w medycynie. Autor wyznaczył także cele szczegółowe swoich badań, które obejmowały: opracowanie metod izolacji i oczyszczania biopolimeru, jego charakterystykę w zakresie właściwości fizykochemicznych i biologicznych, oraz przeciwbakteryjnych w stosunku do patogenów tj. *H. pylori* i *Staphylococcus* sp., weryfikację w badaniach *in vitro* właściwości cytoprotekcyjnych piomelanin, charakterystykę właściwości osteoindukcyjnych i proregeneracyjnych na modelu ludzkich osteoblastów. Jako ostatni cel badawczy Doktorant wskazał poszukiwanie stymulatorów tkanki kostnej z uwzględnieniem metabolitów bakteryjnych o potencjalnym zastosowaniu w biokompozytach stosowanych w odbudowie implantowanych kości.

W swojej pracy badawczej mgr Mateusz Urbaniak zastosował szereg zaawansowanych metod badawczych, w tym np. absorbcyjną spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR), termogravimetrię, skaningowa kalorymetrię różnicową (DSC), które wymagały od Doktoranta dużego zaangażowania i umiejętności interpretacji otrzymanych wyników badań. W celu osiągnięcia założonych celów badawczych Pan mgr Urbaniak stosował również metody chemiczne (izolacja, oczyszczanie piomelaniny, synteza chemiczna) oraz szereg metod biologicznych, w tym technik

mikrobiologicznych i immunologicznych, co świadczy o Jego bogatym przygotowaniu metodycznym do pracy naukowej. Zastosowane metody badawcze w doskonały sposób pozwoliły osiągnąć zamierzone cele niniejszej pracy doktorskiej.

W dalszej części opracowania zostały zamieszczone oryginalne publikacje naukowe w postaci wydruków z czasopism (praca I, II, IV) oraz plik manuskryptu będącego w recenzji (praca III).

Kolejną część dysertacji stanowi *Podsumowanie prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej*, które zawiera syntetyczny opis założeń badawczych, uzyskanych wyników wraz z ich interpretacją. Osobny, 6-stronicowy rozdział stanowi *Dyskusja* wyników. Jest on napisany bardzo ciekawie i świadczy o umiejętności interpretacji wyników i dociekliwości naukowej Doktoranta. W *Dyskusji* Autor wnikliwie porównał otrzymane wyniki z osiągnięciami innych badaczy prezentując dojrzałą postawę naukową.

Mgr Mateusz Urbaniak w swojej pracy doktorskiej wykazał:

1. Użyteczność podłoża mikrobiologicznych, do hodowli bakterii *Pseudomonas* i izolacji dwóch form piomelaniny: rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej w wodzie, których skład opracował na drodze doświadczałnej. Pragnę podkreślić, iż badania te były podstawą zgłoszenia patentowego.
2. Obecność grup: hydroksylowej i karboksylowej w badanych cząsteczkach piomelanin (naturalnych i syntetycznej).
3. Wysoką termooporność piomelaniny, co stanowi niezwykle ważny rezultat w kontekście komercjalizacji produkcji i stosowania badanego biopolimeru w różnych gałęziach przemysłu.
4. Wysoką cytokompatybilność naturalnych piomelanin w przeciwieństwie do syntetycznego analogu wobec fibroblastów myszy, monocytów człowieka, komórek nabłonka żołądka i osteoblastów człowieka (badania *in vitro*) oraz bezpieczeństwo powyższych barwników w badaniach *in vivo* na modelu *Galleria mellonella*.
5. Działanie ochronne (cytoprotekcyjne) i przeciwapoptotyczne piomelanin wobec komórek nabłonkowych żołądka w kostymulacji endotoksyną *H. pylori* i *E. coli* (badania *in vitro*).



6. Nasilenie procesów fagocytozy *H. pylori* przez monocyty w obecności piomelaniny w środowisku hodowlanym.
7. Wpływ na migrację komórek nabłonka żołądka i osteoblastów w obecności biopolimeru (badania *in vitro*).
8. Przeciwbakteryjne właściwości naturalnych piomelanin wobec referencyjnych i klinicznych szczepów *H. pylori* oraz *Staphylococcus* sp.
9. Wspomaganie dojrzewania osteoblastów w hodowlach *in vitro*, poprzez nasilenie sekrecji m.in. cytokin.

Na podstawie przeprowadzonych badań naukowych Doktorant sformułował wniosek końcowy, w którym poprawnie konkluduje, iż naturalne piomelaniny produkowane przez pałeczki *Pseudomonas aeruginosa* posiadają udowodnione w autorskich badaniach właściwości biologiczne, w tym przeciwbakteryjne, proregeneracyjne i immunomodulujące, dzięki czemu mogą mieć szerokie zastosowanie w leczeniu zakażeń bakteryjnych oraz w medycynie regeneracyjnej.

Załączony w opracowaniu wykaz *Literatury* obejmuje aż 230 pozycji, w większości opublikowanych w ostatnich 10-15 latach, co wskazuje na dynamiczny rozwój tej gałęzi badań i zainteresowanie jakie budzi problematyka związana z polimerami produkowanymi przez drobnoustroje.

Praca doktorska została przygotowana w sposób bardzo staranny i choć nie udało się uniknąć kilku błędów stylistycznych, nie wpływa to na moją wysoką oceną strony naukowej rozprawy. Przedstawione wyniki stanowią istotny wkład w rozwój dyscypliny.

Dodatkowo w pracy doktorskiej zostały zamieszczone informacje dotyczące: źródeł finansowania przeprowadzonych badań, dorobku publikacyjnego Doktoranta, zgłoszeń patentowych, udziału w projektach badawczych i odbytych stażach naukowych. Chciałbym podkreślić, iż Mgr Urbaniak jest współautorem 8 artykułów opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych oraz 2 zgłoszeń patentowych, co świadczy o jego istotnej aktywności naukowej.



Po wnikliwym zapoznaniu się z rozprawą doktorską stwierdzam iż stanowi ona oryginalne i niezwykle wartościowe opracowanie dotyczące możliwości zastosowania piomelaniny do wspomagania leczenia zakażeń *Helicobacter pylori* oraz regeneracji tkanki kostnej.

Jednocześnie chciałabym prosić Doktoranta o przedstawienie swojej opinii w następujących kwestiach:

1. Czym Pan kierował się w wyborze modelu *Galleria mellonella* do badań bezpieczeństwa biopolimeru?
2. Czy pH środowiska może mieć wpływ na właściwości biologiczne piomelaniny ?
3. Czy planuje Pan badania oddziaływania piomelaniny z innymi drobnoustrojami niż bakterie np. grzyby mikroskopowe. Czy wobec tych mikroorganizmów można spodziewać się interesujących obserwacji?
4. Czy wiadomo w jaki sposób piomelanina działa na komórki prokariotyczne i eukariotyczne na poziomie molekularnym?.

Wniosek końcowy recenzji:

Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pana **mgr Mateusza Maksymiliana Urbaniaka** spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z późniejszymi zmianami. Przedmiotem rozprawy jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorant wykazał się wiedzą teoretyczną w zakresie prowadzonych badań oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Dlatego zwracam się do Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pana **mgr Mateusza Maksymiliana Urbaniaka** do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie, ze względu na bardzo dobry poziom naukowy prowadzonych badań, istotny wkład tych badań w aktualny stan wiedzy, bardzo szeroki ich zakres oraz złożony warsztat metodyczny, a także zgłoszenia patentowe **wniosuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej**. Pragnę podkreślić, iż wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej przez Pana mgr Mateusza Urbaniaka mogą stanowić podstawę do wprowadzenia w przyszłości nowych metod leczenia infekcji *Helicobacter pylori*, wskazują piomelaninę jako interesującą substancję

przeciwbakteryjną, która mogłaby być stosowana w postaci leku lub środka konserwującego np. w produktach żywnościowych. Jednocześnie pionierskie badania przeprowadzone na potrzeby pracy doktorskiej odnośnie proregeneracyjnych właściwości piomelaniny potwierdzają, iż stanowi ona nowoczesny i bezpieczny biomateriał, który z sukcesem może być stosowany w regeneracji tkanki kostnej. Doktorant wykazał również, iż badana substancja jest bardzo dobrym modulatorem aktywności komórek układu odpornościowego, co może w przyszłości stanowić podstawę do rozwoju badań nad zastosowaniem piomelaniny w leczeniu różnych defektów układu immunologicznego u ludzi.

