

Poznań, dnia 26.04.2019r.

Recenzja
osiągnięcia naukowego i dorobku naukowego
w postępowaniu w sprawie nadania stopnia naukowego doktora
habilitowanego dr Katarzyny Niemirowicz-Laskowskiej
w dziedzinie nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna

Dr Katarzyna Niemirowicz-Laskowska ukończyła w 2011 roku studia na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku, uzyskując tytuł zawodowy magistra chemii. Ponadto, w 2012 roku ukończyła studia na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej i uzyskała tytuł zawodowy magistra analityki medycznej. W latach 2011-2014 odbywała studia doktoranckie na Wydziale Lekarskim z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku i od 2015 roku jest adiunktem w Samodzielnej Pracowni Technik Mikrobiologicznych i Nanobiomedycznych UM w Białymstoku. Dr Katarzyna Niemirowicz-Laskowska uzyskała w dniu 24.09.2014 roku na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku stopień doktora nauk medycznych w dyscyplinie – biologia medyczna na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Ocena efektów działania nanocząstek magnetycznych jako nośników leków w modelach doświadczalnych” (promotor: prof. dr hab. Halina Car).

Efektem pracy badawczej dr Katarzyny Niemirowicz-Laskowskiej jest współautorstwo 15 publikacji oryginalnych (z wyłączeniem publikacji osiągnięcia naukowego) oraz 9 – poglądowych, posiadających IF. Sumaryczny IF dorobku naukowego wraz z publikacjami osiągnięcia naukowego i publikacjami poglądowymi wynosi IF=101,672, liczba punktów MNiSW=1000.

Aktywność naukowa dr Niemirowicz-Laskowskiej wyraża się kierownictwem 4 projektów badawczych (Fundacji Polpharmy, Sonata – NCN, MNSiW oraz Preludium – NCN). Ponadto, otrzymała stypendium Start Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej (2016).

Tematyka naukowa Kandydatki koncentruje się na badaniach nowych zastosowań medycznych utworzonych różnych typów nanosystemów magnetycznych. W ocenie dorobku naukowego dr Niemirowicz-Laskowskiej zwraca uwagę konsekwencja podejmowania ukierunkowanych działań i coraz bardziej zaawansowane badania doświadczalne. Efektem intensywnego rozwoju nanotechnologii jest uzyskanie nanocząstek srebra, złota i miedzi, które cechują się właściwościami przeciwdrobnoustrojowymi. Z kolei, nanocząstki magnetyczne są aktualnie wykorzystywane w medycynie, przede wszystkim w diagnostyce i niektórych rodzajach terapii przeciwnowotworowej. W ostatnich latach podejmowane są próby badawcze utworzenia nowych wielofunkcyjnych nanocząstek magnetycznych, co może pozwolić na rozszerzenie zastosowań tych nanosystemów magnetycznych w medycynie. W tym kontekście, analizowanie ich właściwości *in vitro* jest szczególnie istotne, stąd również konieczność gruntownej oceny prezentowanych badań.

Zgodnie z obowiązującą ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym, dr Katarzyna Niemirowicz-Laskowska przedstawiła osiągnięcie naukowe pt. „Nanocząsteczki magnetyczne jako efektywne transportery związków o aktywności błonowej”, obejmujące zestaw czterech publikacji o łącznym IF=18,551 oraz liczbie punktów MNiSW=145,00 W skład w/w zestawu wchodzi następujące publikacje:

1. Niemirowicz K, Surel U, Wilczewska AZ, Mystkowska J, Piktel E, Gu X, Namiot Z, Kułakowska A, Savage PB, Bucki R. Bactericidal activity and biocompatibility of ceragenin-coated magnetic nanoparticles. J Nanobiotechnology : 2015, May 1; 13: 32
(IF=4,239; MNiSW=35,00)
2. Niemirowicz K, Prokop I, Wilczewska AZ, Wnorowska U, Piktel E, Wątek M, Savage PB, Bucki R. Magnetic nanoparticles enhance the anticancer activity of cathelicidin LL-37 peptide against colon cancer cells. Int J Nanomedicine : 2015, Jun 4; 10: 3843-53
(IF=4,320; MNiSW=35,00)

3. Niemirowicz K, Piktel E, Wilczewska AZ, Markiewicz KH, Durnaś B, Wątek M, Puszkarz I, Wróblewska M, Niklińska W, Savage PB, Bucki R. Core-shell magnetic nanoparticles display synergistic antibacterial effects against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* when combined with cathelicidin LL-37 or selected ceragenins. *Int J Nanomedicine* : 2016, Oct 19;11: 5443-5455
(IF=4,300; MNiSW=35,00)

4. Niemirowicz K, Durnaś B, Tokajuk G, Głuszek K, Wilczewska AZ, Misztalewska I, Mystkowska J, Michalak G, Sodo A, Wątek M, Kiziewicz B, Gwóźdź S, Głuszek S, Bucki R. Magnetic nanoparticles as a drug delivery system that enhance fungicidal activity of polyene antibiotics. *Nanomedicine* : 2016 , Nov; 12(8) : 2395-2404
(IF= 5,720; MNiSW=40,00)

Trzy prace z powyższego zestawu (P1, P3, P4) dotyczą oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej *in vitro* opracowanych nanosystemów, podczas gdy praca P2 analizuje *in vitro* ich oddziaływanie antyproliferacyjne oraz proapoptyczne wobec komórek nowotworowych.

Praca P1 koncentruje się na badaniach właściwości przeciwbakteryjnych nanocząstek magnetycznych MNP połączonych chemicznie za pośrednictwem wiązania iminowego z zsyntetyzowanym kationowym lipidem – cerageniną (CSA-13). W warunkach *in vitro* analizowano aktywność bakteriobójczą wolnej CSA-13, MNP oraz połączeń MNP - CSA-13 wobec tylko trzech nie zdefiniowanych względem ich lekooporności, szczepów *Pseudomonas aeruginosa* (*Pseudomonas aeruginosa* Xen 5, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 i *Pseudomonas aeruginosa* PAO14) oraz tworzonych przez te pałeczki biofilmu. Ponadto, testowano aktywność hemolityczną w/w preparatów wobec ludzkich erytrocytów. W pracy wykazuje się, że maksymalny efekt bójczy wobec badanych szczepów i tworzonych biofilmu wywiera uzyskany nanosystem MNP – CSA-13. Jednak, w ocenie efektywności związków przeciwdrobnoustrojowych, stosuje się standardowo oznaczenia minimalnego stężenia hamującego (MIC), a w wybranych przypadkach także – minimalnego stężenia bakteriobójczego (MBC) oraz w analizie aktywności przeciwbiofilmowej – minimalnego stężenia hamującego biofilm (MBIC). Szkoda zatem, że tych wartości w pracy nie określono. Ponadto, stwierdzona

zależność uwalniania zimmobilizowanej CSA-13 od środowiska kwaśnego (pH poniżej 6) budzi poważne wątpliwości, co do zastosowań tego związku u ludzi (np. pH krwi ludzkiej poniżej 6,9 stanowi przecież zagrożenie życia).

W pracy P3 zastosowano 3 typy nanosystemów na bazie MNP (z użyciem cząsteczek złota – MNP-Au, aminosilanu – MNP-NH₂ lub polimerowej pochodnej z terminalnymi grupami IV-rzędowej soli amoniowej – MNP-PQAS) w badaniach nad przeciwbakteryjnym oddziaływaniem katelicydyny (LL-37) oraz wybranych syntetycznych ceragenin (CSA-13 i CSA-131), jak również klasycznych antybiotyków – wankomycyny i kolistyny. Oznaczając wartości MIC, MBC dla tych preparatów oraz obliczając współczynniki FIC i FBC w ocenie efektywności ich połączeń, zanalizowano aktywność badanych związków wobec dwóch szczepów klinicznych: *Staphylococcus aureus* Xen30 i *Pseudomonas aeruginosa* Xen5, a także wytwarzanego przez te izolaty biofilmu. Jednak szkoda, że zdefiniowany w tej pracy szczep jako MRSA budzi wątpliwości. Z tabeli 1 przecież wynika, że MIC wankomycyny dla tego izolatu wynosił 4 µg/ml. Oznacza to, że przypuszczalnie izolat ten należy do szczepów o obniżonej wrażliwości na glikopeptydy (GISA), co należało uwzględnić w interpretacji uzyskanych wyników. Z kolei, szczep *Pseudomonas aeruginosa* Xen5 był wrażliwy na kolistynę (MIC=1µg/ml). Szkoda, że w badaniach nie zastosowano również szczepów wzorcowych. Praca dokumentuje istotne oddziaływanie przeciwbakteryjne ceragenin (CSA-13 i CSA-131) wobec analizowanych szczepów oraz bardzo słabą aktywność opracowanych trzech typów nanosystemów (np. jak wykazuje tabela 1, MNP-Au lub MNP-NH₂ charakteryzowały się 16-krotnie niższą aktywnością od wankomycyny oraz MNP-PQAS 32-krotnie niższą aktywnością wobec *Staphylococcus aureus* Xen30, a także odpowiednio – 16-krotnie, 128-krotnie i 64-krotnie mniejszą efektywnością od kolistyny wobec *Pseudomonas aeruginosa* Xen5). Jednak, mimo bardzo wysokich różnic w aktywności przeciwbakteryjnej pomiędzy opracowanymi typami nanosystemów i badanymi peptydami oraz antybiotykami (wankomycyna, kolistyna), w pracy w oparciu o wyniki współczynnika FIC/FBC wskazuje się na addycyjność lub nawet synergizm zastosowanych połączeń z LL-37, badanymi cerageninami, wankomycyną lub kolistyną. Nasuwać się może zatem przypuszczenie, że chodzi o synergizm hiperaddycyjny, co wydaje się wątpliwe. Dlatego szkoda, że oprócz wartości FIC/FBC nie podano poszczególnych wyników MIC analizowanych preparatów, co uwiarygodniłoby przedstawione dane. Ponadto, publikacja zawiera istotny błąd merytoryczny. Wankomycyna w kontraście do kolistyny, przecież nie

stanowi antybiotyku aktywnego błonowo, lecz podstawowym jego mechanizmem działania jest hamowanie syntezy ściany komórkowej.

Praca P4 koncentruje się na badaniach *in vitro* aktywności przeciwwgrzybiczej opracowanych nanosystemów MNP w połączeniu z antybiotykiem polienowym (amfoterycyny B lub nystatyny) – MNP-AMF i MNP-NYS wobec klinicznych 6 szczepów gatunku *Candida albicans*, 3 izolatów *Candida glabrata* i 1 – *Candida tropicalis*. Przedstawione dane na podstawie oznaczeń MIC, MFC oraz MBIC dokumentują zwiększoną aktywność amfoterycyny B i nystatyny w formie zimmobilizowanej wobec analizowanych szczepów *Candida*. Ponadto, w publikacji wskazuje się, że MNP w odróżnieniu od wolnej amfoterycyny B, inaktywuje katalazę (Cat-1) w komórkach *Candida glabrata*. Jednak w ostatnich latach udokumentowano, że amfoterycyna B nie tylko oddziałuje destrukcyjnie na komórki *Candida* wskutek bezpośredniego łączenia się z ergosterolem ich błony cytoplazmatycznej, ale także poprzez indukcję oksydacyjnej reakcji stresowej, co wiąże się z redukcją aktywności Cat-1. Jednak tego efektu w prezentowanych badaniach nie stwierdzono, co budzi wątpliwości recenzenta.

W pracy P2 przeprowadzono badania *in vitro* oddziaływania antyproliferacyjnego oraz proapoptycznego naturalnej katelicydyny (LL37), a także syntetycznej cerageniny (CSA13) w formie wolnej oraz zimmobilizowanej z użyciem MNP wobec komórek gruczolaka jelita grubego linii DLD-1 i HT-29. Aktywność powyższych związków analizowano, stosując test proliferacji komórek z radioaktywną tymidyną, test cytotoksyczności z zastosowaniem MTT, badania apoptozy komórek metodą fluorescencyjną. Ponadto, z użyciem mikroskopii konfokalnej dokonano oceny internalizacji badanych związków do komórek nowotworowych. W pracy wykazano, że utworzone nanosystemy (MNP-LL-37 oraz MNP-CSA-13) istotnie oddziałują supresyjnie wobec komórek gruczolaka jelita grubego, hamując ich wzrost oraz indukując apoptozę. Uzyskane wyniki mogą mieć znaczenie praktyczne, uzasadniając kontynuację poszukiwań nowych strategii terapii przeciwnowotworowej. Jednak szkoda, że w przeprowadzonych badaniach nie uwzględniono analizy wybranych genów związanych z proliferacją i apoptozą komórek linii DLD-1 i HT-29, co pozwoliłoby zanalizować wpływ w/w nanosystemów na cykl komórkowy. Ponadto, użycie w badaniach także zdrowych komórek ludzkich, np. nabłonka okrężnicy byłoby

istotne dla potwierdzenia prezentowanej wyjątkowości oddziaływania opracowanych nanosystemów względem komórek rakowych.

Sumując, na podstawie szczegółowo przeprowadzonej analizy stwierdzam, że dr Katarzyna Niemirowicz-Laskowska rozwija żywą działalność zawodową. Posiada interesujący, ale prezentujący wiele powtórzeń dorobek naukowy; obejmuje publikacje reprezentujące wysoki standard. Jednak przedstawiony przez dr Katarzynę Niemirowicz-Laskowską zestaw czterech publikacji dotyczących możliwości zastosowań medycznych opracowanych nanosystemów zawiera sporo ułomności metodycznych i interpretacyjnych. Dlatego decyzję, co do przyjęcia przedstawionego zestawu czterech publikacji jako określonego ustawa osiągnięcia naukowego pozostawiam Wysokiej Komisji Habilitacyjnej.



Prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz

**em. Kerownik Katedry i Zakładu
Mikrobiologii Lekarskiej UM
w Poznaniu**