

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**  
**mgr inż. Aleksandry Talarczyk**

**pt. „Modulacja aktywności pomp efflux i jej wpływ na skuteczność  
antybakteryjnej terapii fotodynamicznej z wykorzystaniem ilościowej analizy na  
poziomie pojedynczej komórki”**

wykonanej w Katedrze Inżynierii Biomedycznej na Politechnice Wrocławskiej pod  
kierunkiem dr hab. inż. Agnieszki Ulatowskiej-Jarża, prof. PW oraz dra hab. inż. Igora  
Buzalewicza, prof. PW.

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria  
Biomedyczna Politechniki Wrocławskiej

**1. Ocena formalna rozprawy doktorskiej**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Talarczyk dotyczy niezwykle aktualnego i istotnego problemu współczesnej biomedycyny, jakim jest poszukiwanie nowych metod przeciwdziałania antybiotykooporności bakterii. Dynamiczny wzrost liczby szczepów wielolekoopornych stanowi jedno z największych wyzwań zdrowia publicznego XXI wieku, dlatego rozwój alternatywnych strategii przeciwdrobnoustrojowych należy uznać za problem o wysokiej randze naukowej i aplikacyjnej.

Doktorantka skoncentrowała swoje badania na możliwościach zwiększenia skuteczności antybakteryjnej terapii fotodynamicznej (aPDT) poprzez modulację aktywności pomp efflux przy użyciu związków pochodzenia naturalnego. Jednocześnie istotnym elementem pracy było wykorzystanie ilościowej analizy pojedynczych komórek bakteryjnych z zastosowaniem

cyfrowej holotomografii (DHT). Takie połączenie metod biologicznych, optycznych i inżynierskich doskonale wpisuje się w zakres współczesnej inżynierii biomedycznej.

Tematyka rozprawy jest nowoczesna, interdyscyplinarna oraz posiada wyraźny potencjał translacyjny zarówno w obszarze medycyny, jak i przemysłu spożywczego czy farmaceutycznego.

Rozprawa ma formę spójnego tematycznie cyklu publikacji naukowych obejmujących badania nad mechanizmami zwiększania skuteczności terapii fotodynamicznej, rolą inhibitorów pomp efflux pochodzenia roślinnego, oraz wykorzystaniem cyfrowej holotomografii do ilościowej oceny zmian zachodzących w pojedynczych komórkach bakterii.

Cykl publikacji obejmuje trzy artykuły naukowe:

1. Pietrowska A, Hołowacz I, Ulatowska-Jarża A, Guźniczak M, Matczuk AK, Wieliczko A, Wolf-Baca M, Buzalewicz I. The Enhancement of Antimicrobial Photodynamic Therapy of Escherichia Coli by a Functionalized Combination of Photosensitizers: In Vitro Examination of Single Cells by Quantitative Phase Imaging. *Int J Mol Sci.* 2022 May 30;23(11):6137. doi: 10.3390/ijms23116137.
2. Pietrowska A, Guźniczak M, Kublicka A, Matczuk A, Wieliczko A, Ulatowska-Jarża A, Buzalewicz I. Efflux pump inhibitors from plant compounds: A new strategy to modulate bacterial growth and morphology. *Industrial Crops and Products.* Volume 233, 2025, 121378, doi: 10.1016/j.indcrop.2025.121378.
3. Talarczyk A, Kublicka A, Matczuk A, Wieliczko A, Ulatowska-Jarża A, Buzalewicz I. Plant-derived efflux pump inhibitors potentiate Chlorin e6-based antimicrobial photodynamic therapy against Bacillus cereus and Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun.* 2026 Jan 25;797:153214. doi: 10.1016/j.bbrc.2025.153214.

Publikacje tworzą logicznie uporządkowaną całość i prezentują konsekwentny rozwój koncepcji badawczej.

## 2. Ocena osiągnięcia naukowego rozprawy doktorskiej

Głównym celem rozprawy było określenie wpływu modulacji aktywności pomp efflux na skuteczność antybakteryjnej terapii fotodynamicznej oraz opracowanie metod ilościowej oceny tych procesów na poziomie pojedynczej komórki bakteryjnej.

Doktorantka wykazała, że **(i)** zastosowanie naturalnych inhibitorów pomp efflux zwiększa akumulację fotosensybilizatorów w komórkach bakterii, **(ii)** zwiększona akumulacja chloryny e6 przekłada się na wyższą skuteczność fotoinaktywacji, **(iii)** cyfrowa holotomografia umożliwia ilościową ocenę zmian zachodzących w pojedynczych komórkach bakterii podczas

terapii. Cele pracy zostały jasno określone i konsekwentnie zrealizowane. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo szeroki zakres zastosowanych metod eksperymentalnych. Doktorantka wykorzystwała mikrobiologiczne testy żywotności, oznaczenia MIC, spektroskopię UV-VIS, konfokalną mikroskopię fluorescencyjną, cyfrową holotomografię, czy ilościową analizę współczynnika refrakcji i suchej masy komórek. Szczególnie cenne jest wykorzystanie DHT jako nowoczesnego narzędzia bezznacznikowego obrazowania ilościowego bakterii. Metoda ta została nie tylko zastosowana poprawnie, ale również rozwinięta pod kątem interpretacji zmian refrakcyjnych jako wskaźników skuteczności terapii przeciwdrobnoustrojowej.

Praca świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu metodologicznym Doktorantki oraz umiejętności integracji metod biologicznych i fizycznych.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy zaliczam:

1. Wykazanie, że inhibitory pomp efflux pochodzenia naturalnego zwiększają skuteczność antybakteryjnej terapii fotodynamicznej.
2. Potwierdzenie synergistycznego działania terapii skojarzonej (aPDT + EPI) wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.
3. Opracowanie ilościowego podejścia do oceny skuteczności terapii z wykorzystaniem cyfrowej holotomografii.
4. Wskazanie potencjału aplikacyjnego badanych związków naturalnych w terapiach przeciwdrobnoustrojowych.

Do najmocniejszych stron rozprawy należą bardzo wysoka aktualność problematyki badawczej, interdyscyplinarny charakter pracy, nowoczesny warsztat eksperymentalny, wysoki poziom metodologiczny, logiczna konstrukcja cyklu publikacji i potencjał wdrożeniowy badań.

### **3. Uwagi krytyczne i dyskusyjne**

Pomimo bardzo wysokiej oceny rozprawy należy wskazać kilka kwestii dyskusyjnych, do których chciałbym prosić Doktorantkę o ustosunkowanie się podczas publicznej obrony:

- Cyfrowa holotomografia została w pracy wykorzystana jako nowoczesne narzędzie ilościowej analizy zmian optycznych i morfologicznych bakterii. Należy jednak podkreślić, że metoda ta ma charakter pośredni i nie stanowi bezpośredniej miary przeżywalności komórek bakteryjnych. W przedstawionych publikacjach wykazano jakościową korelację pomiędzy zmianami parametrów RI a akumulacją fotosensybilizatora oraz odpowiedzią komórkową na

terapię fotodynamiczną, jednak nie przeprowadzono pełnej walidacji ilościowej tych parametrów względem klasycznych oznaczeń żywotności, takich jak CFU czy testy LIVE/DEAD.

- Zastosowane stężenia wybranych inhibitorów pomp efflux, szczególnie palmatyny i berberyny, były relatywnie wysokie w porównaniu z typowymi stężeniami stosowanymi dla klasycznych związków przeciwdrobnoustrojowych. Choć wartości te mieszczą się w zakresie spotykanym w badaniach *in vitro* dotyczących naturalnych związków o słabej aktywności przeciwbakteryjnej, pojawia się pytanie o specyficzność obserwowanych efektów biologicznych oraz potencjalne trudności translacyjne związane z praktycznym zastosowaniem tak wysokich stężeń.

- Pewne wątpliwości budzi wybór *Bacillus cereus* jako podstawowego modelu bakterii Gram-dodatnich. Choć gatunek ten posiada znaczenie środowiskowe i żywnościowe oraz może być dogodnym modelem do badań obrazowych, bardziej oczywistym wyborem w kontekście klinicznych zastosowań terapii fotodynamicznej wydaje się np. *Staphylococcus aureus*, szczególnie szczepy MRSA, powszechnie stosowane w badaniach nad biofilmami i opornością bakterii. W pracy zabrakło szerszego uzasadnienia tego wyboru oraz dyskusji ograniczeń związanych z możliwością uogólniania uzyskanych wyników na inne bakterie Gram-dodatnie.

- Wątpliwości budzi również sposób interpretacji uzyskanych wyników ilościowych dotyczących wzrostu skuteczności terapii kombinowanej. W pracy wskazano m.in. na wzrost efektywności terapii o 273,9%, jednak przedstawione analizy opierają się głównie na parametrach pośrednich, takich jak zmiany współczynnika refrakcji, suchej masy komórkowej czy aktywności metabolicznej ocenianej testem resazurynowym. Brakuje natomiast bezpośrednich oznaczeń przeżywalności bakterii, takich jak CFU lub analizy LIVE/DEAD, które pozwalałyby jednoznacznie powiązać obserwowane zmiany optyczne z rzeczywistą skutecznością bakteriobójczą terapii.

W pracy pojawiają się również pojedyncze sformułowania o charakterze skrótowym lub terminologicznie nieprecyzyjnym, na które chciałbym zwrócić uwagę Doktorantki. Nie oczekuję ustosunkowania się do tych sformułowań, natomiast gorąco zachęcam do większej uważności w posługiwaniu się językiem naukowym w przyszłości:

- „oporność nabyta natomiast powstaje w wyniku mutacji lub narażenia komórki na środki o działaniu przeciwbakteryjnym” - lepszym sformułowaniem byłoby „oporność nabyta rozwija się w wyniku mutacji genetycznych lub nabycia genów oporności, a jej selekcji sprzyja ekspozycja bakterii na środki przeciwbakteryjne.”

- „mutacje w genach kanałów” - lepsze sformułowanie to np. „mutacje w genach kodujących białka transportowe błony” lub „mutacje genów kodujących poriny lub pompy efflux”.

- „przeprogramowanie struktury miejsca wiązania leku wskutek modyfikacji enzymatycznych prowadzących do metylacji genu” - lepsze sformułowanie to np. „modyfikacje enzymatyczne prowadzące do metylacji miejsca docelowego leku” albo „enzymatyczna modyfikacja miejsca wiązania antybiotyku, np. poprzez metylację rRNA”.

- „najczęściej spotyka się połączenie antybiotyków z dodatkową substancją lub czynnikiem np. bakteriofagami” – terapie fagowe trudno nazwać najczęściej spotykanymi; lepszym sformułowaniem byłoby „stosuje się również terapie skojarzone, obejmujące antybiotyki oraz dodatkowe czynniki biologiczne, takie jak bakteriofagi.”

- „częstotliwość mutacji pomp” - lepsze sformułowanie „częstość mutacji genów kodujących pompy efflux”

- „gram-dodatnie posiadają zewnętrzną warstwę peptydoglikanu, która zapewnia jedynie ograniczoną odporność na przepuszczalność” – w tym zdaniu mamy kilka problemów; nie możemy mówić o odporności komórki na przepuszczalność lub zewnętrznej warstwie peptydoglikanu, która sugeruje istnienie jakiejś zewnętrznej osłony bakteryjnej u drobnoustrojów Gram-dodatnich. Lepszym sformułowaniem byłoby „Bakterie Gram-dodatnie posiadają grubą warstwę peptydoglikanu, która jednak nie stanowi tak skutecznej bariery dla transportu cząsteczek jak błona zewnętrzna bakterii Gram-ujemnych.”

Ponadto, w pracy pojawiają się miejscami sformułowania o charakterze zbyt ogólnym lub wymagające doprecyzowania terminologicznego. Przykładem może być użyte określenie „biofilmy i inne struktury bakteryjne”. W języku mikrobiologicznym bardziej precyzyjne byłoby wskazanie konkretnych form organizacji komórek, takich jak mikrokolonie, klastry bakteryjne czy agregaty komórkowe związane z wczesnymi etapami tworzenia biofilmu.

Uwagi te mają jednak głównie charakter redakcyjny i nie wpływają istotnie na ogólną wartość merytoryczną rozprawy.

#### 4. Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Talarczyk oparta jest na trzech wysokiej jakości publikacjach, które zostały docenione przez recenzentów i edytorów w czasopiśmie naukowych. Każda z prac podnosi ważne aspekty i problemy badawcze, wnosi znaczący wkład w badania nad wykorzystaniem metody fotodynamicznej w walce z wielolekoopornymi drobnoustrojami. Na podstawie załączonych oświadczeń Doktorantki oceniam jej udział koncepcyjny jak i wykonawczy w powstaniu prac bardzo wysoko.

Rozprawa świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do prowadzenia samodzielnej pracy naukowej. Doktorantka wykazała umiejętność formułowania problemów badawczych, zdolność planowania i realizacji eksperymentów, bardzo dobrą znajomość nowoczesnych metod badawczych, krytyczne podejście do uzyskiwanych wyników, oraz umiejętność interpretacji danych. Wysoki poziom publikacji oraz ich spójność tematyczna potwierdzają dojrzałość naukową Kandydatki.

#### 5. Wniosek końcowy

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Talarczyk stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego w dyscyplinie inżynieria biomedyczna.

Rozprawa spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie mgr Aleksandry Talarczyk do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Inżynieria Biomedyczna na Politechnice Wrocławskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Aleksandry Talarczyk do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Dr hab. Mariusz Grinholc, prof. UG



Signed by / Podpisano  
przez:

Mariusz Stanisław  
Grinholc  
Uniwersytet Gdański

Date / Data: 2026-05-  
12 12:16