



Dr hab. inż. Anna Brillowska-Dąbrowska
Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii

Gdańsk, 26.08.2019

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Bauer zatytułowanej „Próba zastosowania peptydów przeciwdrobnoustrojowych w prewencji infekcji bakteryjnych związanych z wykorzystaniem biomateriałów” przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Wojciecha Kamysza

Postęp medycyny oprócz możliwości leczenia chorób, które jeszcze dekady temu były postrzegane jako śmiertelne, oprócz polepszenia dobrostanu pacjentów i przedłużenia długości życia, paradoksalnie przyczynił i przyczynia się do powstawania nowych problemów zdrowotnych, a nawet nowych jednostek chorobowych, które najbardziej uciążliwymi są w krajach, w których opieka medyczna jest na wysokim poziomie. Zjawiskiem jednoznacznie związanym z postępem medycyny jest oporność mikroorganizmów na stosowane chemoterapeutyki.

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było zbadanie możliwości zastosowania wybranych peptydów przeciwdrobnoustrojowych do modyfikacji powierzchni hydrożelowych soczewek kontaktowych oraz cewników silikonowo lateksowych do zapobiegania tworzenia na ich powierzchni biofilmów bakteryjnych.

Cechą pracy zasługującą na wyróżnienie jest jej interdyscyplinarność, która umożliwiła przeprowadzenie kompleksowych badań i uzyskanie wartościowych wyników. Syntezę badanych peptydów Doktorantka przeprowadziła samodzielnie, przeprowadziła ich identyfikację oraz oczyściła je. Oczyszczone peptydy sprawdziła z użyciem techniki HPLC oraz spektrometrii mas. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wybranych przez Doktorantkę peptydów wobec planktonowych form była sprawdzana zgodnie z wytycznymi Clinical and Laboratory Standards Institute. Dobrze, że do badań Doktorantka wybrała certyfikowaną metodę, zastanawia mnie jednak dlaczego Doktorantka nie wykorzystwała protokołów opracowanych przez European Committee on Antimicrobial Activity Testing? Dalsze badania obejmowały wyznaczanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej peptydów wobec dojrzałego biofilmu, badanie aktywności przeciwadhezyjnej. Wartościowym efektem tych badań poza wynikami jest opracowanie protokołu wyznaczania aktywności peptydów w stosunku do biofilmu. Analiza wyników wskazała na wysoką aktywność peptydów Palm-KK-NH₂ przeciwdziałającą tworzeniu biofilmu przez *S. epidermidis* i *E. coli*, Palm-KR-NH₂, Palm-RKKK-NH₂ i K-Dap(Palm)-K-NH₂ przez *S. epidermidis* oraz K-Om(Palm)-K-NH₂ na *S. aureus* i *S. epidermidis*. Aktywność badanych peptydów przeciwko tworzeniu biofilmu przez *P. aeruginosa* była

porównywalna z stosowaną w lecznictwie p olimyksyną B. W przypadku badań dotyczących zwalczania dojrzałego biofilmu utworzonego przez *S. aureus* peptydem charakteryzującym się największą aktywnością okazał się Palm-KKNH₂, przez *S. epidermidis* – Palm-KK-NH₂, Palm-KR-NH₂ i Palm-RKKK-NH₂, przez *E. coli* – Palm-KK-NH₂, Palm-KKKK-NH₂, Palm-RKK-NH₂ i Palm-KRK-NH₂, a przez *P. aeruginosa* – Palm-KK-NH₂, Palm-KR-NH₂, Palm-KKKK-NH₂, Palm-KRKK-NH₂ i Palm-KRKK-NH₂. Zwieńczeniem badań służącym wyborowi najbardziej obiecujących peptydów było badanie ich toksyczności w stosunku do ludzkich czerwonych krwinek oraz ich wpływu na przeżywalność komórek fibroblastów. Najmniej toksycznym z badanych lipopeptydów okazał się być K-Om-(Palm)-K-NH₂ oraz K-Dap(Palm)-K-NH₂. Kolejnym etapem badań była modyfikacja powierzchni cewników i soczewek kontaktowych. Wybór właśnie tych materiałów jest uzasadniony – nie dość, że kolonizacja tych właśnie wyrobów medycznych może być przyczyną zakażeń, to jeszcze mają one różnych charakter chemiczny i cechuje je różne własności fizyczne. W celu sprawdzenia obecności badanych związków na powierzchni badanych biomateriałów Doktorantka z powodzeniem zastosowała technikę ATR-FTIR. Do badań właściwości antybakteryjnych zmodyfikowanych powierzchni soczewek Doktorantka wybrała Palm-KK-NH₂ i K-Dap(Palm)-K-NH₂ oraz polimyksynę B jako kontrolę. Uzyskane wyniki potwierdziły zmniejszenie ilości żywych bakterii w przypadku inkubacji w hodowli bakteryjnych cewników o zmodyfikowanej powierzchni oraz zahamowanie wzrostu w przypadku inkubacji soczewek modyfikowanych Palm-KK-NH₂ i K-Dap(Palm)-K-NH₂ w stężeniach już od 16 µg/ml w przypadku bakterii Gram-dodatnich i redukcję ilości żywych komórek bakterii Gram-ujemnych w przez soczewki modyfikowane peptydami o stężeniach od 64 µg/ml.

Część teoretyczna rozprawy obejmuje na 42 stronach omówienie problemu biofilmu bakteryjnego i jego wpływu na terapię infekcji, metody zwalczania biofilmów bakteryjnych, zapobieganie rozwojowi biofilmu na powierzchni materiałów medycznych oraz zagadnienia związane z biomateriałami i peptydami przeciwdrobnoustrojowymi. Na wyróżnienie zasługuje rozdział 5 części pierwszej rozprawy, w którym Doktorantka opisuje peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Przytoczone w części teoretycznej dane uzasadniają podjęcie przedstawionej w rozprawie problematyki badawczej. W tym kontekście wyjątek stanowią dane z tabeli 4. Doktorantka przedstawiła dane zgodnie z danymi literaturowymi z publikacji Veerachamy i wsp. (pozycja 53 w spisie literatury) z roku 2014 z czasopisma *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers - Part H: Journal of Engineering in Medicine*. Nie dość, że z zasady dane epidemiologiczne związane z problemem, który planuje się rozwiązać powinny być jak najświeższe, to jeszcze w tabeli w zestawieniu rodzajów implantów wraz z czynnikami etiologicznymi zakażeń z nimi związanych, w przypadku cewników urologicznych nie znalazła się wybrana do badań *Escherichia coli*, a jedynie *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* i *P. mirabilis*. Nie podaje tutaj w wątpliwość wyboru *E. coli* do badań, a jedynie wyboru danych, które Doktorantka zdecydowała się przedstawić. Podsumowując przegląd 142 pozycji literaturowych zagwarantował Doktorantce dobre zrozumienie tematu badawczego i odpowiednie przygotowanie do planowanych i przeprowadzonych badań, a co więcej został odpowiednio wykorzystany w dyskusji wyników.

W części II cel pracy został przedstawiony w sposób jasny i trafny. Dodatkowo Doktorantka przedstawiła w nim zwięźle sposób rozwiązania problemu badawczego. W mojej opinii jest to bardzo

dobry sposób wprowadzenia do dalszej części rozprawy. Pewnym zaskoczeniem było dla mnie wprowadzenie zdanie „w przypadku soczewek kontaktowych wzięto także pod uwagę kwestie ekonomiczne związane z koniecznością ich zakupu”. Prawdopodobnie Doktorantka chciała przygotować czytelników rozprawy na ograniczoną do minimum ilość badań przeprowadzonych z użyciem soczewek. Jest to zaskakujące ze względu na to, że koszt soczewek w porównaniu do kosztu cewników nie jest wysoki.

Część trzecia opisująca doświadczenia jest napisana w sposób pozwalający na odtworzenie przeprowadzonych przez Doktorantkę eksperymentów. Jest to niezwykle cenne i świadczy o staranności w przeprowadzaniu eksperymentów. Jednakże, w mojej opinii byłoby wartościowe przedstawienie doświadczeń na podstawie, których Doktorantka wybrała peptydy do badań („które wyselekcjonowałam na podstawie wcześniejszych badań”). Wątpliwości budzi metoda do badania wpływu wytworzonej powłoki na redukcję ilości komórek bakteryjnych, które przyłączyły się do powierzchni. Do „odklejenia” bakterii Doktorantka użyła łaźni ultradźwiękowej – skąd pewność, że sonikacja nie spowodowała dezintegracji komórek? W tym miejscu chciałabym również zwrócić uwagę, że wartościowym byłoby zamieszczenie wszystkich wyników w formie aneksu; w pracy zostały przedstawione tylko chromatogramy uzyskane w wyniku analizy jednego, a nie wszystkich badanych peptydów, dotyczy to również innych badań. Niefortunne jest w mojej opinii stwierdzenie „Test powtarzałam do momentu uzyskania jednakowych wyników w 3 kolejnych powtórzeniach”. Rozumiem, że Doktorantka po prostu musiała osiągnąć biegłość w przeprowadzaniu tych testów, zanim osiągnęła powtarzalne wyniki.

Część czwarta zawierająca omówienie wyników była prawdopodobnie największym wyzwaniem ze względu na różnorodność przeprowadzonych badań i mnogość wyników. Rozumiem, że zastosowanie przez Doktorantkę formy bezosobowej przy wzmiance o wyznaczaniu wartości MIC jest informacją, że to nie Doktorantka tę część eksperymentów wykonywała. Przed publikowaniem przedstawionych w rozprawie wyników warto by było powtórzyć ocenę wzrostu drobnoustrojów pochodzących hodowli, w których inkubowane były zmodyfikowane fragmenty cewnika. Metoda zastosowana w trakcie realizacji pracy doktorskiej daje tylko zgrubne wyniki, lepiej byłoby zastosować np. metodę seryjnych rozcieńczeń do oznaczania ilości bakterii. Zastanawiam się też, czy nie należałoby sprawdzić, czy modyfikacje soczewek nie wpływają na ich funkcjonalność. Radziłabym również wystrzegania się kategoryczności w formułowaniu pośrednich wniosków, w przypadku, gdy ilość przesłanek nie jest odpowiednia – „analizując powyższe wyniki można stwierdzić, że długość łańcucha kwasu tłuszczowego wpływa na aktywność związków. Spośród trzech badanych...” (str.82). Ponadto przedstawienie wyników z Tabel 7, 8 i 9 w jednej, byłoby ułatwieniem dla czytających rozprawę.

Część piąta zawiera dyskusję uzyskanych wyników. Jest ona wartościowym elementem pracy i wskazuje na dość znaczną dojrzałość naukową Doktorantki.

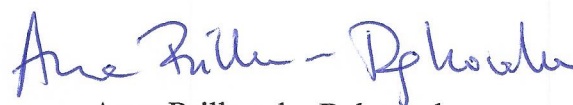
Niestety w części szóstej Doktorantka przedstawiła wnioski końcowe w sposób, który bez zaznajomienia się z treścią całej rozprawy doktorskiej nie odzwierciedla sukcesu, jakim niewątpliwie zakończyły się badania.

Poniżej przedstawiam niektóre z uchybień, które z racji pełnionej funkcji muszę wymienić, a które nie mają wpływu na wartość recenzowanej rozprawy:

- str. 6 – skróty używane po raz pierwszy powinny pojawiać się w nawiasie po pełnej nazwie,
- str. 7 – skrót myślowy „Wybrane związki łączono z powierzchnia za pomocą inkubacji..”,
- str. 13 – „zamieszczono na poniżej rycinie” – błąd typograficzny,
- str. 70 – „skupiłam się na przede wszystkim na popularności” – powinno być np. „powszechności”,
- str. 71 – „co ułatwia umożliwia”,
- str. 71 – skrót myślowy „W pierwszym etapie modyfikowałam powierzchnie (błąd typograficzny) cewnika przez inkubację i na podstawie wyników wybrałam trzy związki”,
- str. 71 – skrót myślowy – „Aktywność modyfikacji...”
- str. 112 „...wciąż pozostają szeroko rozwijaną grupą związków..”,
- str. 115 – „działanie bakteriobójcze otrzymanych powierzchni”,
- str. 127 – brak orzeczenia w pierwszym zdaniu.

Reasumując bardzo wysoko oceniam wartość merytoryczną recenzowanej pracy, z powodu ważkości tematyki, odpowiednio dobranej metodyki oraz wiarygodnych wyników i ich właściwej interpretacji. Doktorantka nie tylko zrealizowała cel pracy, jakim było zbadanie możliwości stosowania peptydów w modyfikacjach powierzchni biomateriałów w celu zapobiegania tworzenia biofilmu, ale zdołała wytypować lipopeptydy, które można by było stosować do tego celu. Mam nadzieję, że badania Doktorantki będą kontynuowane i zakończą się wdrożeniem.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Marty Bauer pt. „Próba zastosowania peptydów przeciwdrobnoustrojowych w prewencji infekcji bakteryjnych związanych z wykorzystaniem biomateriałów” spełnia kryteria określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595) z późniejszymi zmianami w brzmieniu z dnia 15 września 2017 r. (Dz. U. 2017 r. poz. 1789.), zgodnie z Art. 175. 1. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669). W związku z powyższym przedkładałam wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Marty Bauer do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Anna Brillowska-Dąbrowska