

Dr hab. Katarzyna Niemirowicz-Laskowska

Białystok, 02.01.2020

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Macieja Jaśkiewicza

pt. „Aktywność peptydów przeciwdrobnoustrojowych wobec biofilmu gronkowcowego w warunkach przepływowych”

wykonanej pod kierunkiem naukowym Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Kamysza
w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Część wyników zamieszczonych w niniejszej pracy otrzymana została w ramach projektu realizowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki Nr 2011/03/B/NZ7/00548

Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest oprawionym wydrukiem komputerowym formatu A4 liczącym 168 ponumerowanych stron. Układ pracy jest typowy dla dysertacji doktorskich i składa się z 7 rozdziałów głównych oraz 8. rozdziału ze spisem piśmiennictwa obejmującego 325 pozycji literaturowych, krajowych i zagranicznych, z czego 70% stanowią doniesienia z ostatnich 10 lat. Ponadto, wśród nich zawarto dwie pozycje współautorskie, w których Doktorant jest pierwszym autorem oraz dwie pozycje, w których jest trzecim autorem. Na uwagę zasługuje starannie przygotowany materiał dokumentacyjny wyników badań, na który składają się tabele w liczbie 34 (22 w tekście głównym i 12 w dodatku) oraz 45 rycin zamieszczonych w treściach odpowiednich rozdziałów. Rozdział 9 stanowi dodatek, w którym zestawiono dodatkowe dane z analiz HPLC i MS oraz wyniki oznaczeń MIC na szczepach klinicznych *S. aureus*. Pomocnym jest zamieszczony na wstępie rozprawy wykaz używanych skrótów stosowanych w pracy. W recenzowanej dysertacji zamieszczono także streszczenia zarówno w języku polskim jak i angielskim. Nie zamieszczono natomiast informacji dotyczącej analiz statystycznych uzyskanych wyników.

Ocena merytoryczna rozprawy

Staphylococcus aureus jest drobnoustrojem chorobotwórczym, odpowiedzialnym za szereg infekcji szpitalnych jak i poza szpitalnych, zróżnicowanych pod wieloma względami tj. lokalizacją, przebiegiem oraz skuteczności terapeutyczną. Wśród najczęstszych zakażeń wymienia się głównie zakażenia miejscowe skóry i tkanek miękkich oraz ogólnoustrojowe bakteriemie. Trudności i niepowodzenie terapeutyczne zakażeń o etiologii *S. aureus* związane są z patogennością tego drobnoustroju będącej skutkiem ekspresji szeregu czynników wirulencji, które prowadzą do kolonizacji, adhezji,

i uszkodzenia atakowanych tkanek. Ponadto, czynniki te umożliwiają sprawną ochronę przed mechanizmami systemu immunologicznego oraz sprzyjają rozprzestrzenianiu się bakterii w organizmie gospodarza. Jednakże kluczową cechą jest zdolność wyżej wymienionych drobnoustrojów do tworzenia zorganizowanej wspólnoty tj. biofilmu będącego doskonałą metodą zabezpieczającą przed działaniem systemu obronnego gospodarza jak i antybiotyków. Dane literaturowe wskazują, iż do eradykacji drobnoustrojów będących w formie biofilmu, wymagane jest niemalże 1000-krotnie wyższe stężenie antybiotyku w porównaniu do form planktonowych bakterii. Dodatkowo, po uformowaniu się dojrzałej struktury dochodzi do procesu dyspersji, umożliwiającego skuteczne uwalnianie i rozprzestrzenianie się komórek bakteryjnych do krwiobiegu i kolonizację dalszych miejsc. Co więcej, wspomniane wcześniej trudności terapeutyczne powiązane są ściśle z narastającą lekoopornością drobnoustrojów. W przypadku *S. aureus* odnotowano, iż oporność może być następstwem mutacji, poziomego transferu genów, ekspresji białek i pomp typu efflux oraz zdolnością do formowania biofilmu. W związku z powyższym, leczenie zakażeń gronkowcowych stanowi poważne wyzwanie kliniczne. Dlatego też, podczas poszukiwania alternatywnych, nowych metod terapeutycznych wszystkie z wyżej wymienionych czynników powinny być wzięte pod uwagę aby stworzyć skuteczne narzędzie terapeutyczne. Interesującymi pod względem przyszłościowego zastosowania jako matryca do syntezy nowej klasy związków o szerokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej wydają się być peptydy przeciwbakteryjne (AMPs). Związki te stanowią grupę substancji szeroko rozpowszechnionych w przyrodzie, stanowiąc składową odporności nieswoistej organizmów gospodarzy. Ich cechą jest szerokie spektrum aktywności oraz dwukierunkowość działania objawiająca się bezpośrednią interakcją z komórką drobnoustroju oraz stymulacją układu immunologicznego. Powyższe rodzi potrzebę dalszych pogłębionych badań naukowych z zastosowaniem peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz ich analogów w walce z drobnoustrojami. Zagadnienie to staje się coraz bardziej istotne w warunkach intensyfikacji zjawiska lekooporności i związanym z tym brakiem opcji terapeutycznej dla pacjentów dotkniętych tego typu infekcją. W związku z powyższym, podjęte przez Doktoranta badania w zakresie aktywności wybranych peptydów przeciwbakteryjnych i ich retro-analogów w stosunku do szczepów *Staphylococcus aureus* (referencyjnych pochodzących z kolekcji ATCC oraz klinicznych, wyizolowanych od pacjentów z atopowym zapaleniem skóry pochodzących z Katedry i Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego), należy uznać za trafne i celowe, gdyż aktywność ta była oceniana w warunkach przepływowych, odzwierciedlających warunki panujące w ustroju. W ramach podjętego tematu Doktorant postawił sobie następujące zadania badawcze, a mianowicie: W pierwszym etapie scharakteryzowano szeroki wachlarz szczepów klinicznych pod kątem wrażliwości na antybiotyki konwencjonalne oraz wybrane AMPs takie jak CAMEL, Citropina 1.1, LL-37, Pexiganan oraz Temporyna A. W badaniach udowodniono, że wrażliwość szczepów *S. aureus* na AMPs jest niezależna od mechanizmów oporności na antybiotyki, dzięki czemu zasadne było wytypowanie reprezentatywnej grupy szczepów, wobec których realizowane były dalsze prace. W kolejnym etapie zweryfikowano wpływ wymiany przeciwciał w peptydach oraz oceniono aktywność

analogów o odwróconej sekwencji. Na podstawie badań mikrobiologicznych oznaczeń cytotoksyczności wobec ludzkich erytrocytów (stopień hemolizy) oraz linii komórkowej keratynocytów ludzkich (HaCaT) udało się wytypować AMPs o najwyższym potencjale. Związkami wykazującymi najlepsze właściwości okazał się Omiganan, analog Indolicydyny – peptydu pozyskanego z ziarnistości neutrofilów bydłych oraz jego analog o odwróconej sekwencji (retro-Omiganan). Dodatkowo, na uwagę zasługuje fakt, iż w ramach dysertacji dodatkowo opracowano unikalne układy przepływowe z poli(dimetylosiloksanu) (PDMS). Pozwoliły one na ocenę eradykacji biofilmu utworzonego w przepływie, wpływu długotrwałej ekspozycji peptydów na profil wrażliwości ocenianych szczepów oraz weryfikację czy inkorporacja Omigananu i retro-Omigananu do wnętrza kanału zahamuje rozwój biofilmu gronkowcowego w przepływie. Przeprowadzone wyniki badań mikrobiologicznych ostatecznie potwierdziły wysoki potencjał obu związków. Ponadto, opracowana została metodyka badawcza pozwalająca na realizację badań w przepływie dla innych związków. Podsumowując badania wykonane w ramach przedłożonej do oceny rozprawy miały na celu doskonalenie metod syntetycznych oraz mikrobiologicznych do charakterystyki różnicowej chorobotwórczych szczepów gronkowców ważnych z punktu widzenia zapewnienia bezpieczeństwa. Co więcej, uważam iż mają one charakter poznawczy i użyteczny co stanowi wyjście naprzeciw potrzebom lekarzy, diagnostów oraz środowiska naukowego zajmującego się tematyką biofilmu i metodami jego oceny i eradykacji.

Na część opisową recenzowanej rozprawy składają się rozdziały takie jak: część teoretyczna, wspomniany powyżej cel pracy, materiał i metody, omówienie wyników wraz z ich dyskusją, wnioski, streszczenia oraz piśmiennictwo.

Obszerny wstęp teoretyczny Doktorant przedstawił na 44 stronach w oparciu o 237 pozycji piśmiennictwa. Powyższe świadczy o znajomości i znaczeniu podjętej tematyki badawczej Autora dysertacji celem rozwiązania podjętego zadania badawczego. Doktorant podzielił tę część na 5 głównych rozdziałów przedstawiając w nich kolejno charakterystykę badanego drobnoustroju jako czynnika etiologicznego zakażeń szpitalnych i pozaszpitalnych, opisując czynniki wirulencji *S. aureus* oraz oporność na stosowane antybiotyki. W moim odczuciu, bardziej zasadnym byłoby kontynuowanie rozpoczętego opisu ogólnego drobnoustroju o informacje dotyczące czynników wirulencji po czym przedstawienie charakterystyki poszczególnych jednostek chorobowych związanych z badanym drobnoustrojem. Sugerowałabym także, włączyć informacje, wyróżnione jako osobny rozdział o udziale gronkowców w zakażeniach szpitalnych w treść podrozdziału opisującego infekcje powodowane przez *S. aureus*. W kolejnej części wstępu Doktorant opisuje biofilm wyróżniając podrozdział dotyczący etapów tworzenia tej struktury, co uważam nie było koniecznym zabiegiem. Następnie przedstawiony został podrozdział dotyczący terapii infekcji gronkowcowych, który połączyłabym z opisywanym podrozdziale 1.3 zjawiskiem oporności na antybiotyki (1.3.4). W dalszej treści widnieją informacje teoretyczne o przepływowym modelu badania biofilmu, które to mogłyby być kontynuacją rozdziału 2. bowiem, informacje w nim zawarte stanowiłyby doskonały wstęp teoretyczny. Ostatni rozdział części teoretycznej poświęcono charakterystyce

peptydów przeciwbakteryjnych, opisując ich podział, mechanizm działania oraz metody ich modyfikacji w oparciu o syntezę organiczną. Zabrakło mi jednak informacji dotyczących strategii podjętych w aspekcie oporności na bezpośrednie zabijanie przez AMPs obejmujące m.in. modyfikację otoczki bakteryjnej, degradację AMPs, sekwestrację i wydalanie. Mimo przytoczonych uwag, podsumowując część teoretyczną, uważam, iż po uwzględnieniu dodatkowej redakcji, rozdziały te zasługują na publikację jako prace przeglądowe.

W rozdziale materiał i metody Autor przedstawił dokładnie używaną podczas pracy aparaturę naukowo badawczą, odczynniki, materiały laboratoryjne jednorazowego użytku oraz linie komórkowe. Szczegółowo został opisana część chemiczna obejmująca procedurę syntezy, oczyszczania, wymiany jonowej oraz oznaczania zawartości wykorzystywanych do badania peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Powyższe etapy były realizowane samodzielnie przez Doktoranta bądź w ramach realizowanych przedsięwzięć badawczych w Katedrze. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż proces wymiany na aniony Cl⁻ przeprowadzono przy zastosowaniu metody opracowanej w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego zakładającej użycie acetonitrylu nasyconego gazowym 0,5% HCl.

W kolejnych rozdziałach przedstawiono metodykę dotyczącą aktywności mikrobiologicznej badanych związków wobec szczepów *S. aureus*. Doktorant dość szczegółowo opisał wyznaczenie wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost (MIC), minimalnego stężenia eliminującego biofilm (MBEC) oraz minimalnego stężenia hamującego rozwój biofilmu (MBIC). W następnych częściach przedstawił badanie zjawiska narastania oporności oraz opis potencjału depolaryzacji błon. Powyższe realizował poprzez zastosowanie metod spektrofotometrycznych i fluorymetrycznych. Wyżej wymienione eksperymenty oceniane były także w układzie przepływowym. W nawiązaniu do powyższego, mam drobną uwagę dotyczącą podanego w metodyce okresu jednego miesiąca przechowywania płytki agarowej z posianymi koloniami drobnoustrojów. Wydaj się on zbyt długi ze względu na niestabilność składników pożywki i możliwość ich zużycia i degradacji oraz istniejącym ryzykiem kontaminacji. Zabrakło tu szczegółowych informacji na temat przechowywania tak przygotowanych płytek. Powinny być one owinięte specjalną laboratoryjną folią uszczelniającą i przechowywane stroną agarową do góry aby zapobiec kontaminacji utrzymać odpowiednie nawilżenie kultury jak i agaru. Dodatkowo opis oceny minimalnego stężenia eliminującego biofilm w przepływie nie jest zbyt klarowny. Powinien być bardziej uszczegółowiony między innymi o zakres badanych stężeń oraz sposób detekcji.

W metodyce opisano także badanie cytotoksyczności peptydów w stosunku do przedstawicieli komórek gospodarza – krwinek czerwonych oceniając aktywność hemolityczną oraz w stosunku do keratynocytów ludzkich HaCaT (ATCC), przy użyciu testu MTT. Dodatkowo, na podstawie otrzymanych wyników przy użyciu oprogramowania Graphit 7 wyznaczono wartość IC50 czyli stężenie peptydu, które hamuje wzrost 50% komórek poddawanych działaniu związków.

Podsumowując zastosowane metody chemiczne jak i biologiczne pozwoliły na kompleksową ocenę właściwości badanych związków i rozpoznanie możliwości zastosowania ich jako potencjalnych substancji/ bądź jako matrycy do syntezy nowych związków w terapii zakażeń infekcyjnych o etiologii gronkowcowej. Generalnie, sposób i realizacja przedstawionych w dysertacji badań mających niewątpliwie charakter interdyscyplinarny świadczą o dobrym przygotowaniu merytorycznym doktoranta oraz ogromnym doświadczeniu w obszarze prowadzonych badań promotora – Prof. Wojciecha Kamysza, będącego ekspertem w dziedzinie.

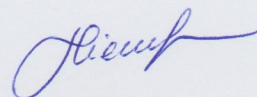
Opis wyników oraz ich dyskusja są prowadzone odpowiednio. Doktorant w sposób umiejętny omawia otrzymane wyniki i porównuje je z dotychczas opublikowanymi danymi. Wyniki badań udokumentowane są na starannie przygotowanych rycinach oraz zestawione w przejrzystych tabelach. Doprecyzowania wymaga fakt podany na stronie 91. Cytując „W pracy Neubauera i wsp. zbadano aktywność tych samych związków wobec szerokiego panelu drobnoustrojów obejmującego zarówno bakterie Gram-dodatnie, Gram-ujemne oraz grzyby” – w domyśle tych testowanych w niniejszej dysertacji, po czym na stronie 92 pada stwierdzenie : „iż żaden zespół badawczy nie przedsięwziął się zbadania takich zależności dla Omigananu, to jednak podobne badania były zrealizowane dla Indolicydyny (naturalnego AMPs, którego Omiganan jest analogiem).”

W ramach przeprowadzonych szerokich badań Autor sformułował 10 wniosków obejmujących zarówno aspekt syntetycznych, biologiczny i użytkowy zastosowania peptydów przeciwdrobnoustrojowych jako potencjalnych narzędzi do walki z zakażeniami o etiologii gronkowcowej. Powyższe możliwe było poprzez ocenę szerokiego panelu szczepów klinicznych *S. aureus* pod względem ich wrażliwości wobec antybiotyków konwencjonalnych i peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs). Ponadto, dokładne poznanie aktywności oraz potencjału aplikacyjnego AMPs możliwe było dzięki realizacji szeregu badań mikrobiologicznych zarówno w stosunku do form planktonowych, biofilmu w warunkach stacjonarnych i przepływowych oraz analiz peptydów.

Praca jest opracowana starannie, jednakże Doktorant nie ustrzegł się drobnych błędów redakcyjnych w postaci:

- nieodpowiednio użyta forma np. przeciwdrobnoustrojową zamiast przeciwdrobnoustrojowej s. 54; znaczące zamiast znacząco s. 88
- powtórzenia wyrazów w tym samym zdaniu np. zrealizowane i realizowane s. 87
- niedokończone zdania s. 90
- stosowanie skrótów myślowych, określeń żargonowych w opisie metodyki bądź dyskusji wyników np. s. 86, s. 93
- nieodpowiednio zacytowany podrozdział powinno być 1.12 a nie 1.11 s. 84, 85 i 86
- nieodpowiednio zacytowana rycina. Jest Rycina 8 i 9 powinno być 21 i 22 np. s. 88 i 89
- podwójna numeracja różnych Tabeli np. Tabela 19 występuje 2-krotnie s. 118 i 120

Powyższe powinno być poprawione podczas przygotowania pracy do druku jednakże nie ujmuje to całościowo wartości merytorycznej przedłożonej do oceny dysertacji.





Podsumowując, praca doktorska Pana mgr Macieja Jaśkiewicza wnosi wartościowe treści i ma charakter poznawczy i użyteczny. Przedstawione w niej nowe aspekty wykorzystania i opracowane metody oceny aktywności mikrobiologicznej peptydów przeciwbakteryjnych stanowią istotny wkład w szeroko prowadzone badania dotyczące poszukiwania nowych substancji o znaczącej aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Wartością dodaną jak również przejawem dobrego przygotowania teoretycznego i merytorycznego doktoranta świadczy interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań.

Podsumowując przygotowana przez Pana magistra Macieja Jaśkiewicza dysertacja w pełni spełnia warunki określone w Ustawie Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z 2018 roku (Dz. U. nr 2018 poz. 1669). W związku z powyższym wnioskuję do Wysokiej Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana magistra Macieja Jaśkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katarzyna Niemirowicz-Laskowska

Dr hab. Katarzyna Niemirowicz-Laskowska