



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej



Warszawa, dn. 16 listopada 2020

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Magdaleny Maciejewskiej pt.
„Badanie krótkich lipopeptydów pod kątem ich potencjalnego zastosowania
w profilaktyce i zwalczaniu infekcji oka związanych ze stosowaniem soczewek
kontaktowych”.**

Praca doktorska mgr Magdaleny Maciejewskiej pt. „**Badanie krótkich lipopeptydów pod kątem ich potencjalnego zastosowania w profilaktyce i zwalczaniu infekcji oka związanych ze stosowaniem soczewek kontaktowych**” została wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Nieorganicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Prof. dr hab. Wojciecha Kamysza. Praca jest opracowaniem monograficznym, ma typowy dla prac doktorskich układ, liczy 159 stron, składa się z 5 podstawowych rozdziałów i streszczenia (w języku polskim i angielskim), zawiera wykaz piśmiennictwa (368 pozycji) oraz suplement. Na początku pracy jest również wykaz wszystkich używanych skrótów i symboli.

We wstępie Doktorantka szeroko omówiła budowę i funkcje ludzkiego oka, z uwzględnieniem mechanizmów chroniących ten szczególny organ. Oko ludzkie jest wyjątkowym narządem narażonym bezpośrednio na różnego rodzaju czynniki szkodliwe, w tym kontakt z drobnoustrojami chorobotwórczymi. Posiada jednak dobrze rozwinięte mechanizmy ochronne, do których należą powieki (ochrona mechaniczna), rogówka, spojówka (produkująca śluz wchodzący w skład filmu łzowego), przeciwciała rozpuszczalne klasy sIgA, czy własna tkanka limfatyczna całego systemu łzowego, odpowiedzialna za rozpoznawanie określonych antygenów.

Film łzowy zawiera ponadto liczne białka o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, takie jak: lizozym, laktoferyna, immunoglobuliny, lipokalina.

Wg danych WHO wady wzroku obecnie występują zdecydowanie częściej niż kiedyś, a krótkowzroczność jest epidemią naszych czasów. Jedną z komfortowych metod korekcji wad wzroku jest stosowanie soczewek kontaktowych. Doktorantka w rozdziale drugim w sposób szczegółowy opisała rodzaje soczewek oraz ich wady i zalety. Jak każdy materiał medyczny przeznaczony do kontaktu z tkankami soczewki oraz płyny do ich pielęgnacji muszą spełniać określone wymagania. Nie zapobiega to jednak, w przypadku wystąpienia zakażenia, potencjalnemu tworzeniu się na ich powierzchni biofilmu bakteryjnego. Autorka opisała różnice w zdolności do absorpcji i odkładania na powierzchni soczewki różnych składników płynu łzowego, co nie tylko może wpływać na zmniejszenie komfortu ich stosowania, ale także sprzyjać powstawaniu stanów zapalnych, a nawet zakażeń bakteryjnych. Doktorantka zwróciła uwagę na choroby oka związane ze stosowaniem soczewek, z uwzględnieniem zakażeń bakteryjnych (takich jak np. zapalenie spojówek czy owrzodzenie rogówki), które nie występują zbyt często, jednak mogą kończyć się powikłaniami i stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia. Czynnikiem etiologicznymi takich zakażeń mogą być zarówno bakterie Gram-dodatnie (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*), jak i Gram-ujemne (np. *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* czy *Escherichia coli*). Są to powszechne patogeny, odpowiedzialne za różnego rodzaju zakażenia (w tym szpitalne), a dodatkowo zdolne do tworzenia biofilmu, zarówno na powierzchniach biotycznych, jak i abiotycznych. Autorka pracy omówiła także najczęstsze metody terapii zakażeń związanych z użytkowaniem soczewek kontaktowych.

Kolejny rozdział część teoretycznej poświęcony jest biofilmowi bakteryjnemu, z opisem etapów jego tworzenia, oporności na powszechnie stosowane związki przeciwdrobnoustrojowe i zakażeniami okulistycznymi związanymi z tym zjawiskiem.

Ponieważ tematem pracy są krótkie lipopeptydy jako potencjalne substancje do zastosowania w terapii schorzeń okulistycznych, autorka bardzo szeroko omówiła naturalnie występujące peptydy o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, z uwzględnieniem ich klasyfikacji na podstawie budowy przestrzennej, wytwarzane przez organizmy prokariotyczne (bakteriocyny) oraz eukariotyczne (endogenne antybiotyki peptydowe, roślinne, zwierzęce i ludzkie).

Endogenne antybiotyki peptydowe wytwarzane przez ssaki to katelicydyny, defensyny i histatyny. Ich rola w procesach obronnych organizmu jest bardzo istotna. Poza szerokim działaniem przeciwdrobnoustrojowym, związanym między innymi z hamowaniem aktywności proteaz bakteryjnych, a w efekcie ograniczaniem ich destrukcyjnego wpływu na tkanki w miejscu zakażenia, stymulują procesy angiogenezy i gojenia ran, działają immunomodulująco i regulują procesy nowotworzenia. Doktorantka w swojej rozprawie bardzo szczegółowo opisała mechanizmy działania tej grupy substancji, zwłaszcza w stosunku do bakterii Gram-dodatnich oraz biofilmu na różnych etapach jego rozwoju.

Zasadniczym celem doktoratu (przedstawionym na stronie 50) była synteza i oczyszczanie peptydów o sekwencjach naturalnych oraz krótkich syntetycznych lipopeptydów, zaprojektowanych w oparciu o właściwości związków naturalnych. Kolejnym etapem była ocena właściwości przeciwbakteryjnych otrzymanych związków wobec komórek planktonowych (w formie wolno pływającej) i w stosunku do biofilmu bakteryjnego. Badania polegały na sprawdzeniu ich zdolności do hamowania i eradykacji biofilmu formowanego na powierzchni płytek polistyrenowych i soczewek kontaktowych, także w skojarzeniu z płynami do pielęgnacji soczewek. W badaniach uwzględniono również sprawdzenie cytotoksyczności nowych lipopeptydów i ocenę bezpieczeństwa potencjalnego wykorzystania ich w profilaktyce i terapii zakażeń związanych z tworzeniem biofilmu na powierzchni soczewek.

Część doświadczalna zawiera dokładne informacje na temat wykorzystywanych materiałów oraz szczegółowy i staranny opis przeprowadzonych procedur badawczych. W ramach pracy dokonano syntezy 9 krótkich lipopeptydów oraz 2 peptydów naturalnych (występujących u płazów) na nośniku polimerowym. Otrzymane związki zostały oczyszczone z wykorzystaniem RT-HPLC, a tożsamość i ich czystość potwierdzono za pomocą RT-HPLC sprzężonego ze spektrometrią mas z zastosowaniem jonizacji poprzez elektrorozpylanie w trybie jonizacji dodatniej.

Do badań mikrobiologicznych w pracy wykorzystano 6 referencyjnych szczepów bakteryjnych, w tym 3 szczepy ziarenkowców Gram-dodatnich (*S. aureus*, *S. epidermidis* i *E. faecalis*) oraz 3 pałeczek Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*, *E. coli* i *P. mirabilis*). Bakterie należące do tych gatunków są często odpowiedzialne za wywoływanie różnego rodzaju ciężkich zakażeń (w tym szpitalnych), także tych związanych z tworzeniem biofilmu na powierzchniach materiałów medycznych (implanty, śruby ortopedyczne, cewniki). Użyte w badaniach gatunki należą również do bakterii wywołujących infekcje okulistyczne. Grupa użytych

szczepów jest reprezentatywna, chociaż dość mała. Nie użyto również do oznaczeń polecanych w szerokim piśmiennictwie do badań nad biofilmem dwóch wzorcowych szczepów z gatunku *S. epidermidis*: ATCC 12228 i ATCC 35984. Jeden z tych szczepów wytwarza biofilm na wysokim, a drugi na niskim poziomie, co być może pozwoliłoby na nieco lepszą ocenę aktywności antybiofilmowej nowych lipopeptydów. Jako związków referencyjnych użyto cyprofloksacyny i chloramfenikolu, leków stosowanych w terapii zakażeń okulistycznych.

W oznaczeniach wartości MIC – najmniejszego stężenia hamującego wzrost komórek planktonowych (wolnopływających), wykonanych z zastosowaniem standardowej metody mikrorozcieńczeń, związki wykazały wyraźniejszą aktywność wobec bakterii Gram-dodatnich, zwłaszcza gronkowców, co mogłoby skłonić Doktorantkę do rozszerzenia grupy badawczej o kilka szczepów z rodzaju *Staphylococcus* pochodzących z materiału klinicznego. Na pewno wzbogaciłoby to pracę i pozwoliło na jeszcze lepszą ocenę potencjału mikrobiologicznego zsyntetyzowanych lipopeptydów,

Zasadniczą część badań mikrobiologicznych stanowi ocena aktywności nowych związków wobec biofilmu tworzonego przez użyte w badaniach szczepy. Sprawdzano zdolność lipopeptydów i substancji referencyjnych do hamowania tworzenia biofilmu i jego eradykacji na powierzchni płytki polistyrenowej oraz soczewek kontaktowych. Wstępnej oceny tworzenia biofilmu dokonywano z wykorzystaniem barwienia resazuryną i odczytem wizualnym zmiany zabarwienia w porównaniu z kontrolą. W schemacie 8 (str. 62), przedstawiającym redukcję resazuryny do rezorufiny, użyto (prawidłowo) informacji, że dzieje się to pod wpływem dehydrogenazy mitochondrialnej, jednak w kontekście prowadzonych badań wobec szczepów bakteryjnych dla przeciętnego czytelnika może to być trochę mylące. Bakterie są organizmami prokariotycznymi i nie posiadają mitochondriów, oczywiście mają dehydrogenazy komórkowe, które również taki proces przeprowadzają. W badaniach wstępnych zabrakło podania przez Autorkę informacji dotyczącej oceny poziomu tworzenia biofilmu przez wybrane szczepy (wysoki, niski?), na co tylko orientacyjnie pozwalała wybrana metoda odczytu wizualnego. Odczyt spektrofotometryczny i podanie wartości absorbancji byłyby bardziej obrazowe. Przy okazji nasuwa się pytanie, dlaczego w badaniach na biofilmie wykorzystano metodę barwienia resazuryną, a nie np. solami tetrazoliowymi (XTT, MTT), które częściej są do tego celu stosowane?

Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka nie pominęła w cyklu badań tak istotnego etapu, jakim jest ocena potencjalnej cytotoksyczności wytypowanych, najbardziej obiecujących pod względem aktywności przeciwdrobnoustrojowej, związków. Analiza ta została przeprowadzona za pomocą testu redukcji MTT wobec ludzkich keratynocytów linii HaCaT. Wstępne badania i ocena cytotoksyczności pozwoliła na wytypowanie jednego lipopeptydu [nr 9 – (C₁₀)₂-KKKK-NH₂] do przeprowadzenia dalszych, bardziej szczegółowych oznaczeń mikrobiologicznych. Polegały one na ocenie aktywności metabolicznej biofilmu bakteryjnego (w porównaniu z kontrolą dodatnią i ujemną) wytworzonego przez 5 szczepów bakteryjnych (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *E. coli* i *P. aeruginosa*) na powierzchni płytek polistyrenowych po ekspozycji na użyte związki. Wybrany lipopeptyd oraz chloramfenikol i cyprofloksacynę zastosowano w szerokim zakresie stężeń (1-256 µg/ml), a odczytu aktywności dokonywano spektrofotometrycznie. Badania te obejmowały ocenę aktywności pozostałych na powierzchni polistyrenu komórek bakteryjnych wybarwionych resazuryną w dwóch wersjach: bezpośrednio po inkubacji wytworzonego biofilmu z badanymi związkami oraz po odpłukaniu związków i kolejnych 24 godzinach inkubacji pozostałości ze świeżą pożywką. Oceny tej dokonywano w porównaniu z kontrolą dodatnią (100%) i ujemną (0%). W taki sposób wyznaczono wartości najmniejszego stężenia badanych związków eliminującego wytworzony biofilm - zmniejszające jego aktywność metaboliczną o 50% i 90% (MBEC₅₀ i MBEC₉₀). Wyniki te zebrano w tabelach (str. 70 i 72) oraz zobrazowano na 11 wykresach, dla biofilmów poszczególnych szczepów bakteryjnych. Oceniono także aktywność wybranego lipopeptydu w stosunku do biofilmu uformowanego na soczewkach kontaktowych (wykres na str. 78). Myślę, że zastosowanie węższego zakresu stężeń (np. wartości od 0,5×MIC do 4×MIC) pozwoliłoby na bardziej czytelne wykresy, a wykorzystanie w badaniach szczegółowych kilku szczepów klinicznych (np. z zakażeń okulistycznych) dałoby szerszy pogląd na aktywność mikrobiologiczną wybranego związku.

Ostatnim etapem badań eksperymentalnych była ocena aktywności przeciwbiofilmowej wytypowanego lipopeptydu w połączeniu z dostępnymi na rynku płynami do soczewek kontaktowych. Kontrole stanowiły czyste roztwory płynów konserwujących. Badanie te przeprowadzono na powierzchni płytek polistyrenowych oraz soczewek kontaktowych, a wyniki przedstawiono na wykresach (str. 80 i 82).

Doktorantka nie pokusiła się o próbę mikroskopowego zobrazowania soczewki kontaktowej z osadzonym na jej powierzchni biofilmem bakteryjnym, a materiał fotograficzny na pewno wzbogaciłby pracę.

Przy wykorzystaniu oprogramowania Toxtree i dostępnego piśmiennictwa oceniono także teoretyczny profil potencjału drażniącego ludzkiego oka dla lipopeptydu, który został wybrany do badań szczegółowych i okazał się najbardziej obiecujący.

W rozdziale „Omówienie Wyników i dyskusja” Pani Mgr Magdalena Maciejewska szczegółowo odniosła się do wyników uzyskanych w poszczególnych etapach pracy, z uwzględnieniem analogicznych badań różnych autorów.

Najniższe wartości MIC uzyskano w przypadku 2 lipopeptydów zawierających krótsze kwasy tłuszczowe wobec 2 szczepów z rodzaju *Staphylococcus*. Również krótkie lipopeptydy okazały się najbardziej aktywne jeśli chodzi o eradykację biofilmu uformowanego na powierzchni polistyrenu, zwłaszcza przez szczepy gronkowców. Jednak biofilm wytworzony na hydrofilowej powierzchni soczewek kontaktowych był dużo mniej wrażliwy na działanie badanych lipopeptydów. Nieco lepsze okazały się wyniki badania zdolności do hamowania tworzenia biofilmu przez bakterie Gram-dodatnie, zarówno na płytkach polistyrenowych, jak i soczewkach kontaktowych. Bakterie Gram-ujemne, przypuszczalnie ze względu na swoją specyficzną budowę, były zdecydowanie bardziej odporne na badane związki. Tak jak można było się spodziewać najbardziej aktywne w stosunku do większości użytych szczepów były związki referencyjne – chloramfenikol i cyprofloksacyna.

W przeprowadzonych badaniach najbardziej obiecujący okazał się jeden z lipopeptydów, nr 9 - $(C_{10})_2$ -KKKK-NH₂. Był najmniej cytotoksyczny w badaniach *in vitro* w stosunku do ludzkich keratynocytów i dodatkowo wykazał najbardziej trwałe działanie przeciwbiofilmowe (po jego usunięciu z pożywki i dalszej hodowli szczepów bakterii Gram-dodatnich), nawet silniejsze niż związki referencyjne. Także suplementacja płynów do soczewek tym związkiem, już w niskich stężeniach wpłynęła korzystnie na ich aktywność przeciwbakteryjną.

W dyskusji Autorka podjęła, w odniesieniu do szerokiego piśmiennictwa, próbę analizy wpływu budowy chemicznej otrzymanych lipopeptydów, obecności określonych połączeń aminokwasowych, czy długości łańcuchów kwasów tłuszczowych, na ich aktywność przeciwbakteryjną.

W rozdziale V Doktorantka syntetycznie podsumowała uzyskane wyniki wysuwając 8 wniosków końcowych.

Badania na modelu biofilmowym są zawsze trudne, gdyż jest to skomplikowana struktura, zachowująca się w bardzo zróżnicowany sposób, zależna od wielu czynników zewnętrznych. Nie ma również wystandaryzowanych metod oceny aktywności przeciwbiofilmowej związków chemicznych, tak jak ma to miejsce w przypadku badań wobec komórek wolnożyjących. Dodatkowo biofilm bakteryjny z różnych powodów (opisanych w pracy przez Doktorantkę), zawsze wykazuje wyższą oporność na związki przeciwdrobnoustrojowe. Zakażenia związane z biofilmem często wykazują tendencje do przechodzenia w stan przewlekły, predysponują do nawrotów lub doprowadzają do ich nasilenia. Dlatego też każde badanie pozwalające sprawdzić nowe substancje pod kątem ich zdolności do hamowania lub eradykacji tej struktury jest bardzo wartościowe. Opracowanie alternatywnych metod terapii bakteryjnych zakażeń, w tym okulistycznych, związanych z formowaniem biofilmu, stanowi bardzo istotny nurt współczesnej medycyny i mikrobiologii.

Przeprowadzone przez Panią mgr Magdalenę Maciejewską badania i poczynione obserwacje wskazują na złożoność mechanizmów zachodzących w procesie formowania i funkcjonowania biofilmów bakteryjnych. Uzyskane wyniki są zachęcające a badania nad syntezą nowych lipopeptydów i sprawdzaniem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej pod kątem wykorzystania w profilaktyce zakażeń, nie tylko okulistycznych, powinny być kontynuowane.

W swoim opracowaniu Doktorantka nie ustrzegła się drobnych błędów edytorskich. Zastosowanie w pracy skrótów literowych (SA, EC, itp.) do nazw używanych szczepów bakteryjnych, zwłaszcza przy opisie wykonywanych badań i omawianiu wyników, bez wcześniejszego ich podania przy nazwach gatunkowych (na str. 54), jest niezbyt czytelne, szczególnie dla osób nie związanych z mikrobiologią. Niektóre pojawiają się jedynie przy pełnych nazwach bakterii we wstępie (str. 23). Takie skróty raczej nie są też wykorzystywane w pracach mikrobiologicznych. Dla polistyrenu i soczewek kontaktowych również niefortunnie zastosowano analogiczne skróty (PS i SK), co doprowadziło w niektórych miejscach do powstania pewnego rodzaju skrótów myślowych (np. „aktywność...wobec biofilmu PA utworzonych na PS”; „...szczepy EF z powierzchni SK i PS”). Tabela nr 9 znajduje się na stronie 70, a nie 69 (informacja na str. 67). Niepoprawnie też użyto nazwy hodowla komórkowa do określenia hodowli bakteryjnej (str. 54).

Podsumowując, należy podkreślić bogaty warsztat wymagający wiedzy i dobrego przygotowania praktycznego Pani mgr Magdaleny Maciejewskiej do przeprowadzenia przedstawionych w rozprawie doktorskiej badań (zarówno chemicznych, jak i mikrobiologicznych). Praca została napisana poprawnym językiem i zredagowana w sposób staranny. Podjęty przez Doktorantkę temat jest bardzo interesujący i ważny, zarówno w kontekście ciągłego poszukiwania nowych substancji o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, jak i problemu zakażeń związanych z biofilmem bakteryjnym, powstającym na różnego rodzaju powierzchniach abiotycznych, w tym np. soczewkach kontaktowych. Możliwość zastosowania w przyszłości płynów do soczewek, które utrudniałyby, czy wręcz uniemożliwiłyby, tworzenie na nich biofilmu bakteryjnego byłaby bardzo istotna z punktu widzenia użytkowników. Dlatego też uzyskane przez Doktorantkę wyniki są obiecujące i stanowią istotny wstęp do kontynuacji, czy wręcz rozszerzenia, poszukiwań nowych związków o aktywności przeciwbiofilmowej wśród lipopeptydów różnego pochodzenia.

Dodatkową zaletę recenzowanej rozprawy doktorskiej stanowi fakt, że uzyskane wyniki zostały już częściowo opublikowane w 3 wysoko punktowanych pracach oryginalnych o zasięgu międzynarodowym.

Uważam, że praca stanowi oryginalny dorobek naukowy Doktorantki i przyczynia się do lepszego poznania poruszanej w niej problematyki. Założone cele pracy zostały zrealizowane i w przejrzysty sposób udokumentowane. Prezentowana rozprawa doktorska spełnia wymagania Ustawy, oceniam ją pozytywnie i przedstawiam wniosek do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie mgr Magdaleny Maciejewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej

dr hab. n. farm. Joanna Stefańska