



Wrocław, 14.06.2023 r.

Prof. dr hab. inż. Zbigniew Lazar

zbigniew.lazar@upwr.edu.pl

+71 320 77 35

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Agnieszki Gibały

wykonanej pod kierunkiem
Prof. dr hab. Tomasza Gosiewskiego
oraz Prof. dr hab. Macieja Szaleńca

Praca doktorska wykonana została w Zakładzie Molekularnej Mikrobiologii Medycznej Katedry Mikrobiologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk.

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego z dnia 16 maja 2023 r.

1. Charakterystyka formalna rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Gibały pt. „Ocena wpływu nanocząstek srebra oraz bakteriofagów na bakterie izolowane od pacjentów z przewlekłym stanem zapalnym zatok przynosowych oraz tworzony przez nie biofilm” przygotowana została w tradycyjny sposób, tj. stanowi monografię złożoną ze 166 stron tekstu z uwzględnieniem literatury oraz z 31 stron załączników. Praca podzielona została na typowe części składowe, a mianowicie: wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, wnioski, dwa streszczenia, w języku polskim oraz angielskim oraz literatura. Ponadto, w pracy znalazł się wykaz skrótów oraz spis tabel i rycin, których w pracy jest sporo, bo aż 56 rycin i 15 tabel. Doktorantka przygotowała rozprawę w oparciu o 228 pozycji literaturowych, które zostały w prawidłowy sposób zacytowane w tekście. Praca w większości napisana jest językiem poprawnym i zrozumiałym. Zdarzają się jednak błędy stylistyczne czy interpunkcyjne jak np. kropki po wymienianych częściach rysunku a). czy b). w opisie Ryciny 5. czy „Bakteriofagi wydają się posiadać potencjał uszkodzający strukturę biofilmu poprzez enzymy naruszających integralność



jego matrycy (...)” – str. 32 lub „(...) zastosowaliśmy alternatywną metodę: test studzienkowo-dyfuzyjny [192, 193], która wyznaczyć MIC zgodnie z procedurą (...)”. Na stronie 18. Doktorantka dwukrotnie w jednym zdaniu wymienia oddziaływanie elektrostatyczne jako możliwość adhezji komórek bakterii do podłoża. Z kolei na stronie 122. Doktorantka pisze „Za reprezentatywne miejsce pobrania próbek w celu identyfikacji bakterii występujących w przebiegu PZZP uważa się przewód nowy środkowy (...)”. Zakładam, że chodziło Doktorantce o przewód nosowy środkowy. Również zastanawiające jest nazwanie Ryciny 15 „przykładowe zdjęcia”. Jest to tylko kilka przykładów uchybień w tekście, których jest zdecydowanie więcej, jednakże nie wpływają one na merytoryczną wartość pracy. Jako recenzent chciałbym również zwrócić Doktorantce uwagę na konsekwencję w tworzeniu rycin. Raz Doktorantka przygotowuje jedną rycinę złożoną z dwóch składowych, jak np. Rycina 38 a i b dotycząca masy tworzonoego biofilmu traktowanego różnymi stężeniami TA-AgNP przez 3 i 24 godziny, z kolei w innym miejscu, wyniki podobnego typu badania, również dotyczącego masy biofilmu bakteryjnego, jednakże traktowanego bakteriofagiem MSA-6 przez 3 i 24 godziny, przedstawione zostały na dwóch rycinach 44. i 45. Ponadto, w mojej ocenie nie jest konieczne podawanie dwa razy tych samych informacji w opisie rycin, jak czyni to Doktorantka, tzn. opis nad i pod ryciną. Chciałbym również zapytać Doktorantkę co oznaczają gwiazdki na rycinach? Zakładam, że są to oznaczenia grup jednorodnych, skoro wykonywane były analizy statystyczne, jednak może jest to wskazanie z jakim poziomem istotności wykonane zostały te analizy. Nie znalazłem takiej informacji w opisach rysunków czy w tekście. Na stronie 40. Doktorantka pisze „Wyniki typowania dla tego bakteriofaga przedstawiono na Rycinie 24”, jednakże Rycina ta jest przedstawiona dopiero dużo dalej w tekście. Możliwe w tym miejscu wstawić odwołanie, na której stronie można ją znaleźć, co znacznie ułatwiłoby odbiór tego fragmentu. Podobnie sytuacja ma się z Ryciną 16., która cytowana jest w rozdziale Metody na stronie 50., podczas gdy w tekście umieszczono ją dopiero na stronie 73. Z kolei na stronie 89. Doktorantka cytuje Rycinę 29., podczas gdy powinna być cytowana Rycina 28., do której odnosi się opis w tekście. Podobna sytuacja ma miejsce na stronie 82., gdzie Doktorantka cytuje Tabelę 16. podczas gdy poniżej znajduje się Tabela 15. Kolejną moją sugestią dla Doktorantki jest stosowanie skrótów nazw mikroorganizmów. W dużej części tekstu, w kolejnych miejscach Doktorantka stosuje ciągle pełne nazwy.

Choć nie jest to wymagane i w żaden sposób nie wpływa na ocenę rozprawy doktorskiej, zabrakło mi informacji związanych z osiągnięciami Doktorantki, co stanowi zazwyczaj część dokumentacji w dysertacjach przygotowanych w oparciu o cykl publikacji, jednakże pozwala zdecydowanie lepiej poznać kandydata do stopnia doktora.

2. Charakterystyka merytoryczna rozprawy doktorskiej

Recenzowana rozprawa doktorska dotyczy przewlekłego zapalenia zatok przynosowych, który dotyka dużej populacji ludzi, gdyż jest to aż 16% dorosłych w USA i 10,9% populacji dorosłych



w Europie. Choć PZZP traktowane jest jak choroba zapalna, zakłada się, że mikroorganizmy bytujące w jamie nosowej mogą ją inicjować lub utrwalac. Za zwiększenie ryzyka wystąpienia PZZP uważa się zaburzenia równowagi w mikrobiomie zatok jak również interakcje gospodarz-środowisko. U dużego odsetka pacjentów cierpiących na tę chorobę wśród izolowanych mikroorganizmów znajdują się szczepy *Staphylococcus aureus*. Co więcej, bakterie bytujące w jamie nosowej i zatokach, w tym te chorobotwórcze, potrafią wytwarzać biofilmy, będące ich strategią adaptacyjną do warunków środowiskowych, zwiększając ich szansę na przetrwanie. Leczenie zakażeń, w których wytworzył się biofilm utrudnione jest przede wszystkim ze względu na obniżoną zdolność antybiotyków do penetracji w głąb tej struktury i zabijanie mikroorganizmów znajdujących się w niższych warstwach. Ponadto, antybiotyki skuteczne w leczeniu zakażeń konkretnymi szczepami są nieskuteczne w leczeniu zakażeń związanych z biofilmem, a dawki tych związków w takim przypadku muszą być zdecydowanie wyższe. Innym istotnym problemem związanym z leczeniem zakażeń bakteryjnych jest coraz powszechniej występujące zjawisko oporności bakterii na powszechnie stosowane antybiotyki, co powoduje, że coraz bardziej kurczą się możliwości do zastosowania opcje terapeutyczne.

Wstęp do pracy przygotowany został z bardzo obszernym przedstawieniem literatury przedmiotu i doskonale wprowadza w zagadnienia, które Doktorantka badała w swojej pracy. Chciałbym jednak zapytać, co Doktorantka miała na myśli pisząc na stronie 14. „Idealna terapia przeciwdrobnoustrojowa powinna zatem celować w gatunki chorobotwórcze i pozostawić nienaruszoną komenslną mikrobiotę. Po zastosowaniu antybiotykoterapii, proces repopulacji zatok nie może być kontrolowany i nie musi prowadzić do przywrócenia równowagi fizjologicznej, ale raczej do ponownej kolonizacji przez odporne na antybiotyki drobnoustroje.”

W świetle przedstawionych we wstępie do pracy problemów, Doktorantka postawiła sobie za cel swoich badań ocenę możliwości zwalczania bakterii izolowanych od pacjentów z PZZP i tworzonego przez nie biofilmu przy pomocy nanocząstek srebra oraz bakteriofagów. Od dawna wiadomo, że wirusy bakteryjne są skuteczne w zwalczaniu infekcji bakteryjnych, jednakże dotychczas przegrywały w konkurencji z antybiotykami. Badania nad ich zastosowaniem prowadzone były intensywnie w krajach Europy Wschodniej, w tym w Polsce, jak również w dawnym Związku Radzieckim, w tym w Gruzji. Co więcej, wspomniane w celu pracy srebro, również znane jest ze swoich przeciwdrobnoustrojowych właściwości, szczególnie zaś jego stosowanie w postaci nanocząstek. W związku z tym, sformułowany przez Doktorantkę cel pracy jest w pełni uzasadniony. Cel ten podzielony został na kilka celów szczegółowych:

- izolacja, identyfikacja i charakterystyka mikrobiologiczna bakterii występujących w zatokach u pacjentów chorych na PZZP;
- ocena zdolności wybranych izolatów klinicznych bakterii do tworzenia biofilmu;



- analiza skuteczności działania biobójczego AgNP, w zależności od ich charakterystyki fizykochemicznej, na referencyjne szczepy bakterii *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 i *Escherichia coli* ATCC 25922;
- ocena wrażliwości izolatów klinicznych bakterii na AgNP i bakteriofagi;
- ocena cytotoksyczności AgNP na ludzką linię komórkową nabłonka nosa HNEpC (PromoCell);
- opracowanie metodologii badania efektów oddziaływania czynników biobójczych na modelowy biofilm w trakcie jego dojrzewania;
- ocena efektów działania AgNP i bakteriofagów na biofilm.

Cel pracy jak i cele szczegółowe w pełni odpowiadają tematowi pracy, a zastosowana metodologia jak i materiał badawczy w opinii recenzenta są adekwatne do postawionych celów. Chciałbym jednak zapytać Doktorantkę skąd różna temperatura inkubacji płytek z bakteriami? W jednym eksperymencie stosowano temperaturę 35°C, w innych 36°C lub 37°C. I druga kwestia, która jest zastanawiająca, w jakim celu umieszczono w pracy Rycinę 12., będącą opisem płytki 24 dołkowej? W mojej ocenie jest to informacja konieczna w trakcie prowadzenia eksperymentu, jednak zbędna w dysertacji.

W swojej pracy Doktorantka wyizolowała i zidentyfikowała łącznie 873 izolaty bakterii, spośród których 767 izolatów pochodziło od osób chorych na PZZP. Najliczniejszą grupą były gronkowce koagulazoujemne, a wśród nich 78% szczepów stanowił *Staphylococcus epidermis*. Ze szczepów potencjalnie patogennych najczęściej izolowano *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* i *Pseudomonas aeruginosa*. W opisie wyników Doktorantka wspomina w tym miejscu, że u dwóch pacjentów z przedsionka nosa posiew był jałowy. Chciałbym zapytać Doktorantkę, czym mogło to być spowodowane, bo nie zakładam, że żadne mikroorganizmy w takim miejscu jak przedsionek nosa u tych pacjentów nie bywały?

Izolaty wyhodowane od pacjentów z PZZP w 80,3% zdolne były do tworzenia silnego lub umiarkowanego biofilmu. Ponadto, dynamika tworzenia biofilmu pomiędzy poszczególnymi izolatami znacząco się różniła. Zanim jednak Doktorantka przystąpiła do oceny zdolności do eradykacji biofilmu przez nanocząstki srebra i bakteriofagi, przeprowadziła szereg analiz związanych z wyborem najbardziej aktywnej formy nanocząstek oraz najbardziej aktywnego bakteriofaga wykorzystując w tym celu kolekcyjne szczepy *S. aureus* ATCC29213 i *E. coli* ATCC25922. Najniższe wartości MIC oraz MBC wobec gatunków referencyjnych wyznaczono dla nanocząstek stabilizowanych kwasem taninowym (TA-AgNP) i lizyną, a do dalszych badań wybrano TA-AgNP ze względu na przeciwutleniające i bakteriobójcze właściwości samego kwasu taninowego. Spośród przetestowanych bakteriofagów, wybrano faga MSA-6. Ocenę zdolności nanocząstek srebra w połączeniu z bakteriofagiem na eradykację biofilmu Doktorantka analizowała względem *S. aureus*, jako że bakterie te wykazują najbardziej niekorzystny wpływ na przebieg PZZP. Wpływ wspomnianych czynników na biofilm analizowano w 24 dołkowych



plytkach po 3 i 24 h i oznaczano masę biofilmu jak i aktywność metaboliczną komórek. W badaniach obserwowano znaczne różnice pomiędzy ubytkiem masy biofilmów tworzonych przez różne szczepy po działaniu bakteriofagiem jak i nanocząstkami srebra. Czy Doktorantka ma pomysł na wyjaśnienie wzrostu masy biofilmu i aktywności metabolicznej komórek po traktowaniu ich 3 h 50 mg/L nanocząstek srebra, co prezentowane jest na Rycinach 35. i 42.? Choć masa biofilmu ulegała zmniejszeniu, nie obserwowano całkowitej degradacji macierzy biofilmu. Wykazano natomiast bardzo dużą aktywność lityczną zastosowanego bakteriofaga. Niestety nawet skojarzone działanie obu czynników eradykacji, nie spowodowało całkowitej degradacji biofilmów. Co więcej, wydaje się, że za efekt bójczy w głównej mierze odpowiadają przede wszystkim nanocząstki srebra.

Pracę Doktorantka podsumowuje sześcioma wnioskami. O ile pięć z nich nie budzi żadnych zastrzeżeń, o tyle wniosek nr 1 jest raczej stwierdzeniem konieczności poszukiwania alternatywnych terapii przeciwko PZZP, ze względu na rosnące zjawisko antybiotykooporności. W mojej ocenie wniosek ten powinien raczej podsumowywać pozostałe wnioski a nie być wynienionym jako pierwszy.

Po lekturze pracy, z ciekawości, chciałbym zapytać czy Doktorantka nie zastanawiała się może nad możliwością podania kolejnej dawki nanocząstek srebra i bakteriofaga do prób po 24 godzinach lub w innym czasie? Eksperyment ten miałby symulować terapię pacjentów z PZZP analizowanymi związkami i być może spowodowałby całkowite usunięcie biofilmu.

Interesuje mnie również jakie jest zdanie Doktorantki na temat nabywania przez bakterie odporności na bakteriofagi, jak chociażby odkryty mechanizm CRISPR/Cas9? Czy nie stanowi to podobnego problemu jaki obserwujemy obecnie z szerzeniem się antybiotykooporności?

3. Wniosek końcowy

Po wnikliwej analizie rozprawy doktorskiej stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca **spełnia** warunki określone w art. 187. ust. 1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.) i na tej podstawie **wnioskuję** do Rady Dyscypliny Nauki medyczne Uniwersytetu Jagiellońskiego o **nadanie stopnia naukowego doktora** nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne **mgr Agnieszce Gibale**.

Zbigniew Łazarz