

Łódź, dn. 28.06.2023

Prof. dr hab. n. med. Jurek Olszewski
Kierownik II Katedry Otolaryngologii
Klinika Otolaryngologii
Onkologii Laryngologicznej, Audiologii i Foniatrii
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
90-549 Łódź, ul. Żeromskiego 113

Recenzja

Rozprawy doktorskiej lek. Łukasza Andrzeja Ścibika

pt.

„Funkcjonalizacja powierzchni rurki tracheostomijnej z poli (chlorku winylu) w kierunku zapobiegania biofilmu bakteryjnego do zastosowań u pacjentów poddanych zabiegowi tracheotomii”

Podstawą rozprawy doktorskiej są następujące dwie publikacje, w których doktorant jest pierwszym autorem:

1. **Ścibik Ł**, Ochońska D, Gołda-Cępa M, Brzychczy-Włoch M, Kotarba A. Microbiological analysis of tracheostomy tube biofilms and antibiotic resistance profiles of potentially pathogenic microorganisms. *Otolaryngol Pol.* 2022;76(5):1-13 doi:10.5604/01.3001.0015.8827. **Punktacja MEiN 100.**
2. **Ścibik Ł**, Ochońska D, Gołda-Cępa M, Kwiecień K, Pamuła E, Kotarba A, Brzychczy-Włoch M. Sonochemical deposition of gentamicin nanoparticles at the PCV tracheostomy tube surface limiting bacterial biofilm formation. *Materials.* 2023;16(10): 3765 doi:10.3390/ma16103765. **Punktacja MEiN 140, IF 3,87.**

Ponadto bezpośrednio z tematyką rozprawy doktorskiej związane są następujące publikacje, w których Doktorant jest współautorem:

1. Drożdż K, Ochońska D, **Ścibik Ł**, Gołda-Cępa M, Biegun K, Brzychczy-Włoch M. The Frequency of Occurrence of Resistance and Genes Involved in the Process of Adhesion and

Accumulation of Biofilm in Staphylococcus aureus Strains Isolated from Tracheostomy Tubes. *Microorganisms*. 2022;10(6):1210. doi:10.3390/microorganisms10061210.

2. Ochońska D, Ścibik Ł, Brzychczy-Włoch M. Biofilm Formation of Clinical Klebsiella pneumoniae Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity. *Pathogens*. 2021;10(10):1345. doi: 10.3390/pathogens10101345.

3. Drożdż K, Ochońska D, Ścibik Ł, Brzychczy-Włoch M. Ocena tworzenia biofilmu przez szczepy kliniczne Staphylococcus aureus wyizolowane od pacjentów z tracheostomią. *Forum Zakażeń*. 2019;10(4):253-5.

Z dostępnego piśmiennictwa i danych klinicznych wynika, że zabieg tracheotomii należy do jednych z najstarszych zabiegów chirurgicznych, a jego wykonanie przypisuje się Asklepiadesowi około 100 lat przed naszą erą.

W terminologii medycznej istnieją dwie nazwy, które często są mylone i używane zamiennie. Tracheotomia to termin dotyczący samej procedury zabiegu, a w literaturze anglojęzycznej odnosi się do wytworzenia tracheostomii czasowej. Drugim terminem jest tracheostomia, która odnosi się do wytworzonego otworu w trakcie zabiegu, a w literaturze anglojęzycznej odnosi się do zabiegu tracheostomii stałej.

Do zabezpieczenia otworu tracheostomijnego przed jego zamykaniem służą rurki tracheostomijne. Najpopularniejsze rurki wykonane są z poli(chlorku winylu), a ich popularność wynika z niskiej ceny zakupu oraz samych właściwości polimeru m.in. odporność na działanie czynników stosowanych do dezynfekcji urządzeń medycznych i duża wytrzymałość mechaniczna.

Wprowadzenie biomateriałów do leczenia pacjentów zrewolucjonizowało nowoczesną medycynę i obecne standardy terapii chorego są nierozzerwalnie związane z użyciem sprzętu wykonanego z polimerów syntetycznych. Zastosowanie ich do powszechnego użytku medycznego spowodowało pojawienie się problemu zakażeń związanych z biomateriałami.

Zatem podjęcie pracy, dotyczącej opracowania sfunkcjonalizowanej powierzchni poli(chlorku winylu), z którego zbudowana jest rurka tracheostomijna, nanocząstkami antybiotyku – gentamycyny, jest jak najbardziej celowe i trafnie wybrane.

Rozprawa w formie wydruku komputerowego bardzo starannie wykonanego zawiera 2 tabele i 30 kolorowych rycin oraz podzielona jest na 9 głównych rozdziałów: wprowadzenie, cel pracy, techniki badawcze, wyniki wraz z ich omówieniem, wnioski, podsumowanie, spis tabel i rycin, piśmiennictwo oraz aneks.

We wstępie Doktorant przedstawił:

- Aspekty kliniczne w projektowaniu biomateriału, w tym; historię zabiegu tracheotomii; podział, wskazania i przeciwwskazania do tracheostomii; budowę rurki tracheotomijnej.
- Aspekty mikrobiologiczne w projektowaniu biomateriału, w tym; problematykę zakażeń związanych z użytkowaniem sprzętu medycznego; biofilm bakteryjny.
- Aspekty fizykochemiczne w projektowaniu biomateriału, w tym; opis nanomedycyny jako dziedziny nauki; funkcjonalizację powierzchni; właściwości fizykochemiczne biomateriału, a jego biozgodność.

Rozdział ten jest napisany w sposób syntetyczny i oparty jest na podstawie polskiego i głównie anglojęzycznego piśmiennictwa.

Celem pracy było:

- Określenie profilu bakterii tworzących biofilm na powierzchni rurek tracheostomijnych używanych przez pacjentów poddanych zabiegowi tracheotomii wraz z oceną lekooporności wyizolowanych drobnoustrojów na antybiotyki.
- Dwuetapowa funkcjonalizacja powierzchni poli(chloroku winylu): wprowadzenie tlenowych grup funkcyjnych (wykorzystując plazmę tlenową), nanocząstek gentamycyny (stosując metodę sonochemiczną) oraz kompleksowa charakterystyka fizykochemiczna badanych układów.

Ocena skuteczności funkcjonalizacji powierzchni i jej wpływu na wzrost biofilmu bakteryjnego przy wykorzystaniu szczepów referencyjnych *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. Ocena cytotoksyczności otrzymywanych biomateriałów z wykorzystaniem linii komórkowej A549.

Materiał badań stanowiły rurki tracheostomijne pozyskiwane od pacjentów hospitalizowanych w 5 Wojskowym Szpitalu Klinicznym z Polikliniką w Krakowie, w tym: 35 pacjentów było hospitalizowanych w Klinice Otolaryngologii i Chirurgii Onkologicznej Głowy i Szyi, 10 pacjentów było hospitalizowanych w Klinice Anestezjologii i Intensywnej terapii. Łącznie do badania włączono 45 pacjentów po zabiegu tracheostomii (35 mężczyzn i 10 kobiet) w wieku 36-94 lata (średnia 75 lat). Charakterystykę pacjentów oraz szczegółowy proces preparatyki opisano w publikacji nr 1.

Materiał do badań eksperymentalnych uzyskano od producenta rurek tracheostomijnych (firma SUMI, Sulejówek, Polska). Producent dostarczył sterylnie zapakowane krążki o wymiarach 15 mm średnicy i 2 mm grubości, wycięte z tego samego materiału z jakiego wykonywane są rurki tracheostomijne z poli(chloroku winylu).

Metodyka badań obejmowała:

- Do badania użyto siarczan gentamycyny (Biological Industries (Izrael)/SARTORIUS) o wzorze sumarycznym C₆₀H₁₂₇N₁₅O₂₆S i masie cząsteczkowej 575,67 pakowany w zamkniętych opakowaniach po 5 g.

- W badaniu wykorzystano dwa szczepy referencyjne (wskaźnikowe), w tym przedstawiciela bakterii Gram-dodatnich – gatunek *Staphylococcus aureus* ATCC25923 oraz przedstawiciela bakterii Gram-ujemnych – gatunek *Escherichia coli* ATCC25922. Szczepy pochodziły z American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, Wirginia, USA. Do obserwacji kolonii bakteryjnych pod mikroskopem optycznym użyto standardowego zestawu do barwienia metodą Grama (Merck, Poland).

-Do badania cytotoksyczności użyto model gruczolakoraka ludzkiej linii komórek podstawnych nabłonka pęcherzyków płucnych A549 ATCC CCL185. Komórki hodowano w pożywce DMEM z -L-glutaminą uzupełnioną 10% FBS i 1% ZellShield (MB Minerva Biolabs) w 5% CO₂ i 37°C z L-alanylo-L-glutaminą (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Komórki zawarte w 1 ml zawiesiny zliczono i rozcieńczono uzyskując 1 x 10⁴ komórek na próbkę.

- Zastosowano metody podwójnego barwienia przy użyciu zestawu LIVE/DEAD (Live/Dead Cell Double Staining Kit, Molecular Probes), które pozwalają w łatwy i szybki sposób określić żywotność komórek w populacji w oparciu o integralność błony komórkowej. Barwnik diocetan fluoresceiny dzięki małej masie cząsteczkowej jest w stanie wnikać do wnętrza komórki o zachowanych błonach cytoplazmatycznych. Drugi barwnik jodek propidyny – PI (ang. propidium iodide) posiadający dużą masę cząsteczkową wnika tylko do komórek posiadających uszkodzenia w błonie cytoplazmatycznej.

- Metodę utrwalenia preparatów komórkowych do obrazowania w skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).

- Metody fizykochemiczne, w tym; modyfikację plazmą tlenową, termogravimetrię (TGA) i termiczną analizę różnicową (DTA), spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), syntezę nanocząstek gentamycyny i ich depozycję na powierzchni PVC, pomiar rozkładu wielkości nanocząstek przy wykorzystaniu techniki NTA, kinetykę uwalniania gentamycyny, obrazowanie mikroskopowe techniką SEM i AFM.

- Metody mikrobiologiczne i biologii komórki, w tym; technikę izolacji i identyfikacji szczepów bakteryjnych z materiału biologicznego, ocenę lekooporności szczepów klinicznych, ocenę cytotoksyczności gentamycyny i sfunkcjonalizowanej powierzchni poli(chlorku winylu), ocenę wzrostu biofilmu bakteryjnego na sfunkcjonalizowanej powierzchni poli(chlorku winylu),

Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie, nr 1072.6120.153.2019.

W wynikach badań Doktorant stwierdził, że:

- *W wynikach mikrobiologicznych*; wszystkie rurki tracheostomijne uzyskane od pacjentów były dodatnie w posiewach. Łącznie wyizolowano i zidentyfikowano 58 izolatów (10 gatunków). Na 37 rurkach tracheostomijnych zidentyfikowano 2 i więcej mikroorganizmów. Szczegółowe dane co do zidentyfikowanych gatunków zawarte są w tabeli 2 publikacji I cyklu doktorskiego.

- *W funkcjonalizacji powierzchni*; czas funkcjonalizacji mieścił się w zakresie 6-600 sekund, a najniższy kąt zwilżania uzyskano po 180 sekundach; przedłużony czas ekspozycji >180 sekund powodował wzrost kąta zwilżania; należy zauważyć, że największy spadek kąta zwilżania następuje w pierwszych kilkudziesięciu sekundach; dla próbek przed i po procesie funkcjonalizacji nie obserwuje się zmian w topografii powierzchni; zmiana w kącie zwilżania nie wynika zatem ze zmiany topograficznej, lecz z generowanych grup funkcyjnych poprzez łagodną obróbkę plazmą tlenową; synteza nanocząstek gentamycyny wykazuje zdolności ich do aglomeracji; analiza spektroskopowa sfunkcjonalizowanej powierzchni poli(chloru winylu) wykazała brak wpływu plazmy tlenowej na strukturę PVC i badanie potwierdziło obecność gentamycyny na powierzchni PVC; profile uwalniania pokazują ośmiokrotny wzrost ilości gentamycyny dla próbki z powierzchniowymi grupami tlenu w stosunku do próbki nietraktowanej plazmą tlenową.

- *W analizie biogodności i efektu terapeutycznego*; obrazy spod mikroskopu optycznego oraz mikroskopu skaningowego pokazały efekt wpływu nanocząstek gentamycyny na linię komórkową A549 zbadany testem kalorymetrycznym MTT; w przeprowadzonym badaniu oceny cytotoksyczności na linii komórkowej A549 nie zaobserwowano znacznego wpływu sfunkcjonalizowanych powierzchni na śmiertelność komórek w odniesieniu do grupy kontrolnej, co świadczy o jego biokompatybilności; wykazano właściwość antybakteryjną spadek liczby bakterii z $1,65 \cdot 10^5$ jtk/ml do $2 \cdot 10^1$ jtk/ml PVC modyfikowanego nanocząstkami gentamycyny (GMNPs) względem *E. coli* ATCC25922 ($p < 0.05$); stwierdzono istotnie statystycznie hamujący wpływ nanocząstek na adhezję do poli(chloru winylu).

Wnioski w liczbie 7, oparte na własnych badaniach i spostrzeżeniach Doktoranta, są rozwiązaniem podjętego celu pracy i przedstawiają się następująco:

1. Analiza mikrobiologiczna rurek tracheostomijnych pozyskanych od pacjentów z tracheostomią wykazała, że rurki stanowią źródło potencjalnie patogennych mikroorganizmów i stanowią realne zagrożenie dla pacjentów je użytkujących.

2. Badania fizykochemiczne pokazały, że struktura polimeru podczas użytkowania ulega znacznemu uszkodzeniu, co dodatkowo tworzy nisze do rozwoju biofilmu bakteryjnego.
3. W niniejszej pracy doktorskiej wykorzystano szereg eksperymentów z zakresu chemii powierzchni i mikrobiologii, aby poprawić właściwości powierzchni PVC do stosowań u pacjentów z tracheostomią. Wybrane metody pozwoliły na opracowanie nowatorskiej sfunkcjonalizowanej powierzchni PVC o właściwościach biozgodnych z tkankami oraz wykazującej właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Badania przeprowadzono zgodnie z zasadami „green chemistry” – metody mają być proste, bardziej opłacalne ekonomicznie, a przede wszystkim przyjazne dla środowiska.
4. Podsumowanie przeprowadzonych badań doświadczalnych schematycznie przedstawiono na rycinie 29, gdzie pokazano kolejne etapy funkcjonalizacji oraz działania opracowanej powierzchni rurki tracheostomijnej. W etapie I następuje wygenerowanie powierzchniowych grup funkcyjnych - efekt ten uzyskiwano przy zastosowaniu plazmy tlenowej. Etap II to zakotwiczenie na powierzchni nanocząstek gentamycyny z wykorzystaniem metody sonochemicznej. Etap III to określenie profilu uwalniania leku z powierzchni określającego możliwość uzyskania dawki terapeutycznej przy zastosowanej funkcjonalizacji.
5. Zastosowanie plazmy tlenowej i sonochemii pozwoliło na klinicznie istotne załadowanie leku, którego działanie przeciwdrobnoustrojowe potwierdzono na referencyjnych szczepach bakteryjnych *S. aureus* i *E. coli*.
6. Biozgodność materiału potwierdzona za pomocą testów oceniających cytotoksyczność wytworzonej powierzchni potwierdziła brak negatywnego efektu na linię komórkową A549. Ocena cytotoksyczności oraz właściwości antybakteryjnych otrzymanej powierzchni stanowiła etap IV badań.
7. Zaprojektowana metodologia może w przyszłości posłużyć do wytworzenia nowej rurki tracheostomijnej dla pacjentów, która będzie hamować rozwój biofilmu bakteryjnego, a przez to będzie zdecydowanie bezpieczniejsza w użytkowaniu, szczególnie u pacjentów, którzy nie są w stanie dbać o prawidłową toaletę tracheostomii.

Piśmiennictwo, liczące 83 pozycje, obejmuje doniesienia obcojęzyczne w 96,4% i polskie w 3,6%. Piśmiennictwo zostało dobrane tematycznie, ale niektóre pozycje jak: 3, 4 mają już znaczenie historyczne.

Z obowiązku recenzenta podaję również inne uwagi:

- w pracy stwierdzono drobne błędy literowe i interpunkcyjne oraz niektóre niefortunne zdania,

- w niektórych pozycjach piśmiennictwa brakuje tomu lub stron.

Powyższe uwagi nie umniejszają istoty wartości przedstawionej do oceny pracy, a są tylko pewnymi sugestiami ułatwiającymi przygotowanie kolejnych prac do publikacji.

Stwierdzam, że praca **lek. Łukasza Andrzeja Ścibika** stanowi samodzielny dorobek naukowy Autora, który wykazał znajomość podjętego tematu na równi z umiejętnością prowadzenia pracy naukowej i łącznie z posługiwaniem się piśmiennictwem.

Przedstawiona mi praca odpowiada warunkom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu i spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. 2023, poz. 742) i na tej podstawie pozwalam sobie wystąpić do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki medyczne UJ w Krakowie z wnioskiem o dopuszczenie **lek. Łukasza Andrzeja Ścibika** do dalszych etapów przewodu doktorskiego **i jednocześnie ze względu na duże walory naukowe oraz praktyczne zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy.**

.....