



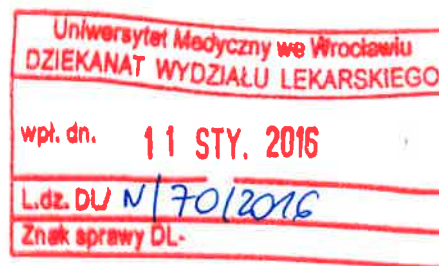
Dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska, prof. nadzw. UWr

Zakład Mikrobiologii

Instytut Genetyki i Mikrobiologii

Uniwersytet Wrocławski

5.01.2016



Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Nowickiej z Katedry i Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego
we Wrocławiu

pt. " Wpływ wybranych związków przeciwdrobnoustrojowych na tworzenie biofilmu przez szczepy
gronkowców na implantach ortopedycznych"

Promotor: prof. dr hab. Grażyna Gościńskiak

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* od wielu lat plasują się na czele statystyk wśród drobnoustrojów powodujących zakażenia szpitalne. Jest to wynikiem szerokiego ich rozprzestrzenienia w populacji ludzkiej i powszechnej kolonizacji skóry czy śluzówek. Dodatkowym ważnym problemem epidemiologicznym jest łatwe i szybkie nabywanie przez te bakterie oporności na wiele antybiotyków, co skutkuje selekcją szczepów opornych w środowisku szpitalnym.

Podjęcie tematyki udziału gronkowców koagulazoujemnych w zakażeniach związanych ze stosowaniem biomateriałów jest trafny, aktualny i bardzo potrzebny z praktycznego punktu widzenia. Równie istotnym, bardzo aktualnym aspektem badawczym w mikrobiologii są badania nad biofilmami bakteryjnymi, które również podjęto w przedstawionej do recenzji pracy. Pomimo dużej wiedzy jaką obecnie posiadamy w tym zakresie, wiele aspektów szczególnie dotyczących interakcji pomiędzy bakteriami tworzącymi te struktury nadal pozostaje nierozwiązanych, a wiedza w tym zakresie ma ogromny wpływ na możliwości leczenia zakażeń. W tym aspekcie podjęcie badań przez Doktorantkę w zakresie tematyki dotyczącej tworzenia biofilmu na implantach ortopedycznych jest trafny i oryginalny. Do innowacyjnych elementów badań niewątpliwie należy zaliczyć użycie peptydu przeciwdrobnoustrojowego Camel w eradykacji biofilmu tworzonego przez gronkowce.

Praca ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. W pracy wyróżniono: wprowadzenie, wstęp, cel pracy, materiał, metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie oraz piśmiennictwo.

Wstęp w sposób bardzo wyczerpujący wprowadza w eksperymentalną część pracy. Autorka szczegółowo omawia zarówno zagadnienia ważne z typowo medycznego punktu widzenia tj. biomateriały i implanty stosowane w ortopedii czy ograniczenia tworzenia biofilmu na powierzchni

implantów, ale także zagadnienia typowo mikrobiologiczne. Dokładnie przedstawiona jest charakterystyka gronkowców koagulazoujemnych, drobiazgowo omówione zostały zagadnienia dotyczące powstania biofilmu bakteryjnego oraz charakterystyka zastosowanych w pracy związków przeciwdrobnoustrojowych. Na wyróżnienie zasługuje bardzo dobrze opracowany rozdział omawiający ograniczenia tworzenia biofilmu na powierzchni implantów. Rozdział ten w sposób wyczerpujący bardzo ciekawy i szczegółowy omawia literaturę dostępną w tym zakresie. Ta część pracy została bardzo dobrze opracowana.

Poprawność formułowania hipotez i problemów badawczych stawianych przez Doktorantkę oceniam bardzo dobrze. Cele przedstawiono poprawnie i bardzo zwięźle. Głównym celem pracy była analiza wpływu wybranych związków przeciwdrobnoustrojowych na proces tworzenia oraz eradykacji struktur biofilmu, utworzonych na stalowych, tytanowych i pokrytych warstwą nanokrystalicznego diamentu wkrętach do kości korowej. Główny cel pracy został zrealizowany, a otrzymane wyniki pozwoliły na sformułowanie ważnych wniosków.

W swojej pracy Doktorantka wykorzystała metody mikrobiologiczne, metody z obszaru biologii molekularnej oraz mikroskopii. Zastosowała podstawowe metody związane z przechowywaniem szczepów, hodowlą i identyfikacją bakterii oraz oceną zdolności do wytwarzania śluzu czy wytwarzania biofilmu przez bakterie. Oznaczyła także wrażliwość analizowanych szczepów na wybrane antybiotyki oraz badała wpływ antybiotyków na biofilm gronkowców, a także dokonała oceny wpływu antyseptyków na biofilm. Interesującym punktem badań było poszukiwanie genów mających wpływ na tworzenie biofilmu. Ciekawym i ważnym elementem w badaniach prowadzonych przez Doktorantkę było zastosowanie mikroskopii elektronowej, mikroskopii laserowej 3D oraz mikroskopii konfokalnej. Doktorantka dla pełnej analizy wyników zastosowała także oznaczenia statystyczne. Metody do badań zostały wybrane trafnie i umiejętnie zastosowane. Opracowanie rozdziałów Materiały i Metody oceniam pozytywnie, niemniej pragnę wskazać na kilka kwestii.

W części metodycznej zabrakło informacji (schematu), które z eksperymentów wykonywane będą na jakiej liczbie szczepów oraz z wykorzystaniem których biomateriałów. Taki schemat znacząco usprawniłby dalszą analizę wyników pracy. W rozdziale omawiającym wyniki Autorka często pokazuje wyniki dla wybranych szczepów bakterii, istotnym byłoby wskazanie w rozdziale dotyczącym metodyki badań, dlaczego te, a nie inne szczepy zostały wybrane. W zaproponowanych metodach można by także uwzględnić dodatkowo identyfikację bakterii z zastosowaniem metody MALDI-TOFF oraz badania nad opornością bakterii na antybiotyki z wykorzystaniem metod PCR.

Rozdział przedstawiający wyniki stanowi sporą część pracy i jest bogaty w dokumentację zdjęciową, wykresy i tabele. Przeprowadzone badania i uzyskane wyniki wnoszą wiele praktycznej wiedzy mogącej z powodzeniem zostać wykorzystanej w ortopedii, ale jednocześnie uzupełniają naszą wiedzę w

zakresie badań podstawowych dotyczących wirulencji *S. epidermidis* oraz *S. haemolyticus*. Zasadniczo ta część pracy jest poprawnie opracowana, aczkolwiek w kilku aspektach brakuje informacji pozwalających na prawidłową ocenę prezentowanych danych, dlatego proszę Doktorantkę o odpowiedź na kilka pytań.

W omawianych wynikach Autorka często analizuje uzyskane dane w odniesieniu do dwóch analizowanych gatunków bakterii tj. *S. epidermidis* oraz *S. haemolyticus*, natomiast nie ma w wynikach (poza kilkoma fragmentami) odniesień do konkretnych numerów badanych szczepów. Taka informacja winna być umieszczona m.in. w opisie zdjęć produktów amplifikacji genów, wzorów genotypowych czy ilościowej oceny zdolności tworzenia biofilmu, gdyż np. na wykresach 11-16 numeracja szczepów nie jest zgodna z numeracją podaną w rozdziale Materiały w tabelach 5-9. Jako, że do kolejnych etapów badań Doktorantka wybrała szczepy oznaczone jako tworzące biofilm, na stronie 119 należało wymienić jakie Doktorantka bierze pod uwagę, tym bardziej że na wykresach 17-20 pokazano wyniki tylko dla 4 szczepów.

W związku z tym proszę Doktorantkę o odpowiedź czy dla szczepów pozyskiwanych z krwi, rany czy biomateriałów charakterystyczny jest któryś z wyznaczonych wzorów genotypowych?

W opinii Recenzenta tak pogłębiona analiza jest bardzo potrzebna, gdyż koreluje ona z rodzajem materiału z jakiego izolat został pozyskany, a więc daje odpowiedź dotyczącą konkretnych czynników wirulencji w zależności od miejsca bytowania bakterii. Takie zestawienie całościowe byłoby cennym materiałem do analiz i powinno być dołączone w przyszłości do publikacji. Interesującym byłoby zestawienie zbiorcze wszystkich cech fenotypowych i genotypowych uzyskanych dla poszczególnych szczepów. Na tej podstawie można by było wyciągnąć dodatkowe wnioski dotyczące wirulencji badanych szczepów w korelacji do miejsca ich bytowania w organizmie człowieka.

W części wyników dotyczących wpływu chlorheksydydny na tworzenie biofilmu Autorka pisze na stronie 132: „Wśród szczepów *S. epidermidis* 100% redukcję liczby komórek zaadherowanych do biomateriału zaobserwowano u 21%, u kolejnych 52% redukcję w zakresie 75%-99%”. Moje pytanie dotyczy sposobu uzyskania tych danych, jak były one wyliczane?

W odniesieniu do prezentowanych wyników proszę o wytłumaczenie jak Doktorantka rozumie używane przez siebie stwierdzenie: „redukcja biomasy pod wpływem zastosowanego antybiotyku przyjmuje wartość ujemną”.

Na stronie 147 Doktorantka pisze: „Redukcja utworzonego biofilmu pod wpływem peptydu zależna jest od stężenia antybiotyku”. Jak należy to rozumieć? Takich danych nie przedstawiono w rozdziale 6.3.16.

Na wykresach 27, 28, 33, 34, 38 i 39 zabrakło pełnego opisu obu osi, znacząco poprawiłoby to możliwość analizy uzyskanych przez Doktorantkę wyników.

Całościowe spojrzenie na wyniki umieszczone w rozprawie doktorskiej pozwala mi stwierdzić, iż przeprowadzone eksperymenty były niezwykle pracochłonne i wymagały dużego zaangażowania Autorki rozprawy. Zdaję sobie sprawę, iż przy analizie tak dużej ilości danych, w oparciu o badania na tak dużej populacyjnie grupie szczepów, niezwykle trudnym jest takie ich przedstawienie, aby wszystkie aspekty zostały w równym stopniu uwypuklone. W zdecydowanej większości Doktorantka podołała temu trudnemu zadaniu.

Dyskusja napisana jest w sposób wyczerpujący i bardzo ciekawy, świadczy o dużej znajomości tematu przez Doktorantkę. Wnioski są trafne i syntetycznie ujęte.

Autorka rozprawy cytuje 193 prace zarówno anglojęzyczne jak i polskojęzyczne. Wśród cytowanych prac ponad pięćdziesiąt jest z lat 2013-2015, co świadczy o bardzo aktualnym piśmiennictwie. Czasami w pracy Autorka pomija cytowania, szczególnie jest to ważne we fragmentach, w których mówi o tym, iż „wielu autorów uważa” czy „opisywana jest w literaturze” (strona 21), a nie podaje tej literatury w tym miejscu, czy nie podaje wspomnianych autorów (strona 53).

Praca napisana jest poprawnie pod względem formalno-językowym. W pracy Autorka nie ustrzegła się jednak drobnych błędów stylistycznych oraz interpunkcyjnych, a także czasami tzw. żargonu naukowego. Niezbyt trafne sformułowanie odnajdujemy na stronie 38: „ Czyli tym samym biofilm aby nie zginąć z powodu braku pokarmu lub samozatrucia metabolitami wydała związki świecące informujące o konieczności zaprzestania rozmnażania”. W mojej opinii szczególnie sformułowanie: „wydała związki świecące” jest nieprawidłowe. W pracy nie została także ujednoczona nomenklatura dotycząca nazewnictwa grup bakterii, tj. bakterie Gram-ujemne oraz Gram-dodatnie pisane są w różny sposób: jako Gram+, gram dodatnie czy Gram-dodatnie, a także G+ oraz G-.

Powracając do tego, co jest w mojej opinii najważniejszym aspektem ocenianej rozprawy, należy stwierdzić, iż mgr Joanna Nowicka w swojej pracy doktorskiej uzyskała bardzo ciekawe i ważne naukowo wyniki. Do najważniejszych wyników rozprawy doktorskiej mgr Joanny Nowickiej zaliczyć należy:

1. stwierdzenie, iż najbardziej podatnym materiałem na tworzenie biofilmu okazują się implanty stalowe, a najbardziej opornym implanty pokryte warstwą nanokrystalicznego diamentu;
2. wskazanie, iż szczepy *S. haemolyticus* wykazują większą aniżeli *S. epidermidis* wrażliwość na antyseptyki i peptyd Camel i jednocześnie większą niż *S. epidermidis* oporność na antybiotyki;
3. wykazanie, iż peptyd Camel zmniejsza zdolności adhezyjne gronkowców i tworzenie biofilmu;

Bardzo interesującym wnioskiem o zastosowaniu praktycznym jest ten mówiący o tym, że materiałem na którym gronkowce tworzyły biofilm w najmniejszym stopniu, był nanokrystaliczny diament.

Przedstawiona mi do recenzji praca pt. „Wpływ wybranych związków przeciwdrobnoustrojowych na tworzenie biofilmu przez szczepy gronkowców na implantach ortopedycznych” wymagała dużej pracowitości i dokładności, aby uzyskać wyniki możliwe do interpretacji. Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi krytyczne i pytania w żadnym stopniu nie umniejszają wartości naukowej przedstawionej pracy i są elementem dyskusji z Doktorantką. Warto podkreślić, iż wyniki badań były opublikowane w jednej pracy, a także prezentowane na 3 konferencjach naukowych.

Podsumowując pragnę stwierdzić, iż rozprawa doktorska mgr Joanny Nowickiej została dobrze przygotowana i wykonana, uzyskano cenne wyniki. Stwierdzam iż: „Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.)”.

Zwracam się do wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z uprzejmą prośbą o dopuszczenie mgr Joanny Nowickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie i nagrodzenie rozprawy doktorskiej.

KIEROWNIK
Zakładu Mikrobiologii

dr hab. Gabriela Bugła-Płoskońska, prof. nadzw. UWr

Dr hab. Gabriela Bugła-Płoskońska, prof. nadzw. UWr