

Rozprawy doktorskiej Pani mgr analityki medycznej Joanny Nowickiej p.t.

„Wpływ wybranych związków przeciwdrobnoustrojowych na tworzenie biofilmu przez szczepy gronkowców na implantach ortopedycznych”

**Wykonanej w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu**

Promotor: Prof. dr hab. Grażyna Gościński

Zakażenia występujące u pacjentów z wprowadzonym wszczepem są istotnym problemem w chirurgii implantacyjnej. Wszczepy mogą być naturalne (własne tkanki) lub sztuczne, wykonane z biomateriałów. Dlatego w przypadku tych drugich zakażenia okołowszczepowe noszą nazwę zakażeń związanych z biomateriałem (BAIs – *Biomaterial Associated Infections*). Wszczepy mają szerokie zastosowanie w zabiegach ortopedycznych (endoprotezy stawów), w traumatologii narządu ruchu (płytki i śruby/wkręty do stabilizacji osteosyntezy płytkowej, gwoździe śródszpikowe i stabilizatory zewnętrzne), w chirurgii stomatologicznej i szczękowo-twarzowej (implanty stomatologiczne i uzupełnienia ubytków w chorobach nowotworowych), w kardiochirurgii (sztuczne zastawki, wszczepy naczyniowe) oraz w neurochirurgii (zastawki).

Zakażenia okołowszczepowe mogą doprowadzić do nieprawidłowego zrostu lub braku zrostu odłamów kostnych, do zapalenia skóry i błon śluzowych, również do zakażeń ogólnoustrojowych, zwłaszcza u pacjentów poddanych leczeniu immunosupresyjnemu. Powikłania te przedłużają hospitalizację, zwiększają koszty leczenia, a często obniżają jakość, w tym funkcjonalność życia pacjentów.

Właśnie tym zagadnieniom jest poświęcona oceniana praca, gdzie nadrzędnym celem jest scharakteryzowanie pod względem fenotypowym i genotypowym szczepów gronkowców koagulazujących, przede wszystkim *S. epidermidis* i *S. haemolyticus*, czynników etiologicznych zakażeń związanych ze stosowaniem biomateriałów w implantach ortopedycznych.

Autorka niniejszej pracy podjęła się ambitnego zadania – próby odpowiedzi na pytanie, jaka jest wrażliwość tych drobnoustrojów na wybrane przeciwgronkowcowe antyseptyki i endogenny antybiotyk peptydowy, i jaki te związki przeciwdrobnoustrojowe mają wpływ na adhezję, tworzenie biofilmu oraz dojrzały biofilm utworzony na implantach ortopedycznych.

Całość pracy, bardzo obszerna stanowi: 207 stron tekstu o typowym układzie dla rozpraw doktorskich, tj. wprowadzenie, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski i streszczenia w języku polskim i angielskim. Ponadto na początku pracy umieszczono wykaz skrótów użytych w tekście, spis tabel, rycin i wykresów. Dodatkowo jest także zamieszczony skan dokumentu wydanego przez Komisję Bioetyczną przy AM we Wrocławiu wyrażającego zgodę przeprowadzenie badania będącego podstawą do ocenianej rozprawy doktorskiej. Wykaz piśmiennictwa (193 pozycji) zawiera wiele pozycji prac polskich i zagranicznych. Niestety, wykaz alfabetyczny (dopuszczalny i często praktykowany w pracach doktorskich), a nie kolejność cytowania, bardzo utrudnia czytającemu celowość oraz prawidłowość cytowania. Na początku pracy zamieszczono listę zawierającą tytuły: pracy oraz wystąpień na zjazdach i konferencjach, w których były wykorzystane częściowe wyniki badań ocenianej rozprawy.

W bardzo ciekawym wstępie Autorka opisuje biomateriały i implanty stosowane w ortopedii. Następnie bardzo szczegółowo charakteryzuje szczepy gronkowców koagulazoujemnych, w tym omawia morfologię, wyznaczniki chorobotwórczości, znaczenie kliniczne, oporność na antybiotyki, ich wpływ na układ immunologiczny dla dwóch gatunków *S. epidermidis* *S. haemolyticus*. Dalej Doktorantka podaje najważniejsze informacje dotyczące biofilmu, opisując poszczególne etapy formowania się biofilmu, oraz charakteryzuje szczepy gronkowcowe tworzące tą strukturę. Także bardzo ciekawe są podrozdziały omawiające zakażenia na oddziałach ortopedycznych związane ze stosowaniem biomateriałów i możliwości ograniczenia tworzenia biofilmu na powierzchniach implantów. W ostatniej części wstępu zawarte są informacje dotyczące związków przeciwdrobnoustrojowych zastosowanych w pracy, w tym antybiotyków (cefazolinę - stosowaną w profilaktyce okołozabiegowej i gentamycynę – najczęściej stosowaną w miejscowej aplikacji), antyseptyków jak chlorheksydyna czy dichlorowodorek oktenidyny i mały peptyd przeciwdrobnoustrojowy o nazwie Camel.

Nadrzędnym **celem pracy** jest jej aspekt praktyczny. Mianowicie Pani magister Joanna Nowicka w swej pracy przeprowadziła analizę wpływu wybranych związków przeciwdrobnoustrojowych na proces tworzenia a także eradykację struktur biofilmu tworzącego się na stalowych, tytanowych i pokrytych nanokrystalicznym diamentem wkrętach do kości korowej. Cel pracy zrealizowała poprzez scharakteryzowanie właściwości feno- i genotypowych szczepów CNS izolowanych, jako czynniki etiologiczne zakażeń u pacjentów ortopedycznych, następnie określiła ich wrażliwość na wybrane środki przeciwegronkowcowe, na koniec przeprowadziła analizę wpływu tych środków na adhezję i tworzenie się oraz na dojrzały biofilm utworzony na implantach ortopedycznych.

Materiał i metody przedstawiono bardzo dokładnie, aż na 30 stronach maszynopisu, opisując szczegółowo pochodzenie szczepów CNS (kliniczne, z biomateriałów i referencyjne), a na zdjęciach zademonstrowano biomateriały wykorzystane do badań -trzy wkręty – implanty do osteosyntezy. Omówiono także wszystkie metody zastosowane w ocenianej rozprawie. Szczegółowo opisano metodę oceny zdolności wytwarzania śluzu przez gronkowce – test CRA, metodę płytkową Christensena – ocena zdolności wytwarzania biofilmu, także metody oceniające właściwości hydrofobowe badanych szczepów gronkowcowych. W drugiej części omówiono metody określające wrażliwość analizowanych szczepów na wybrane antybiotyki (jakościowe i ilościowe), następnie metody genetyczne umożliwiające określenie częstości występowania genów mających wpływ na tworzenie biofilmu. Opisano także metody (jakościowa i ilościowa) oceniające tworzenie się biofilmu gronkowcowego na wkrętach, oraz metody oceniające wpływ wybranych środków przeciwegronkowcowych na różne formy biofilmu. Na koniec omówiono zastosowane metody mikroskopowe tj. mikroskopii elektronowej, laserowej 3D oraz konfokalnej.

W oznaczeniach statystycznych wykorzystano odpowiednie testy (test T- Studenta, Manna-Whitneya, test χ^2 , test Fishera czy test trendu Cochрана- Armitagea.).

Wyniki przedstawiono na 55 stronach maszynopisu, dane- wyniki zebrano w 14 tabelach, a tekst zilustrowano 42 wykresami i 28 zdjęciami, w tym zdjęciami z mikroskopu laserowego 3D, mikroskopu skaningowego oraz konfokalnego.

Wyniki podzielono na 3 części.

Pierwsza z nich to charakterystyka fenotypowa i genotypowa analizowanych szczepów. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w ocenie zdolności produkcji śluzu u analizowanych gatunkach CNS, chociaż szczepy *S. haemolyticus* produkujące śluz częściej izolowano z krwi i wymazów z ran, natomiast z biomateriałów szczepy *S. epidermidis*.

Co do możliwości tworzenia biofilmu, szczepy z gatunku *S. haemolyticus* wykazały istotnie statystycznie, większą zdolność do tworzenia biofilmu, Co ciekawe, na biomateriałach były to szczepy *S. epidermidis* i ani jeden szczep z gatunku *S. haemolyticus*.

Dalej nie wykazano różnic istotnych statystycznie, w ocenie hydrofobowości pomiędzy gatunkami, traktując poszczególne kategorie hydrofobowości, jako zmienną porządkową.

U szczepów *S. haemolyticus* wykazano wyższą oporność na zastosowane antybiotyki. W zakresie charakterystyki genotypowej istotnie statystycznie częściej wykazano u szczepów *S. epidermidis* występowanie genów operonu, *icaADBC* (odpowiedzialne za wytwarzanie PIA). Geny *ebp* (odpowiedzialne za adhezję specyficzną), *bhp* (istotne w fazie akumulacji biofilmu), *aap* (istotne w fazie akumulacji biofilmu), *atlE* (odpowiedzialne za adhezję specyficzną) istotnie statystycznie częściej występowały u szczepów *S. epidermidis*.

W drugiej części wyników Doktorantka oceniła tworzenie biofilmu przez szczepy gronkowcowe na implantach (wkrętach) do osteosyntezy.

Analiza jakościowa zdolności tworzenia biofilmu na wkrętach do kości korowej wykazała, że biomateriałem najbardziej podatnym do tworzenia biofilmu okazały się wkręty stalowe, najbardziej opornym implanty pokryte warstwą nanokrystalicznego diamentu. W ocenie ilościowej stwierdzono, że szczepy *S. epidermidis* częściej tworzyły biofilm. Ilościowa ocena z oznaczeniem, CFU/ml, mikroskopia skaningowa i konfokalna wykazały korelację z metodą jakościową. W efekcie tych badań można stwierdzić, że biomateriałem, na którym biofilm tworzył się najwolniej był nanokrystaliczny diament, a dominującym gatunkiem tworzącym biofilm był gatunek *S. epidermidis*.

Trzecia część wyników dotyczy oceny wpływu wybranych związków przeciwdrobnoustrojowych na proces adhezji i formowania biofilmu na wkrętach do kości korowej oraz skuteczności preparatów w redukcji dojrzałej struktury biofilmu. Po określeniu MIC w hodowli planktonowej i biofilmie wszystkich stosowanych do oceny związków ustalono, że: dichlorowodorek oktenidyny nie wykazał istotnej różnicy na tworzenie biofilmu

pomiędzy analizowanymi gatunkami, natomiast wpływ tego antyseptyku na redukcję utworzonego biofilmu był większy w przypadku szczepów *S. haemolyticus*.

Chlorheksydyna w ocenie wykazała wpływ zarówno na tworzenie (biomasa biofilmowa), ale też na eradykację, biofilmu tworzonego przez szczepy *S. haemolyticus*.

Wpływ cefazoliny i gentamycyny na formowanie jak i eradykację biofilmu był zależny od zastosowanego stężenia związku, (co jest oczywiste).

Natomiast peptyd Camel wpływał hamująco na zdolności adhezyjne gronkowców i to proporcjonalnie do stężenia odpowiadającego wielokrotności, MIC.

Dyskusja została przedstawiona na 28 stronach rozprawy. Jest to moim zdaniem najcenniejsza część pracy. Dyskusja nad wynikami została przeprowadzona przez Autorkę w staranny oraz rzeczowy sposób i w oparciu o właściwie zebraną literaturę. Doktorantka z dużą swobodą i doskonałą znajomością tematu porównuje kolejno swoje wyniki badań z danymi z piśmiennictwa światowego (w tym polskiego) dotyczącego patomechanizmu zakażeń związanych z implantacją biomateriału z zabiegach ortopedycznych. Często wyniki autorki pracy potwierdzają niektóre dyskusyjne spostrzeżenia badaczy.

Wnioski

Doktorantka kończy swą pracę ośmioma logicznymi wnioskami, bezpośrednio wynikającymi z wyników przeprowadzonych badań. Wszystkie z nich odpowiadają na postawione cele pracy, tym niemniej dwa z nich to wnioski praktyczne wskazujące na najmniejsze zagrożenie tworzenia biofilmu na powłokach z nanokryształicznego diamentu, oraz większej skuteczności redukcji biofilmu przy zastosowania badanych antyseptyków w przypadku biofilmu tworzonego przez szczepy *S. haemolyticus*..

Z obowiązku recenzenta muszę wypunktować kilka niedociągnięć, które wkradły się w tekście pracy. Mianowicie w rozdziale Wyniki na str 112 ma być "dotyczy zdjęć 15- 22" a nie 13- 22. W rozdziale Dyskusja na str 175 zła cytacja poz. 185, czy na str 176 brak numeru cytacji (Dawgul). W całości tekstu brak cytacji zamieszczonych w spisie Piśmiennictwa, a mianowicie: poz. 32, 73, 118,151,160, 179,182, 188, 193.

Dalej zła cytacja poz. 50 to Fey a nie Christen.

W Piśmiennictwie w poz. 89, 102 brak roku wydania. Poz. 13, 20, 73, 75, 132 nie zaznaczono czy te pozycje to prace doktorskie czy habilitacyjne.

Także proszę o wyjaśnienie, dlaczego w metodyce pracy do oceny skuteczności działania cefazoliny i gentamycyny na tworzenie biofilmu używano szczepu *S. epidermidis*, a dla peptydu Camel *S. haemolyticus*.

Na koniec, proszę o poprawę literówki oraz kilku niezręczności stylistycznych oraz uwzględnić czcionkę pochyłą w nazwach gatunkowych drobnoustrojów w przyszłych publikacjach. Także w przyszłych publikacjach należy poprawić jakość zdjęć, które niewątpliwie stanowią jeden z cenniejszych elementów pracy.

Chciałam jednak podkreślić, że praca (pomimo kilku powyżej wymienionych niedociągnięć edytorskich i innych) została bardzo starannie przygotowana i wykonana, z uwzględnieniem nowoczesnych metod badawczych, wpisuje się w cenny dorobek naukowy.

W podsumowaniu, chciałabym przedstawić kilka szczególnie istotnych elementów nadających nowatorski charakter pracy, są nimi:

- Zastosowanie endogennych peptydów przeciwdrobnoustrojowych, jako jednego ze związków przeciwdrobnoustrojowych
- Testowanie nowych materiałów z warstwą nanokrystalicznego diamentu
- Testowanie wpływu niektórych środków przeciwdrobnoustrojowych na dynamikę tworzenia się biofilmu

Także na szczególne wyróżnienie zasługuje fakt wykorzystania i znajomość literatury tematu z różnych środowisk: mikrobiologicznych, weterynaryjnych, inżynierskich (biomateriały) czy ochrony środowiska.

W świetle powyższych danych pracę oceniam wysoko i uważam, że rozprawa doktorska p.t. „Wpływ wybranych związków przeciwdrobnoustrojowych na tworzenie biofilmu przez szczepy gronkowców na implantach ortopedycznych” wykonana przez

Panią mgr Joannę Nowicką, w pełni spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. Zm.).

W związku z powyższym stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani Joanny Nowickiej do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego.

Kraków 04.01.2016

Margareta Bulanda
Prof. dr hab. med. Małgorzata Bulanda