

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt. „Ocena przydatności matrycy biocelulozowej do nieantybiotykowej profilaktyki zakażeń kości w badaniach *in vitro*”

lek. med. Arkadiusz Janusz

Przygotowana na zlecenie Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, nr 455/III/2022 zgodnie z pismem z dnia 24 marca 2022. Numer zlecenia RN-BM-D 48/04/2022; Nr wniosku 31/2019 podpisanym przez Panią zastępcę przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Medyczne prof. dr hab. Marzenę Podhorska-Okołów

Zapalenie kości i szpiku o etiologii bakteryjnej to narastający proces zapalny w obrębie tkanki kostnej. Odpowiedź organizmu na obecność drobnoustrojów oraz uszkodzenia tkanki kostnej, będące efektem rozwoju biofilmu, prowadzi do destrukcji macierzy kostnej oraz układu naczyniowego, a w efekcie do martwicy kości i odłączenia się jej fragmentów nazwanych martwakami lub sekwestrami. Gronkowiec złocisty jest jednym z najczęstszych czynników etiologicznych zakażeń kości. Analizy epidemiologiczne sugerują jego obecność u 40 % przypadków wszystkich zakażeń kości. Wyniki badań wielu autorów wykazały, że *S. aureus* cechuje się zdolnością do sekwestracji kości nawet bez udziału układu immunologicznego. Rozwój komórek w formie biofilmu na powierzchniach kostnych doprowadza do okresowych zmian wartości pH w mikrośrodowisku tej struktury i uszkodzeń macierzy kostnej. Gronkowiec złocisty jest w stanie wnikać pod powierzchnię kości i rozwijać się w tym obszarze unikając odpowiedzi immunologicznej. W badaniach licznych autorów stwierdzono zdolność biofilmu gronkowca złocistego do rozkładu i żywienia się różnego rodzaju komórkami pacjenta – w tym osteoblastami. Poszukiwanie nowych rozwiązań w zwalczaniu biofilmu oraz terapii i profilaktyki związanych z nim zakażeń kości jest nie tylko zasadnym, ale coraz pilniejszym do rozwiązania problemem badawczym. Tak więc temat pracy doktorskiej lekarza medycyny Arkadiusza Janusza uważam za jak najbardziej aktualny, godny opracowania.

Do oceny otrzymałam egzemplarz pracy liczącej 122 strony łącznie z tabelami, wykresami i zdjęciami. Praca ma typowy układ przyjęty w tego typu opracowaniach. W dobrze napisanym i zwięzłym wstępie (str. 1-14) Autor przedstawił charakterystykę zapaleń kości i szpiku, uwzględniając ich podział, patogenezę, mikrobiologię zakażeń kości dotyczącą biofilmu gronkowca złocistego jako czynnika etiologicznego.

W dalszej części wstępu Autor omawia profilaktykę i leczenie zakażeń kości z wykorzystaniem antybiotyków oraz ich nośników. W rozdziale tym przedstawiono także informację dotyczącą biocelulozy bakteryjnej. W przedstawionej mi do recenzji pracy brakowało mi wykazu zastosowanych skrótów, co należałoby uzupełnić w manuskrypcie.

Cel pracy (str. 15) został jasno określony, zamierzenia badawcze doktoranta dotyczyły m.in. oceny skuteczności prototypowych nośników biocelulozowych w profilaktyce zakażeń kości. Działanie nośników oparto na oddzieleniu (sekwestracji) drobnoustrojów i utrudnieniu ich adhezji – co miało uniemożliwić formowanie się agregatów komórek bakteryjnych i w konsekwencji mogłoby zmniejszyć ryzyko powstania biofilmu oraz rozprzestrzeniania się infekcji.

W rozdziale Materiały i Metody (str. 16-34) Autor przedstawiła charakterystykę oraz pochodzenie badanego materiału. Przedmiotem badań było 49 szczepów gronkowca złocistego MRSA wchodzących w skład kolekcji Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz 1 szczep referencyjny pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Szczepów Wzorcowych (ATCC 33591). Profil antybiotykoodporności badanych szczepów określono zgodnie z obowiązującymi metodami w tego typu badaniach. W kolejnych etapach eksperymentów zastosowano substancje przeciwdrobnoustrojowe wprowadzone do nośników. Oceniając zdolność szczepów *S. aureus* do produkcji biomasy biofilmowej na powierzchni polistyrenowej. Założeniem pracy była także m.in. ocena zdolności szczepów gronkowca złocistego do tworzenia biofilmu na hydroksyapatycie i kościach udowych szczurów. W dalszym etapie badań Autor dokonał oceny Minimalnego Stężenia Hamującego i Minimalnego Stężenia Eradykującego biofilm wybranych związków przeciwdrobnoustrojowych względem gronkowca złocistego. W tej części pracy doktorant przedstawił metodę wytwarzania i oczyszczania nośnika biocelulozowego, charakterystykę tego nośnika oraz syntezę kompozytu biocelulozowo-hydroksyapatytowego [BC-HA]. Rozdział ten zawiera szczegółowy opis wszystkich zastosowanych w badaniach metod oraz analizę statystyczną w której wykorzystano różne programy, testy i metody. W rozdział obliczenia statystyczne nieprawidłowo podano stronę (w spisie treści jest to str. 36 a w tekście pracy str. 35), co będzie wymagało korekty w manuskrypcie.

Wyniki badań (str. 36-87) lek. med. Arkadiusz Janusz przedstawił w 9 tabelach, 6 zdjęciach oraz na 28 wykresach. Rozdział ten został dobrze opracowany, na podkreślenie zasługuje czytelne przedstawienie wyników badań w formie tabel, zdjęć i wykresów, które doskonale obrazują uzyskane wyniki.

W badaniach własnych Autor podjął się sprawdzenia w badaniu *in vitro* potencjalnej przydatności nośnika z bakteryjnej celulozy, poddawanego różnego typu modyfikacjom, w charakterze okładziny na powierzchnie kostne, hamujące penetrację gronkowców złocistych i tworzenie struktury biofilmu. Uzyskane wyniki scharakteryzował pod kątem właściwości fizycznych wykazując wysoką zdolność bakteryjnej celulozy do pochłaniania płynów, która częściowo zmniejszona była w nośnikach zawierających hydroksapatyt, z kolei nośniki hydroksyapatytowe uwalniały płyn w czasie dłuższym niż nośniki niezmodyfikowane. Za pomocą zróżnicowanych technik obejmujących mikrobiologiczne metody ilościowe, półilościowe i oraz wizualizację z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej Autor ocenił zdolność 50 szczepów gronkowca złocistego MRSA do tworzenia biofilmu na powierzchniach płaskich i porowatych zawierających hydroksyapatyt oraz na kościach długich szczurów. Doktorant dokonał też oceny wrażliwości tych szczepów na antybiotyki : gentamycynę, lewofloksacynę, oritawancynę oraz alkaloidu roślinnego chelerytyny. Na podstawie uzyskanych wyników badań Autor wskazał na istotny wpływ zmienności wewnątrzgatunkowej oraz zastosowanych układów badawczych na analizowane parametry. Oceniając cytotoksyczność i tempo zasiedlania nośników przez komórki kościotwórcze Autor wykazał ich wysoką biokompatybilność, przy czym najwyższą wartością tego parametru cechowały się nośniki zawierające hydroksyapatyt. W rozdziale tym zauważono niezgodność stron dotyczących tabeli 3 (w tekście jest na str. 46, a w spisie jest to str. 47). Podobnie jak w przypadku wykresu 6 (w tekście pracy jest na str. 45, a w spisie jest na str. 46).

W rozdziale dyskusja (str.88-102) Doktorant omawia wyniki własne w świetle badań innych autorów. Dyskusja przeprowadzona jest rzeczowo, dane z literatury przytoczone zostały prawidłowo i świadczą o krytycznym podejściu do interpretacji wyników badań własnych, a także dowodzą wszechstronności i umiejętności pracy naukowej Kandydata.

Na zakończenie pracy Autor przedstawia 8 wniosków (str.103-104), które są bardzo dobrze sformułowane i mają uzasadnienie w wynikach badań.

Na uznanie zasługuje również znakomicie opracowane streszczenie pracy (str.109-112), które w zwięzłym nowoczesnym stylu oddaje meritum pracy.

Piśmiennictwo (str.113-122) zawiera liczbę 69 cytowanych prac, głównie anglojęzycznych. Stanowi ono silną pozycję dysertacji, gdyż jest ściśle tematycznie i pochodzi z ostatnich lat. Na podkreślenie zasługuje fakt, że 27 cytowanych prac zostało opublikowanych w latach 2015-2021. Warto zwrócić także uwagę na to, że lek. med. Arkadiusz Janusz przytacza prace nie tylko autorów zagranicznych, ale także 17 pozycji piśmiennictwa polskiego.

Z obowiązku recenzenta chcę zwrócić uwagę, na fakt, że w tej części pracy znaleziono nieliczne uchybienia związane z brakiem cytowania poz. 10 w tekście pracy, czy też jak w poz. 48 i 49 (nie podano skrótów czasopisma); brak też tomu czasopisma, poz. 40 nieprawidłowo cytowany tom i zeszyt, co będzie wymagało korekty przy przygotowaniu pracy do druku.

Za szczególną wartość pracy uważam to, że Autor wykazał, że zdolność gronkowców złocistych do tworzenia biofilmu w dużej mierze zależy od zastosowanej powierzchni wzrostowej oraz od zastosowanego układu badawczego. Nośniki z bakteryjnej celulozy cechują się pożądanymi parametrami fizycznymi predysponującymi je do zastosowania w charakterze okładzin na kości. Dodatek hydroksyapatytu do bakteryjnej celulozy podnosi tempo zasiedlania tego nośnika przez komórki kościotwórcze, osteoblasty. Nośniki z bakteryjnej celulozy zawierające antybiotyki cechują się wysoką skutecznością w aspekcie hamowania penetracji gronkowca złocistego przy uwzględnieniu wrażliwości danego szczepu na określony antybiotyk.

Istotne znaczenie mają także własne obserwacje Doktoranta z których wynika, że nośniki z bakteryjnej celulozy zawierające hydroksyapatyt oraz chelerytynę cechują się najkorzystniejszymi łącznymi parametrami w aspekcie jego zastosowania jako okładziny hamującej penetrację gronkowca złocistego na powierzchnię kości.

Podsumowując stwierdzam, że oceniana praca ze wszech miar odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, stanowi ona cenny wkład w rozwój wiedzy nad nowymi możliwościami terapii zainfekowanych ran przewlekłych i dowodzi dojrzałości naukowej Kandydata. Pragnę podkreślić, że pracę doktorską lek. med. Arkadiusza Janusza cechuje aktualność omawianej problematyki oraz walory poznawcze i praktyczne. Uważam, że problem naukowy ocenianej pracy został postawiony i rozwiązany prawidłowo. Cel pracy został osiągnięty, uzyskane wyniki stanowiły podstawę do wyciągnięcia rzeczowych wniosków.

W związku z powyższym oceniając pozytywnie przedstawioną pracę stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U Nr 65, poz. 595, z późn. zm) i przedstawiam Radzie Dyscypliny Nauki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lek. med. Arkadiusza Janusza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 28 kwietnia 2022.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
ZAKŁAD NAUK PODSTAWOWYCH
kierownik
Irena Choroszy-Król 4
prof. zw. dr hab. Irena Choroszy-Król