



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
im. Ludwika Hirsfelda
Polskiej Akademii Nauk

Krajowy Naukowy Ośrodek Wiodący
Centrum Doskonałości: IMMUNE

dr hab. Jacek Rybka, prof. IITD PAN
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
im. Ludwika Hirsfelda we Wrocławiu
ul. Weigla 12, 53-114 Wrocław
email: jacek.rybka@hirsfeld.pl

Wrocław, 29 stycznia 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Zuzanny Ewy Sycz: „Wpływ triterpenów pentacyklicznych na uropatogenne pałeczki Gram-ujemne”

Promotor: dr hab. Dorota Wojnicz

Promotor pomocniczy: dr Dorota Tichaczek-Goska

Przedstawiona do recenzji praca mgr Zuzanny Ewy Sycz dotyczy ważnego problemu związanego z poszukiwaniem nowych substancji terapeutycznych, mogących mieć zastosowanie w terapii bakteryjnych wielogatunkowych zakażeń układu moczowego. Szczepy bakteryjne izolowane w zakażeniach tego typu często przejawiają cechy uropatogenne, hemolizujące, posiadające czynniki wirulencji zwiększające ich zdolność adhezji do nabłonka dróg moczowych gospodarza czy zdolność rozmnażania wewnątrzkomórkowego. Mogą posiadać także cechy antybiotykooporności czy oporności wielolekowej, które w przypadku zakażenia wielogatunkowego przenoszą się poziomo pomiędzy poszczególnymi szczepami bakteryjnymi. Dodatkowo, przewlekłe infekcje prowadzić mogą do powstawania biofilmów, zwłaszcza na powierzchniach ciał obcych, np. cewników. Bakterie tworzące biofilm wykazują wielokrotnie zwiększoną oporność na niekorzystne warunki środowiska a także na substancje terapeutyczne. Z uwagi na rosnące zjawisko antybiotykooporności wśród bakterii chorobotwórczych konieczne jest poszukiwanie alternatywy dla dotychczas stosowanych leków przeciwbakteryjnych, niniejsza rozprawa skupia się na dwu substancjach pochodzenia roślinnego, należących do grupy triterpenów pentacyklicznych: na kwasie azjatykowym i kwasie ursolowym. Zjawisko wzajemnego oddziaływania na siebie szczepów bakteryjnych tworzących biofilmy wielogatunkowe sprawia, że wrażliwość powstającego konsorcjum bakteryjnego nie jest prostą sumą wrażliwości poszczególnych szczepów, stąd badania opisane w niniejszej pracy koncentrują się na działaniu badanych triterpenów na bakteryjne konsorcja dwu- i trójgatunkowe.



Rozprawa mgr Zuzanny Ewy Sycz ma mniej typowy układ mieszany, stworzona jest zarówno z prac opublikowanych jak i wyników wcześniej nieopublikowanych (układ taki, zgodnie z Komunikatem RDN nr 19/2020, jest w pełni dopuszczalny), i składa się z wykazu publikacji stanowiących rozprawę doktorską, wprowadzenia w tematykę pracy, przedstawienia założeń i celu projektu badawczego, materiałów i metod, publikacji wchodzących w skład rozprawy, dwóch rozdziałów systematyzujących wyniki zawarte w obu pracach eksperymentalnych wchodzących w skład rozprawy, wniosków, wyników dodatkowych eksperymentów i proponowanych dalszych kierunków badań, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazu skrótów, spisu tabel, wykresów, rysunków i fotografii, zestawienia cytowanej literatury, noty biograficznej i dorobku naukowego doktorantki oraz załączników.

W skład rozprawy wchodzi trzy opublikowane prace: jedna przeglądowa i dwie eksperymentalne:

1. Sycz Z., Tichaczek-Goska D., Wojnicz D. (2022) Anti-Planktonic and Anti-Biofilm Properties of Pentacyclic Triterpenes-Asiatic Acid and Ursolic Acid as Promising Antibacterial Future Pharmaceuticals. *Biomolecules* 12(1):98
2. Sycz Z., Tichaczek-Goska D., Jezierska-Domaradzka A., Wojnicz D. (2021) Are Uropathogenic Bacteria Living in Multispecies Biofilm Susceptible to Active Plant Ingredient-Asiatic Acid? *Biomolecules* 11(12):1754
3. Sycz Z., Wojnicz D., Tichaczek-Goska D. (2022) Does Secondary Plant Metabolite Ursolic Acid Exhibit Antibacterial Activity against Uropathogenic *Escherichia coli* Living in Single- and Multispecies Biofilms? *Pharmaceutics* 14(8):1691

Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich trzech prac, w załączonych oświadczeniach doktorantki oraz współautorów publikacji, włączonych w skład rozprawy, znajdują się omówienia udziału poszczególnych autorów w powstaniu prac.

Rozprawę rozpoczyna obszerne wprowadzenie do tematyki rozprawy. Autorka opisuje właściwości antybakteryjne triterpenów pentacyklicznych, charakteryzuje gatunki bakterii najczęściej spotykane w zakażeniach układu moczowego, opisując ich budowę, właściwości i skupiając się na trzech gatunkach: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* oraz *Pseudomonas aeruginosa*, które stanowią organizmy modelowe w toku badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej. We wstępie opisano pokrótce przebieg i mechanizmy zakażeń układu moczowego, wywołujących je bakterii, diagnostykę, zagadnienia dotyczące powstawania,

budowy i właściwości biofilmów bakteryjnych i ich wpływu na przebieg procesu chorobowego.

W kolejnej części opisano materiały i metody wykorzystane w badaniach, po czym zamieszczono kolejno trzy publikacje, które wchodzi w skład niniejszej rozprawy. Pierwsza z prac nie jest pracą eksperymentalną, zawiera przegląd informacji dotyczących pochodzenia, budowy i właściwości chemicznych oraz biologicznych kwasów azjatykowego i ursolowego, oraz mechanizmu ich działania przeciwbakteryjnego. Praca zawiera jednocześnie także elementy metaanalizy, gromadzącej i grupującej dane ilościowe z szeregu publikacji, dotyczące przeciwbakteryjnych właściwości obu substancji.

Wchodzące w skład rozprawy prace druga i trzecia, analizują kolejno wpływ obu triterpenów pentacyklicznych: kwasów azjatykowego i ursolowego, na wzrost i rozwój bakterii *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* oraz *Pseudomonas aeruginosa*, tworzących jedno-, dwu- i trójgatunkowe biofilmy, stanowiące model złożonej infekcji układu moczowego. Analizowane były przeżywalności bakterii w takich biofilmach, ilości biofilmów powstających w różnych układach gatunkowych a także aktywność metaboliczną poszczególnych gatunków w tych układach. Badano także zmiany morfologiczne komórek pod wpływem triterpenów.

W kolejnych dwóch rozdziałach rozprawy wyniki opisane w powyższych dwu pracach zostały zebrane i porównane, co umożliwiło zastosowanie tej samej metodyki i tego samego modelu badawczego do analizy właściwości przeciwbakteryjnych odpowiednio kwasu azjatykowego i ursolowego w obu pracach. Taki zabieg edytorski znacząco ułatwił czytelnikowi analizę i porównanie właściwości obu substancji.

Obszerna część opisująca wnioski z przeprowadzonych badań, opisuje i podsumowuje antagonistyczne działanie szczepów w biofilmach dwu- i trójgatunkowych na wzajemną przeżywalność i produkcję biofilmu, wrażliwość szczepów na badane triterpeny pentacykliczne, ich wpływ na produkcję biofilmu w badanych układach jedno- i wielogatunkowych, na ich aktywność metaboliczną, na morfologię komórek bakteryjnych oraz na stosunki antagonistyczne pomiędzy poszczególnymi szczepami. Wnioski są szczegółowo opisane, jasno podzielone i logiczne wynikają z uzyskanych wyników badań.

Rozdział 10 jest ostatnim rozdziałem związanym z pracami eksperymentalnymi i opisuje wyniki dodatkowych doświadczeń obejmujących badanie wpływu wprowadzania dodatkowego gatunku do istniejącego biofilmu tworzonego przez *E. coli*.

Uwagi merytoryczne do przedstawionej pracy są nieliczne. Ciekawe byłoby głębsze zbadanie mechanizmu leżącego u podstaw dwufazowej reakcji niektórych bakterii na działanie badanych kwasów: np. *E. coli* na kwas azjatykowy lub *E. cloacae* i po części *P. aeruginosa* na

kwasy ursolowe w biofilmach jednogatunkowych, czy jest to wynik stopniowej degradacji badanych triterpenów, czy stopniowe nabywanie oporności przez bakterie, co może mieć znaczenie w badaniu wartości terapeutycznej badanych związków. Ciekawe jest także zjawisko wzajemnego antagonizmu bakterii w konsorcjach wielogatunkowych, z pewnością warto kontynuować badania dotyczące tej tematyki.

Pewną niejasność wprowadza zabieg edytorski polegający na szczegółowym omówieniu i porównaniu wyników zawartych w opublikowanych pracach. O ile część ta znakomicie porządkuje uzyskane dane doświadczalne i znacząco ułatwia porównanie działania przeciwbakteryjnego obu badanych kwasów, o tyle przy niektórych danych nie jest jasne, z której pracy pochodzą przedstawione wyniki, lub czy są to dane nowe, niezawarte w dwu załączonych pracach. Dodatkową niejasność wprowadza powtarzanie danych prezentowanych na wykresach na kolejnych wykresach zbiorczych, jednak, przy tej ilości danych doświadczalnych, należy się zgodzić, że alternatywą byłoby podawanie tych danych osobno lub na jednym złożonym wykresie, co utrudniłoby czytelność i możliwość porównania wyników. Także pewien niedosyt pozostawia u czytelnika rozdział, omawiający uzyskane wyniki dodatkowych eksperymentów, w którym wyniki te opisano w tekście, bez formy graficznej, wprowadzając nowe dane już po części opisującej wnioski z poprzednich badań. Część ta jest jednak merytorycznie bardzo interesująca, opisanie ingerencji kolejnych gatunków w już powstający biofilm może być dobrym modelem realnego procesu chorobowego, warto ten temat kontynuować w toku dalszych prac badawczych. Bardzo dobrym pomysłem w tej części pracy jest z kolei graficzne przedstawienie zakresu merytorycznego badań dodatkowych na zbiorczym wykresie. Należy jednak podkreślić, że powyższe uwagi nie wpływają na ogólną, pozytywną ocenę rozprawy.

W podsumowaniu należy podkreślić, że praca jest wartościowa, badania zostały prawidłowo zaplanowane i zrealizowane, zastosowana metodyka odpowiada założonemu celowi pracy a uzyskane wyniki są interesujące i dostarczają szeregu oryginalnych danych dotyczących wpływu kwasów azjatykowego i ursolowego na wielogatunkowe konsorcja bakteryjne tworzące biofilmy i z pewnością znajdą w przyszłości swoje zastosowanie w praktyce. Bardzo interesująca jest obserwacja, że antagonizm międzygatunkowy w obrębie biofilmu znacząco słabnie pod wpływem działania badanych triterpenów. Ciekawe byłoby w przyszłości wyjaśnienie, czy jest to tylko efekt zwykłego osłabienia szczepu dominującego w danym konsorcjum, czy w grę wchodzi bardziej złożone mechanizmy związane z quorum sensing pomiędzy szczepami.

Nie mam znaczących uwag krytycznych do pracy, błędy literowe oraz stylistyczne, czy pomyłki rzeczowe są nieliczne, tytuł jest zgodny z treścią rozprawy.

We wszystkich trzech pracach, składających się na niniejszą rozprawę, mgr Zuzanna Sycz była pierwszym autorem. Zwraca uwagę wysokie zaangażowanie doktorantki w tworzenie przedstawionych publikacji. Należy wysoko ocenić także Jej pozycję wśród współautorów, zważywszy, że prace opublikowano w czasopismach o wysokim współczynniku wpływu (odpowiednio 6,064; 6,064; 6,525). Jednocześnie w swoim oświadczeniu opisuje rolę w opisanych badaniach i powstałych publikacjach: współtworzenia hipotezy badawczej, koncepcji badań, wykonywanie doświadczeń, dokumentacji, analizy statystycznej, opracowywaniu wyników i następnie prac do druku, co dobrze wyraża również rozwój naukowy doktorantki.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Zuzanny Ewy Sycz 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 naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Wnioskuje do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Zuzanny Ewy Sycz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Składam jednocześnie wniosek o wyróżnienie tej rozprawy ze względu na jej wartość merytoryczną i znaczący udział doktorantki w powstanie wszystkich trzech składających się na nią opublikowanych prac.

