



Łódź, 26.09.2023

prof. UM dr hab. n. farm. Izabela Grzegorzczak-Karolak
Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Malwiny Brożyny zatytułowanej: „**Określenie zdolności wybranych olejków eterycznych do eradykacji biofilmu tworzonego przez drobnoustroje izolowane z zakażeń kości i ran**” wykonanej w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu pod kierunkiem promotora dr hab. n. med. Adama Junki, prof. UMW oraz promotora pomocniczego dr n. farm. Ruth Dudek-Wicher.

Problematyka podjęta w Rozprawie.

Celem recenzowanej pracy była ocena właściwości przeciwdrobnoustrojowych i przeciwbiofilmowych olejków eterycznych uwzględniająca aktywność zarówno ciekłych jak i lotnych frakcji substancji zapachowych. Bardzo ważnym aspektem pracy Doktorantki było opracowanie protokołu testu, który służyłby wiarygodnej ocenie aktywności składników lotnych. Bowiem o ile badania frakcji ciekłych związków aromatycznych bazują na ściśle zdefiniowanych testach wrażliwości zalecanych przez Europejski Komitet ds. Badania Wrażliwości Przeciwdrobnoustrojowej, metody badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej związków lotnych są niestandardyzowane, co skutkuje rozbieżnymi wynikami związanymi z brakiem ujednoczonych warunków badań. Ostatni etap pracy badawczej mgr Brożyny obejmował określenie wpływu składu podłoża hodowlanego na cechy biofilmu i jego podatność na działanie środków przeciwbakteryjnych.

Choroby zakaźne stanowią istotną przyczynę zachorowalności i śmiertelności u ludzi. Rozwijająca się wśród drobnoustrojów na przestrzeni lat antybiotykooporność staje się coraz poważniejszym problemem. Do patogenów oportunistycznych związanych z poważnymi zakażeniami

należą między innymi *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* czy *Candida albicans*. Infekcje wywołane tymi mikroorganizmami mogą mieć ciężki przebieg i zagrazać życiu. Zakażenia o powyższym charakterze często wywoływane są przez biofilmy będące złożonymi „społecznościami” drobnoustrojów osadzonych w macierzy zewnątrzkomórkowej. Tak wykształcona niejednorodna „społeczność” komórek drobnoustrojów wykazuje istotne różnice w porównaniu z osobnikami planktonowymi. Biofilm może tworzyć się na żywych tkankach oraz znajdującym się w organizmie sprzęcie medycznym takim jak cewniki czy implanty. Komórki biofilmu są otoczone zewnątrzkomórkowymi substancjami polimerowymi, które służą jako rusztowanie dla integralności strukturalnej społeczności drobnoustrojów oraz jako bariera chroniąca komórki przed czynnikami zewnętrznymi. Ze względu na obecność ochronnej macierzy zewnątrzkomórkowej, biofilm wykazuje wysoką tolerancję na konwencjonalne środki przeciwdrobnoustrojowe. Ponadto, w biofilmie odnotowuje się istotne zróżnicowanie metaboliczne drobnoustrojów w obrębie określonych warstw. Na skutek tego komórki drobnoustrojów w macierzy biofilmu charakteryzują się niską aktywnością komórkową i są niewrażliwe na antybiotyki i antyseptyki ukierunkowane na procesy komórkowe. Wysoka oporność biofilmu na antybiotyki oraz rozwijająca się oporność na środki antyseptyczne, skłania do wdrażania nowych strategii w leczeniu infekcji opartych na metodach nieantybiotykowych i nieantyseptycznych. Obejmują one wykorzystanie związków naturalnych, które mogłyby zakłócać tworzenie biofilmu i wzmacniać odpowiedź immunologiczną gospodarza.

W poszukiwaniach nowych skutecznych związków przeciwdrobnoustrojowych obiecującą alternatywą wydają się być olejki eteryczne, które poza niską toksycznością i bezpośrednim efektem przeciwdrobnoustrojowym, często wykazują działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne i immunostymulujące. Ich potencjał przeciwbiofilmowy związany jest z szerokim spektrum aktywności takim jak zakłócanie integralności ścian komórkowych drobnoustrojów i struktur błonowych, blokowanie układu quorum-sensownego, zakłócanie ruchliwości bakterii, zmniejszanie przylegania bakterii do obojętnej powierzchni, zwiększanie stresu oksydacyjnego w komórkach drobnoustrojów czy blokowanie produkcji enzymów. Ponadto olejki ze względu na swoje zróżnicowane i niespecyficzne działanie oraz zmienność składu obniżają ryzyko wykształcenia u bakterii oporności.

W powyższym zakresie cel badań podjęty w przedstawionej mi do oceny rozprawie doktorskiej jest jak najbardziej aktualny i uzasadniony. Zresztą pani mgr Malwina Brożyna jednoznacznie i trafnie sprecyzowała podjęty problem badawczy. Wraz ze wzrostem zapotrzebowania na nowe związki „przeciwbiofilmowe”, dostrzegła ona również potrzebę opracowania prostego i skutecznego testu do oszacowanie w tym zakresie aktywności potencjalnych substancji lotnych, aby poprawić jednoznaczność wykonywanych analiz. Odpowiedzią na tę potrzebę było stworzenie protokołu testu aktywności przeciwbiofilmowej związków lotnych (AntiBioVol), którego przydatność w odniesieniu do biofilmów utworzonych przez *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *C. albicans* została przetestowana i porównana z tradycyjnie stosowaną metodą ulatniania krążka.

Ocena formalna Rozprawy

W skład recenzowanej rozprawy doktorskiej wchodzi cztery publikacje. Sumaryczny IF (Journal Citation Reports) cyklu, zgodny z rokiem publikacji, jest równy **11,81**, zaś punktacja MNiSW wynosi **340**. Są to następujące pozycje:

1. Brożyna Malwina, Żywicka Anna, Fijałkowski Karol, Gorczyca Damian, Oleksy-Wawrzyniak Monika, Dydak Karolina, Migdał Paweł, Dudek Bartłomiej, Bartoszewicz Marzenna, Junka Adam. The novel quantitative assay for measuring the antibiofilm activity of volatile compounds (AntiBioVol). *Applied Sciences-Basel*, 2020, vol. 10, nr 20, art.7343
2. Brożyna Malwina, Paleczny Justyna, Kozłowska Weronika, Chodaczek Grzegorz, Dudek-Wicher Ruth, Felińczak Anna, Gołębiowska Joanna, Górniak Agata, Junka Adam. The antimicrobial and antibiofilm *in vitro* activity of liquid and vapour phases of selected essential oils against *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, 2021, vol. 10, nr 9, art.1207
3. Brożyna Malwina, Paleczny Justyna, Kozłowska Weronika, Ciecholewska-Juško Daria, Parfińczyk Adam, Chodaczek Grzegorz, Junka Adam. Chemical composition and antibacterial activity of liquid and volatile phase of essential oils against planktonic and biofilm-forming cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 2022, vol. 27, nr 13, art.4096.
4. Brożyna Malwina, Kozłowska Weronika, Malec Katarzyna, Paleczny Justyna, Detyna Jerzy, Fabianowska-Majewska Krystyna, Junka Adam. Chronic wound milieu challenges essential

oils' antibiofilm activity. Publikacja została udostępniona w bazie bioRxiv jako preprint, DOI: 10.1101/2023.06.21.545846.

Powyższe publikacje stanowią spójny jednotematyczny cykl. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a w trzech pełni też wraz ze swoim promotorem funkcję autora korespondencyjnego. Załączone kopie publikacji będące podstawą rozprawy poprzedzone są krótkim wprowadzeniem.

We wstępie autoreferatu Doktorantka krótko wprowadza w zagadnienia badawcze. W dalszej części przedstawia cel naukowy oraz etapy jego realizacji opisane w publikacjach. Kolejną część autoreferatu stanowi metodyka, która skrótowo opisuje wszystkie wykonane w pracy analizy. Na kolejnych dwóch stronach wprowadzenia Doktorantka podsumowuje wyniki opisane w poszczególnych publikacjach. Na koniec Autorka formułuje 11 wniosków. Wprowadzenie zawiera również streszczenie i informacje na temat całości osiągnięć naukowych Doktorantki. Dorobek naukowy mgr Brożyny obejmujących 13 publikacji w czasopismach z IF i dwie w czasopismach spoza tej listy o łącznej aktualnej punktacji IF – 67,919 i punktacji ministerialnej – 1760. Ponadto, mgr Brożyna jest współautorką rozdziału w monografii i współautorką 17 komunikatów zjazdowych z czego w czterech figuruje jako pierwszy autor.

Prace wchodzące w skład cyklu są wieloautorskie, więc do rozprawy dołączone są oświadczenia współautorów, z których wynika, że udział Doktorantki w badaniach był wiodący. Każdorazowo brała ona udział we współtworzeniu koncepcji i metodologii, samodzielnie wykonywała część eksperymentów, wykonywała analizy statystyczne, brała udział w opracowaniu szkicu manuskryptu, przygotowywała ostateczną wersję publikacji i pozyskiwała finansowanie na badania. Badania naukowe przedstawione w publikacjach zostały wykonane w ramach projektu Preludium 20, którego Doktorantka była kierownikiem i Opus 14, w którym była członkiem zespołu badawczego.

Pewne wątpliwości natury formalnej budzi we mnie bardzo zwięzły charakter autoreferatu, w którym wyniki przedstawiono bardzo krótko i osobno w odniesieniu do poszczególnych publikacji, a także brak w autoreferacie konfrontacji uzyskanych wyników jako całości z danymi literaturowymi w postaci dyskusji. W moim odczuciu, celem recenzji rozprawy doktorskiej w postaci cyklu jest ocena osiągnięcia jako całości, a nie tylko załączonych opatrzonych krótkim komentarzem poszczególnych publikacji, które w większości zostały już poddane ocenie eksperckiej przed ich opublikowaniem.

Zasadniczo, poszczególne publikacje zostały zredagowane starannie i ich forma redakcyjna nie budzi zastrzeżeń. Można w nich wskazać tylko nieliczne drobne błędy edytorskie nie mające wpływu na poziom merytoryczny pracy, co nie jest zaskakujące w obliczu faktu, że manuskrypty przeszły już tryb korekty redakcyjnej. Jednocześnie poszczególne publikacje zawierają przegląd i odniesienia do aktualnej i prawidłowo wyselekcjonowanej literatury przedmiotu.

Ocena merytoryczna Rozprawy

W pierwszej pracy opublikowanej w czasopiśmie Applied Science mgr Brożyna przedstawiła protokół opracowanej przez siebie metody oceniającej aktywność przeciwbiofilmową związków lotnych (AntiBioVol). Jednocześnie wykazała, że jest to metoda ekonomiczna, o wysokiej powtarzalności, umożliwiającą wiarygodną ocenę efektu przeciwbiofilmowego. Ponadto, wykonując serię badań porównawczych Doktorantka udokumentowała fakt, że parametry techniczne związane z rozmiarami stosowanych płytek hodowlanych oraz różną objętością podłoża agarowego istotnie modyfikują wyniki uzyskane metodą odwróconej płytki Petriego i standaryzacja metodologii badawczej jest konieczna w celu właściwej oceny skuteczności przeciwdrobnoustrojowej frakcji lotnych olejków eterycznych.

W dwóch kolejnych publikacjach Doktorantka wykazała, że działanie przeciwbakteryjne olejków eterycznych w postaci płynnej może się różnić od działania ich frakcji lotnych. Jednocześnie, w stosunku do wykorzystanych w badaniach szczepów *S. aureus* i *P. aeruginosa* odnotowała międzygatunkową zmienność w odpowiedzi na użyte w badaniach olejki. Mgr Brożyna zwróciła również uwagę na fakt, że ze względu na wiele zmiennych w tym, tych odnoszących się do badanych drobnoustrojów i zmiennego składu olejków eterycznych, dopiero zastosowanie kilku różnych technik pozwala uzyskać kompleksowy zestaw danych i wiedzę o aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Ostatnia praca włączona w cykl rozprawy doktorskiej obejmuje badanie oceniające właściwości przeciwegrowkowe olejków zarówno względem form planktonowych jak i w postaci biofilmu w warunkach przypominających środowisko przewlekłych ran. W ramach tego doświadczenia Doktorantka po raz pierwszy wykorzystwała podłoże IVWM naśladujące środowisko rany, co pozwoliło na uzyskanie biofilmu odzwierciedlającego ten powstający w warunkach *in vivo*, a przez to umożliwiło wglądu w rzeczywistą aktywność przeciwdrobnoustrojową i przeciwbiofilmową

badanych olejków eterycznych. Mgr Brożyna wykazała, że użycie podłoża IVWM znacząco zmieniło kluczowe cechy biofilmu, takie jak aktywność metaboliczna, jego struktura i skład w porównaniu ze standardowymi podłożami wzrostowymi wpływając w ten sposób na aktywność przeciwdrobnoustrojową.

Po zapoznaniu się z pracami włączonymi w skład rozprawy, stwierdzam, że Doktorantce udało się zrealizować wszystkie podjęte cele badawcze. Wysoka wartość badań Doktorantki polega między innymi na kompleksowym podejściu do zagadnienia. Pani mgr Malwina Brożyna wykazała się znajomością nowoczesnej metodyki badawczej; w badaniach bazowała na wynikach uzyskanych z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas, odwróconej płytki Petriego, zmodyfikowanego testu dyfuzji krążkowej, technik mikrorozcieńczeń, pomiaru aktywności opatrunku antybiofilmowego, protokołu AntiBioVol, mikroskopii fluorescencyjnej/konfokalnej i dynamicznego rozpraszania światła. Włączenie do badań tak obszernego spektrum analiz pokazuje, że Doktorantka potrafi patrzeć na zagadnienia badawcze z szerokiej perspektywy i posiada szeroką znajomość metod i narzędzi badawczych. Wyniki zaprezentowane w przedstawionych mi do oceny publikacjach są interesujące i wartościowe, a działania Doktorantki w zakresie planowania i prowadzenia badań w interdyscyplinarnym zespole naukowych są w pełni przemyślane. Badania mgr Malwiny Brożyny mają zarówno oryginalny charakter, jak i istotne znaczenie teoretyczne oraz praktyczne. Opracowany przez Doktorantkę test aktywności przeciwbiofilmowej związków lotnych jest odpowiedzią na zapotrzebowanie na standaryzowaną metodę analiz w obliczu różnic obserwowanych w odpowiedzi na ten sam olejek eteryczny u tego samego mikroorganizmu przy zastosowaniu różnych metod/warunków badawczych. Test AntiBioVol jest czuły, prosty, tani i powtarzalny, dlatego idealnie nadaje się jako test do badań przesiewowych, ale pozwala również uzyskać wyniki ilościowe/półilościowe w postaci parametrycznego współczynnika eradykacji komórek drobnoustrojów.

Jeśli chodzi o uwagi krytyczne, to muszę stwierdzić, że bazując na dołączonym do zbioru publikacji autoreferacie, nie można jednoznacznie ocenić umiejętności korzystania z fachowej literatury przez Doktorantkę czy konfrontacji uzyskanych przez nią wyników badań z innymi doniesieniami naukowymi. W samym autoreferacie bowiem tematyka zagadnienia nakreślona jest skrótowo, a dyskusji w odniesieniu do cyklu brak. Oczywiście zarówno wprowadzenie do tematyki

poszczególnych artykułów jak i dyskusja będąca konfrontacją uzyskanych wyników z wynikami podobnych doniesień naukowych wchodzi w skład każdej odrębnej publikacji. Jednak prace te są wieloautorskie i nie jest oczywiste, jaki był udział Doktorantki w pisaniu tych części manuskryptów. Zwłaszcza w świetle informacji zawartych na końcu publikacji oraz w oświadczeniach współautorów, gdzie udział w powstawaniu i recenzji manuskryptów odnotowano również w odniesieniu do kilku innych osób. Nie chciałabym w tym miejscu podważać ewentualnego istotnego udziału Doktorantki w tym zakresie, ale też otrzymane materiały nie pozwalają mi na jednoznaczną ocenę tych zagadnień. Jednocześnie fakt ten nie poważa wiodącego udziału mgr Brożyny w samych badaniach.

Podczas czytania przedłożonej mi do oceny rozprawy nasunęły mi się następujące pytania, które chciałabym zaadresować do Doktorantki z prośbą o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony:

1. Po pierwsze, moją wątpliwość budzi zawarte w tytule prezentowanego cyklu sformułowanie „izolowanych z zakażeń kości i ran”. Informacja, która pojawia się w autoreferacie wskazuje na wykorzystanie w eksperymentach izolatów klinicznych *S. aureus* i *P. aeruginosa*. I o ile w jednej z publikacji odnotowano, że 7 szczepów *S. aureus* wyizolowano z zainfekowanych ran i 7 z kości, to w żadnej z publikacji nie znalazłam informacji o pochodzeniu szczepów klinicznych *P. aeruginosa* stosowanych w eksperymentach. Zakażenie pałeczką ropy błękitnej może dotyczyć każdego narządu i układu, a często ma związek z infekcjami układu oddechowego. Czy uzasadnione więc było takie zawężanie w tytule rozprawy odnośnie pochodzenia użytych w badaniach drobnoustrojów? Aby rozwiać te wątpliwości, prosiłabym o uzupełnienie informacji dotyczącej pochodzenia klinicznych szczepów pałeczki ropy błękitnej.
2. W publikacji 4, w przypadku biofilmów gronkowców hodowanych na podłożu IVWM, zaobserwowała Pani istotną liniową korelację pomiędzy poziomem biomasy biofilmu, a jego aktywnością metaboliczną. Czy ta zależność może mieć jakiegokolwiek praktyczne znaczenie? Jakie są konsekwencje istnienia takiej korelacji i co taka informacja mogłaby wnieść dla oceny wrażliwości biofilmu? Czy można na przykład spekulować, że aktywne metabolicznie i intensywnie rosnące biofilmy będą mniej wrażliwe na środki przeciwdrobnoustrojowe? Czy

wręcz odwrotnie: biofilmy charakteryzujące się wysoką biomasą, a więc i aktywnością będą bardziej podatne na działanie środków przeciwdrobnoustrojowych biorąc pod uwagę fakt, że niska odpowiedź na antybiotyki może wynikać z niskiej aktywności metabolicznej części komórek biofilmu?

Wnioski końcowe

Podsumowując, wysoko oceniam badania będące udziałem Doktorantki. Mają one szeroki zakres, interdyscyplinarny charakter i zawierają elementy nowości. Doktorantka wykazała się dużą dojrzałością naukową w zakresie podjętego tematu badawczego. Rozprawa charakteryzuje się wysoką wartością poznawczą w wymiarze naukowym, a także aplikacyjnym. W tym zakresie na szczególną uwagę zasługuje ustanowienie protokołu testu AntiBioVol i jego optymalizacja. Na uwagę zasługuje też znaczący jak na obecny etap kariery naukowej, całkowity dorobek Doktorantki.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pt: „Określenie zdolności wybranych olejków eterycznych do eradykacji biofilmu tworzonego przez drobnoustroje izolowane z zakażeń kości i ran” jest oryginalnym dorobkiem Pani mgr Malwiny Brożyny i spełnia warunki określone dla rozpraw doktorskich w art. 187 ust. 1 i 2 ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.). Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr Malwiny Brożyny do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie ze względu na wysoki poziom naukowy przedstawionej mi do oceny dysertacji i jej wkład w rozwój reprezentowanej dziedziny badawczej wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Malwiny Brożyny.

dr hab. n. farm. Izabela Grzegorzczak-Karolak
profesor uczelni
Izabela Grzegorzczak-Karolak
Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi