



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 48
60-627 Poznań

WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOŚCI I ŻYWIENIU

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności

RN-BF 4000. 3. 2019
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
BIURO RPII/18/36/2023
RADY DISCYPLINY NAUKI FARMACEUTYCZNE
Podpis *Foralewski*
11.10.2023

Dr hab. inż. Wojciech Białas, Prof. UPP
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań, 29.09.2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Malwiny Brożyny pt. „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 dr hab. inż. dr hab. n. med. Adama Feliksa Junka, prof. UMW
oraz promotora pomocniczego dr n. farm. Ruth Dudek-Wicher

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Malwiny Brożyny została wykonana na zlecenie Przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu prof. dr hab. Adama Matkowskiego zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne z dn. 06 lipca 2023 r.

1. Ocena zasadności wyboru tematyki rozprawy doktorskiej

Celem rozprawy doktorskiej było opracowanie testu służącego ocenie aktywności przeciwbiofilmowych lotnych związków, ocena in vitro właściwości przeciwdrobnoustrojowych i przeciwbiofilmowych olejków eterycznych oraz określenie wpływu składu medium hodowlanego na cechy biofilmu i skuteczność przeciwdrobnoustrojową olejków eterycznych.

Biofilm bakteryjny odgrywa istotną rolę w patogenezie wielu chorób, mających zazwyczaj charakter przewlekły. Biofilm stanowi skupisko bakterii osadzone w samodzielnie



wytworzonej matrycy, przylegającej zarówno do powierzchni biotycznych jak i abiotycznych. Zdolność do kolonizowania powierzchni abiotycznych stanowi poważny problem, ponieważ biofilm może tworzyć się na powierzchni powszechnie stosowanych w medycynie biomateriałów wykorzystywanych do produkcji cewników moczowych, cewników naczyniowych, układu zastawkowego do drenażu komorowego, stentów oraz różnego rodzaju implantów. Wspomniana matryca stanowiąca biofilm składa się w głównej mierze z substancji takich jak białka i polisacharydy. Uformowany biofilm stanowi zwartą, trójwymiarową strukturę złożoną z kilku do kilkudziesięciu warstw bakterii należących do tego samego lub różnych gatunków. W strukturze biofilmu można także wskazać rozbudowaną sieć kanałów, które łączą jego wnętrze z otaczającym środowiskiem. Służą one do transportu metabolitów oraz tlenu w obrębie biofilmu. Ta złożona struktura powoduje, że bakterie w nim żyjące są odporne na środki dezynfekcyjne, promieniowanie ultrafioletowe oraz mechanizmy odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Oporność ta jest między innymi związana z całkowitym brakiem lub bardzo ograniczonym wnikaniem substancji przeciwbakteryjnych do wnętrza biofilmu oraz powstaniem opornych fenotypów. Zakażenia o podłożu biofilmowym występują w układzie słuchowym, sercowo-naczyniowym, trawiennym, rozrodczym, oddechowym oraz moczowym. Obecna wiedza na temat wpływu biofilmu na patogenezę chorób wskazuje na szereg różnych mechanizmów, których poznanie jest kluczowe dla opracowania skutecznych strategii prewencji oraz leczenia wspomnianych infekcji. Badania związane z biofilmem bakteryjnym są ukierunkowane zarówno na poszukiwanie skutecznych oraz bezpiecznych metod zwalczania drobnoustrojów zdolnych do jego tworzenia jak i nowych metod jego badania. Tematyka recenzowanej pracy obejmuje swym zakresem oba wspomniane aspekty. W dobie niepokojąco rosnącej antybiotykoodporności podjęte w rozprawie badania należy uznać za bardzo aktualne i mające także szeroko zakrojony wymiar poznawczy.

2. Charakterystyka formalnej strony rozprawy doktorskiej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska składa się z dwóch części. Część pierwszą, o objętości 26 stron, stanowi autoreferat, który obejmuje: wykaz dorobku naukowego Doktorantki stanowiący przedmiot rozprawy doktorskiej, streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie, cel pracy, wykaz materiałów i metod stosowanych podczas realizacji pracy oraz omówienie wyników badań zaprezentowanych w poszczególnych publikacjach. Na końcu tej części pracy znajdują się najważniejsze wnioski i stwierdzenia dotyczące uzyskanych wyników, a także wykaz literatury. Drugą część rozprawy stanowi jednolity tematycznie zbiór 3 oryginalnych publikacji naukowych:



- 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. **IF 2020 = 2,679; 100 pkt. MEiN**
- Brożyna Malwina, Paleczny Justyna, Kozłowska Weronika, Chodaczek Grzegorz, Dudek-Wicher Ruth, Felińczak Anna, Gołębiwska 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. **IF 2021 = 4,531; 100 pkt. MEiN**
- Brożyna Malwina, Paleczny Justyna, Kozłowska Weronika, Ciecholewska-Juśko Daria, Parfięńczyk 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. **IF 2022 = 4,927; 140 pkt. MEiN**

Wymienione wyżej publikacje zostały opublikowane w renomowanych czasopismach znajdujących się w bazie JCR. Ich łączny współczynnik oddziaływania IF oraz liczba punktów MNiSW wynoszą odpowiednio 12,137 i 340 pkt., co świadczy o bardzo dobrym poziomie przeprowadzonych badań, ocenionych również przez niezależnych recenzentów. Wszystkie publikacje są pracami zespołowymi, a liczba współautorów waha się od 7 do 10. Należy podkreślić, że we wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem i zgodnie z oświadczeniami pozostałych członków zespołu badawczego Jej udział w ich powstaniu był wiodący. Indywidualny wkład pracy doktorantki w przypadku większości publikacji obejmował: współtworzenie koncepcji badań, udział w opracowaniu założeń metodycznych, realizację badań eksperymentalnych, analizę i opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu. W mojej opinii udział Doktorantki w poszczególnych pracach jest znaczący i jednocześnie wystarczający do włączenia ich do cyklu publikacji stanowiącego podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora. Mając na uwadze zakres merytoryczny publikacji wchodzących w skład dzieła należy stwierdzić, że tytuł rozprawy doktorskiej odzwierciedla jej treść i jest w pełni adekwatny. Prezentacja wyników, poprzedzona opisem metodyki badań i jasno sformułowanym celem rozprawy, ułatwiają jej lekturę i zrozumienie koncepcji badań przyjętej dla poszczególnych prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Natomiast za nieuzasadnione uważam włączanie do dorobku naukowego ostatniej pracy (publikacja P4). Tekst manuskryptu został umieszczony w bazie danych bioRxiv świadczącej



bezpłatne usługi archiwizacji i dystrybucji niepublikowanych tekstów naukowych z zakresu nauk przyrodniczych. Baza ta pozwala na udostępnienie społeczności naukowej wstępnej wersji manuskryptu, przy czym jest to wersja niepodlegająca recenzji przez niezależnych ekspertów. Tym samym w mojej opinii nie można formalnie zaliczyć tej pracy do dorobku naukowego doktorantki.

3. Ocena merytoryczna rozprawy

Głównym problemem naukowym podejmowanym w niniejszej rozprawie doktorskiej była ocena *in vitro* aktywności przeciwdrobnoustrojowej i przeciwbiofilmowej frakcji lotnych i płynnych wybranych olejków eterycznych względem patogenów izolowanych z zakażeń kości i ran. Autorka słusznie zauważa, że liczne badania *in vitro* wskazują na silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe olejków eterycznych. Natomiast wyniki badań *in vivo* są bardzo często niejednoznaczne lub całkowicie odmienne od wyników testów *in vitro*. Dotyczy to w szczególności badań aktywności lotnych frakcji olejków eterycznych. Warto w tym miejscu zaznaczyć, że kluczowe znaczenie dla faktycznej oceny aktywności badanych substancji ma wybór szczepów. Wielokrotnie okazuje się, że dana substancja ma silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe jedynie w stosunku do szczepów referencyjnych, pochodzących z kolekcji czystych kultur. Natomiast ich aktywność w odniesieniu do szczepów klinicznych jest marginalna lub statystycznie nieistotna. W publikacji P1 Autorka wykorzystała jedynie szczepy referencyjne. W kolejnych publikacjach pojawiają się natomiast izolaty kliniczne, co istotnie podnosi wartość naukową recenzowanej rozprawy doktorskiej. Publikacja P1 zawiera dane eksperymentalne ilustrujące możliwości opracowanej przez doktorantkę autorskiej metody weryfikacji aktywności olejków eterycznych względem wybranych szczepów bakterii wykazujących zdolności do tworzenia biofilmu (AntiBioVol). Doktorantka udowodniła, że wspomniana metoda pozwala na uzyskanie wiarygodnych wyników w relatywnie krótkim czasie i przy istotnie zredukowanych nakładach materiałowych. Badania zaprezentowane w publikacji P1 wykazały także, że bakterie występujące w formie biofilmu charakteryzują się znacznie większą odpornością na działanie substancji zawartych w badanych olejkach eterycznych aniżeli formy planktoniczne. Dopełnieniem dla prezentowanych wyników liczbowych jest obszerna dokumentacja zdjęciowa preparatów bakterii tworzących biofilm, wykonana techniką SEM.

Wspomniana publikacja zawiera także obszerny suplement obejmujący swym zakresem wyniki uzyskane z zastosowaniem powszechnie uznanych metod badawczych. W materiałach tych zawarto między innymi rezultaty badań dotyczących oceny aktywności



przeciwdrobnoustrojowej roztworów PEG. W literaturze przedmiotu znajdujemy dane wskazujące, że dodatek PEG może pozytywnie wpływać na aktywność różnego rodzaju substancji przeciwdrobnoustrojowych, w tym także olejków eterycznych. Autorka rozprawy wskazała natomiast, że obecność tego polimeru nie wpływa w sposób istotny na aktywność przeciwdrobnoustrojową i przeciwbiofilmową. W publikacji jak i w suplemencie nie zawarto niestety informacji dotyczącej rodzaju oraz masy cząsteczkowej stosowanych roztworów PEG. W związku z tym proszę, by podczas publicznej obrony doktorantka wyjaśniła, czym kierowała się przy wyborze polimeru, jaka była jego masa cząsteczkowa i kryteria, na podstawie których zastosowano opisane stężenia PEG. W suplemencie do publikacji P1 zaprezentowano także wyniki analizy składu chemicznego badanych olejków wykonane metodą GC-MS. Jest to istotny element tej pracy, ponieważ pozwala na kompleksową charakterystykę stosowanych substancji oraz ułatwia porównanie uzyskanych wyników z danymi prezentowanymi przez innych autorów.

W dalszej części badań opisanych w publikacji P2 doktorantka zaprezentowała wyniki dotyczące oceny wpływu frakcji płynnych jak i lotnych wybranych olejków eterycznych (z tymianku, drzewa herbacianego, bazylii, rozmarynu, eukaliptusa, lawendy i mięty mentolowej) na przeżywalność oraz zdolność do tworzenia biofilmu przez 16 wyselekcjonowanych szczepów gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*). Praca ta jest bardzo wartościowa, ponieważ opisuje badania wykonane na 14 szczepach klinicznych zdolnych do tworzenia w pełni dojrzałego biofilmu. Uzyskane wyniki wskazują, że w obrębie szczepów należących do tego samego gatunku drobnoustroju mogą występować bardzo istotne różnice w tolerancji na poszczególne olejki eteryczne. Autorka wykazała, że olejek tymiankowy w formie lotnej jako jedyny wykazał wysoką skuteczność wobec form planktonicznych wszystkich badanych szczepów gronkowca złocistego. Natomiast w formie emulsji (w stężeniu równym 0,1%) całkowicie eradykował biofilm szczepów klinicznych. Pewne wątpliwości budzi jedynie sposób realizacji badań w aspekcie wyboru szczepów. Autorka badała w sumie 16 szczepów, podczas gdy na poszczególnych wykresach dotyczących wpływu wybranych olejków (rys. 3 i 4 oraz np. w tabeli S2) przedstawiono wyniki odnoszące się do znacznie mniejszej ich liczby. W tekście publikacji pojawia się jedynie informacja mówiąca, że podstawą selekcji były wyniki uzyskane metodą mikrorozcieńczeń. W związku z tym proszę doktorantkę o wyjaśnienie, dlaczego dokonano tego rodzaju selekcji i co było podstawą wyboru danego szczepu do testu z wykorzystaniem określonego olejku eterycznego. Autorka podczas realizacji tych badań stosowała szereg bardzo nowoczesnych metod analitycznych bazujących np. na chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem masowym czy metodzie dynamicznego rozpraszania światła



stosowanej do pomiaru wielkości kropeł emulsji. Wykorzystała także możliwości jakie daje nowoczesna mikroskopia konfokalna oraz fluorescencyjna. Szkoda jedynie, że ostatecznie dwie wymienione techniki wykorzystano jedynie do analizy próbek odnoszących się do szczepu referencyjnego *S. aureus* ATCC 6538. Analiza porównawcza obrazów mikroskopowych dla wybranych szczepów *S. aureus* różniących się reakcją na olejki eteryczne byłaby prawdopodobnie interesującym dopełnieniem prezentowanych wyników.

W publikacji P3 autorka skupiła się na badaniu wpływu olejków eterycznych (ich frakcji ciekłych jak i lotnych) na referencyjne oraz kliniczne szczepy *Pseudomonas aeruginosa* występujących w formie planktonicznej jak i biofilmu. Wybór obiektu badań należy uznać za w pełni uzasadniony, bowiem szczepy te są bardzo ważnym czynnikiem etiologicznym wielu zakażeń. Badania opisane w publikacji P3 wykonano zgodnie ze schematem zaprezentowanym w publikacji P2, z tą różnicą, że wyniki analizy składu chemicznego olejków wykonanej metodą GC-MS zaprezentowano w głównej części manuskryptu. Uważam, że wystarczyło w tym przypadku powołać się na opublikowane wcześniej prace Autorki. Analiza aktywności przeciwbakteryjnych płynnych frakcji olejków eterycznych względem form planktonicznych *P. aeruginosa* wykazała, iż olejek rozmarynowy cechował się najwyższą skutecznością spośród testowanych związków. Wykazano, że emulsje zawierające 0,8% olejku całkowicie hamują wzrost 93% badanych szczepów. Autorka zaobserwowała także ciekawe zjawisko związane ze wzrostem przeżywalności komórek tworzących biofilm po ich traktowaniu badanymi olejkami. Wyjaśnienie tego zjawiska jest kluczowe w przypadku potencjalnego wykorzystania olejków w zwalczaniu szczepów tworzących biofilm i wymaga w mojej ocenie dalszych pogłębionych badań. Tutaj poproszę Autorkę o dodatkowy komentarz na ten temat w trakcie publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Przedmiotem czwartej publikacji, której w mojej opinii nie należy traktować formalnie jako części dorobku naukowego autorki były badania mające na celu ocenę wpływu stosowanego podłoża hodowlanego na właściwości i strukturę biofilm bakteryjnego. Badania te są bardzo interesujące i szkoda, że nie udało się Autorce opublikować ich przed złożeniem rozprawy do recenzji. Mimo to myślę, że warto skomentować zaprezentowane wyniki. Autorka zastosowała we wspomnianej pracy podłoże, którego zadaniem była symulacja warunków zbliżonych do tych, jakie występują w trudno gojących się ranach. Wyniki badań porównała z rezultatami uzyskanymi na referencyjnym podłożu TSB. Jest to bardzo ciekawe podejście, zbliża bowiem eksperyment realizowany w warunkach *in vitro* do tego z czym mamy do czynienia w warunkach *in vivo*. Doktorantka wykazała, że rodzaj podłoża ma kluczowe znaczenie dla struktury biofilmu oraz odporności komórek na działanie badanych olejków



etrycznych. Szkoda, że przy okazji realizacji badań na dwóch różnych podłoża Autorka nie podjęła także próby oceny kinetyki formowania dojrzałego biofilmu. W badaniach przyjęto założenie, że dojrzały biofilm powstaje po 24h inkubacji, natomiast można oczekiwać, że zarówno w odniesieniu do podłoża TSB jak i IVWM proces ten będzie przebiegał znacznie szybciej (6-12h). Porównanie kinetyki formowania biofilmu byłoby z całą pewnością wartościowym źródłem dodatkowych danych ułatwiających planowanie dalszych badań i późniejszą interpretację wyników.

Wyniki uzyskane podczas realizacji badań umożliwiły sformułowanie jedenastu wniosków, które należy uznać za w pełni uzasadnione. W tym miejscu chciałbym poprosić doktorantkę o wyrażenie swojej opinii na tematy realnej możliwości zastosowania badanych olejków w zwalczaniu drobnoustrojów tworzących biofilmy. We wnioskach zabrakło mi bowiem ostatecznej konkluzji wskazującej jakie są perspektywy wprowadzenia tego rodzaju rozwiązań do praktyki. Chciałbym także prosić doktorantkę o wyrażenie swojej opinii na temat zjawiska quorum-sensing i jego znaczenia w badaniu biofilmów bakteryjnych.

4. Podsumowanie i wniosek końcowy

Recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska mgr Malwiny Brożyny pt. „Określenie zdolności wybranych olejków eterycznych do eradykacji biofilmu tworzonego przez drobnoustroje izolowane z zakażeń kości i ran” wykonana została z należytą starannością oraz zachowaniem właściwej metodologii badań. Doktorantka nie tylko posiada odpowiednią wiedzę oraz warsztat badawczy z zakresu mikrobiologii, ale także potrafi prowadzić dojrzałą dyskusję uzyskanych wyników. Warto także dodać, że doktorantka posiada znaczny dorobek publikacyjny, wykraczający zdecydowanie poza tematykę recenzowanej rozprawy. Potwierdza to w pełni jej predyspozycje do samodzielnego planowania i prowadzenia badań naukowych.

W mojej ocenie przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Malwiny Brożyny pt. „Określenie zdolności wybranych olejków eterycznych do eradykacji biofilmu tworzonego przez drobnoustroje izolowane z zakażeń kości i ran” spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018, poz. 1668 ze zm.). Zwracam się zatem do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie rozprawy mgr Malwiny Brożyny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 29.09.2023 r.