

OCENA

Rozprawy doktorskiej lek. med. Andrzeja Reetza p.t.

„Skuteczność wybranych antybiotyków oraz nowych środków przeciwdrobnoustrojowych w eradykacji biofilmu tworzonego przez szczepy *Staphylococcus aureus* izolowane z zakażeń kości długich”

Wykonanej w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Promotor: Dr hab. n. med. Marzenna Bartoszewicz, prof. nadzw.

W ostatnim dziesięcioleciu znacząco wzrosła liczba pacjentów leczonych w zakresie chorób narządu ruchu. Dotyczy to zarówno dzieci jak i osoby dorosłe, ale szczególnie pacjentów w podeszłym wieku. Światowa Organizacja Zdrowia nazwała te ostatnie dziesięć lat dekadą chorób kości i stawów, a chirurgię ortopedyczną „Chirurgią ryzyka i niepewnych gwarancji”. Zakażenie kości, które może być efektem różnych sytuacji klinicznych (efekt długotrwałego procesu zapalnego stawów, urazów- złamań otwartych oraz wprowadzenie biomateriału – wszczepów w zaopatrywaniu chirurgicznym) stanowi bardzo poważny problem nowoczesnej medycyny. Zakażenia związane z wprowadzeniem ciała obcego (Biomaterial Associated Infections- BAI) to zakażenie implantu. Jest następstwem kompleksowej reakcji między gospodarzem, drobnoustrojem, a ciałem obcym, w następstwie tworzenia biofilmu. Najczęstszym czynnikiem sprawczym w zakażeniu kości długich są szczepy gronkowca złocistego, które posiadają szczególną zdolność do tworzenia struktur biofilmu. Niestety mimo, prowadzenia prawidłowej diagnostyki oraz stosowania zgodnie z rekomendacjami terapii, skuteczność kliniczna infekcji kości długich jest niezadawalająca. Wynika to z jednej strony z wysokiej oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe czynników etiologicznych wywołujący tę infekcję (szczepy „biofilmowe”), a z drugiej z charakteru tkanki, jaką jest kość, w której toczy się proces, trudnej do przenikania i osiągnięcia odpowiedniego stężenia leku. Najskuteczniejszym postępowaniem w zakażeniu kości jest połączenie prawidłowego leczenia chirurgicznego wspomaganego racjonalną antybiotykoterapią.

Autor niniejszej pracy podjął się ambitnego zadania – próby odpowiedzi na pytanie czy istnieją antybiotyki i nowe środki przeciwdrobnoustrojowe skuteczne w eradykacji biofilmu, który tworzą najczęstsze czynniki etiologiczne, jakim są szczepy *Staphylococcus aureus* (S.a), powodujące zakażenia kości długich.

W tym celu w etapie wstępnym scharakteryzował skolekcjonowane szczepy gronkowcowe izolowane z zakażeń kości u ludzi, pod względem ich wrażliwości na wybrane, najczęściej stosowane w praktyce w leczeniu zakażeń kości antybiotyki, oraz określił zdolności badanych szczepów S.a do tworzenia biofilmu różnymi metodami badawczymi, stosując różne warunki atmosferyczne, odżywcze i różne powierzchnie jak krążki i proszek hydroksypatytowy oraz powierzchnię kości udowych szczurów. Zasadniczym celem poznawczym pracy, jak wspomniano powyżej, było oszacowanie skuteczności wybranych antybiotyków i nowych środków przeciwdrobnoustrojowych, niestosowanych w rutynowej praktyce klinicznej w usuwaniu (eradykacji) biofilmu tworzonego przez szczepy S.a, wcześniej scharakteryzowane.

Całość pracy stanowi: 98 stron tekstu o typowym układzie dla medycznych prac doświadczalnych. Praca zawiera: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski i streszczenia w języku polskim i angielskim. Ponadto na początku pracy umieszczono spis tabel, zdjęć oraz wykresów wraz z numeracją stron, na których się znajdują. Szkoda tylko, że numeracja ta nie zgadzała się z rzeczywistością występowania w tekście, co nieco utrudniało pracę czytającemu, oraz numeracja się powtarza (np. występuje dwa razy - wyk. 9).

Wykaz piśmiennictwa zawiera 84 pozycje prac polskich i zagranicznych związanych z tematyką pracy doktorskiej. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt zamieszczenia w spisie i cytowanie wielu znaczących pozycji prac pochodzących z ostatnich lat.

Z obowiązku recenzenta stwierdzam, że poz. 15 w spisie piśmiennictwa nie jest cytowana w tekście pracy.

Wstęp

W bardzo ciekawym wstępie zawartym na 37 stronach tekstu, Autor omawia w sposób szczegółowy problem biofilmu, jako formy życia i przetrwania drobnoustrojów, podaje obecną definicję tego zjawiska, omawia poszczególne etapy tworzenia się biofilmu. W rozdziale poświęconym zagadnieniu bakterii z gatunku *Staphylococcus aureus*, Doktorant zawiera bardzo szczegółowe informacje dotyczące tego drobnoustroju oraz tworzeniu biofilmu

gronkowcowemu pod kontrolą lub niezależnie od operonu icaABCD. Właśnie te rozdziały zasługują na szczególne wyróżnienie i dowodzą wiedzy na ten temat. Autor, jako klinicysta musiał dogłębnie przestudiować te problemy. W dalszej części wstępu Pan lek med. Andrzej Reetz omawia diagnostykę zakażeń kości, ich klasyfikację, etiologię oraz metody leczenia. W ostatniej części wstępu przedstawia nowe możliwości rozwiązań służących profilaktyce i leczeniu zakażeń kości. I właśnie ta część wstępu bezpośrednio nawiązuje do nadrzędnego celu pracy Autora, który ma przede wszystkim aspekt kliniczny. Mianowicie Pan lek med. Andrzej Reetz w swej pracy zajął się problemem oceny skuteczności działania wybranych antybiotyków (zalecanych w rekomendacjach do leczenia zapaleń kości) i nowych środków przeciwdrobnoustrojowych, niestosowanych w rytynowej praktyce klinicznej. Z obowiązku recenzenta zauważam, że obecnie nie używa się już definicji Zakażenia szpitalne, tylko Zakażenia związane z opieką zdrowotną (HAI -*healthcare associated infection*).

Material i metody

Material i metody przedstawiono bardzo dokładnie na 12 stronach maszynopisu, opisując metody umożliwiające charakterystykę wybranych 24 szczepów MRSA i 24 szczepów MSSA izolowanych z zakażeń kości długich człowieka, pod względem ich profilu antybiotykoodporności oraz określenia ich zdolności do tworzenia biofilmu na różnych materiałach, w tym na kościach udowych szczurów, w różnych warunkach atmosferycznych i odżywczych. Zdaniem recenzenta właśnie ta część badań jest najcenniejsza ze względu zbliżenie warunków badań (symulację) do warunków rzeczywistych w przebiegu infekcji kości u ludzi. Dodatkowo poza metodami mikrobiologicznymi zastosowano w badaniach wizualizację w mikroskopii skaningowej. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono przy pomocy testu Manna Whitney'a oraz Kruskala- Walisa z analizą post-hoc Dunnea przy założeniu istotności statystycznej $p < 0,05$ z użyciem oprogramowania GraphPad Prism 5. Z uwag, należy ujednoczyć i używać spolszczonej pisowni w nazwach antybiotyków.

Wyniki

Wyniki swych badań Autor przedstawia na 23 stronach, a tekst ilustruje w 7 tabelach, 4 zdjęciach i 10 wykresach.

Wyniki podzielono na 3 części.

Pierwsza z nich to ocena wrażliwości na poszczególne antybiotyki szczepów klinicznych MSSA i MRSA izolowanych z materiałów biologicznych od chorych z zakażeniem kości długich. Szczepy cechowały się zróżnicowaną wrażliwością na poszczególne antybiotyki. Interesującą informacją jest stwierdzenie wysokiej oporności na klindamycynę szczególnie wśród szczepów MRSA.

Szkoda, że w zestawie antybiotyków zamiast lewofloksacyny nie zastosowano ciprofloksacyny, co dawałoby lepsze porównanie z dalszymi badaniami.

W drugiej części wyników, Autor określił zdolności szczepów MRSA i MSSA do tworzenia biofilmu *in vitro* (dwoma metodami) i stwierdził, że wszystkie szczepy tę zdolność posiadały i nie było istotnych różnic między nimi w posiadaniu tej zdolności.

Najciekawsze wyniki Autor uzyskał w grupie doświadczeń dotyczących tworzenia się biofilmu gronkowcowego na różnych materiałach (proszek, krążki hydroksyapatytowe i powierzchnia kości długich szczurów) w warunkach zbliżonych do rzeczywistych (warunki atmosferyczne i odżywcze- podłoże do hodowli osteoblastów).

Zaobserwowano, że szczepy MRSA istotnie statystycznie silniej tworzyły biofilm na powierzchni kostnej, co potwierdzono także poprzez wizualizacje mikroskopową. Wadą tej metody jest brak możliwości walidacji, ze względu na różne cechy fragmentów kości stosowanych do eksperymentu.

Trzecia część wyników dotyczy określenia aktywności stosowanych klinicznie w leczeniu zakażeń kości antybiotyków i nowych środków przeciwbakteryjnych poprzez ustalenie MIC i MBEC względem formy planktonicznej oraz biofilmowej reprezentatywnego szczepu MRSA i MSSA. Ustalono, że oporność szczepów MSSA w formie biofilmowej była przynajmniej kilka razy wyższa niż form planktonicznych. Analiza statystyczna wykazała, że szczepy MRSA w formie biofilmowej charakteryzowały się istotnie wyższą opornością na klindamycynę niż szczepy MSSA. A najwyższą zdolność eradykacji biofilmu poprzez określenie % poziomu przeżywalności komórek tworzących biofilm uzyskano przy zastosowaniu citropiny i bisfosfonianu: ciprofloksacyną.

Z uwag recenzenta:

- Na str. 70 w tekście w zdaniu: „, Podobnie jak w przypadku szczepów MRSA...” powinno być MSSA

- W wykr. 6 i 7 powinna być jednakowa skala
- Str. 71 (pomyłka w numeracji tab. – powinna być 7 w tekście)
- Str. 72 (pomyłka w numeracji tab. – powinna być 7, wykr. 8, 9 i 10 w tekście)
- Str. 76 (pomyłka w numeracji wykresów powinno być: 8, 9 i 10)

Dyskusja

Dyskusja została przedstawiona na 7 stronach rozprawy. Doktorant z dużą swobodą i doskonałą znajomością tematu omawia przydatność kolejnych modeli badawczych *in vitro* i porównuje swoje wyniki badań z danymi z piśmiennictwa światowego (także polskiego).

Bardzo krytycznie ocenia swoje wyniki i w sposób logiczny tłumaczy wprowadzenie kolejnych modeli badań dotyczących aktywności przeciwdrobnoustrojowej standardowych leków i nowych preparatów. Autor wykazuje, że obecnie stosowane antybiotyki, ale także nowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe charakteryzują się ograniczoną przydatnością w zwalczaniu zakażeń kości (poza wymienionymi wyjątkami).

Bogata i wielowątkowa dyskusja świadczy o dociekliwości, znajomości podejmowanego tematu i dojrzałości naukowej Autora.

Wnioski.

Doktorant kończy swą pracę sześcioma logicznymi wnioskami, bezpośrednio wynikającymi z wyników przeprowadzonych badań, odpowiadającymi na postawione cele pracy. Najciekawszy wniosek poznawczy to stwierdzenie, że kość, jako powierzchnia wzrostowa biofilmu gronkowcowego, pozwoliła na stwierdzenie większej zdolności do tworzenia tego biofilmu przez szczepy MRSA. Natomiast dwa ostatnie to wnioski praktyczne. Pierwszy z nich sugeruje konieczność zmian w rekomendacjach do leczenia stanów zapalnych kości (wycofanie z zaleceń stosowania klindamycyny ze względu na wysoką oporność najczęstszych czynników etiologicznych zakażenia kości, szczepów gronkowcowych na klindamycynę), a drugi rozważenie stosowanie dotychczas niestosowanych klinicznie związków takich jak citropina, a zwłaszcza koniugatu bisfosfonianu z ciprofloksacyną.

Na zakończenie chciałam podkreślić, że praca (pomimo kilku powyżej wymienionych niedociągnięć edytorskich) została bardzo starannie przygotowana i wykonana, z

uwzględnieniem nowoczesnych metod badawczych, wpisuje się w cenny dorobek naukowy. Wnosi nowe elementy i poszerza wiedzę na badany temat. Napisana jest w przejrzysty sposób, poprawnym językiem naukowym, co sprawia, że czyta się ją z dużym zainteresowaniem.

W świetle powyższych danych pracę oceniam wysoko i uważam, że rozprawa doktorska p.t. „Skuteczność wybranych antybiotyków i nowych środków przeciwdrobnoustrojowych w eradykacji biofilmu tworzonoego przez szczepy *Staphylococcus aureus* izolowane z zakażeń kości długich” wykonana przez Pana lek. med. Andrzeja Reetza, w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz.5 z późn.zm.),

W związku z powyższym stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Nauk i Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pana lek. med. Andrzeja Reetza do dalszych etapów postępowania przewodu doktorskiego i wnoszę o uznanie pracy, jako wyróżniającej.

U. Juszczyk