



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Zakład Nauk Podstawowych

Kierownik prof. dr hab. Irena Choroszy-Król

50-367 Wrocław, ul. Chałubińskiego 4

tel.(71) 784-00-76, fax.(71) 784-00-76, e-mail irena.choroszy-krol@umed.wroc.pl

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt. „Ocena zdolności klinicznych szczepów bakteryjnych do tworzenia biofilmu oraz możliwości jego eradykacji z cewników moczowych a pomocą metod chemicznych i fizycznych”

mgr Moniki Oleksy-Wawrzyniak

Przygotowana na zlecenie Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, n6 6/4/2019 zgodnie z pismem z dnia 19. grudnia 2019. Numer zlecenia RD-2/2020; Nr wniosku-DF-208/2017 podpisanym przez Panią Dziekan prof. dr hab. Agnieszkę Piwowar i przewodniczącego Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne prof. dr hab. Adama Matkowskiego.

Zakażenia układu moczowego należą do najbardziej rozpowszechnionych infekcji występujących u ludzi. Wysoki odsetek uroinfekcji szpitalnych związanych jest z obecnością cewnika moczowego, a drobnoustroje zdolne adsorbować się do powierzchni biomateriałów są obecne zarówno w powietrzu sali operacyjnej i sprzęcie medycznym, jak i na skórze chorego i personelu. Tworzenie biofilmu na powierzchni cewników urologicznych jest niezwykle istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia zakażeń układu moczowego związanej z obecnością kateteru. Złożoność struktury biofilmu oraz poziom zagrożenia rozwojem infekcji o tej patogenezie skłania do przeprowadzenia głębszych badań nad drobnoustrojami występującymi w postaci biofilmu. Poszukiwanie nowych rozwiązań w zwalczaniu biofilmu oraz terapii związanych z nim infekcji jest nie tylko zasadnym, ale coraz pilniejszym do rozwiązania problemem badawczym. Tak więc temat pracy doktorskiej mgr Moniki Oleksy-

Wawrzyniak uważam za jak najbardziej aktualny, godny opracowania. Zadaniem badawczym doktorantki była m.in. ocena zdolności drobnoustrojów będących częstym czynnikiem etiologicznym zakażeń układu moczowego do tworzenia biofilmu na różnych powierzchniach, a także możliwość eradykacji utworzonego biofilmu za pomocą metod fizykochemicznych i fizycznych. Praca miała też na celu: ocenę zdolności drobnoustrojów do tworzenia biofilmu stacjonarnie na polistyrenie i polichloroku winylu w pełnym medium hodowlanym, w pożywkach imitujących fizjologiczny moczu ludzki oraz moczu wzbogacony glukozą, ocenę zdolności drobnoustrojów do tworzenia biofilmu na powierzchni polichloroku winylu w warunkach przepływowych w pełnym medium hodowlanym i w warunkach zbliżonych do środowiska dróg moczowych. Ponadto spośród licznych celów szczegółowych wymienić należy: mikroskopową ocenę struktury biofilmu utworzonego w warunkach przepływowych na cewniku w czasie hodowli w pełnym medium hodowlanym oraz w sztucznym moczu wzbogaconym glukozą; ocenę zdolności badanych szczepów do produkcji zewnątrzkomórkowego śluzu w zależności od warunków hodowli, a także określenie przydatności zewnętrznego pola elektromagnetycznego w próbach eradykacji biofilmu utworzonego na powierzchni cewnika moczowego.

Do oceny otrzymałam egzemplarz pracy liczącej 218 stron łącznie z tabelami, schematami, rycinami, zdjęciami i suplementem. Praca ma typowy układ przyjęty w tego typu opracowaniach. W dobrze napisanym i obszernym wstępie (str. 16-49) Autorka przedstawiła charakterystykę biofilmu w patogenezie zakażeń oraz poruszyła zagadnienia dotyczące biofilmu zasiedlającego organizm człowieka i tworzonego na powierzchni ciał obcych.

W dalszej części wstępu Autorka przedstawiła charakterystykę zakażeń układu moczowego oraz czynniki etiologiczne wywołujące ten typ zakażeń, a następnie omówiła metody badania biofilmu *in vitro* oraz metody jego eradykacji w zakażeniach układu moczowego. W rozdziale tym opisano także metody usuwania biofilmu z organizmu oraz eradykację biofilmu z powierzchni cewników moczowych. W przedstawionej mi do recenzji pracy brakowało w wykazie zastosowanych skrótów, polskiego odpowiednika angielskiego tłumaczenia niektórych skrótów, co należałoby uzupełnić w manuskrypcie. W tej części pracy zauważyłam także nieliczne błędy literowe, brak spacji między wyrazami, opuszczone litery oraz brak łącznika w zdaniu.

Cel pracy (str. 50) został jasno określony, zamierzenia badawcze doktorantki dotyczyły m.in. oceny zdolności drobnoustrojów będących częstym czynnikiem etiologicznym zakażeń układu moczowego do tworzenia biofilmu na różnych powierzchniach, ocenę składu poszczególnych substancji zewnątrzkomórkowej macierzy biofilmowej oraz określenie

minimalnych stężeń hamujących tworzenie biofilmu na powierzchni polistyrenu przez badane drobnoustroje dla wybranych substancji przeciwdrobnoustrojowych w hodowli ze sztucznym moczem wzbogaconym glukozą.

W rozdziale Materiały i Metody (str. 51-87) Autorka przedstawiła charakterystykę oraz pochodzenie badanego materiału. Przedmiotem badań było 396 szczepów klinicznych wchodzących w skład kolekcji Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz 6 szczepów referencyjnych pochodzących z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych ATCC. Analizowane szczepy charakteryzowały się wysokim stopniem oporności na badane substancje przeciwdrobnoustrojowe - szczegółowy profil lekowrażliwości Autorka przedstawiła w tabelach w załączonym suplementcie.

W kolejnych etapach eksperymentów wybrano reprezentacyjną pulę liczącą od kilku do kilkunastu szczepów z każdego gatunku. Wśród badanych szczepów były to: *Escherichia coli* (n=31), *Klebsiella pneumoniae* (n=40), *Enterobacter cloacae* (n=34) i *Enterococcus faecium* (n=29) - łącznie 134 szczepy kliniczne i 6 szczepów wzorcowych (doświadczenia przeprowadzono w 6 powtórzeniach). Rozdział ten zawiera szczegółowy opis wszystkich zastosowanych w badaniach metod oraz analizę statystyczną w której wykorzystano różne programy, testy i metody.

W tej części pracy zauważyłam drobne nieścisłości i nieliczne błędy literowe, opuszczone litery, nieprawidłową odmianę, brak łącznika zdań, brak spacji między wyrazami (str.50-63), które będą wymagały korekty. Na str. 65 Autorka pisze „diwodorofosforan potasu” powinno być dwuwodorofosforan potasu, podobnie na str. 77 „trifluorooctowy” a powinno być trójfluorooctowy, ponieważ praca pisana jest w języku polskim wymaga to zmiany. Ponadto na str. 61, 63, 77, 85 niefortunnie użyto wyrazu krok; proponuję zastąpić to słowem etap. Autorka dość często używa słowa sekcja w odniesieniu do rozdziału. W wielu miejscach tej części pracy Autorka używa cytując „12 lub 96 dołkowe płytki” proponuję zastąpić to słowem wgłębienia lub studzienki chociaż w rozdziale materiał i metody pojawia się też poprawna nazwa studzienki, proponuję to ujednoczyć.

Wyniki badań (str. 88-169) mgr Monika Oleksy-Wawrzyniak przedstawiła w 13 tabelach, 2 schematach, 60 rycinach oraz 22 zdjęciach. Rozdział ten został dobrze opracowany, na podkreślenie zasługuje czytelne przedstawienie wyników badań w formie tabel i rycin, które doskonale obrazują uzyskane wyniki. We wstępnych badaniach Autorka przeprowadziła dwuetapową analizę zdolności do tworzenia biofilmu, oceniając zarówno elementy morfotyczne w badanej strukturze, jak również ilość i skład zewnątrzkomórkowej macierzy.

Badania przeprowadzono przy użyciu standardowych analiz płytkowych oraz w układach doświadczalnych imitujących warunki występujące u pacjenta z założonym cewnikiem moczowym. Przesiewowe badania pomiaru całkowitej biomasy biofilmu utworzonego na polistyrenie, w pełnym medium hodowlanym pozwoliło Autorce na wstępny podział analizowanych drobnoustrojów na grupy o zróżnicowanych zdolnościach formowania struktury biofilmu. Półilościowa ocena liczby żywych komórek adherujących do podłoża w wyżej wymienionych warunkach wykazała zróżnicowanie pomiędzy szczepami wewnątrz wyodrębnionych wcześniej grup. Uzyskane wyniki świadczą o dużym zróżnicowaniu wewnątrzgatunkowym jeśli chodzi o zdolności do tworzenia biofilmu oraz istotnym znaczeniu macierzy zewnątrzkomórkowej w tworzeniu tej struktury. Analizując otrzymane wyniki badań można zauważyć, że Gram ujemne pałeczki tworzyły biofilm silniej w porównaniu do Gram-dodatnich ziarniaków, co potwierdza istotny udział tych drobnoustrojów w zakażeniach o patogenezie biofilmowej.

W badaniach własnych wykorzystując technikę posiewów ilościowych Autorka wykazała, że spośród analizowanych gatunków drobnoustrojów najwyższym powinowactwem do powierzchni cewnika typu Nelaton cechowały się komórki pałeczek *E. coli*. Podobnie w warunkach przepływu medium, biofilm *E. coli* oceniany metodą Richards a był znacznie silniejszy w badaniach z użyciem kateteru niż utworzony stacjonarnie na polistyrenie.

W dalszych badaniach mgr Monika Oleksy-Wawrzyniak prowadząc eksperyment w warunkach przepływowych w sztucznym moczu z glukozą wykazała m.in., że *Klebsiella pneumoniae* tworzyła biofilm znacząco silniej niż w standardowych warunkach laboratoryjnych.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Autorka stwierdziła, że doświadczenia oceniające zdolność do produkcji śluzu wykazały, że powszechnie stosowane metody nie są wystarczająco czułe, powtarzalne i porównywalne. W tej części pracy również zauważyłam nieliczne błędy literowe, opuszczone litery, opuszczone wyrazy, nieprawidłową odmianę, brak spacji między wyrazami (str. 89, 97, 109, 129, 137, 144, 150), które będą wymagały korekty.

W rozdziale omówienie wyników i dyskusja (str.170-188) Doktorantka 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 Kandydatki.

Na zakończenie pracy Autorka przedstawia 8 wniosków (str.189), które są bardzo dobrze sformułowane i mają uzasadnienie w wynikach badań.

Na uznanie zasługuje również znakomicie opracowane streszczenie pracy (str.190-193), które w zwięzłym nowoczesnym stylu oddaje meritum pracy.

Piśmiennictwo (str.197-207) zawiera liczbę 122 cytowanych prac, głównie anglojęzycznych. Stanowi ono silną pozycję dysertacji, gdyż jest ściśle tematycznie i pochodzi z ostatnich lat. Na podkreślenie zasługuje fakt, że 56 cytowanych prac zostało opublikowanych w latach 2015-2019. Warto zwrócić także uwagę na to, że mgr Monika Oleksy-Wawrzyniak przytacza prace nie tylko autorów zagranicznych, ale także 40 pozycji piśmiennictwa polskiego.

Z obowiązku recenzenta chcę zwrócić uwagę, na fakt, że w tej części pracy znaleziono wiele uchybień związanych z brakiem spacji między wyrazami, brakiem znaków interpunkcyjnych przy podawaniu strony „od... do” w poszczególnych czasopismach, czy też jak w poz. 87, 104 brak roku wydania, poz. 31, 63 brak strony końcowej, poz.70, 97 nieprawidłowe litery, w poz.41 nie podano tomu, poz. 28, 30, 31, 50, 88, 98, 103 nie podano skrótów czasopism lub skróty są nieprawidłowe, co będzie wymagało korekty przy przygotowaniu pracy do druku.

Za szczególną wartość pracy uważam to, że Autorka wykazała, że zdolność tworzenia biofilmu jest cechą zależną od szczepu i ma związek zarówno z liczbą adherujących do podłoża komórek jak i ilością zewnątrzkomórkowej macierzy. Jednocześnie, siła tworzenia biofilmu zależy od rodzaju powierzchni przylegania, składu medium hodowlanego oraz warunków hodowli, a obecność w środowisku glukozy może być czynnikiem promującym tworzenie się silnych struktur biofilmu wewnątrz światła cewnika. Istotne znaczenie mają także własne obserwacje Doktorantki z których wynika, że środki przeciwdrobnoustrojowe cechowały się wyższą skutecznością w eradykacji biofilmu w medium zbliżonym do moczu człowieka niż w pełnym medium hodowlanym, a mechaniczne przepłukiwanie kateteru może być skuteczną formą usuwania biofilmu z jego powierzchni.

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 Kandydatki. Pragnę podkreślić, że pracę doktorską mgr Moniki Oleksy-Wawrzyniak 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) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2019 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz.1669 z późn. zm) i przedstawiam Radzie Dyscypliny Nauki Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr Moniki Oleksy-Wawrzyniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 15 stycznia 2020.

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

