



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

dr. hab Anna Pawlik
tel. 071-3709949
e-mail: anna.pawlik@hirsztfeld.pl

Wrocław, 12.08.2020

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Pawła Krzyżka pt.:
„Wpływ antybiotyków i innych związków na szczepę *Helicobacter pylori*”

Rozprawa doktorska mgr Pawła Krzyżka przedstawia wyniki badań zmierzających do identyfikacji związków, które mogą być wykorzystane w leczeniu zakażeń *H. pylori*. Rozprawa została wykonana pod opieką Pani Profesor Grażyny Gościński, w zespole posiadającym duże doświadczenie w badaniu i monitorowaniu oporności szczepów *H. pylori* na antybiotyki.

Oporność bakterii na antybiotyki jest zjawiskiem znanym od momentu ich pierwszego zastosowania na początku lat 40 ubiegłego wieku. Natomiast problem szybko narastającej oporności bakterii, w szczególności oporności wielolekowej, pojawił się stosunkowo niedawno, i jest spowodowany m.in. przez nadużywanie antybiotyków w medycynie i rolnictwie, a potęgowany przez niewystraszający postęp prac zmierzających do odkrywania nowych antybiotyków. W tym świetle badania podjęte przez Doktoranta wpisują się w nurt aktualnie prowadzonych, oryginalnych prac naukowych dotyczących szeroko pojętego problemu antybiotykoodporności bakterii.

Rozprawa doktorska w formie spójnego tematycznie zbioru prac obejmuje 3 artykuły, w tym dwie prace oryginalne i jedną przeglądową. Prace mają charakter zespołowy, przy czym, zgodnie z dokumentami przedstawionymi w pracy, wkład Doktoranta w ich powstanie był bardzo duży, zarówno na poziomie koncepcyjnym, wykonawczym i publikacyjnym. Wartym podkreślenia jest fakt, że Doktorant jest autorem korespondencyjnym we wszystkich publikacjach. Prace zostały opublikowane w języku angielskim w czasopismach naukowych posiadających współczynnik wpływu IF (łącznie 12,162 według Journal Citation Reports za rok 2019), znajdujących się w „Wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych wraz z przypisaną liczbą punktów” (załącznik o komunikatu MNiSW z dnia 31.7.2019r) (łącznie 340 pkt). Rozprawa jest uzupełniona o wymagane streszczenia w języku polskim i angielskim oraz oświadczenia współautorów pracy o udziale w powstałych publikacjach. Ponadto rozprawa zawiera 7 rozdziałów w języku polskim, w których doktorant zawarł kolejno: krótki rys teoretyczny, cel pracy, opis metod, wyniki, dyskusję, podsumowanie i piśmiennictwo. Zastanawiam się nad celowością zamieszczenia tak rozbudowanej, niewymaganej ustawą części rozprawy. O ile pewien rodzaj wprowadzenia do rozprawy w formie spójnego tematycznie zbioru prac jest wskazany, głównie aby wykazać cel

pracy i spójność tematyczną publikacji, to w tym wypadku uważam, że ten rozdział, stanowiący coś w rodzaju „mini-rozprawy”, jest zbyt długi, powtarza w znaczącej części to, co jest zwarte w artykułach i mógłby być zdecydowanie skrócony. W rozprawie brakuje natomiast danych dodatkowych uzupełniających opublikowane prace (*ang. Supplementary information*). Obie prace oryginalne zawierają takie suplementy, natomiast nie zostały one wydrukowane i dołączone do rozprawy. Są one publicznie dostępne i możliwe do oceny, ale powinny być dołączone do rozprawy aby stanowiły jednolitą całość z główną częścią pracy.

Celem wyraźnie sprecyzowanym i realizowanym w pracy podjętej przez Doktoranta było zbadanie czy 3-bromopirogronian oraz sertralina wykazują działanie hamujące wzrost lub biobójcze w stosunku do *H. pylori*. Doktorant w wyborze związków kierował się danymi literaturowymi oraz danymi uzyskanymi od współpracowników, wykazującymi aktywność bakteriobójczą badanych związków w stosunku do różnych gatunków bakterii, oraz dotychczasowym wykorzystaniem wybranych do badań związków jako leków, co potencjalnie, zgodnie ze strategią repozycjonowania, może przyspieszyć zastosowanie substancji w leczeniu zakażeń *H. pylori*. Doktorant, wykorzystując standardowe metody mikrobiologiczne (hodowle płynne, testy krążkowo-dyfuzyjne), analizował oporność szczepów *H. pylori* na badane substancje w zależności od oporności na antybiotyki, wyznaczał wartości najniższych stężeń hamujących wzrost bakterii (MIC), najniższych stężeń wykazujących działanie biobójcze (MBC), określał żywotność *H. pylori* w zależności od czasu działania badanych związków oraz analizował wpływ każdej z substancji na działanie znanych antybiotyków stosowanych w terapii przeciwko *H. pylori*. Wykorzystując metody mikroskopowe (mikroskopia fluorescencyjna Live/Dead, mikroskopia elektronowa SEM) Doktorant badał indukowanie zmian morfologicznych komórek bakteryjnych (formy spiralnej i kokoidalnej) oraz przeżywalność bakterii w zależności od czasu działania badanych związków. Zagadnieniu zależności oporności *H. pylori* na antybiotyki od formy morfologicznej poświęcona jest praca przeglądowa wchodząca w skład rozprawy. Zaznaczyć należy, że duża wiedza teoretyczna, kompleksowe podejście do problemu i zastosowanie wielu dobrze dobranych metod do oceny aktywności bakteriobójczej każdego ze związków pozwoliło Doktorantowi na dokładne opisanie aktywności badanych związków i ich potencjalne zastosowanie w leczeniu zakażeń *H. pylori*.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy należą:

- Wykazanie, że 3-bromopirogronian działa hamująco na wzrost *H. pylori* w stężeniu 32-128 µg/ml, a biobójczo w stężeniu 128 µg/ml.
- Wykazanie, że 3-bromopirogronian w przypadku szczepu Tx30a wykazuje synergistyczną aktywność hamowania wzrostu *H. pylori* w parze z klarytromycyną (w przypadku szczepu 7143 aktywność addytywną); natomiast w parze z amoksycyliną lub tetracykliną 3-bromopirogronian wykazuje aktywność addytywną hamowania wzrostu obu badanych szczepów *H. pylori*.
- Wykazanie, że sertralina działa hamująco na wzrost *H. pylori* w stężeniu 2-8 µg/ml, a biobójczo w stężeniu 4-8 µg/ml.
- Wykazanie, że zachodzi synergistyczna zależność aktywności hamowania wzrostu *H. pylori* w parze sertralina- tetracyklina w przypadku obu badanych szczepów (Tx30a i 7143) i

w układzie sertralina-metronidazol w przypadku szczepu 7143; aktywność addytywna została wykazana dla obu badanych szczepów w parach sertraliny z klarytromycyną, amoksycyliną, a dla szczepu Tx30a z metronidazolem.

- Wykonanie analizy możliwości zastosowania 3-bromopirigronianu i sertraliny w leczeniu zakażeń *H. pylori* na podstawie dotychczasowych danych farmakologicznych.
- Wykonanie analizy danych literaturowych dotyczących wpływu różnych klas substancji i ich mieszanin na morfologię *H. pylori* oraz oporności różnych form *H. pylori* na substancje chemiczne. Krytyczna dyskusja danych literaturowych pod kątem stosowania metod badania aktywności antybiotycznej związków/substancji wobec *H. pylori* w zależności od morfologii bakterii (spiralnej lub kokoidalnej) jest również istotna dla badań nad bakteriami tworzącymi formy niehodowlane VBNC.

Wyniki zaprezentowane w pracy są przekonujące, dobrze udokumentowane, wyczerpująco opisane i świadczą o rzetelnym i dokładnym przeprowadzeniu zaplanowanych badań, które umożliwiły osiągnięcie postawionego w pracy celu. Nie znalazłam jednak informacji dotyczących kilku istotnych kwestii i proszę Doktoranta o uzupełnienie informacji:

1. W jaki sposób obserwował Pan zahamowanie wzrostu w testach zmierzających do określenia wartości MIC? O ile wiadomo jak określana była wartość MBC, to nie jest jednoznacznie podane jak mierzony był wzrost bakterii w celu określenia wartości MIC.
2. Dlaczego na rysunkach 1 i 2 w publikacji *Cancers 2019, 11, 229* oraz 2 i 3 w publikacji *Pathogens 2019, 8, 228* nie zaznaczono odchyłeń standardowych dla wartości CFU/ml i procentu form spiralnych. W opisie metod napisano, że analizy wykonano dwukrotnie (w powtórzeniu dwukrotnym), więc prezentowane dane są zapewne uśrednione i powinny zawierać wartości odchyłeń standardowych. Czy były to powtórzenia biologiczne czy techniczne?
3. Proszę podać które szczepy przedstawiają zdjęcia na rysunkach 3 i 5 w publikacji *Cancers 2019, 11, 229* i na rysunku 4 w publikacji *Pathogens 2019, 8, 228*.
4. W opisie metody „Light microscopy” w publikacji *Cancers 2019, 11, 229* podano, że gdy procent form spiralnych był mniejszy niż 15 lub większy niż 90 to nie liczono dokładnej liczby bakterii spiralnych. W jaki sposób w takim razie szacowano ten procent?
5. W publikacji *Cancers 2019, 11, 229*, w opisie metody „Disk-Diffusion Method” opisuje Pan sposób rozcieńczeń wysiewanych bakterii. Napisał Pan, że bakterie rozcieńczano do stężenia ok. 10^8 CFU/ml, a potem wysiewano na płytki osiągając stężenie ok. 5×10^6 CFU/ml. Tylko jak można określić stężenie (liczbę bakterii w objętości), podczas wysiewania bakterii na płytki?
6. Jakie płytki stosował Pan w testach MIC/MBC i testach szachownicy? Nie jest to podane w opisie metody, a cechy płytki, sposób wentylacji czy izolacji cieplnej (np. płaszcz wodny) mogą być istotne dla wzrostu bakterii i wyników testu.
7. Czy podczas wykonywania testu szachownicy z wykorzystaniem 3-bromopirogronianu hodowle były wytrząsane? W opisie metody nie jest to zaznaczone, a jest to ważne dla wyników testu.

Chciałabym poprosić Doktoranta o komentarz do następujących pytań o bardziej ogólnym charakterze, które nasunęły mi się w trakcie czytania pracy:

1. 3-bromopirogronian i sertralina wykazują aktywność przeciwbakteryjną wobec innych gatunków bakterii. Czy można wskazać gatunki, na które związki te działają lepiej/wydajniej (generalnie przy niższym stężeniu) i jak na tym tle wygląda aktywność przeciwko *H. pylori*. Czy któryś z tych związków znalazł już zastosowanie poza swoim pierwotnym przeznaczeniem?

2. Czy biorąc pod uwagę fakt, że oba związki są lub mogą być w przyszłości stosowane w terapiach nieobojętnych dla zdrowia człowieka (leczenie depresji, chemioterapia), można jednoznacznie powiedzieć, że ich zastosowanie w leczeniu *H. pylori* przyniesie rzeczywiście korzyści przewyższające ryzyko wynikające ze stosowania tych leków? Pytanie jest o tyle istotne, że aby można było osiągnąć wartości zbliżone do stężeń hamujących wzrost *H. pylori*, przewiduje Pan konieczność zastosowania tych związków w stężeniach bliskich dziennym maksymalnym dawkom (sertraliny 200 mg/dobę), lub bliskich efektowi cytotoksyczności (1,75 mM 3-bromopirogronianu).

3. Cytuje Pan w pracy dokumenty/publikacje zawierające zalecenia eradykacji *H. pylori* nawet wtedy kiedy pacjent nie ma objawów choroby. Z drugiej strony, powodem lekooporności bakterii, w tym *H. pylori*, jest nadużywanie antybiotyków. Wiadomo, że większość zakażeń *H. pylori* jest bezobjawowa, objawy rozwijają się u około 10-15%, a rak żołądka u około 1-2% zakażonych. Czy w takim razie, biorąc pod uwagę dużą liczbę zakażonych, leczenie pacjentów bezobjawowych nie przyczyni się do zwiększenia lekooporności bakterii?

Podsumowując recenzję merytoryczną rozprawy doktorskiej Pana mgr Pawła Krzyżka mogę stwierdzić, że cel pracy doktorskiej został osiągnięty a moje uwagi nie umniejszają jej wartości. Praca zawiera nowatorskie wyniki, dotyczące aktualnie istotnego problemu naukowego (prace opublikowane w 2019 roku cytowane są 7 razy, w tym 3 razy autocytowane), o możliwym zastosowaniu aplikacyjnym. Rozprawa została przygotowana starannie, nieliczne błędy językowe/stylistyczne nie utrudniają czytania i zrozumienia pracy. Podkreślić należy wkład pracy Doktoranta w wykonanie analiz z wykorzystaniem wielu szczepów *H. pylori* i jego wiodący udział w przygotowaniu opublikowanych prac na każdym etapie ich powstawania.

Uważam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Pawła Krzyżka 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 w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595. z późn. zm.). Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medycze Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pana mgr Pawła Krzyżka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na uzyskane wyniki oraz ponadprzeciętny wkład Doktoranta w cały proces pracy naukowej, świadczący o jego dużej inwencji i samodzielności naukowej, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Medycze Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Dr hab. Anna Pawlik

Kierownik Laboratorium
Biologii Molekularnej Mikroorganizmów