



21.08.2020

Prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska
Zakład Mikrobiologii
Instytut Genetyki i Mikrobiologii
Uniwersytet Wrocławski

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr mikrobiologii **Pawła Krzyżek** wykonanej w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pt. "**Wpływ antybiotyków i innych związków na szczepy *Helicobacter pylori***"
Promotor: prof. dr hab. Grażyna Gościński

Przedstawiona do recenzji praca jest spójnym tematycznie cyklem trzech artykułów opublikowanych w latach 2019-2020 w czasopismach naukowych: *Cancers* oraz *Pathogens*. Oba czasopisma znajdują się w wykazie czasopism MNiSW z dnia 18 grudnia 2019 r. Sumaryczny IF publikacji to 12,972, a liczba punktów MNiSW to 340. Mgr Paweł Krzyżek jest pierwszym autorem we wszystkich pracach i co niezwykle ważne, w każdej z prac jest autorem korespondencyjnym.

W rozprawie doktorskiej wyróżniono rozdziały w języku polskim: wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie, piśmiennictwo, oraz teksty 3 publikacji w języku angielskim, w tym jedna z prac w cyklu jest pracą przeglądową. W dokumentacji Doktorant ujął także swoje osiągnięcia naukowo-badawcze, oświadczenia współautorów określające wkład w powstanie prac oraz oświadczenie komisji bioetycznej. Procentowy udział Doktoranta w powstawaniu prac wynosił od 75%-95%. Mgr P. Krzyżek był odpowiedzialny za koncepcję prac naukowych wchodzących w skład cyklu, samodzielne wykonanie znaczącej części eksperymentów i co ważne również pozyskiwanie funduszy na badania. Doktorant był także odpowiedzialny za przygotowanie manuskryptów oraz korespondencje z wydawnictwami w procesie wydawniczym.

Głównym celem jaki postawił sobie Doktorant w badaniach było zbadanie wpływu antybiotyków i sertraliny oraz 3-bromopirogronianu na formy planktoniczne *Helicobacter pylori*, dodatkowo Doktorant oceniał wpływ tych związków na morfologię komórek bakterii.

Tematykę i zakres badań ujętych w niniejszej rozprawie należy uznać za innowacyjne i nowatorskie. Obecnie, w dobie narastającej nieustannie antybiotykooporności wśród różnych gatunków bakterii, poszukiwanie nowych terapii, w tym alternatywnych, analizowanie i poznawanie mechanizmów odpowiedzi bakterii na różne związki możliwe do wykorzystania w terapii, są jednym z najważniejszych wyzwań



jakie stawia się przed mikrobiologami i takie właśnie wyzwanie podjął Doktorant w swoich badaniach.

Obiektem badawczym były bakterie z gatunku *Helicobacter pylori*. *H. pylori* to mikroaerofilna, Gram - ujemna bakteria kolonizująca głównie błony śluzowe żołądka, będąca czynnikiem etiologicznym zapalenia błony śluzowej żołądka. Długotrwała kolonizacja błony śluzowej żołądka przez *H. pylori* może prowadzić do zanikowego zapalenia żołądka, następnie do gruczoloraka czy chłoniaków. Współcześnie, dodatkowym problemem w eradykacji *H. pylori* jest wzrastająca liczba opornych na antybiotyki szczepów. W tym kontekście, tematykę jaką podjął Doktorant w swojej pracy badawczej, uznać należy za cenną, aktualną i dającą podstawy do dalszych badań w przyszłości.

Wstęp jest krótkim wprowadzeniem do omówienia wyników eksperymentalnej części pracy. Autor przedstawia krótką charakterystykę bakterii z gatunku *H. pylori*, omawia także zjawisko oporności tej bakterii na antybiotyki. Związkami przeciwdrobnoustrojowymi wybranymi do badań była sertralina, wykorzystywana w leczeniu depresji oraz 3-bromopirogronian (3-BP) używany jako lek przeciwnowotworowy. Oba związki, co ciekawe, wykazują także potencjalne działanie przeciwbakteryjne (przeciwdrobnoustrojowe) i przeciwgrzybicze (badania z lat 2012-2019). Warto nadmienić, iż w badaniach nad tymi związkami udział swój mają także inni badacze z Polski, w tym z Uniwersytetu Wrocławskiego. Wykazanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej sertraliny i 3-bromopirogronianu względem szczepów *H. pylori* było zasadniczym celem pracy doktorskiej. W pracy badano aktywność przeciwdrobnoustrojową sertraliny i 3-BP w połączeniu z antybiotykami stosowanymi w terapii wobec szczepów *H. pylori*. Interesującym nurtem badawczym ujętym w pracy jest także ustalenie zależności między aktywnością przeciwdrobnoustrojową badanych substancji, a zmiennością morfologiczną komórek bakterii. W związku z tym, iż w części wprowadzającej Autor rozprawy nie ujął zagadnienia możliwych zmian w wirulencji *H. pylori* w odpowiedzi na stosowanie różnych związków przeciwdrobnoustrojowych, w tym sertraliny oraz 3-bromopirogronianu, poproszę o omówienie tego zagadnienia w trakcie publicznej obrony pracy.

- ✓ Jak biorąc pod uwagę mechanizmy działania tych związków na komórkę bakterii mogą one wpływać na wirulencję *H. pylori*?
- ✓ Czy zastosowanie tych związków w terapii może mieć wpływ na zjawisko mimikry molekularnej antygenów *H. pylori*?

Materiały i metody przedstawione są czytelnie. Autor rozprawy opanował techniki mikrobiologiczne (techniki hodowlane, techniki określające aktywność przeciwbakteryjną



badanych substancji) i techniki mikroskopowe (mikroskopia świetlna, fluorescencyjna czy skaningowa mikroskopia elektronowa).

- ✓ Pytanie do tej części pracy dotyczy charakterystyki wybranych szczepów do badań. Autor wskazuje w opisie (strona 9), iż były to szczepy odporne na antybiotyki, natomiast w tekstach publikacji wymieniane są szczepy zarówno odporne jak i wrażliwe na antybiotyki, skąd ta nieścisłość?
- ✓ Co było kryterium wyboru szczepów dla wyznaczenia wartości MIC i MBC dla 3-BP i sertraliny?

Wyniki zasadniczo ujęte są w dwa obszary: charakterystyka aktywności 3-BP względem szczepów *H. pylori* oraz charakterystyka aktywności sertraliny względem szczepów *H. pylori*. W badaniach wykazano zróżnicowaną wartość MIC, inną dla 3-BP (32-128 $\mu\text{l/ml}$) oraz inną dla sertraliny (2-8 $\mu\text{l/ml}$). Interesujące wyniki uzyskano w zakresie interakcji z antybiotykami zarówno 3-BP jak i sertraliny.

Pytania do tej części pracy:

- ✓ Czy obie testowane substancje mogą mieć wpływ na mikrobiom jelitowy?
- ✓ Jaka jest opinia Doktoranta wobec potencjalnie możliwego występowania zjawiska oporności komórek *H. pylori* na 3-BP lub sertralinę?

Cenny wynik dla przyszłych badań dotyczy tego, że antybiotykooporność szczepów *H. pylori* nie wpływa na wrażliwość bakterii na 3-BP jak i sertralinę. Biorąc pod uwagę uzyskane dotychczas przez Doktoranta wyniki badań, plany badawcze jakie wskazuje na przyszłość Doktorant są bardzo trafnie dobrane i przemyślane.

Zadanie jakie postawił sobie Doktorant w pracy przeglądowej dotyczyło zebrania dostępnych w publikacjach informacji o morfologicznych zmianach komórek *H. pylori* w formy sferyczne po zastosowaniu związków przeciwbakteryjnych i wpływie tych morfologicznych zmian na ochronę komórek przed działaniem związków przeciwbakteryjnych.

Analizując opublikowane prace Doktoranta, na wyróżnienie zasługuje dobrze i szczegółowo opracowana część metodyczna, czytelne schematy i dokumentacja fotograficzna wyników, dobre zestawienia tabelaryczne i wykresy, a także dojrzała i ciekawa dyskusja. W badaniach własnych Doktorant wykazał, iż testowane 3-BP oraz sertralina wykazywały bakteriobójczość mimo obecności sferycznych form *H. pylori*,



dodatkowo wysoka aktywność przeciwbakteryjna tych związków względem *H. pylori* daje duże nadzieje w przyszłej terapii.

Doktorant w dokumentacji przedstawił także całość swoich osiągnięć naukowo-badawczych, którą oceniam wysoko. Doktorant wykazuje się znaczącą aktywnością naukową, jest pierwszym autorem w 19 pracach zarówno oryginalnych jak i przeglądowych. Na wyróżnienie zasługuje także szeroka współpraca z innymi ośrodkami naukowymi z Francji, Włoch, Serbii czy USA.

Podsumowując stwierdzam, iż rozprawa doktorska **mgr Pawła Krzyżek** wykonana w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im Piastów Śląskich we Wrocławiu pt. "**Wpływ antybiotyków i innych związków na szczepy *Helicobacter pylori***" została dobrze zaplanowana i wykonana, uzyskano w niej wartościowe wyniki. Mgr Paweł Krzyżek wykazał się nie tylko umiejętnościami w zakresie planowania koncepcji pracy, wykonania szeregu eksperymentów, ale także umiejętnościami napisania i przygotowywania manuskryptów, które opublikowane zostały w czasopismach indeksowanych na liście MNiSW. Są to niezwykle cenne umiejętności Doktoranta, które oceniam bardzo wysoko. Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, iż rozprawa doktorska 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.). Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z uprzejmą prośbą o dopuszczenie **mgr Pawła Krzyżek** do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie rozprawy doktorskiej.


Prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska