

dr hab. n. med. Bartosz Kubisa

Oddział Kliniczny Torakochirurgii

Kliniki Kardiochirurgii

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

recenzent rozprawy doktorskiej Joanny Czajkowskiej

zgodnie z pismem od Dziekana Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej

Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

WTiCh/A/111/2022 z dnia 08.07.2022r

Warszawa, 03.08.2022r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani Joanny Czajkowskiej pt.: „Odpowiedź fibroblastów na obecność biofilmów tworzonych przez patogeny izolowane z przewlekłych owrzodzeń żylnych”**

Współcześnie coraz więcej ludzi dożywa sędziwszego wieku, co powoduje wzrost częstotliwości chorób cywilizacyjnych, takich jak choroby układu krążenia, cukrzyca i otyłość. Sprzyja to komplikacjom i wydłużeniu się czasu gojenia ran przewlekłych (odleżyny, owrzodzenia żylna i stopa cukrzycowa) występujących w tej grupie pacjentów. Istnieje zatem potrzeba znalezienia nowych metod diagnostyki i leczenia tych schorzeń. W tej pracy analizowano metabolomikę i genetykę drobnoustrojów tworzących biofilmy w przewlekłych owrzodzeniach żylnych goleni oraz poszukiwano biomarkerów infekcji w oparciu o model in vitro.

Jest mi miło oceniać pracę z perspektywy lekarza klinicysty – chirurga na co dzień zajmującego się między innymi leczeniem ran pooperacyjnych – jednak innych niż modelowe, opisywane w niniejszej rozprawie doktorskiej owrzodzenie żylna podudzia. W swojej recenzji

skupię się bardziej na aspektach medycznych zagadnienia, a siłą rzeczy mniej na technikaliach badania, patrząc na ten problem z innej perspektywy.

Dostępna literatura naukowa podkreśla brak pełnej wiedzy na temat procesów biologicznych zachodzących w ranie przewlekłej, których poznanie jest konieczne do opracowania diagnostyki oraz terapii leczniczych. Jednym z kluczowych czynników negatywnie wpływającym na stan rany i podnoszącym ryzyko jej przejścia w stan przewlekły jest obecność drobnoustrojów. W ranie rozwijają się one w formie biofilmów, czyli złożonych i dobrze zorganizowanych społeczności, które są odporne na eradykację standardowo dostępnymi metodami oraz trudne (we wczesnym etapie rozwoju) do wykrycia technikami diagnostycznymi. Chociaż w czasie ostatniej dekady dość dobrze opisano właściwości biofilmów rozwijających się w warunkach laboratoryjnych, to niewiele wiadomo o ich metabolizmie i zmienności adaptacyjnej zachodzących w środowisku rany przewlekłej. Dało to asumpt do podjęcia badań mogących stanowić punkt wyjścia do opracowania i wdrożenia skutecznej, nieinwazyjnej metody diagnostyki infekcji rany przewlekłej.

Ostatnie postępy w technologiach metabolomicznych prowadzą do rosnącej liczby zastosowań biomedycznych. W szczególności metabolomika jest coraz częściej wykorzystywana do diagnozowania chorób i poznawania ich mechanizmów, identyfikowania nowych celów leków, dostosowywania terapii i monitorowania wyników terapeutycznych, co może się przyczynić do wieloaspektowej poprawy jakości życia pacjentów. Głównym ograniczeniem analityki metabolomicznej jest brak możliwości scharakteryzowania całego fenotypu drobnoustrojów. Dlatego wydaje się, że przyszłe cele metabolomiczne będą obejmować rozwój bardziej kompleksowych platform analitycznych oraz integrację danych metabolomicznych otrzymanych z wykorzystaniem różnych narzędzi badawczych. Nowatorskie lub/ oraz zintegrowane techniki analityczne, takie jak obrazowanie metabolitów, algorytmy statystyczne i obliczeniowe, są pilnie potrzebne by uczynić z metabolomiki stałe narzędzie użyteczności klinicznej. Nasza wiedza, na temat profilu metabolicznego ran przewlekłych i jego roli w procesach gojenia, jest ograniczona, ponieważ metabolom procesu gojenia się ran nie został jak do tej pory zbadany. Wiadomo jednak, że zrozumienie związku między różnymi zbiorowiskami drobnoustrojów w ranie a ostatecznym wynikiem gojenia się rany umożliwi manipulowanie mikrobiomem w stanach chorobowych za pomocą terapii celowanej. Aby ułatwić wdrożenie

nowych biomarkerów, w tym markerów metabolicznych, w postępowaniu klinicznym niezbędne staje się przeprowadzenie badań na dużą skalę z zastosowaniem solidnych kryteriów walidacji oraz zrozumienie interakcji między wszystkimi czynnikami biologicznymi (genami, transkryptami, białkami i metabolitami). Podążając tą ścieżką badawczą zaproponowano przeprowadzenie badań metabolomicznych i genetycznych w środowisku odzwierciedlającym warunki w zainfekowanej ranie przewlekłej. Otrzymane rezultaty badań wniosą wkład w znajomość patomechanizmu tworzenia biofilmu w ranach przewlekłych, co może się przyczynić do wdrożenia nowatorskiej, przystępnej kosztowo, metody diagnostyki ran przewlekłych.

W związku z powyższym, po zapoznaniu się z rozprawą doktorską Pani Joanny Czajkowskiej przedstawiam pozytywną recenzję, która obejmuje obszary i uwzględnia kryteria oceny wskazane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz rozporządzeniu w sprawie szczegółowego trybu i warunkach przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz postępowaniu o nadanie tytułu profesora. **Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym o raz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz 595, z późn. zm).**

Rozprawa doktorska – doktorat wdrożeniowy - została przygotowana na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Promotorem pracy jest Pani dr hab. inż. Agata Markowska-Szczupak, a promotorem pomocniczym Pan dr hab. Adam Feliks Junka.

### **Ocena rozprawy doktorskiej w zakresie wstępu, celów, materiału i metody**

1. Bardzo dobry wstęp, właściwe przedstawienie tła pracy badawczej.
2. Bogaty materiał badawczy stanowiły trzy szczepy wzorcowe mikroorganizmów: bakterii gronkowca złocistego *Staphylococcus aureus* (SA), pałeczki okrężnicy *Escherichia coli* oraz drożdżaka bielnika białego *Candida albicans* w oparciu o model infekcji rany przewlekłej linii komórkowej tkanki łącznej mysich fibroblastów L929. Praca polegała na

inokulacji kultur fibroblastów tymi trzema patogenami na odpowiednich – precyzyjnie dobranych podłożach i obserwacji ich rozwoju w okresie 24 godzin dla bakterii oraz 96 godzin dla drożdżaka. Obserwowano dwie fazy hodowli: fazę wzrostu i fazę stacjonarną. Fazy zamierania nie obserwowano ze względu na czas hodowli – prawdopodobnie faza zamierania występuje po czasie odpowiednio 24 i 96 godzin.

Doktorantka postawiła sobie 7 celów pracy doktorskiej:

1. Przeanalizowanie procesu tworzenia biofilmu in vitro metodami mikrobiologii klasycznej, mikroskopii konfokalnej i skaningowej mikroskopii elektronowej trzech wspomnianych wyżej patogenów: dwóch bakteryjnych i jednego drożdżaka.
2. Opracowanie kohodowli fibroblastów z 3 patogenami – co jest modelem infekcji rany przewlekłej.
3. Ocena wpływu patogenów na żywotność fibroblastów – jaki jest punkt krytyczny kolonizacji.
4. Ocena zmian metabolicznych w czasie interakcji gospodarz-patogen, jakie towarzyszą temu metabolity wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe.
5. Ocena ekspresji genów w czasie tworzenia biofilmu przez patogeny.
6. Ocena ekspresji genów apoptozy w fibroblastach w odpowiedzi na infekcję.
7. Identyfikacja biomarkerów przewlekłych owrzodzeń żylnych goleni.

### **Ocena rozprawy doktorskiej w zakresie wyników, wniosków i dyskusji**

1. Przejściu z fazy wzrostu drobnoustrojów w biofilmie w fazę stacjonarną towarzyszy spadek aktywności metabolicznej- co doktorantka udowodniła w swoim badaniu.
2. Określono in vitro punkty krytyczne kolonizacji, czyli moment rozpoczęcia szkodliwego działania patogenu na leczenie rany. Wynosił on odpowiednio 12 godzin dla SA, 16 godzin dla E. coli oraz 24 godz. dla C. albicans. Po tym czasie można wnioskować, że in vivo biofilm tych patogenów zaczyna być odporny na próby leczenia. Doktorantka sugeruje, że ze względu na inne siły obronne organizmu in vivo te czasy mogą być dłuższe.

3. Wykazano metabolity charakterystyczne dla rozwoju biofilmu SA – dimetyloamina, w odróżnieniu od metabolitu fibroblastów – kwas izowalerianowy.
4. Metabolit charakterystyczny dla E. coli: octan oraz kwas aminomasłowy.
5. Metabolity dla C. albicans to kwas 4-hydroksybenzoesowy oraz kwas nikotynowy.
6. Należy uznać, że osiągnięcie stanu stacjonarnego w ranie, czyli braku przyrostu drobnoustrojów oraz spadku stężenia ich metabolitów – czyli osiągnięcie dojrzałości przez biofilm - jest z punktu widzenia klinicznego okresem, kiedy leczenie antyseptykami oraz lekami przeciwważaknymi (bakterio- i grzybobójczymi) przestaje przynosić efekty, a wtedy ratunkiem in vivo mogło być chirurgiczne opracowanie rany.

Doktorantka sformułowała 9 wniosków, z czego wnioski 3-6 stanowią wnioski stricte naukowe, natomiast wnioski 1-2 oraz 7-9 stanowią raczej komentarz do tej pracy badawczej. Najciekawsze wydaje się być określenie punktów krytycznych poszczególnych hodowli, określenie metabolitów – markerów zakażenia rany, określenie genów odpowiedzialnych za apoptozę ulegających zwiększonej ekspresji oraz określenie genów kodujących białka odpowiedzialne za tworzenie biofilmów ustrojowych.

### **Ocena rozprawy doktorskiej – inne aspekty.**

1. W pracy umieszczono 11 tabel oraz aż 77 rysunków. Tabele i ryciny (rysunki) dobrze ilustrują treść pracy i są przydatne przy czytaniu i zrozumieniu tekstu pracy. Pouczająca jest zwłaszcza Tabela 2, gdzie porównano zastosowanie, wady, zalety oraz czułość i specyficzność technik badania infekcji ran przewlekłych. Z przedstawionych 6 technik dwie wydają się najbardziej czułe i specyficzne: tomografia komputerowa oraz rezonans magnetyczny – co w opinii recenzenta zbiega się to z praktyką kliniczną.
2. Dyskusja (Omówienie wyników) została starannie przeprowadzona.
3. Rozległe piśmiennictwo jest cytowane prawidłowo, dobór literatury, umiejętności w korzystaniu z niej oraz wykorzystanie źródeł poprawne.
7. Podjęta problematyka badawcza jest oryginalna i niesie ze sobą wartości praktyczne, ponieważ wnoszą wkład nie tylko w znajomość mechanizmu tworzenia biofilmów w

ranach przewlekłych, ale mogą przyczynić się do wdrożenia nowatorskiej metody prognostyki przewlekłych owrzodzeń żylnych goleni.

4. Nie znajduję w tej pracy poważniejszych błędów formalno-językowych, stylistycznych, czy interpunkcyjnych. Moje pytania do doktorantki, to co miała na myśli pisząc o zakażeniu protez płuc na stronie 27 – czy chodziło o respiratory? Czy na stronie 27 nie powinien być użyty skrót TIMERS zamiast TIMES?
5. Metody badawcze są trafne oraz umiejętnie zastosowane.
6. Układ pracy jest poprawny, a struktura podziału treści nadzwyczaj rozwinięta.