

Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

Klinika Hematologii

ul. Indiry Gandhi 14, 02-776 Warszawa

tel. +48 22 34 96 313 , fax +48 22 34 96 178

Warszawa, 28.10.2022

Ocena rozprawy doktorskiej

Autor: mgr Suhanya Veronica Prasad

Tytuł: Non-peptide mimics of antimicrobial peptides and their functionalized gold nanosystems to combat antibiotic resistance

Promotorzy: prof. dr hab.n.med Robert Bucki and dr hab.n.med Krzysztof Fiedoruk z Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe jest obecnie jednym z najważniejszych zagadnień programów ochrony zdrowia na świecie, jest powszechnym problemem zdrowotnym wpływającym na jakość leczenia chorych, zwiększającym jego koszty i pogarszającym szansę na skuteczność prowadzonych terapii.

Od pierwszego wyizolowania antybiotyku (penicyliny benzylowej) w roku 1938, upłynęło 84 lata. Początkowo bardzo skuteczny, ratujący życie lek stał się mało znaczący i w niewielkim tylko stopniu użyteczny w terapii. Powodem takiego stanu rzeczy jest fakt, że bakterie poddane działaniu penicyliny benzylowej, a także innych antybiotyków β -laktamowych nabyły na nie oporności. Już w 1969 r. po ogłoszeniu raportu tak zwanego Komitetu Swanna po raz pierwszy zwrócono uwagę na niebezpieczne, z punktu widzenia ochrony zdrowia ludzi, zjawisko narastania oporności bakterii na antybiotyki (antimicrobial resistance – AMR). Ten utworzony w Wielkiej Brytanii zespół naukowców alarmował, że w medycynie pojawił się problem związany z niewłaściwym stosowaniem leków



przeciwdrobnoustrojowych. Około 50 lat później w dotyczącym problemu narastania lekooporności raporcie przygotowanym w Wielkiej Brytanii przez grupę ekonomistów pod kierunkiem O'Neila - globalna walka z zakażeniami wywołanymi przez wielolekooporne drobnoustroje - wysunięto prognozę, że w 2050 r. liczba zgonów spowodowana lekoopornymi bakteriami może osiągnąć poziom ok. 10 mln. We wspomnianym raporcie prognozuje się, że choroby, których przyczyną będą bakterie lekooporne, w ciągu najbliższych 50 lat mogą się stać najważniejszą, po nowotworach i chorobach układu krążenia, przyczyną zgonów ludzi oraz sięgających 10% strat w produkcji zwierzęcej.

Los penicyliny benzylowej podzieliło wiele innych, coraz nowszych antybiotyków, co budzi uzasadnioną obawę w świecie medycznym i w kręgach akademickich odnośnie do przyszłości leczenia infekcji bakteryjnych. Oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe jest rodzajem naturalnego procesu adaptacji drobnoustroju do trudnych warunków środowiskowych, które bakterie napotykaają w swoich siedliskach. Aby poradzić sobie z szerokim zakresem czynników toksycznych, bakterie wyewoluowały mechanizmy odpowiedzi, które modulują ekspresję genów za pośrednictwem sieci regulacyjnych, powodując zmiany w ich fizjologii i zachowaniu, znane jako reakcja na stres. Ponadto nabyta oporność na leki może łatwo ewoluować poprzez chromosomalne mutacje DNA w docelowych genach antybiotyków i poziomy transfer genów za pośrednictwem plazmidu. Co ważne, presja selekcyjna wywierana przez konkretny środek przeciwdrobnoustrojowy może prowadzić do oporności krzyżowej na inne środki przeciwdrobnoustrojowe z powodu wielu zmian specyficznych dla szlaku. Reasumując, procesy te są odpowiedzialne za pojawienie się patogenów bakteryjnych wielolekoopornych (MDR), rozszerzonej oporności przeciw lekowej (XDR) lub nawet panlekoopornych (PDR).

Biorąc pod uwagę ogólnoświatowe zagrożenie opornością na środki przeciwdrobnoustrojowe, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) sklasyfikowała istotne medycznie bakterie wymagające pilnych badań i rozwoju nowych środków przeciwdrobnoustrojowych na trzy kategorie: krytyczne, o wysokim i średnim priorytecie.

W przedstawionej do recenzji dysertacji mgr Suhany'a Prasad przedstawia wyniki analiz mających na celu zbadanie aktywności przeciwbakteryjnej nowej klasy kationowych środków uznawanych

za potencjalnie przeciwdrobnoustrojowe – ceragenin (CSA) oraz ich nanosystemów, ale również potencjalnych mechanizmów oporności na CSA w wybranych patogenach reprezentujących te kategorie. Doktorantka analizowała aktywność p/drobnoustrojową ceragenin (CSA-13, CSA -44 i CSA-131) i funkcjonalizowanych cerageniną cząstek złota o kształcie orzeszków ziemnych (AuP@CSAs) przeciwko wiodącym patogenom sprawczym zapalenia ucha środkowego, a także scharakteryzowała na poziomie genomycznym i transkryptomycznym rozwój oporności podczas eksperymentalnej adaptacji szpitalnego patogenu *Enterobacter hormachei* subsp. *steigerwaltii* (ST89) do subhamujących stężeń ceragenin i antybiotyku–kolistyny.

Doktorantka swoją uwagę skupiła na głównych czynnikach sprawczych zapalenia ucha środkowego, a mianowicie *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*, podczas gdy jako patogen modelowy w eksperymentach dotyczących indukcji oporności drobnoustroju na cerageniny służył patogen Gram-ujemny – *Enterobacter hormachei* subsp. *steigerwaltii* (ST89). Wybór tego jelitowego Gram-ujemnego drobnoustroju nie był przypadkowy, ponieważ stanowi on coraz większy problem kliniczny w Polsce, szczególnie w kontekście oporności na karbapenemy.

Temat badawczy należy uznać za bardzo aktualny. Poszukiwanie nowych, skutecznych metod terapii przeciwdrobnoustrojowej jest w kontekście narastania oporności p/drobnoustrojowej bardzo istotny.

Analizy badawcze Doktorantka przeprowadziła na szczepach *Haemophilus influenzae* ATCC 49766, *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238, and *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 oznaczonych jako otopatogeny oraz izolatów *Enterobacter hormachei* subsp. *steigerwaltii* (ST89). Cerageniny CSA-13, CSA-44 i CSA-131 zostały zsyntetyzowane i dostarczone przez profesora Paula B. Savage'a z Wydziału Chemii i Biochemii Uniwersytetu Brigham Younga w USA. Odczynniki do syntezy nanocząstek złota w kształcie orzeszków ziemnych pokrytych odpowiednimi związkami cerageniny zostały zakupione od firmy Sigma-Aldrich (MO, USA).



W mojej ocenie zaplanowanie doświadczeń oraz ich realizacja świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu metodycznym Doktorantki i są niewątpliwym wynikiem dużego doświadczenia badawczego i wiedzy promotora pracy Pana Prof. dr hab. n. med. Roberta Buckiego.

Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły Doktorantce na sformułowanie wniosków z badań pozwalających na stwierdzenie wyższej aktywności przeciwbakteryjnej funkcjonalizowanych cerageniną nanocząstek złota w porównaniu do ceragenin wolnych.

Wszystkie cerageniny funkcjonalizowane nanocząstkami złota w kształcie orzecha ziemnego wykazały lepsze właściwości bakteriobójcze niż cerageniny w postaci wolnej w zakresie od 0,5 do 5 $\mu\text{g/ml}$. W szczególności efekt ten był widoczny dla cerageniny CSA-13, ponieważ jego sprzężony z AuP NP odpowiednik był wysoce skuteczny w eradykacji *H. influenzae* przy mniejszej dawce. Wśród różnych ceragenin, CSA-131 wykazywał większą aktywność zabijania, ponieważ zmniejszał zdolność tworzenia kolonii o 2 log CFU/ml dla *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae*. Zgodnie z tymi wynikami, wartości MIC i MBC mierzone w obecności wysoce pożywnego podłoża wykazały, że AuP NP wzmacniają właściwości przeciwdrobnoustrojowe ceragenin. Doktorantka potwierdziła, że zarówno cerageniny, jak i nanoukłady zawierające CSA wykazywały do 90% redukcję masy biofilmu bakteryjnego w zakresie stężeń 5 – 20 $\mu\text{g/ml}$. Przy dawce bakteriobójczej 10 $\mu\text{g/ml}$ jak wykazano w analizach jest również (co istotne) bezpieczna dla komórek ssaków.

*Doktorantka sformułowała wnioski, z których wynika, że niesferyczne nanocząstki złota (AuNPs) jako nośniki leków wzmacniają antybakteryjne działanie ceragenin także na biofilm *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catharalis*, zarówno w warunkach *in vitro*, tj. w bakteryjnych podłożach hodowlanych, jak i *ex vivo* tutaj w obecności woskowiny ludzkiej. Zawierające cerageninę nanosystemy wykazują zadawalającą biokompatybilność w stężeniach bakteriobójczych i ograniczają stany zapalne wywołane przez bakterie wzmocnienie korzystnego działania badanych środków w leczeniu zapalenia ucha środkowego.*



Przedłużona ekspozycja *Enterobacter hormaechei* na CSA-13 indukowała jedynie umiarkowany poziom oporności na tę cerageninę w porównaniu z kolistyną. I co bardzo istotne Doktorantka wykazała, że molekularne mechanizmy odpowiedzialne za wysoki poziom oporności *E. hormaechei* na kolistynę nie mają wpływu na jego wrażliwość na cerageniny CSA-13.

Rozprawa doktorska mgr Suhanyi Prasad liczy 94 strony maszynopisu, powszechnie akceptowanego układu, który obejmuje: obszerny wykaz skrótów, pomocny w dalszej lekturze rozprawy, wstęp, opis zaprojektowanej analizy naukowej, w tym wprowadzenie, materiały i metodykę, wyniki wraz z ich omówieniem, dyskusję, wnioski, spis tabel i rycin oraz wykaz cytowanego piśmiennictwa a także streszczenie pracy przetłumaczone na język polski. W punkcie 10 dysertacji znajdują się dwie publikacje stanowiące podstawę rozprawy.

Podstawą rozprawy doktorskiej mgr Suhanyi Prasad są dwie publikacje opublikowane w renomowanych czasopismach:

Praca oryginalna IF: 6.096; MNiSW: 100

1. Prasad SV, Piktel E, Depciuch J, Maximenko A, Suprewicz Ł, Daniluk T, Spałek J, Wnorowska U, M Zielinski P, Parlinska-Wojtan M, B Savage P, Okła S, Fiedoruk K, Bucki R. *Targeting bacteria causing otitis media using nanosystems containing nonspherical gold nanoparticles and ceragenins*. *Nanomedicine (Lond)*. 2021 Dec;16(30):2657-2678. doi: 10.2217/nnm-2021-0370. Epub 2021 Nov 26. PMID: 34823374.

Review article IF: 5.924; MNiSW: 140:

2. Prasad SV, Fiedoruk K, Daniluk T, Piktel E, Bucki R. *Expression and Function of Host Defense Peptides at Inflammation Sites*. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 22;21(1):104. doi: 10.3390/ijms21010104. PMID: 31877866; PMCID: PMC6982121.

W obu pracach Doktorantka jest pierwszą autorką.

W oparciu o dane umieszczone we wstępie dysertacji oraz zawarte w pracy poglądowej Doktorantka sformułowała cele analizy badawczej.

1. Zbadanie aktywności przeciwbakteryjnej ceragenin i sprzężonych z cerageniną nanocząstek złota w kształcie orzeszków ziemnych (AuP@CSAs) przeciwko wiodącym patogenom sprawczym zapalenia ucha środkowego, a mianowicie *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* i *Moraxella catarrhalis*.
2. Scharakteryzowanie na poziomie genomycznym i transkryptomycznym rozwoju oporności podczas eksperymentalnej adaptacji szpitalnego patogenu *Enterobacter hormachei* subsp. *steigerwaltii* (ST89) do subhamujących stężeń ceragenin i polikacyjnego antybiotyku–kolistyny.

Dyskusja przeprowadzone została przez Doktorantkę w sposób dojrzały. Doktorantka odniosła własne wyniki do dostępnych danych literaturowych, a sposób przeprowadzenia analizy uzyskanych wyników potwierdza dobre przygotowanie merytoryczne i szeroką wiedzę w zakresie tematyki prowadzonych badań.

Przeprowadzone badania stały się podstawą do sformułowania przez Autorkę 5 wniosków.

1. Niesferyczne nanocząstki (AuNPs) jako nośnik leku (AuNP@CSA) potęgują przeciwbakteryjne działanie ceragenin (CSAs) przeciwko formą planktonicznym oraz biofilmowi bakterii *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, i *Moraxella catarrhalis*, zarówno *in vitro*, tj. w pożywkach wzrostowych bakterii jak też *ex vivo* w warunkach odzwierciedlających zmiany patologiczne w przewodzie słuchowym zewnętrznym, tj. w obecności woskowiny ludzkiej.
2. Nanosystemy zawierające cerageninę zachowują satysfakcjonującą biokompatybilność w stężeniach bakteriobójczych i ograniczają stan zapalny wywołany przez bakterie nasilając korzystne działanie badanych związków w leczeniu zakażenia ucha środkowego.
3. Pomimo wspólnego kationowego charakteru cerageniny CSA-13 i kolistyny, przedłużona ekspozycja *Enterobacter hormachei* na CSA-13 wywołała jedynie umiarkowany stopień oporności na tę cerageninę (wzrost wartości MIC z 4 do 32-64 ug/mL) w porównaniu do kolistyny (wzrost wartości MIC z 0.125 do 128 ug/mL).
4. Mechanizmy molekularne odpowiedzialne za wysoką oporność na kolistynę, w tym dobrze znane czynniki oporności na kolistynę, obserwowane u *Enterobacter hormachei* podczas



długotrwałej ekspozycji na ten antybiotyk nie mają wpływu na jego wrażliwość na cerageninę CSA-13.

5. Zastosowane metod multiomicznych, sekwencjonowania całego genomu (WGS) i sekwencjonowania transkryptomu (RNA-seq), pozwoliło na zidentyfikowanie kilku nowych mechanizmów, które bezpośrednio lub pośrednio mogą przyczyniać się do rozwoju oporności na kolistynę lub cerageninę CSA-13 u *Enterobacter hormaechei*

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Suhanyi Prasad charakteryzuje się trafnością wyboru tematu. Doktorantka wykazała się umiejętnością wykorzystania dostępnej bibliografii oraz formułowania celów planowanych badań naukowych i wniosków z nich wypływających. Zawarta w rozprawie analiza tematu jest spójna i przyczynia się do lepszego poznania omawianej tematyki, toteż jest cennym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego. Autorka nie ustrzegła się błędów edycyjnych, które jednak nie umniejszają wartości pracy.

Autorka w pełni zrealizowała zaplanowany cel, dobrze opanowała nietatwy warsztat badawczy i wykazała doskonale przygotowanie merytoryczne. Wartościowe wnioski można wykorzystać do prowadzenia dalszych analiz, tak koniecznych w obecnym czasie w klinice. Rozprawa ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca autorstwa mgr Suhanyi Prasad spełnia wszystkie warunki określone art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2022 r. poz. 574). Tym samym zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Suhanyi Prasad do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wnioskuję o uznanie pracy za wyróżniającą.

Urem
Dr hab. n. med. Marzena Wątek
specjalista chorób wewnętrznych,
hematologii i transplantologii klinicznej
PWZ: 5958755

Institute of Hematology and Transfusion in Warsaw

Department of Hematology

Indiry Gandhi 14, 02-776 Warsaw

Phone +48 22 34 96 313 , Fax +48 22 34 96 178

Warsaw, 28.10.2022

Review report of PhD thesis submitted to the Medical University of Bialystok

Author: Suhanya Veronica Prasad MSc

Title: Non-peptide mimics of antimicrobial peptides and their functionalized gold nanosystems to combat antibiotic resistance

Scientific supervisor: prof. dr hab.n.med Robert Bucki and dr hab.n.med Krzysztof Fiedoruk

PROJECT BACKGROUND

Antimicrobial resistance is currently one of the most important issues of health programs in the world, it is a common problem affecting the quality of treatment of patients, increasing its costs and decreasing the chance of effectiveness of therapies.

84 years have passed since the first isolation of the antibiotic (benzyl penicillin) in 1938. Initially, a very effective, life-saving drug, became insignificant and only to a small extent useful in therapy. The reason for this is that bacteria treated with benzyl penicillin, as well as other β -lactam antibiotics, have acquired resistance to them. Attention to the dangerous phenomenon of the accumulation of antibiotic resistance (AMR) from the point of view of protecting human health was firstly drawn by the Swann Committee after the publication of their report in 1969. This team of scientists created in the



UK alarmed, that there was a problem in medicine related to the improper use of antimicrobial drugs. About 50 years later, a report on the rise of drug resistance was prepared in the UK by a group of economists led by O'Neil "Global fight against infections caused by multidrug-resistant microorganisms" predicted, that in 2050 the number of deaths caused by drug-resistant bacteria could reach around 10 million. The report predicts that diseases caused by drug-resistant bacteria in the next 50 years, may become the most important cause of human death after cancer and cardiovascular diseases, as well as up to 10% of losses in animal production.

The fate of benzyl penicillin has been shared by many other, increasingly newer antibiotics, which raises legitimate concerns in the medical world and in academic circles about the future treatment of bacterial infections. Antimicrobial resistance is a type of natural process of adapting a microbe to the harsh environmental conditions that bacteria encounter in their habitats. To cope with a wide range of toxic agents, bacteria have evolved response mechanisms that modulate gene expression through regulatory networks, causing changes in their physiology and behavior, known as the stress response. In addition, acquired drug resistance can easily evolve through chromosomal DNA mutations in target antibiotic genes and horizontal plasmid-mediated gene transfer. Importantly, the selection pressure exerted by a particular antimicrobial can lead to cross-resistance to other antimicrobials due to many pathway-specific changes. In summary, these processes are responsible for the emergence of multidrug-resistant bacterial pathogens (MDR), extended anti-drug resistance (XDR) or even panleavorous (PDR).

Given the global threat of antimicrobial resistance, the World Health Organization (WHO) has classified medically relevant bacteria requiring urgent research and development of new antimicrobials into three categories: critical, high, and medium priority.



In the dissertation presented for review, Suhany Prasad presents the results of analyses aimed at investigating the antibacterial activity of a new class of cationic agents considered to be potentially antimicrobial – ceragenin (CSA) and their nanosystems, but also potential mechanisms of resistance to CSA in selected pathogens representing these categories. The PhD student analyzed the p/microbial activity of ceragenins (CSA-13, CSA-44 and CSA-131) and ceragen-functionalized peanut-shaped gold particles (AuP@CSAs) against leading causative pathogens of otitis media, and also characterized at the genomic and transcriptomic level the development of resistance during the experimental adaptation of the hospital pathogen *Enterobacter hormachei* subsp. *steigerwaltii* (ST89) to subinhibiting concentrations of ceragenin and antibiotic–colistin.

The PhD student focused her attention on the main causative agents of otitis media, namely *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*, while the Gram-negative pathogen – *Enterobacter hormachei* subsp. *steigerwaltii* (ST89) served as a model pathogen in experiments on the induction of microbial resistance to ceragenin. The choice of this intestinal Gram-negative microorganism was not accidental, because it is a growing clinical problem in Poland, especially in the context of resistance to carbapenems.

The research topic should be considered very current. The search for new, effective methods of antimicrobial therapy is very important in the context of the increase in microbial resistance.

The Doctoral Student conducted research analyses on strains of *Haemophilus influenzae* ATCC 49766, *Moraxella catarrhalis* ATCC 25238, and *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 marked as otopathogens and isolates of *Enterobacter hormachei* subsp. *steigerwaltii* (ST89). The ceragenins CSA-13, CSA-44 and CSA-131 were synthesized and supplied by Professor Paul B. Savage of the Department of Chemistry and Biochemistry at Brigham Young University in the USA. Reagents for the synthesis of peanut-shaped gold nanoparticles coated with appropriate ceragen compounds were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA).



In my opinion, the planning of experiments and their implementation testify to the very good methodological preparation of the Doctoral Student and are undoubtedly the result of extensive research experience and knowledge of the supervisor of the work of Prof. Robert Bucki, MD, PhD.

The experiments allowed the PhD student to formulate conclusions from the research allowing to determine the higher antibacterial activity of ceragen-functionalized gold nanoparticles compared to free ceragenins.

All ceragens functionalized with peanut-shaped gold nanoparticles showed better bactericidal properties than ceragens in free form in the range of 0.5 to 5 µg/ml. This effect was evident for CSA-13 ceragenin because its AuP-coupled NP was highly effective in eradicating H influenzae at a lower dose. Among the various ceragenins, CSA-131 showed higher killing activity because it reduced the colony-forming capacity by 2 log CFU/ml for H. influenzae, M. catarrhalis, S. pneumoniae. According to these results, MIC and MBC values measured in the presence of a highly nutritious medium showed that AuP NP enhance the antimicrobial properties of ceragenin. The PhD student confirmed that both ceragenins and CSA-containing nanocircuits showed up to 90% reduction in bacterial biofilm mass in the concentration range of 5 – 20 µg/ml. At a bactericidal dose of 10 µg/ml, as shown in the analyzes, it is also (importantly) safe for mammalian cells.

The PhD student formulated conclusions that non-spherical gold nanoparticles (AuNPs) as drug carriers enhance the antibacterial effect of ceragenin also on the biofilm Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Moraxella catharalis, both in vitro, i.e. in bacterial culture media, and ex vivo here in the presence of human earwax. Ceragenin-containing nanosystems exhibit satisfactory biocompatibility at bactericidal concentrations and reduce inflammation caused by bacteria to enhance the beneficial effects of the investigational agents in the treatment of otitis media.



Prolonged exposure of *Enterobacter hormaechei* to CSA-13 induced only moderate levels of resistance to this ceragenin compared to colistin. And what is very important, *the PhD student showed that the molecular mechanisms responsible for the high level of resistance of E. hormaechei to colistin do not affect its sensitivity to CSA-13 ceragens.*

Suhanyi Prasad's doctoral dissertation consists of 94 pages of manuscript, a commonly accepted layout, which includes: an extensive list of abbreviations, helpful in further reading of the dissertation, introduction, description of the designed scientific analysis, including introduction, materials and methodology, results with their discussion, discussion, conclusions, list of tables and figures and a list of cited literature as well as a summary of the work translated into Polish. In point 10 of the dissertation there are two publications that form the basis of the dissertation.

The basis of Suhanya Prasad's doctoral dissertation are two publications published in renowned journals:

Original IF Work: 6.096; Ministry of Science: 100

1. Prasad SV, Piktel E, Depciuch J, Maximenko A, Suprewicz Ł, Daniluk T, Spałek J, Wnorowska U, M Zielinski P, Parlinska-Wojtan M, B Savage P, Okła S, Fiedoruk K, Bucki R. *Targeting bacteria causing otitis media using nanosystems containing nonspherical gold nanoparticles and ceragenins.* Nanomedicine (Lond). 2021 Dec;16(30):2657-2678. doi: 10.2217/nnm-2021-0370. Epub 2021 Nov 26. PMID: 34823374.

Review article IF: 5.924; MNiSW: 140:

2. Prasad SV, Fiedoruk K, Daniluk T, Piktel E, Bucki R. *Expression and Function of Host Defense Peptides at Inflammation Sites.* Int J Mol Sci. 2019 Dec 22;21(1):104. doi: 10.3390/ijms21010104. PMID: 31877866; PMCID: PMC6982121.

In both theses, the PhD student is the first author.



Based on the data included in the introduction of the dissertation and contained in the review thesis, the Doctoral Student formulated the objectives of the research analysis.

1. Investigate the antibacterial activity of ceragline and ceragen-coupled peanut-shaped gold nanoparticles (AuP@CSAs) against the leading causative pathogens of otitis media, namely *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*.
2. Characterization at the genomic and transcriptomic level of resistance development during experimental adaptation of the hospital pathogen *Enterobacter hormachei* subsp. *steigerwaltii* (ST89) to subinhibiting concentrations of ceragenin and the polycyclic antibiotic colistin.

The discussion was conducted by the PhD student in a mature way. The doctoral student compared her own results to the available literature data, and the method of conducting the analysis of the obtained results confirms good substantive preparation and extensive knowledge in the field of research.

The conducted research became the basis for the author to formulate 5 conclusions.

1. Nonspherical nanoparticles (AuNPs) as a drug carrier (AuNP@CSA) enhance the antibacterial effect of ceragenin (CSAs) against the planktonic form and biofilm of the bacteria *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*, both in vitro, i.e. in bacterial growth media as well as ex vivo under conditions reflecting pathological changes in the external ear canal, i.e., in the presence of human earwax.
2. Nanosystems containing ceragenin maintain satisfactory biocompatibility at bactericidal concentrations and reduce inflammation caused by bacteria by enhancing the beneficial effects of the tested compounds in the treatment of middle ear infection.
3. Despite the common cationic nature of ceragenin CSA-13 and colistin, prolonged exposure of *Enterobacter hormachei* to CSA-13 induced only a moderate degree of proficiency to this ceragenin (increase in MIC from 4 to 32-64 ug/mL) compared to colistin (increase in MIC from 0.125 to 128 ug/mL).



4. The molecular mechanisms responsible for high resistance to colistin, including the well-known colistin resistance factors observed in *Enterobacter hormaechei* during prolonged exposure to this antibiotic, have no effect on its sensitivity to ceragenin CSA-13.
5. The use of multi-genomic methods, whole genome sequencing (WGS) and transcriptome sequencing (RNA-seq), have identified several new mechanisms that may directly or indirectly contribute to the development of resistance to colistin or ceragenin CSA-13 in *Enterobacter hormaechei*

To sum up, I state that the doctoral dissertation of Suhanyi Prasad, MSc, is characterized by the accuracy of the choice of topic. The doctoral student demonstrated the ability to use the available bibliography and formulate the goals of the planned scientific research and the conclusions drawn from it. The analysis of the topic contained in the dissertation is consistent and contributes to a better understanding of the discussed topic, so it is a valuable complement to the available scientific literature. The author did not avoid editing errors, which, however, do not detract from the value of the work.

The author fully achieved the planned goal, mastered the difficult research workshop well and showed excellent substantive preparation. Valuable conclusions can be used to conduct further analyzes, so necessary at the present time in the clinic. The dissertation is of great cognitive value and provides the basis for continuing scientific research in this field I conclude that the work submitted for review by Suhanya Prasad, MSc, meets all the conditions set out in art. 187 Act. Of 20 July 2018 Law on Higher Education and Science (Journal od Law Dz. U. z 2022 r. item. 574). Thus, I appeal to the Senate of the Medical University of Bialystok to allow Suhanyi Prasad, MSc, to further stages of the doctoral dissertation and I request that the thesis be recognized as outstanding.

Dr hab. n. med. Marzena Watek
specjalista chorób wewnętrznych,
hematologii i transplantologii klinicznej
PWZ: 5958755