Szczecin, 06.05.2019

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Wnorowskiej pt. "Potencjał terapeutyczny peptydu LL-37 oraz jego syntetycznych analogów w terapii zakażeń wywołanych przez lekooporne szczepy pałeczek Gram-ujemnych" wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Roberta Buckiego z Samodzielnej Pracowni Technik Mikrobiologicznych i Nanobiomedycznych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Oporność bakterii na antybiotyki oraz chemioterapeutyki przeciwbakteryjne towarzyszy stosowaniu powyższych leków, ograniczając ich skuteczność terapeutyczną. Pojawia się zazwyczaj po kilku-, kilkunastu latach klinicznego zastosowania leku przeciwbakteryjnego. Występowanie szczepów opornych sprawia, że infekcje bakteryjne ponownie stają się zagrożeniem. Szerząca się oporność na leki przeciwbakteryjne jest przypisywana nadużywaniu i niewłaściwemu stosowaniu tych leków, a także brakowi nowych leków opracowywanych przez przemysł farmaceutyczny. Szacuje się, że w Europie każdego roku występuje ok. 400 000 zakażeń i 25 000 zgonów z powodu infekcji najczęstszymi bakteriami opornymi na wiele leków (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*). Wśród powyżej wymienionych patogenów znajdują się dwa, tj. *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa*, które są podstawą zainteresowań badawczych mgr U. Wnorowskiej. Dlatego też temat badawczy podjęty przez Doktorantkę należy uznać za w pełni aktualny, poświęcony poszukiwaniu nowych strategii terapeutycznych wobec antybiotykoopornych szczepów bakteryjnych, tj. określenia aktywności przeciwbakteryjnej peptydu LL-37 oraz ceragenin CSA 13 i CSA-131. Należy również podkreślić, że założenia rozprawy doktorskiej znalazły uznanie ekspertów Narodowego Centrum Nauki, badania stanowiące podstawę przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej były finansowane z funduszy Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM pt. „Immunomodulujące działanie katelicydyny LL-37 i jej amfipatycznych analogów w procesie zapalnym błony śluzowej w zakażeniach dróg moczowych".

Na rozprawę doktorską mgr Urszuli Wnorowskiej składają się trzy opublikowane prace, w tym dwie w renomowanych czasopismach: dwie prace oryginalne - 1) Wnorowska U, Niemirowicz K, Myint M, Diamond SL, Wróblewska M, Savage PB, Janmey PA, Bucki R. Bactericidal activities of cathelicidin LL-37 and select cationic lipids against the hypervirulent Pseudomonas aeruginosa strain LESB58. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2015, 59:3808-3815 (IF=4,415) oraz Wnorowska U, Piktel E, Durnaś B, Fiedoruk K, Savage PB, Bucki R. Use of ceragenins as a potential treatment for urinary tract infections. BMC Infectious Diseases,

2019, 19:369 (IF 2,949) oraz jedna praca przeglądowa – Wnorowska U, Wątek M, Durnaś B, Głuszek K, Piktel E, Niemirowicz K, Bucki R. Zewnątrzkomórkowy DNA jako istotny składnik oraz cel terapeutyczny biofilmu bakteryjnego; Extracellular DNA as an essential component and therapeutic target of microbial biofilm. Studia Medyczne, 2015, 31:132-138. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, jej udział w powstaniu poszczególnych prac wynosi odpowiednio: 60%, 70% oraz 65%, co zostało potwierdzone przez pozostałych współautorów poszczególnych prac. Ponadto przedłożona do oceny praca zawiera wstęp, omówienie prac składających się na pracę doktorską składające się z przedstawienia celu pracy, materiałów i metod, wyników oraz wniosków jak również streszczenia w języku polskim i angielskim.

We wstępie Doktorantka przedstawiła problemy epidemiologiczne związane z zakażeniami wywołanymi przez lekooporne szczepy pałeczek Gram-ujemnych, scharakteryzowała naturalne peptydy przeciwbakteryjne jako istotną składową obrony przeciwbakteryjnej oraz omówiła możliwości zastosowania naturalnych peptydów przeciwbakteryjnych jako potencjalnych leków w zakażeniach lekoopornymi szczepami pałeczek Gram-ujemnych. Informacje przedstawione we wstępie uzasadniają w pełni zakres badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej opracowanej przez mgr Urszulę Wnorowską.

W oparciu o przesłanki zawarte we wstępie i pracy poglądowej Doktorantka sformułowała następujące cele pracy doktorskiej: 1) ocena aktywności przeciwbakteryjnej naturalnego peptydu LL-37 oraz jego wybranych syntetycznych analogów z rodziny ceragenin w stosunku do formy planktonicznej wieloopornych bakterii Gram-ujemnych, jak i wytwarzanego przez nie biofilmu; 2) ocena aktywności przeciwbakteryjnej peptydu LL-37 oraz ceragenin w obecności naturalnych polielektrolitów takich jak DNA, F-aktyna oraz bakteriofagów Pf1; 3) ocena wpływu peptydu LL-37 oraz ceragenin na strukturę błony komórkowej *Pseudomonas aeruginosa* oraz 4) ocena wewnątrzkomórkowej aktywności przeciwbakteryjnej badanych związków.

Dla zrealizowania postawionych celów Doktorantka przeprowadziła badania na szczepach bakteryjnych *P. aeruginosa* izolowanych z plwociny pacjentów chorych na mukowiscydozę, *P. aeruginosa* Xen 5, *P. aeruginosa* LASB58 jak również szczepch *E. coli* izolowanych od pacjentów z zakażeniem układu moczowego. W celu określenia minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii oraz minimalnego stężenia bakteriobójczego zastosowano metodę seryjnych rozcieńczeń oraz test zliczania kolonii. Test zliczania kolonii wykonano również w środowisku polielektrolitów (DNA, F-aktyna, bakteriofag Pf1). Stosując metodę wybarwiania fioletem krystalicznym z detekcją chemiluminescencyjną określono wpływ badanych peptydów na tworzenie biofilmu. Metodę dynamicznego rozproszenia światła z detekcją spektroskopową zastosowano do oceny tworzenia agregatów badanych polielektrolitów. Zastosowanie mikroskopii sił atomowych umożliwiło ocenę wpływu badanych peptydów na strukturę powierzchni

komórek bakteryjnych (*P. aeruginosa* LASB58). Żywotność bakterii oraz komórek pęcherza moczowego (T24) oceniano testem MTT. W stosunku do izolatów *E. coli* oceniano również wewnątrzkomórkową aktywność przeciwbakteryjną badanych peptydów. Jako związki referencyjne w badaniach zastosowano tobramycynę i doksycyklinę. Należy stwierdzić, że sposób zaplanowania badań oraz ich realizacja świadczą o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktorantki. Wynikają one również z długotrwałej pracy i doświadczenia w obszarze prowadzonego badania promotora prof. Roberta Buckiego, który jest uznanym ekspertem w dziedzinie. W planowaniu badania być może powinno się uwzględnić wpływ badanych peptydów w stosunku nie tylko do komórek nowotworowych (zastosowanych przez Doktorantkę komórek raka pęcherza moczowego T24), lecz również komórek natywnych (np. ludzkich fibroblastów z pęcherza moczowego, ATCC). Do wyjaśnienia pozostają również metody statystyczne zastosowane w analizie danych. W rozdziale 5.2.6 Doktorantka wskazuje na zastosowanie t-testu Studenta (określonego błędnie jako test t-studenta), natomiast w publikacji dotyczącej *P. aeruginosa* wymieniona jest analiza wariancji (ANOVA) z korektą Boniferroniego, praca poświęcona *E. coli* nie wymienia żadnej metody statystycznego opracowania wyników.

Po przeprowadzeniu szeregu dobrze zaprojektowanych doświadczeń Doktorantka wykazała m.in., że cerageniny CSA-13 i CSA-131 wykazują znacznie silniejszą aktywność przeciwbakteryjną wobec szczepów *E. coli* oraz *P. aeruginosa* w odniesieniu do naturalnej katelicydyny – peptydu LL-37, jak również doksycykliny i tobramycyny; polielektrolity: DNA i F-aktyna oraz bakteriofag Pf1 hamują aktywność bakteriobójczą peptydu LL-37, w przeciwieństwie do braku hamującej aktywności wobec ceragenin CSA-13 oraz CSA-131; zmniejszenie zdolności tworzenia biofilmu przez *E. coli* oraz *P. aeruginosa* LESB58 pod wpływem ceragenin CSA-13 oraz CSA-131; skojarzone zastosowanie peptydu LL-37 oraz badanych ceragenin nasila działanie bakteriobójcze wobec form planktonicznych, biofilmu bakteryjnego oraz aktywności wobec wewnątrzkomórkowych *E. coli*. Wyniki części doświadczalnej pracy doktorskiej opublikowano w renomowanych czasopismach *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (badania dotyczące *P. aeruginosa*) oraz *BMC Infectious Diseases* (wyniki dotyczące *E. coli*).

Na podstawie przeprowadzonych badań Autorka przedstawiła sześć wniosków: 1. Cerageniny wykazują znacznie silniejszą aktywność przeciwbakteryjną wobec klinicznych szczepów *E. coli*, wysoce opornych szczepów *P. aeruginosa*, jak również przeciw hiperwirulentnemu szczepowi LESB58, w porównaniu do naturalnego peptydu LL-37, czy konwencjonalnych antybiotyków; 2. Aktywność bakteriobójcza peptydu LL-37 jest hamowana w obecności bakteriofagów Pf1; 3. Obecność naturalnych polielektrolitów, w tym DNA i F-aktyny, a także bakteriofagów Pf1 nie wpływa na aktywność przeciwbakteryjną ceragenin CSA-13 oraz CSA-131; 4. Cerageniny CSA-13 oraz CSA-131 skutecznie zapobiegają tworzeniu się biofilmu przez *E. coli*,

oraz *P. aeruginosa* LESB58, również w obecności czynników stymulujących jego formowanie; 5. Zastosowanie peptydu LL-37 w kombinacji z cerageninami skutkuje nasileniem efektywności bójczej przeciwko *E. coli* zarówno w stosunku do formy planktonicznej jak i biofilmu bakteryjnego; 6. Kombinacja peptydu LL-37 z cerageninami wykazuje silniejszy efekt bójczy w porównaniu do samych środków przeciwbakteryjnych, w przypadku wewnątrzkomórkowych szczepów *E. coli*. Sformułowane przez Doktorantkę wnioski dobrze oddają uzyskane wyniki, wynikają bezpośrednio z analizy wyników uzyskanych w czasie realizacji badań. We wnioskach brak jest jednakże stwierdzenia, że badane polielektrolity (DNA i F-aktyna oraz bakteriofag Pf1) hamują aktywność bakteriobójczą peptydu LL-37, co różnicuje powyższy peptyd od ceragenin CSA-13 oraz CSA-131 (we wnioskach wspomniano jedynie o bakteriofagu Pf1). Należy również zwrócić uwagę, że analiza danych dotyczących oddziaływania badanych peptydów z *E. coli* nie została poparta analizą statystyczną, co należałoby uwzględnić.

Reasumując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Autorki, która dobrze opanowała niełatwy warsztat badawczy i wykazała dobre merytoryczne przygotowanie. Uważam, że praca stanowi znaczący dorobek z elementami nowości naukowych i w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim. Dlatego też zwracam się do Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim w Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Urszuli Wnorowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoki poziom merytoryczny pracy, docenionej również przez grono międzynarodowych ekspertów, wnioskuję o wyróżnienie pracy *summa cum laude*. Wyniki pracy opublikowano w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (IF=4,415) oraz *BMC Infectious Diseases* (IF 2,949).

Prof. dr hab. n. med. Marek Droździk