



Gdańsk 15.09.2023

Dr hab. inż. Piotr Szweda
Katedra Technologii Leków i Biochemii
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Urszuli Tatiany Wójcik-Bojek zatytułowanej:
„Weryfikacja możliwości zapobiegania rozwojowi zakażeń z udziałem *Staphylococcus aureus* w oparciu o zastosowanie naturalnych ekstraktów roślinnych”**

Charakterystyka tematyki pracy doktorskiej

Zjawisko lekooporności drobnoustrojów staje się jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. Bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, w tym przede wszystkim gatunek *Staphylococcus aureus* należą do bakterii, u których rozwój oporności na chemioterapeutyki zaliczane do różnych grup chemicznych następuje bardzo szybko. Stąd konieczne jest poszukiwanie nowych, alternatywnych i przede wszystkim skutecznych metod profilaktyki i zwalczania infekcji bakteryjnych, w tym gronkowcowych. Badania, które w ramach swojej pracy doktorskiej prowadziła Pani mgr Wójcik-Bojek wpisują się w ten nurt. Na stronie 19 Autorka rozprawy szczegółowo omówiła najważniejsze cele swoich badań. Celem nadrzędnym była weryfikacja możliwości wykorzystania ekstraktów z kory i owoców kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.) w zapobieganiu zakażeniom wywoływanym przez *S. aureus*. Literatura dotycząca właściwości prozdrowotnych, w tym aktywności przeciwdrobnoustrojowej, ekstraktów otrzymywanych z roślin różnych gatunków jest aktualnie bardzo bogata, a liczba publikacji w tym zakresie bardzo szybko rośnie. Typowy, prezentowany w większości publikacji, cykl badań mających na celu ocenę potencjału przeciwdrobnoustrojowego wybranej rośliny obejmuje: optymalizację warunków ekstrakcji (np. dobór rozpuszczalnika), określenie składu chemicznego otrzymanych ekstraktów, określenie właściwości biostatycznych i/lub biobójczych (wyznaczenie parametrów MIC – *Minimum Inhibitory Concentration* i MBC – *Minimum Bactericidal Concentration*) oraz ewentualnie próby identyfikacji składników aktywnych odpowiedzialnych za efekt biologiczny. Pod tym względem koncepcja badań realizowanych w recenzowanej pracy doktorskiej odbiega od utartego schematu i bez wątpienia jest to jej istotna zaleta. Doktorantka nie tylko określiła skład chemiczny i potencjał przeciwdrobnoustrojowy otrzymanych ekstraktów, który obiektywnie można ocenić najwyżej jako umiarkowany (MIC=1000 µg/ml). Przede wszystkim Pani Wójcik-Bojek skupiła się na właściwościach immunomodulujących ekstraktów oraz ocenie wpływu ich składników na aktywność sortazy A – enzymu, który odpowiedzialny jest za przyłączanie powierzchniowych białek adhezyjnych *S. aureus* do peptydoglikanu, stanowiącego podstawowy składnik ściany komórkowej tych bakterii. Ewentualne zahamowanie aktywności tego białka skutkuje obniżeniem zdolności adhezji komórek *S. aureus* do tkanek ludzkich (lub zwierzęcych), co jest równoznaczne z istotnym obniżeniem zdolności wywołania infekcji. Zarówno w zakresie badania właściwości immunomodulujących jak i zdolności hamowania aktywności sortazy, uzyskane przez Doktorantkę wyniki są obiecujące. Należy także podkreślić, że poprzestanie na przeprowadzeniu typowego cyklu badań doprowadziłoby do niewłaściwej oceny potencjału terapeutycznego ekstraktów kaliny koralowej.

Ocena formalna pracy doktorskiej

Kandydatka do stopnia naukowego doktora Pani mgr Urszula Tatiana Wójcik-Bojek przedłożyła rozprawę doktorską pt. „Weryfikacja możliwości zapobiegania rozwojowi zakażeń z udziałem *Staphylococcus aureus* w oparciu o zastosowanie naturalnych ekstraktów roślinnych”, która została wykonana pod kierunkiem Pani dr hab. Beaty Sadowskiej w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego. Dysertacja Pani mgr Wójcik-Bojek została przygotowana w formie hybrydowej, w jej skład wchodzi: cykl dwóch spójnych tematycznie artykułów naukowych, opublikowanych w renomowanych czasopismach z listy JCR:

1. [P1] Wójcik-Bojek, U.; Różalska, B.; Sadowska, B. *Staphylococcus aureus*—A Known Opponent against Host Defense Mechanisms and Vaccine Development—Do We Still Have a Chance to Win? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 948. <https://doi.org/10.3390/ijms23020948>; IF (2022) = 5,6, Punktacja wg. listy Ministerstwa Edukacji i Nauki – 140 pkt.

2. [P2] Wójcik-Bojek, U.; Rywaniak, J.; Bernat, P.; Podsędek, A.; Kajszczyk, D.; Sadowska, B. An In Vitro Study of the Effect of *Viburnum opulus* Extracts on Key Processes in the Development of Staphylococcal Infections. *Molecules* **2021**, *26*, 1758. <https://doi.org/10.3390/molecules26061758>; IF (2021) = 4,9, Punktacja wg. listy MEiN – 140 pkt.

oraz wyniki badań nieopublikowanych. Taką formę przygotowania pracy doktorskiej uważam jako rozsądną. Umożliwiło to Doktorantce zaprezentowanie także tych wyników, które uzyskała w końcowym etapie realizacji pracy doktorskiej. Jak powszechnie wiadomo okres oczekiwania na recenzje manuskryptów publikacji w większości czasopism naukowych jest dość długi, co niepotrzebnie wydłużyłoby proces przygotowania rozprawy o co najmniej kilka miesięcy. W swojej dysertacji (strona 65) Autorka pisze, że w oparciu o wyniki przedstawione w tej części pracy przygotowano manuskrypt publikacji, na stronie 121 przedstawiono oświadczenia współautorów dotyczące ich wkładu w przeprowadzenie badań i przygotowanie tekstu manuskryptu. Byłbym wdzięczny gdyby w trakcie obrony Pani mgr Wójcik-Bojek mogła przedstawić informację, dotyczącą aktualnego etapu przygotowania/oceny manuskryptu (czy został on już przesłany do redakcji, czy jest w trakcie oceny).

Wkład Doktorantki w przygotowanie opublikowanych już artykułów przedstawiono na stronach 118-120. W obydwu przypadkach był to udział wiodący. Przy okazji chciałbym podkreślić, że udziały procentowe poszczególnych współautorów przedstawione w tabelach określono w sposób realny – zgodny z opisem wykonanych badań.

Oprócz kopii publikacji (strony 22-37 oraz 39-64) na treść pracy składają się: spis treści, wstęp teoretyczny (strony 5-18), opis założeń i celów pracy (strona 19), dane bibliograficzne publikacji stanowiących podstawę pracy (strona 20), krótkie streszczenie treści zawartych w publikacji przeglądowej P1, która ukazała się w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (strona 21), krótkie streszczenie pracy zawierającej opis wyników badań eksperymentalnych P2, która ukazała się w czasopiśmie *Molecules* (strona 38), wprowadzenie do tematyki badań, których wyniki nie zostały jeszcze opublikowane (strony 65-66), opis metodologii tej części badań (strony 67 – 75), opis wyników i podsumowanie badań nieopublikowanych (strony 75-86), podsumowanie i wnioski (strony 87-91), dyskusja (strony 92-97), streszczenia w języku polskim i angielskim (strony odpowiednio 98-100 i 101-103). Spis piśmiennictwa obejmujący 133 pozycje, w zdecydowanej większości publikacje z renomowanych czasopism naukowych opublikowane w przeciągu ostatnich 20 lat, przedstawiono na stronach 104-116. Wspomniane już wcześniej oświadczenia współautorów o udziale w publikacjach przedstawiono o na stronach 118-121, natomiast dorobek Autorki na stronach 122-124. Taki układ dysertacji nie budzi żadnych zastrzeżeń. W

mojej ocenie jedyną nietypową kwestią jest umieszczenie streszczeń na końcu opracowania, zwykle streszczenia prezentuje się na początku, ale oczywiście jest to kwestia umowna i w żadnym stopniu nie wpływa ona negatywnie na ocenę pracy czy odbiór zawartej w niej treści.

Należy przyznać, że pod względem edytorskim i formalnym praca przygotowana jest bardzo starannie. Nie stwierdziłem istotnych błędów w zakresie nazewnictwa fachowego, w tekście rozprawy praktycznie nie występują błędy edytorskie – tzw. literówki. Praca nie jest może bogato ilustrowana, ale wszystkie tabele i ryciny (zarówno w publikacjach jak i w części dotyczącej wyników niepublikowanych) zostały przygotowane w sposób bardzo staranny i przede wszystkim zawierają istotne informacje, które zostały zaprezentowane w sposób przemyślany, co bardzo ułatwia czytelnikowi interpretację tekstu opracowania. Na uwagę zasługuje także w pełni profesjonalna analiza statystyczna wyników zaprezentowanych w pracy.

Z obowiązku recenzenta wspomnę tylko o drobnych uchybieniach edytorskich (które nie mają praktycznie wpływu na ogólną ocenę pracy):

Strona 10 – cytata z pracy: „Najtrudniejsze w leczeniu są zakażenia wywołane przez szczepy wielolekooporne, w tym zaliczane do tzw. grupy ESKAPE (akronim od nazw gatunkowych/rodzajowych drobnoustrojów wchodzących w skład tej grupy)” – moim zdaniem w tym miejscu należało też podać nazwy gatunkowe/rodzajowe tych drobnoustrojów.

Strona 12 – w miejsce słowa „ekscytacji” proponowałbym słowo „wzbudzeniu”

Strona 18 (powtarza się także w innych miejscach w pracy, np. str. 38) - Doktorantka stosuje określenie „skład biochemiczny” – moim zdaniem stosowanie określenie „skład chemiczny” byłoby lepszym rozwiązaniem. Można było także wyjaśnić znaczenie skrótów stosowanych na tej stronie (nazwy wykorzystanych technik analitycznych) – UPLC oraz UPLC-QTOF-MS.

Strona 20 – stwierdziłem pewną nieścisłość w zakresie opisu bibliograficznego pracy P2 – z informacji przedstawionej (na tej stronie) wynika, że praca ukazała się w 2022 roku – z informacji zawartych w kopii pracy jednoznacznie wynika, że praca ta ukazała się w roku 2021

Strona 66 – Doktorantka używa określenia: „jako kontrole nastawiano makrofagi” – moim zdaniem lepiej brzmi „jako kontrole wykorzystano makrofagi”

Strona 73 – „... do osadu bakterii dodawano 1 mg/ml izotiocyjanianu fluoresceiny w PBS ...”- moim zdaniem lepiej brzmi „ ... do osadu bakterii dodawano PBS zawierający izotiocyjanian fluoresceiny w stężeniu 1 mg/ml...”

Na tej samej stronie nie zdefiniowano skrótu MOI oraz nie zdefiniowano znaczenia parametru FI

Strona 74 – nie podoba mi się określenie „niezadherowane bakterie”

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Pod względem merytorycznym rozprawę oceniam bardzo wysoko. Jak już wspomniałem szczególnie podoba mi się oryginalny plan badań, który obejmował zarówno bezpośrednią ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów z kory i owoców kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.) jak i badanie wpływu tych preparatów na ekspresję

wybranych czynników wirulencji *S. aureus* oraz przede wszystkim ich właściwości immunomodulujących. Wyniki badań Pani mgr Wójcik-Bojek zostały już częściowo opublikowane. Pozostałą część wyników Doktorantka zaprezentowała w dysertacji na stronach 75-86.

Publikacje

Obie prace, które stanowią podstawę powyższej pracy doktorskiej zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych i z pewnością zostały już poddane wnikliwej ocenie recenzentów. Pozwolę sobie w związku z tym przedstawić jedynie krótki komentarz odnośnie każdej prac.

Publikacja P1 - *Staphylococcus aureus*— a known opponent against host defense mechanisms and vaccine development—do we still have a chance to win?

Jest to praca przeglądowa w której autorzy przedstawili problemy terapii i profilaktyki zakażeń wywoływanych przez gronkowce. W pełni zgadzam się z opinią Doktorantki, że publikacja ta stanowi doskonałe uzupełnienie części teoretycznej dysertacji (str.20). Z danych dostępnych bazie Scopus wynika, że praca cieszy się dużym uznaniem – artykuł ukazał się w styczniu 2022 roku i do dnia 10.09.2023 liczba cytowań tej publikacji wynosi 7.

Publikacja P2 - An *in vitro* study of the Effect of *Viburnum opulus* extracts on key processes in the development of staphylococcal infections.

Jest to praca oryginalna, w której zaprezentowano wyniki badań eksperymentalnych. Do najważniejszych osiągnięć autorów tej pracy należy zaliczyć:

1. Określenie aktywności przeciwgronkowcowej uzyskanych ekstraktów (wyznaczenie parametrów MIC i MBC),
2. Określenie składu chemicznego uzyskanych preparatów,
3. Wykazanie istotnego wpływu składników ekstraktów na aktywność enzymu sortazy A i co za tym idzie zmniejszenie poziomu ekspresji białka SpA na powierzchni komórek gronkowców,
4. Wykazanie wpływu ekstraktów na tworzenie biofilmu przez gronkowce (umiarkowane) oraz skład lipidów obecnych w błonie komórkowej tych bakterii.
5. Wykazanie niskiej aktywności cytotoksycznej ekstraktów.

Także ta praca także cieszy się dużym uznaniem – liczba cytowani wynosi 8, praca ukazała się w marcu 2021 roku.

Na stronie 19 rozprawy Doktorantka przedstawiła szczegółowe cele swoich badań. Jednym z tych celów (nr 2) była ocena możliwości wykorzystania sortazy A jako celu molekularnego preparatów przeciwdrobnoustrojowych oraz szczepionek przeciwgronkowcowych. Na stronie 89 Pani mgr Wójcik-Bojek przedstawiła wniosek 4, w którym w sposób jednoznaczny stwierdza, że enzym ten nie może być rozpatrywany samodzielnie jako cel molekularny dla nowych leków i szczepionek. W trakcie publicznej obrony prosiłbym Doktorantkę o nieco bardziej szczegółowe uzasadnienie tego wniosku w świetle uzyskanych wyników.

Dane niepublikowane

Jak już kilka razy wspominałem w powyższej recenzji jest to część pracy, która szczególnie mi się podoba. Dobrze przygotowany plan badań oraz wykorzystanie zaawansowanych technik laboratoryjnych z zakresu mikrobiologii, immunologii umożliwiło

przeprowadzanie bardzo kompleksowej oceny potencjału immunomodulacyjnego badanych ekstraktów. Bez wątplenia do najbardziej wartościowych wniosków z tej części badań należy zaliczyć:

1. Wykazanie, że składniki ekstraktów kaliny koralowej powodują uwalnianie prozapalnych komponentów komórek bakteryjnych (peptydoglikanu i białka SpA) co ma istotne konsekwencje immunomodulujące,
2. Wykazanie, że uwalniane przez subinhibitorowe stężenia ekstraktów czynniki prozapalne stymulują makrofagi do zwiększonej produkcji cytokin,
3. Wykazanie, że stymulacja makrofagów za pomocą supernatantów z hodowli gronkowców (planktonowych i biofilmowych) traktowanych badanymi ekstraktami skutkuje ograniczeniem wewnątrzkomórkowego przeżywania i namnażania *S. aureus*.

Bardzo podoba mi się zaprezentowana w tej części pracy rzetelna dokumentacja uzyskanych wyników (nawet w sytuacji gdy nie są one zbyt optymistyczne) oraz ich krytyczna analiza.

Odnosnie tej części rozprawy chciałbym żeby w trakcie publicznej obrony doktorantka wyjaśniła następujące kwestie:

1. Dlaczego do badań wybrano ekstrakty wodne i etanolowe, podczas gdy we wcześniejszych etapach badań najwyższą aktywność przeciwbakteryjną wykazały ekstrakty acetonowe?
2. Czy w momencie przygotowywania roztworów wodnych ekstraktów etanolowych (wykorzystywano liofilizaty tych ekstraktów) z owoców *V. opulus* nie obserwowano wtrącania niektórych składników (czy otrzymany roztwór był klarowny)?
3. Nieco problematyczny/mylący jest w mojej ocenie opis prób kontrolnych. W punkcie IV.2.9. przedstawiono następujący zapis: „Odpowiednie układy kontrolne: komórki w samym podłożu hodowlanym (K1) oraz w podłożu hodowlanym zawierającym 10% (v/v) TSB/Glu (K2)”. Kontrola K1 była „punktem odniesienia” dla pomiarów, w których makrofagi traktowano składnikami ściany komórkowej (PG i SpA), natomiast K2 była punktem odniesienia dla pomiarów, w których makrofagi traktowano supernatantami z hodowli *S. aureus*. Natomiast w punktach IV.2.11 – 13 zastosowano zapis: „... a także nieekspozowane komórki kontrolne (K1 i K2)”. Komórki kontrolne K1 faktycznie można zaklasyfikować jako „nieekspozowane”, natomiast komórki kontrolne K2 były jednak „poddane ekspozycji” na składniki podłoża TSB/Glu – i jak widać w niektórych sytuacjach składniki te w istotny sposób wpływały na odpowiednie „cechy” makrofagów – np. wyniki przedstawione na Rycinie 5.
4. Na Rycinie 6 nie uwzględniono wyników dla prób kontrolnych - czy pochłanianie *S. aureus* w obydwu próbach kontrolnych było identyczne?

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Urszuli Tatiany Wójcik-Bojek jest oryginalną, cenną zarówno pod względem naukowym jak i aplikacyjnym, rzetelnie i starannie przygotowaną pracą naukową. Opracowanie spełnia wszystkie wymogi formalne i merytoryczne stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Tym samym wnoszę do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pani mgr. Urszuli Tatiany Wójcik-Bojek do dalszego etapu postępowania doktorskiego.