



Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Wójcik-Bojek

pt. „ Weryfikacja możliwości zapobiegania rozwojowi zakażeń z udziałem *Staphylococcus aureus* w oparciu o zastosowanie naturalnych ekstraktów roślinnych”

**wykonana w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Instytutu Mikrobiologii
Biotechnologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego
pod kierunkiem dr hab. Beaty Sadowskiej, prof. UŁ**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma formę pracy hybrydowej zawierającej dwie publikacje, jedna o charakterze przeglądowym, druga oryginalna obejmująca wyniki badań spójne z tematem rozprawy oraz zawiera również nieopublikowane wyniki badań (do czasu przedstawienia pracy doktorskiej), ale omówione i przeanalizowane. Rozprawa obejmuje: Wstęp, Założenia i cel pracy, Publikacje rozprawy doktorskiej, Wyniki nieopublikowane, Podsumowanie i wnioski, Dyskusję, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Literaturę. Na końcu autorka umieściła oświadczenia współautorów o zakresie jej udziału w publikacjach, z których wyniki zostały ujęte w rozprawie oraz wykaz dorobku naukowego.

Praca oryginalna („ An In Vitro Study of the Effect of Viburnum opulus Extracts on Key Processes in the Development of Staphylococcal Infections” – *Molecules*, 2021, 26, 1758), która wchodzi w skład pracy doktorskiej pt: „ Weryfikacja możliwości zapobiegania rozwojowi zakażeń z udziałem *Staphylococcus aureus* w oparciu o zastosowanie naturalnych ekstraktów roślinnych” - zawiera spójny z tematem rozprawy zakres wykonanych badań, podobnie jak zaprezentowane nieopublikowane jeszcze badania. Natomiast w moim odczuciu, nie do końca jest uzasadnione włączenie do rozprawy pracy teoretycznej („*Staphylococcus aureus* –

A Known Opponent against Host Defense Mechanisms and Vaccine Development – Do We Still Have a Chance to Win?” – International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23, 948), której celem było przedstawienie potrzeby wdrożenia swoistej profilaktyki wobec inwazyjnych zakażeń *Staphylococcus aureus* i trudności w tym zakresie ze względu na liczne czynniki wirulencji tego gatunku oraz dotyczyła światowych trendów w badaniach nad nowoczesnymi technologiami mikrobiologii molekularnej w opracowaniu nowych szczepionek, szczególnie przeciwko *S. aureus*. Wg mnie, zawarte w publikacji informacje istotne ze względu na temat rozprawy, mogłyby być przedstawiony w postaci dodatkowego rozdziału we wstępie z uwzględnieniem zagadnień bezpośrednio związanych z tematem prezentowanych badań.

Wstęp pracy doktorskiej zawiera charakterystykę *S. aureus* oraz informacje o alternatywnych sposobach zwalczania zakażeń gronkowcowych. Autorka przedstawia wiadomości o ekstraktach roślinnych, które mogą mieć zastosowanie w leczeniu zakażeń gronkowcowych i szczegółowo charakteryzuje ekstrakty z kaliny koralowej, które były przedmiotem badań w zakresie ich zastosowania w zapobieganiu zakażeniom *S. aureus*. Wstęp zawiera istotne i ciekawie przedstawione informacje, które wprowadzają w tematykę rozprawy. Dodatkowo, jak już wspomniałam, wstęp mógłby obejmować powiązane z tematem rozprawy informacje bazujące na publikacji poglądowej.

W Założeniach pracy doktorantka zwróciła uwagę na kluczowe problemy w zapobieganiu i leczeniu zakażeń gronkowcowych, co było podstawą do sformułowania nadrzędnego celu bezpośrednio związanego z tematem pracy, dotyczącego kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.) jako modelu wykorzystania naturalnych ekstraktów roślinnych, które posłużyły do analizy możliwości zastosowania ich w zapobieganiu zakażeniom *S. aureus*, zwracając uwagę na możliwy szeroki zakres występowania zakażeń - miejscowy, uogólniony i z udziałem biofilmu. Postawione cele szczegółowe są spójne i związane z aspektem możliwego oddziaływania przeciwdrobnoustrojowego na *S. aureus* badanych ekstraktów z owoców i kory kaliny koralowej, wpływu na enzym sortazę A, który ma istotny udział w aktywności gronkowcowych adhezyjnych białek powierzchniowych i jest niezbędny do kolonizacji gospodarza i patogenezy zakażeń inwazyjnych. Stąd też w pełni uzasadnione jest tak przedstawione ukierunkowanie badań w pracy doktorskiej, tym bardziej, że zwracana jest uwaga w wielu publikacjach na małowcząsteczkowe inhibitory sortazy, które mogą być istotne w zapobieganiu kolonizacji przez *S. aureus* i rozwoju chorób inwazyjnych. Istotnym

celem rozprawy były badania obejmujące analizę wpływu używanych ekstraktów na postacie gronkowców we wzroście planktonicznym i biofilmie oraz wybrane parametry aktywności komórek fagocytarnych.

Cele główne i szczegółowe zostały właściwie sformułowane i są adekwatne do spektrum przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników.

Opublikowana praca doświadczalna zawiera wykonane badania bardzo istotne w zakresie tematu rozprawy. Została przeprowadzona charakterystyka biochemiczna ekstraktów acetonowych, etanolowych i wodnych z owoców i kory kaliny koralowej, które zgodnie z założeniem pracy mogłyby być dodatkiem do diety w celu zapobiegania infekcjom gronkowcowym. W badaniach analizowany był czas i wpływ ekstraktów na adhezyjność *S. aureus* i tworzenie biofilmu. Wpływ na czynniki wirulencji takie jak aktywność SrtA, ekspresję SpA, które mogą determinować rozwój infekcji powiązany z tworzeniem biofilmu. Rozważając potencjalne zastosowanie ekstraktów jako dodatku do diety, zbadano ich cytotoksyczność na linii fibroblastów ludzkiego napletka HFF-1.

W badaniach ekstraktów z surowców naturalnych zwracana jest uwaga na różnice w zawartości głównych związków wpływających na ich aktywność – w zależności od obszaru występowania surowców roślinnych i czynników środowiskowych – czy autorka rozprawy ma w tym względzie własne obserwacje dotyczące analizowanych próbek i różnic w zakresie ich składu?

Badanie cytotoksyczności ekstraktów wobec użytej do badań linii fibroblastów wskazuje, że żywotność nie spadła poniżej 80% komórek dla stężenia 500 g/ml preparatów. Natomiast został zaobserwowany przy tym stężeniu widoczny wzrost rozwoju fibroblastów. Czy taki efekt przy wyższych stężeniach lub dłuższej potencjalnej suplementacji preparatami nie może mieć wpływ na zwiększoną proliferację komórek w różnych możliwych działaniach np.: regeneracji tkanki w ognisku zapalnym lub stymulacji komórek np.: w procesie nowotworzenia? Jakże ewentualnie badania mogłyby rozstrzygnąć te wątpliwości?

Autorka rozprawy oceniła również bezpośredni hamujący i bójczy wpływ ekstraktów na *S. aureus*, wskazując na najefektywniejsze działanie ekstraktu acetonowego. Wytwarzanie przez gronkowce biofilmu jest bardzo istotną cechą tych drobnoustrojów w rozwoju zakażenia, stąd też w pełni uzasadniony jest etap badań ekstraktów w kontekście ich wpływu

na tę postacie wzrostu gronkowców. W przeprowadzonym doświadczeniu doktorantka wykazała hamujący wpływ ekstraktów, natomiast istotną informacją jest również zróżnicowanie tego działania w zależności od analizowanego, użytego szczepu wzorcowego *S. aureus*. Kolejnym etapem badań była analiza aktywności SrtA po zadziałaniu ekstraktów.

Część rozprawy, która zawiera nieopublikowane wyniki badań, tak jak informuje doktorantka jest opracowana w przygotowanym manuskrypcie, ale nie został on opublikowany przed złożeniem rozprawy. W tej części rozprawy, przed zaprezentowaniem wyników badań, autorka przedstawia założenia i podstawy teoretyczne tej części pracy doktorskiej, które uzasadniają wybór zaplanowanego zakresu badań. Jest to bardzo interesujące spektrum wykonanych badań powiązanych z tematem rozprawy. Miały one na celu analizę pośredniego działania immunomodulującego na ludzkie makrofagi (wyprowadzone z linii ludzkich komórek monocytarnych THP-1) analizowanych różnych postaci ekstraktów jako czynników, które mogą stymulować uwalnianie prozapalnych składników z komórek bakteryjnych *S. aureus*, uwzględniając tworzoną przez bakterie postać planktoniczną i biofilm. Scharakteryzowano również aktywność fagocytarną makrofagów poprzez ocenę pochłaniania i wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii. Oznaczono poziom wybranych cytokin – TNF-10 i IL-10 oraz badano polaryzację makrofagów do fenotypu prozapalnego w oparciu o ekspresję powierzchniowych cząsteczek CD.

Wnioski z przeprowadzonych badań wskazują na słabe bezpośrednie działanie przeciwdrobnoustrojowe badanych ekstraktów uzyskanych z kory i owoców kaliny koralowej (*Viburnum opulus* L.) wobec gronkowców. Stwierdzono również obniżenie ekspresji SpA na powierzchni komórek i zmiany w składzie błon komórek bakteryjnych *S. aureus*. Istotnym wnioskiem doktorantki był zaobserwowany brak zahamowania tworzenia biofilmu przez ekstrakty, co w kontekście obniżenia ekspresji SpA sugerowało, iż sortaza A nie stanowi odpowiedniego celu molekularnego dla preparatów przeciwgronkowcowych. Wnioski uzyskane z tego etapu badań obejmujące właściwości immunomodulujące badanych ekstraktów wskazują na trudności w określeniu zmian fenotypu makrofagów i braku możliwości pośredniego modulowania aktywności tych komórek immunologicznych pod wpływem ekstraktów kaliny koralowej.

Punkt Podsumowanie i wnioski dotyczące przeprowadzonych badań zostały sformułowane adekwatnie do uzyskanych wyników. Natomiast wg. mnie powinny być one

umieszczone po Dyskusji, a nie przed Dyskusją. Dobór piśmiennictwa w rozprawie jest właściwy.

Doktorantka w pracy rozpatrywała ewentualną możliwość suplementacji diety preparatami kaliny koralowej, natomiast czy wobec przeprowadzonych badań byłoby możliwe zastosowanie badanych ekstraktów miejscowo na zakażone np. rany *S. aureus*? Jak ocenia Doktorantka w tym zakresie potencjalną ich skuteczność?

Pragnę podkreślić, iż w przeprowadzonych badaniach w rozprawie doktorskiej, autorka wykazała się bardzo dobrym przygotowaniem metodycznym i teoretycznym, co umożliwiło wykonanie w szerokim zakresie badań z wykorzystaniem różnych klasycznych i nowoczesnych metod i technik badawczych, dokładnego ustalenia warunków oznaczeń z zastosowaniem wzorców i kontroli, niezbędnych do prawidłowej interpretacji wyników badań. Wskazuje to na szerokie umiejętności doktorantki do samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Podsumowując chciałabym podkreślić, iż rozprawa doktorska mgr Urszuli Wójcik-Bojek jest pracą, która obejmuje szeroki zakres bardzo dobrze przemyślanych, zaplanowanych oraz przeprowadzonych badań i może być podstawą do prowadzenia analiz innych preparatów roślinnych w kontekście ich zastosowania w terapii przeciwdrobnoustrojowej.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Urszuli Wójcik-Bojek pt. „Weryfikacja możliwości zapobiegania rozwojowi zakażeń z udziałem *Staphylococcus aureus* w oparciu o zastosowanie naturalnych ekstraktów roślinnych” oceniam pozytywnie. Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2022 r., poz. 574 ze zm.).

W związku z powyższym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Urszuli Wójcik-Bojek do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Lublin 1.09.2023

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Prof. dr hab. n. med. Alina M. Olender