

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Karola Skłodowskiego pt. "Wpływ kształtu i rozmiaru nanocząstek złota na efekt przeciwbakteryjny i przeciwgrzybiczy ceragenin związanych z ich powierzchnią – badania *in vitro*" wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Roberta Buckiego oraz promotora pomocniczego dr n. med. Sylwii Joanny Chmielewskiej-Deputy z Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej i Inżynierii Nanobiomedycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Oporność wielolekowa stała się głównym problemem terapii przeciwbakteryjnej, która nieustannie wzrasta, w ostatnich latach kilkukrotnie stanowiąc duże zagrożenie dla zdrowia populacji ludzkiej. Lekooporność stanowi nie tylko problem kliniczny (np. będący przyczyną dwóch milionów infekcji i około 23 000 przypadków śmierci pacjentów rocznie w Stanach Zjednoczonych), ale również i ekonomiczny (koszt oporności wielolekowej w Europie szacuje się rocznie na 1,5 miliarda euro, w Stanach Zjednoczonych na 55 miliardów dolarów). Początkowo szczepy odporne izolowano głównie w środowisku szpitalnym, jednakże wobec coraz bardziej powszechnego stosowania leków przeciwbakteryjnych, nie tylko ze wskazań klinicznych, szczepy odporne są wszechobecne. Spośród lekoopornych bakterii na szczególną uwagę zasługują te objęte akronimem ESKAPE, do których zalicza się: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp. Określane są one również mianem tzw. patogenów alarmowych ze względu na dużą zdolność rozwijania lekooporności. Dwa patogeny z grupy ESKAPE, a mianowicie *Acinetobacteriaceae* odporne na karbapenemy i *Enterobacteriaceae* odporne na karbapenemy umieszczono wśród pięciu bakterii opornych na antybiotyki na liście pilnych zagrożeń, a pozostałe 4 patogeny tworzące tę grupę znajdują się na liście poważnych zagrożeń (wg Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorobom, Departament Zdrowia i Opieki Społecznej Stanów Zjednoczonych). Powyższe patogeny znajdują się również na globalnej liście antybiotykoopornych patogenów priorytetowych Światowej Organizacji Zdrowia utworzonej w celu ustalenia priorytetów badań i opracowania nowych skutecznych terapii przeciwbakteryjnych. Niestety brak nowych związków o aktywności przeciwbakteryjnej stale pogorsza statystyki infekcji bakteriami wieloopornymi, a nieskuteczne leczenie tych infekcji dodatkowo przyczynia się do ekspansji oporności na leki przeciwbakteryjne.

Podobnie do bakterii ESKAPE, dużym problemem klinicznym są infekcje grzybami drożdżopodobnymi, zwłaszcza u pacjentów z upośledzoną funkcją układu odpornościowego i leczonych lekami przeciwbakteryjnymi. Kandydoza jest najczęstszą jednostką chorobową zakażeń grzybiczych i jest przyczyną

ok. 27 000 hospitalizacji rocznie, a ich całkowity koszt ekonomiczny wynosi 1,4 miliarda dolarów w Stanach Zjednoczonych. *Candida albicans* odpowiada za ok. 75% wszystkich infekcji *Candida* i stanowi ogromne globalne obciążenie zdrowotne, którego nasilenie stale rośnie. Ten patogen powoduje ponad 150 milionów infekcji błon śluzowych i ok. 200 000 zgonów rocznie z powodu inwazyjnej i rozsianej postaci choroby w populacji podatnej na zakażenie. Wysoka śmiertelność związana z inwazyjnymi zakażeniami grzybiczymi wskazują na ograniczenia aktualnie dostępnych terapii przeciwgrzybiczych. Ograniczona liczba leków przeciwgrzybiczych w połączeniu ze stale rosnącym poziomem oporności na leki przeciwgrzybicze powoduje konieczność poszukiwania nowych skutecznych strategii terapeutycznych.

Dlatego też temat badawczy podjęty przez mgr Karola Skłodowskiego należy uznać za w pełni aktualny, poświęcony poszukiwaniu nowych strategii profilaktyki i leczenia zakażeń bakteryjnych wywołanych bakteriami z grupy ESKAPE oraz grzybami drożdżopodobnymi, tj. określeniu aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej nanocząstek złota sfunkcjonalizowanych cerageninami CSA-13, CSA-44, CSA-131.

Na rozprawę doktorską mgr Karola Skłodowskiego składają się dwie opublikowane prace, tj. „praca oryginalna: Skłodowski K, Chmielewska SJ, Depciuch J, Deptuła P, Piktel E, Daniluk T, Zakrzewska M, Czarnowski M, Cieśluk M, Durnaś B, Parlińska-Wojtan M, Savage PB, Bucki R. Ceragenin-Coated Non-Spherical Gold Nanoparticles as Novel Candidacidal Agents. *Pharmaceutics*. 2021;13(11):1940 (IF 6,525) oraz praca przeglądowa – Skłodowski K, Chmielewska-Deptuła SJ, Piktel E, Wolak P, Wollny T, Bucki R. Metallic Nanosystems in the Development of Antimicrobial Strategies with High Antimicrobial Activity and High Biocompatibility. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3):2104 (IF 5,6). W obu pracach Doktorant jest pierwszym autorem, jego udział w powstaniu każdej z powyżej wymienionych prac wynosi 60%, co zostało potwierdzone przez pozostałych współautorów poszczególnych prac. Ponadto przedłożona do oceny praca zawiera wstęp, omówienie prac składających się na pracę doktorską obejmujące przedstawienie celu pracy, materiałów i metody, wyników oraz wniosków jak również streszczeń w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, wykaz tabel i rycin.

We wstępie Doktorant przedstawił charakterystykę patogenów z grupy ESKAPE i *Candida*, przedstawił mechanizmy oporności drobnoustrojów, omówił charakterystykę ceragenin o potencjalnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej oraz scharakteryzował nanocząstki złota sfunkcjonalizowane cerageninami. Informacje przedstawione we wstępie uzasadniają w pełni zakres badań stanowiących podstawę pracy doktorskiej opracowanej przez mgr Karola Skłodowskiego.

W oparciu o przesłanki zawarte we wstępie oraz pracy przeglądowej Doktorant sformułował następujące cele pracy doktorskiej mające określić właściwości przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze nanocząstek złota

sfunkcjonalizowanych cerageninami, tj.: 1) określenie aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej nanocząstek złota sfunkcjonalizowanych cerageninami wobec bakterii z grupy ESCAPE oraz grzybów drożdżopodobnych; 2) ocena wpływu kształtu oraz wielkości nanocząstek złota sfunkcjonalizowanych cerageninami na aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą; 3) określenie przeciwgrzybiczego mechanizmu działania nanosystemów; 4) ocena indukcji oporności na nanocząstki złota sfunkcjonalizowane cerageninami u wybranych szczepów *Candida*; 5) określenie aktywności badanych nanosystemów w stosunku do zewnątrzkomórkowych oraz wewnątrzkomórkowych patogenów z grupy ESCAPE; 6) ocena toksyczności badanych nanocząstek złota sfunkcjonalizowanych cerageninami w stosunku do komórek gospodarza.

Dla zrealizowania postawionych celów Doktorant przeprowadził badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej nanocząstek złota w kształcie patyczków (AuR NPs), fistaszków (AuP NPs) i gwiazdek (AuS NPs) sfunkcjonalizowanych CSA-13, CSA-44, CSA-131 na szczepach bakteryjnych z grupy ESCAPE (szczep wzorcowy *Enterobacter faecium* ATCC 700221 (VRE), szczepy kliniczne: *Acinetobacter baumannii* (oporny na karbapenemy, aminoglikozydy, fluorochinolony) i *Klebsiella pneumoniae* (oporny na antybiotyki β -laktamowe, aminoglikozydy, fluorochinolony) oraz dwóch szczepach referencyjnych grzybów: *Candida albicans* ATCC 26790 i *Candida albicans* ATCC 1408 oraz szczepie klinicznym *Canida krusei*. W celu określenia aktywności przeciwdrobnoustrojowej w odniesieniu do wankomycyny i imipenemu (MIC, MBC, MFC) zastosowano metodę seryjnych rozcieńczeń, test zliczania kolonii oraz kinetykę wzrostu bakterii z użyciem resazuryiny. Aktywność przeciwbakteryjną nanosystemów oceniano ponadto: w stosunku do bakterii zewnątrzkomórkowych za pomocą testu adhezji, w stosunku do bakterii wewnątrzkomórkowych za pomocą testu internalizacji z wykorzystaniem komórek A549 (ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc). Potencjał rozwoju oporności *Candida albicans* ATCC 26790 i *Canida krusei* oceniano metodą seryjnego pasażowania komórek drobnoustrojów z testowanymi nanosystemami. Mechanizmy aktywności bakteriobójczej oceniano poprzez określenie: powstawania wolnych rodników (pomiar pochodnych nadtlenuków za pomocą 2'-7'-diocyanu dichlorofluoresceiny, DFCH-DA), integralności/przepuszczalności błon komórkowych (N-fenylo-l-naftyloamina, NPN; odczynnik Bradforda – odpowiednio z detekcją fluorescencyjną oraz kolorymetryczną) oraz depolaryzacji błony komórkowej (jodek 3,3'-dipropylotiadikarbocyaniny (diSC₍₃₎). Biozgodność oceniano testem MTT używając komórki ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc A549 oraz uwalniania hemoglobiny z krwinek czerwonych. Należy stwierdzić, że sposób zaplanowania badań oraz ich realizacja świadczą o bardzo dobrym merytorycznym przygotowaniu Doktoranta. 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, ze względu na mechanizm działania ceragenin, inny test biozgodności (MTT ocenia aktywność oksydacyjną mitochondriów) odzwierciedlający integralność błony komórkowej, np. test LDH. W charakterystyce badanych nanostruktur sfunkcjonalizowanych cerageninami (scharakteryzowanych pod względem strukturalnym: STEM, spektroskopia Ramana, potencjał zeta - Zetasizer) brak jest oceny stabilności kompleksów w warunkach eksperymentalnych (co potencjalnie utrudnia wnioskowanie dotyczące aktywności biologicznej sfunkcjonalizowanych nanostemów). Plan badania powinien również być może uwzględnić układ odniesienia w postaci niesfunkcjonalizowanych nanocząstek złota.

Po przeprowadzeniu szeregu doświadczeń Doktorant wykazał m.in., większą aktywność przeciwbakteryjną (MIC/MBC, test zliczania kolonii, kinetyka wzrostu) sfunkcjonalizowanych CSA-13 nanostruktur złota niezależnie od kształtu od wankomycyny i imipenemu; mechanizm działania przeciwrzybiczego sfunkcjonalizowanych cerageniną nanocząstek złota związany z zaburzeniem integralności błony komórkowej bakterii i indukcją stresu oksydacyjnego (1,2-1,7-krotny wzrost powstawania ROS, depolaryzacja błony – 1,27-2,3 wzrost sygnału fluorescencji diSC₍₃₎, wzrost wychwytu NPN, uwolnienia zawartości cytoplazmy – test wycieku białka); wysoką aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do patogenów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych (hamowanie adhezji *A. baumannii* do komórek A549, hamowanie wzrostu *K. pneumoniae* wewnątrz komórek A549) indukowaną przez AuNPs@CSA-13; brak indukcji powstawania oporności u szczepów *Candida* (do 25 pasaży) poddanych ekspozycji na sfunkcjonalizowane AuNPs@CSA-13, AuNPs@CSA-44, AuNPs@CSA-131; biokompatybilność (żywotność komórek A549 > 70% (EN ISO 10993-5, section 8.5), test MTT; Według Amerykańskiego Towarzystwa Badań i Materiałów (American Society for Testing and Materials, ASTM), hemoliza poniżej 5% uważana jest za nieistniejącą, powyżej tej granicy do 10% uważa się za niską, a powyżej 10% uważa się za istotną hemolizę) badanych nanostruktur. Wyniki wpływu badanych nanostruktur oraz imipenemu i wankomycyny na wzrost bakterii przedstawiono jedynie w formie opisowej, nie poddano ich analizie wzmiankowanymi w opisie metodami oceniającymi istotność statystyczną.

Dyskusja uzyskanych wyników eksperymentalnych (zawarta w publikacji) jest prowadzona dojrzałe, uwzględnia aktualnie dostępną wiedzę w dziedzinie. Została również pozytywnie oceniona przez recenzentów czasopisma. Jednakże być może dyskusja powinna odnieść się do, nie uwzględnionej w układzie doświadczalnym, aktywności przeciwbakteryjnej niesfunkcjonalizowanych nanocząstek złota (uwzględnienie tego aspektu w planie badania umożliwiłoby lepsze wnioskowanie wobec udowodnionej aktywności przeciwbakteryjnej wielu typów nanocząstek złota, tj. czy funkcjonalizacja cerageniną zwiększa aktywność przeciwbakteryjną nanostruktur złota).

Na podstawie przeprowadzonych badań Autor sformułował sześć wniosków: 1. nanocząstki złota sfunkcjonalizowane cerageninami wykazują wysoką aktywność bakteriobójczą i grzybobójczą; 2) mechanizm aktywności przeciwdrobnoustrojowej nanosystemów obejmuje wytwarzanie reaktywnych form tlenu, depolaryzację oraz uszkodzenie błony komórkowej; 3) nanocząstki złota sfunkcjonalizowane cerageninami nie indukowały oporności zarówno u szczepu wzorcowego *C. albicans* jak i szczepu klinicznego *C. krusei*; 4) badane nanosystemy charakteryzuje wysoka aktywność przeciwbakteryjna zarówno w stosunku do bakterii zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowych; 5) niska aktywności hemolityczna badanych nanosystemów w dawkach bakteriobójczych oraz grzybobójczych wskazują na ich duży potencjał w opracowaniu nowych metod zwalczania infekcji wywołanych przez bakterie z grupy ESKAPE oraz grzyby z rodzaju *Candida*; 6) nanocząstki złota w kształcie fistaszków sfunkcjonalizowane cerageninami wykazują większą aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybiczą w porównaniu do patyczków i gwiazdek.

Przedstawione przez Doktoranta wnioski dobrze oddają uzyskane obserwacje doświadczalne, wynikają bezpośrednio z analizy wyników uzyskanych w czasie realizacji badań. Być może we wnioskach można by również odnieść się do współczynnika bezpieczeństwa badanych nanosystemów (wobec dostępnych danych dotyczących MIC i stężeń o potencjalnym toksycznym działaniu).

Reasumując należy stwierdzić, że cel pracy został w pełni zrealizowany, a uzyskane wyniki są oryginalnym osiągnięciem Autora, który dobrze opanował złożony warsztat badawczy i wykazał 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 Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Karola Skłodowskiego 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: *Pharmaceutics* (IF 6,525) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (IF 5,6).

Prof. dr hab. n. med. Marek Drożdżik