

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 napotykają 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 hormaechei* 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 hormaechei* 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 µg/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 µg/ml. Przy dawce bakteriobójczej 10 µg/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/nmm-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 w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018r poz. 1669 z późn.zm). 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.