



Warsaawa, 28.10.2022

Recenzja rozprawy doktorskiej

Autor: Suhanya Veronica Prasad

**Tytuł: "Non-peptide mimics of antimicrobial peptides and their functionalized gold nanosystems to combat antibiotic resistance"**

Promotorzy: prof. dr hab. Robert Bucki  
oraz dr hab. Krzysztof Fiedoruk

Temat rozprawy doktorskiej Pani mgr Suhanya Prasad jest bardzo ważny z powodu pojawiania się wielolekoopornych (ang. multidrug-resistant, MDR) szczepów drobnoustrojów wywołujących zakażenia na całym świecie. Symulacje naukowe wskazują, że w 2050 r. więcej osób umrze z powodu infekcji o takiej etiologii niż z powodu nowotworów. Jest też coraz więcej doniesień o szczepach drobnoustrojów o rozszerzonej oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe (ang. extensively drug-resistant, XDR), a nawet całkowicie opornych na wszystkie antybiotyki stosowane wobec danego drobnoustroju (ang. pandrug-resistant, PDR). Z tego powodu priorytetem jest poszukiwanie alternatywnych opcji terapeutycznych do zwalczania zakażeń wywoływanych przez takie czynniki etiologiczne. Jedną z opcji może być kliniczne zastosowanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych i/lub ich pochodnych lub syntetycznych analogów. Jednak wyniki badań naukowych dotychczas przeprowadzonych z użyciem tych cząsteczek wskazują, że ich interakcje *in vivo* w organizmie człowieka mogą być zróżnicowane, dlatego też muszą być wnikliwie zbadane.

Struktura rozprawy jest typowa dla pracy doktorskiej opartej na cyklu tematycznie spójnych i opublikowanych artykułów naukowych. Praca zawiera dwie wieloautorskie publikacje naukowe (1 artykuł poglądowy i 1 publikacja oryginalna), w których Pani mgr Suhanya Prasad jest pierwszym autorem. Artykuły te ukazały się w recenzowanych czasopismach naukowych o współczynniku oddziaływania (ang. impact factor, IF) 5,924 (artykuł poglądowy, opublikowany w 2019 r.) oraz 6,096 (artykuł oryginalny, opublikowany w 2021 r.), z całkowitym IF 12,020. Punktacja Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) tych artykułów wynosi odpowiednio 140 i 100 (całkowita punktacja: 240).

Pani mgr Suhanya Prasad jest także współautorką 3 publikacji, które nie są włączone do niniejszej rozprawy doktorskiej, o całkowitym współczynniku oddziaływania (IF) 19,633 oraz punktacji MEiN równej 350. Dorobek naukowy Doktorantki obejmuje 3 doniesienia na konferencjach naukowych.





Rozprawa liczy 117 stron i zawiera 10 rozdziałów: „Dorobek naukowy”, „Zestawienie wartości IF i punktacji MEiN”, „Lista skrótów”, „Wstęp” (7 stron), „Opis badań naukowych” (zawierający podrozdziały: „Cele i założenia” – 1 strona, „Materiały i metody” – 7 stron, „Wyniki” – 5 stron, „Dyskusja” – 2 strony, „Wnioski” – 1 strona, „Lista rycin” oraz „Bibliografia”), „Cykl publikacji włączonych do rozprawy”, „Streszczenie w języku angielskim”, „Streszczenie w języku polskim”, „Finansowanie badań i zgoda Komisji Bioetycznej” oraz „Wkład Autorki i współautorów w publikacje włączone do rozprawy”.

W uzupełnieniu danych zawartych w artykułach stanowiących cykl publikacji włączony do rozprawy doktorskiej, Doktorantka przeprowadziła badanie indukcji oporności bakterii na cerageninę CSA-13 i kolistynę z użyciem nowo opisanego patogenu szpitalnego – *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (ST89).

W rozdziale „Wstęp” Pani mgr Suhanya Prasad przedstawiła opis zjawiska oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe (ang. antimicrobial resistance, AMR) i klasyfikację priorytetowych badań naukowych dotyczących tego problemu zdrowia publicznego, zwłaszcza w odniesieniu do trzech najważniejszych patogenów ucha – *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* oraz *Moraxella catarrhalis*. Jest także przydatna informacja o *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii*, stosowanym w niektórych eksperymentach opisanych w niniejszej rozprawie. W dalszej części „Wstępu” Autorka przedstawiła właściwości i potencjalne zastosowanie terapeutyczne endogennych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (ang. endogenous antimicrobial peptides, AMPs), a także ich syntetycznych analogów niepeptydowych, opartych na kwasie cholowym – ceragenin, określanych też jako kationowe steroidowe związki przeciwdrobnoustrojowe (ang. cationic steroid antimicrobials, CSAs). Należy podkreślić, że cerageniny charakteryzują się szerokim spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej i właściwościami immunomodulacyjnymi, a badania przeprowadzone *in vitro* nie wykazują oporności komórek bakteryjnych i grzybiczych na te związki. W tym rozdziale Doktorantka opisała także potencjalne zastosowanie nanosystemów zawierających cerageniny w terapii zakażeń, szczególnie w aspekcie ich działania hamującego wytwarzanie biofilmów. Ciekawe byłoby dodanie rozważań na temat możliwości zastosowania terapeutycznego ceragenin w leczeniu wstrząsu septycznego, gdyż związki te „mogą hamować reakcję zapalną organizmu gospodarza aktywowaną przez endotoksynę”.

Podrozdział „Cele i założenia” zawiera dwa dobrze sformułowane cele: 1. Analiza przeciwbakteryjnego działania ceragenin i sprzężonych z cerageninami nanocząsteczek złota (AuP@CSAs) w kształcie orzeszków ziemnych przeciwko głównym patogenom wywołującym zapalenie ucha środkowego, takim jak *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* oraz *Moraxella catarrhalis*; 2. Określenie na poziomie genomowym i transkryptomowym wytworzenia się oporności podczas eksperymentalnej adaptacji patogenu szpitalnego *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (ST89) na subinhibitorowe stężenia ceragenin i polikationowego antybiotyku – kolistyny. Pierwszy z tych celów został osiągnięty w oryginalnej publikacji będącej częścią cyklu włączonego do





niniejszej pracy doktorskiej, podczas gdy drugi z w/w celów jest szczegółowo opisany w rozprawie (wyniki nie są jeszcze opublikowane).

Podrozdział rozprawy „Materiały i metody” zawiera szczegółowe informacje dotyczące przeprowadzonych eksperymentów, w tym określenie bakteriobójczych mechanizmów działania ceragenin i nanosystemów zawierających CSA wobec otopatogenów, a także indukcji *in vitro* oporności *E. hormaechei* na kolistynę i CSA-13. Analizy statystyczne zastosowane w pracy doktorskiej były właściwe.

Wyniki eksperymentów naukowych przeprowadzonych przez Doktorantkę są przedstawione w podrozdziale „Wyniki” rozprawy i w artykule oryginalnym włączonym do niniejszej rozprawy doktorskiej.

Podrozdział „Dyskusja” jest zwięzły, lecz dyskusja jest dobrze przeprowadzona i pouczająca. Autorka rozprawy odniosła się w niej głównie do nieopublikowanych jeszcze wyników eksperymentów *in vitro* dotyczących indukcji oporności na cerageniny i kolistynę.

Na podstawie wyników badań eksperymentalnych Doktorantka wyciągnęła 5 wniosków odpowiadających założonym celom pracy doktorskiej:

1. Ze względu na szersze spektrum działania ceragenin, są one rozważane jako leki do terapii zakażeń wywołanych przez Gram-dodatnie i Gram-ujemne patogeny wykazujące oporność na obecnie dostępne antybiotyki. Niesferyczne nanocząsteczki złota jako nośniki leku zwiększają aktywność ceragenin w stężeniach, które nie są toksyczne dla komórek gospodarza.
2. Zawierające cerageniny nanocząsteczki złota mające kształt orzeszków ziemnych mogą być zastosowane w leczeniu infekcji przebiegających z wytworzeniem się biofilmu, gdyż wykazują znakomitą skuteczność bakteriobójczą w zahamowaniu wzrostu biofilmów wytworzonych przez *S. pneumoniae*, *H. influenzae* oraz *M. catarrhalis*.
3. Cerageniny nie wykazują szybkiej stymulacji lekooporności u bakterii i prawdopodobnie wymagana jest do tego długotrwała ekspozycja jako czynnik stresowy, ułatwiająca powstanie zmian w lekowrażliwości o umiarkowanym poziomie, co czyni je obiecującymi kandydatami na leki mające zastosowanie kliniczne.
4. Wykazano powstanie oporności na kolistynę i CSA-13 u szczepu *E. hormaechei* w warunkach eksperymentalnej adaptacji poprzez wywołanie zmian w obrębie osłony komórkowej, stanowiącej miejsce działania tych związków. Prowadzi to do zaburzenia procesu wiązania się leku z błoną komórkową, przy czym większą ekspresję tego mechanizmu zaobserwowano u szczepu opornego na kolistynę. Niemniej jednak w odniesieniu do wszystkich związków z grupy ceragenin nie stwierdzono zmian w ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej u szczepu *E. hormaechei* opornego na kolistynę.
5. Znajomość zmian genetycznych w odpowiedzi na selektywną presję strukturalnie podobnych syntetycznych analogów kationowych peptydów przeciwdrobnoustrojowych (ang. cationic antimicrobial peptides, CAMPs), takich jak cerageniny, będzie przydatna w przyszłości w badaniach nad opracowaniem i zastosowaniem tych syntetycznych





związków w celu zminimalizowania występowania lub ominięcia zjawiska wielolekooporności.

Podrozdział „Wykaz rycin” zawiera 5 rycin przedstawiających wyniki eksperymentów mających na celu indukcję oporności na kolistynę i CSA-13, nieopisanych w publikacjach stanowiących cykl artykułów.

Podrozdział „Bibliografia” zawiera 78 publikacji, z których ponad połowa została opublikowana w ciągu ostatnich 5 lat (2017-2022). Ponadto lista 151 publikacji zawarta jest w artykule poglądowym oraz 95 publikacji w artykule oryginalnym, które stanowią cykl publikacji włączony do niniejszej rozprawy doktorskiej.

Cykl publikacji włączonych do niniejszej rozprawy obejmuje dwa artykuły. Publikacja poglądowa (Prasad SV i wsp. Expression and function of host defense peptides at inflammation sites. IF: 5,924; MEiN: 140) stanowi bardzo szczegółowy opis biologicznych funkcji peptydów odpornościowych (ang. host defense peptides, HDPs) i ich potencjalne znaczenie w różnych stanach chorobowych o podłożu zapalnym. Pani mgr Suhanya Prasad i współautorzy tego artykułu podkreślają, że HDPs mogą wykazywać przeciwstawne działania prozapalne i przeciwzapalne, zależnie od poziomu ich ekspresji w miejscu procesu zapalnego. Mechanizmy molekularne tych właściwości HDPs są wyjaśnione. Autorzy przedstawili również aktualne dane na temat klinicznego znaczenia zaburzeń regulacji ekspresji HDPs w stanach zapalnych i w wybranych chorobach, w tym w chorobach przyzębia, w chorobach płuc o podłożu zapalnym oraz w chorobach zapalnych jelit. Należy podkreślić, że ten artykuł poglądowy zawiera 23 strony, w tym 4 ryciny, a także bardzo szczegółową tabelę przedstawiającą przeciwdrobnoustrojowe i immunomodulacyjne właściwości HDPs, w tym katelicydyn,  $\alpha$ -defensyn,  $\beta$ -defensyn, histatyn i RNaz, oraz ich powiązanie z różnymi jednostkami chorobowymi. W podsumowaniu Doktorantka i współautorzy stwierdzają, że niektóre HDPs mogą mieć kliniczne zastosowanie jako potencjalne biomarkery wielu chorób o podłożu zapalnym. Ważne jest jednak, by zrozumieć różne funkcje HDPs zanim nowe strategie terapeutyczne z ich użyciem będą mogły być opracowane.

W oryginalnym artykule (Prasad SV i wsp. Targeting bacteria causing otitis media using nanosystems containing non-spherical gold nanoparticles and ceragenins. IF: 6,096; punktacja MEiN: 100) celem pracy była ocena przeciwbakteryjnej aktywności niesferycznych nanocząsteczek złota sprzężonych z cerageninami w fizjologicznym roztworze chlorku sodu buforowanego fosforanem (ang. phosphate-buffered saline, PBS) oraz w obecności ludzkiej woskowiny. Zastosowano następujące metody badawcze: ocena minimalnych stężeń hamujących i minimalnych stężeń bakteriobójczych badanych substancji, testy ilościowe z określeniem liczby kolonii bakteryjnych oraz wytwarzanie reaktywnych form tlenu u patogenów wywołujących zapalenie ucha środkowego (ang. otitis media, AOM) – *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* oraz *Streptococcus pneumoniae*. Biobójczą aktywność badanych nanosystemów zawierających cerageniny przeciw patogenom wywołującym AOM oceniono z użyciem technik fluorometrycznych i kolorymetrycznych.





Keratynocyty zostały zastosowane do określenia biokompatybilności utworzonych nanocząsteczek i ich zdolności do obniżenia uwalniania IL-8. Ten artykuł zawierający wyniki oryginalnego badania naukowego jest bardzo obszerny i zawiera 22 strony. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów są pokazane w 8 szczegółowo opracowanych rycinach oraz w 1 tabeli. W podsumowaniu Doktorantka i współautorzy tej publikacji stwierdzili, że niesferyczne nanocząsteczki złota sprzężone z cerageninami mogą być potencjalnie zastosowane jako nowe metody leczenia do eradykacji wytwarzających biofilm czynników etiologicznych AOM.

W rozdziale „Finansowanie badań i zgoda Komisji Bioetycznej” stwierdzono, że badania naukowe przeprowadzone przez Doktorantkę były sfinansowane przez fundusze uzyskane z Unii Europejskiej oraz z Ministerstwa Edukacji i Nauki (poprzednio: Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego). Projekt badania został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach.

W rozdziale „Wkład Autorki i współautorów w publikacje włączone do rozprawy” zawarte są oświadczenia Pani mgr Suhanya Prasad i wszystkich współautorów, w których wykazują oni swój udział w w/w artykułach stanowiących cykl publikacji oraz zgodę na włączenie tych artykułów do niniejszej rozprawy. Współautorzy oświadczyli też, że Doktorantka – Pani mgr Suhanya Prasad – odegrała wiodącą rolę w tych publikacjach poprzez zaplanowanie badań, przeprowadzenie eksperymentów naukowych, przygotowanie rycin, analizę danych, interpretację wyników oraz opracowanie manuskryptów.

Uważam, że rozprawa Pani mgr Suhanya Prasad reprezentuje bardzo wysoki poziom pracy naukowej i zawiera znaczące wyniki. Badania naukowe podjęte przez Doktorantkę przyczyniają się do lepszego zrozumienia mechanizmów działania cząsteczek przeciwdrobnoustrojowych i potencjalnego zastosowania klinicznego ich pochodnych lub syntetycznych analogów niepeptydowych. Zastosowanie funkcjonalizowanych nanocząsteczek złota stanowi duży postęp w zakresie potencjalnego terapeutycznego zastosowania w medycynie peptydów odpornościowych (HDPs).

Rozprawa doktorska Pani mgr Suhanya Prasad wykazuje Jej szeroką wiedzę w zakresie badanego tematu, właściwe zaplanowanie eksperymentów naukowych, umiejętności praktyczne i zdolność samodzielnego przeprowadzenia badań, a także analitycznego podejścia do wyników przeprowadzonych badań i ich interpretacji. Wiele wyników przedstawionych w niniejszej rozprawie jest nowatorskich i o wysokiej wartości poznawczej.

Jako recenzent mam tylko kilka drobnych uwag edytorskich, które nie mają żadnego wpływu na pozytywną ocenę niniejszej rozprawy. Zastosowanie skrótów nazwy Ministerstwa Edukacji i Nauki jest zmienne: MNiSW vs MEiN. W rozdziale „Lista skrótów” wyjaśnienie skrótu CPE jest niewłaściwe – *Enterobacteriaceae* wytwarzające karbapenemy (ang. carbapenem-producing *Enterobacteriaceae*), a powinno być: *Enterobacteriaceae* wytwarzające karbapenemazy (ang. carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*), podczas gdy skrót AOM jest powtórzony. W tekście rozprawy słowo „Gram” powinno być napisane



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

---

Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej

dużą literą, gdyż pochodzi od nazwiska duńskiego bakteriologa – Hansa Christiana Grama – który opracował tę metodę barwienia, stanowiącą obecnie podstawę klasyfikacji bakterii na Gram-dodatnie i Gram-ujemne.

Uważam, że jakość przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej oraz wyniki przeprowadzonych badań naukowych spełniają wymagania na stopień doktora nauk medycznych. Na tej podstawie wnioskuję do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Suhanya Prasad do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie wnioskuję o przyznanie Doktorantce wyróżnienia za wybór bardzo ważnego i ambitnego tematu pracy doktorskiej oraz uzyskanie nowatorskich wyników przeprowadzonych badań naukowych.

KIEROWNIK  
Zakładu Mikrobiologii Stomatologicznej  
  
prof. dr hab. n. med. Marta Wróblewska