Politechnika Łódzka

Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Dr hab. Adriana Nowak, prof. PŁ
Katedra Biotechnologii Środowiskowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
ul. Wólczańska 171/173
90-530 Łódź

Łódź, 16.03.2022 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Anny Minkiewicz-Zochniak
pt.: *„Wykorzystanie prądu o niskim natężeniu w eliminacji biofilmu bakteryjnego u pacjentów z mukowiscydozą"*
wykonanej w Zakładzie Biologii Medycznej
Wydziału Nauk o Zdrowiu Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego
w dyscyplinie nauki o zdrowiu
pod kierunkiem dr hab. n. o zdr. Gabrieli Olędzkiej

Oceny pracy dokonano w oparciu o uchwałę Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu nr 356/2019 Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 25.06.2019 r.

Uzasadnienie podjęcia tematu

Tworzenie biofilmów mikrobiologicznych zwłaszcza w implantologii i urządzeniach medycznych stanowi nie lada problem i wyzwanie dla współczesnej nauki. Według *US National Institute of Health* 80% wszystkich infekcji u ludzi ma podłoże biofilmowe, z których 65% to zakażenia szpitalne. W rzeczywistości przewlekłe infekcje biofilmowe mogą negatywnie wpływać na każdy narząd w ludzkim organizmie. Płytka nazębna może prowadzić do infekcji jamy ustnej, chorób przyzębia, zapalenia dziąseł i próchnicy. Stwierdzono również, że osoby z chorobami przyzębia są prawie dwukrotnie bardziej narażone na chorobę wieńcową. Płytka nazębna oraz biofilm na powierzchniach zębów i implantów mogą przyczyniać się do stanów zapalnych także układu oddechowego, zwłaszcza u osób z grup ryzyka, na przykład u pacjentów z mukowiscydozą, u których bakterie związane z zapaleniem płuc wykrywa się w płytce nazębnej. Bakterie najczęściej związane z zakażeniem dróg oddechowych i izolowane z plwociny pacjentów z mukowiscydozą obejmują powszechne patogeny ludzkie, przede

wszystkim *Staphylococcus aureus*. Szczególnie niebezpieczne są szczepy MRSA, czyli oporne na metycylinę, których wzrost występowania obserwuje się w ostatnich latach u pacjentów z mukowiscydozą, co może być potencjalnym czynnikiem ryzyka zgonu w mukowiscydozie. Poszukiwanie i wykorzystanie metod alternatywnych wobec antybiotykoterapii oraz zaplanowana profilaktyka i zapobieganie kolonizacji jamy ustnej szczepami patogennymi są jak najbardziej pożądane.

Podjęcie badań w tym zakresie uważam za wysoce uzasadnione. Celem pracy doktorskiej była weryfikacja oraz opracowanie wykorzystania metod fizycznych, w tym zastosowania prądu o niskim natężeniu – umożliwiające eliminację biofilmu bakteryjnego z materiałów implantologicznych oraz uzupełnień stomatologicznych u pacjentów z mukowiscydozą – jako metody profilaktycznej w zapobieganiu infekcji jamy ustnej.

Formalna ocena pracy

Praca stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie czterech oryginalnych artykułów naukowych zgodny z wymaganiami art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r., poz. 1789 ze zm.), który składa się z następujących publikacji:

1. Jarzynka S, Olędzka G, Minkiewicz A, Iwańczyk B, Chudek J, Gulatowska P, Skorupa W, Nowak J, Augustynowicz-Kopeć E. Oral health status in adults with cystic fibrosis - dental and microbiological assessment; Journal of Health Study and Medicine. 2020; 1: 155-166. MEiN: 20
2. Minkiewicz-Zochniak A, Jarzynka S, Iwańska A, Strom K, Iwańczyk B, Bartel M, Mazur M, Pietruczuk-Padzik A, Konieczna M, Augustynowicz-Kopeć E, Olędzka G. Biofilm formation on dental implant biomaterials by *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with cystic fibrosis. Materials. 2021; 14(8):2030. MEiN: 140; IF: 3,623.
3. Jarzynka S, Strom K, Barbarska O, Pawlikowska E, Minkiewicz-Zochniak A, Rosiak E, Oledzka G, Wesolowska A. Combination of high-pressure processing and freeze-drying as the most effective techniques in maintaining biological values and microbiological safety of donor milk. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2021; 18(4):2147. MEiN: 140; IF: 3,39.
4. Minkiewicz-Zochniak A, Strom K, Jarzynka S, Iwańczyk B, Koryszewska-Bagińska A, Olędzka G. Effect of low amperage electric current on *Staphylococcus aureus* strategy

for combating bacterial biofilms formation on dental implants in cystic fibrosis patients, *in vitro* study. Materials. 2021; 14(20):6117. MEiN: 140; IF: 3,623.

Publikacje powstały w latach 2020-2021, a ich łączny *Impact Factor* wynosi 10,636 i odpowiada 440 punktom Ministerstwa Edukacji i Nauki. Doktorantka jest pierwszym autorem dwóch publikacji, w pozostałych dwóch jest autorem trzecim i piątym, natomiast nie jest autorem korespondencyjnym w żadnej z nich. Udział Doktorantki w powstaniu spójnego tematycznie zbioru czterech publikacji wynosi od 5 do 55%, w zależności od pracy (wynosi on odpowiednio 12, 36, 5 oraz 55%), a więc tylko w jednej publikacji jest autorem wiodącym. Potwierdzeniem roli Doktorantki są oświadczenia Współautorów, które określają jej wkład w tworzenie koncepcji pracy, opracowanie metodologii badań, wykonywanie eksperymentów, prowadzenie procesu badawczego, analizę i tworzenie danych oraz przygotowanie publikacji.

Przedstawiony do recenzji cykl publikacji uzupełniono o ponad 30-stronicowe opracowanie zatytułowane „*Wykorzystanie prądu o niskim natężeniu w eliminacji biofilmu bakteryjnego u pacjentów z mukowiscydozą*". Doktorantka w opracowaniu przedstawiła wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zaprezentowane do oceny, zarysowała uzasadnienie podjęcia tematu i metodologię, omówiła osiągnięcia badawcze, przedstawiła wnioski oraz bibliografię. Tytuł, geneza i cel pracy zostały sformułowane poprawnie. Ponadto do opracowania dołączono kopie publikacji zaprezentowanych do oceny. Opracowanie oraz jego strona graficzna zostały przedstawione starannie.

Ocena merytoryczna pracy

W publikacji nr 1 pt.: „Oral health status in adults with cystic fibrosis - dental and microbiological assessment" opublikowanej w *Journal of Health Study and Medicine* 2020; 1:155-166 dokonano oceny stanu jamy ustnej 10 dorosłych pacjentów z mukowiscydozą, wykonano badania mikrobiologiczne dotyczące występowania bakterii próchnicotwórczych w jamie ustnej, a także wyizolowano w sumie 33 szczepy *S. aureus* z prób śliny chorych jako potencjalnego patogenu dróg oddechowych i przeznaczono do dalszych badań.

W publikacji nr 2 pt.: "Biofilm formation on dental implant biomaterials by *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with cystic fibrosis" opublikowanej w *Materials* 2021; 14(8):2030 (*IF 3,623*) zbadano zdolność 33 wyizolowanych szczepów klinicznych *S. aureus* do tworzenia biofilmów *in vitro* metodą kolorymetryczną. Następnie szczepy sklasyfikowano jako nietworzące biofilmu lub tworzące biofilm (mały, średni, duży), spośród których do dalszych badań wybrano szczep o największej zdolności tworzenia

biofilmu. Następnie zbadano jego zdolność do tworzenia biofilmu na trzech powierzchniach biomateriałów stosowanych w leczeniu implantoprotetycznym: stopie tytanu Ti-6Al-4V, stopie kobaltowo-chromowym oraz tlenku cyrkonu. Powstały na powierzchni krążków biofilm oceniono przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Dodatkowo powierzchnie dysków badano pod kątem żywotności bakterii i formowania biofilmu za pomocą metody fluorescencyjnej LIVE/DEAD BacLight™. Do oceny powierzchni czystych krążków wykorzystano mikroskop sił atomowych (AFM). Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka stwierdziła, że zalecanym do użycia przez pacjentów z mukowiscydozą biomateriałem do leczenia implantoprotetycznego powinien być tlenek cyrkonu, a w dalszej kolejności stop tytanu, gdyż na ich powierzchniach obserwuje się mniejszą zdolność formowania biofilmu przez wybrany szczep *S. aureus*, w porównaniu ze stopem kobaltowo-chromowym.

W kolejnej publikacji nr 3 pt.: „Combination of high-pressure processing and freeze-drying as the most effective techniques in maintaining biological values and microbiological safety of donor milk" opublikowanej w *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2021; 18(4):2147 (*IF 3,39*) zbadano wpływ ciśnieniowania, z wykorzystaniem metody HHP (wysokich ciśnień hydrostatycznych) na biofilm na powierzchni implantów wykonanych z materiałów implantologicznych: stali chropowatej i gładkiej. Metoda ta okazała się skuteczna do eliminacji biofilmu *S. aureus*.

W publikacji nr 4 pt.: „Effect of low amperage electric current on *Staphylococcus aureus* strategy for combating bacterial biofilms formation on dental implants in cystic fibrosis patients, *in vitro* study" opublikowanej w *Materials* 2021; 14(20):6117 (*IF 3,623*) dokonano oceny wpływu prądu o niskim natężeniu na tworzenie biofilmu przez *S. aureus* izolowanych od pacjentów z mukowiscydozą na materiałach implantologicznych: stopie tytanu (Ti-6Al-4V) i tlenku cyrkonu. W tym celu wykorzystano metody posiewów płytkowych oraz wizualizację w mikroskopie fluorescencyjnym (LIVE/DEAD BacLight™). Doktorantka udowodniła, iż prąd o nikim natężeniu (1 mA oraz 10 mA) hamuje formowanie biofilmu przez *S. aureus* oraz powoduje redukcję liczby komórek bakteryjnych już powstałego biofilmu na wybranych biomateriałach stomatologicznych.

Przedstawioną do oceny pracę przeczytałam z dużym zainteresowaniem, a otrzymane rezultaty są bardzo istotne z uwagi na ludzkie zdrowie i życie. Uzyskane wyniki mają charakter wysoce aplikacyjny i stanowią punkt wyjścia do opracowania aparatu wykorzystującego prąd o nikim natężeniu do wdrożenia nawet w warunkach domowych w celu zapobiegania formowania oraz eliminacji biofilmu stosowanego przez pacjentów z grup ryzyka, zwłaszcza

pacjentów z mukowiscydozą, przy czym jest to metoda łatwa, nieinwazyjna i tańsza od innych. Uzyskane rezultaty mogą być pomocne w opracowywaniu nowych metod walki z bakteriami tworzącymi biofilm w płucach osób chorych na mukowiscydozę.

Uwagi

1. Pytanie do publikacji nr 3: na czym polegał udział Doktorantki w „*prowadzeniu procesu badawczego, wykonywaniu eksperymentów oraz zbieraniu danych z doświadczeń*" (cyt. za str. 6) i dlaczego wynosił on tylko 5%? Co zadecydowało o tym, że publikacja ta została ujęta do rozprawy doktorskiej?
2. Pytanie do publikacji nr 1: badania wykonano dla 10 pacjentów (7 kobiet i 3 mężczyzn) – czy płeć ma jakikolwiek wpływ na otrzymane wyniki?
3. Czy Doktorantka/Autorzy publikacji nie brali pod uwagę wykorzystania szczepów kolekcyjnych *S. aureus* (izolowanych z innych środowisk niż jama ustna i nie od pacjentów z mukowiscydozą) do badań porównawczych?
4. Dlaczego w publikacjach Doktorantka zastosowała w ocenie statystycznej wyników tylko jeden poziom istotności?
5. Pytanie do publikacji nr 2: proszę o dokładne wyjaśnienie na jakiej podstawie sklasyfikowano/oceniono izolaty *S. aureus* (str. 26 i 61 opracowania) jako nietworzące biofilmu lub tworzące biofilm (mały, średni, duży)?
6. Pytanie do publikacji nr 4: dla ilu izolatów klinicznych *S. aureus* przeprowadzono badania, ponieważ nie jest to doprecyzowane? Czy otrzymane wyniki są cechą specyficzną tzn. szczepową? A może gatunkową lub rodzajową? Jakie jest prawdopodobieństwo uzyskania podobnych wyników dla wszystkich szczepów *S. aureus*? Innymi słowy, czy wykorzystanie prądu o niskim natężeniu w eliminacji biofilmu *S. aureus* można zastosować do całego gatunku z podobnym skutkiem? Czy metodę tę można wykorzystać wobec innych patogenów?
7. W opracowaniu Doktorantki, w spisie opublikowanych i powiązanych tematycznie czterech oryginalnych artykułów naukowych przestawionych do oceny, Doktorantka w określaniu punktów ministerialnych używa skrótu MNiSW tj. Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, podczas, gdy powinno być Ministerstwo Edukacji i Nauki (MEiN).
8. W opracowaniu Doktorantka na początku (str. 8) zamieściła „Wykaz stosowanych skrótów", jednakże w tekście są one wprowadzane i definiowane jeszcze raz, co uważam za zbędne.

9. W opracowaniu obecne są nieliczne usterki techniczne typu brak spacji, podwójny nawias, drobne literówki.
10. Na stronie 16 opracowania Doktorantka wymienia rodzaje bakterii wchodzących w skład mikrobioty górnych dróg oddechowych zaczynając od „*Abiotrophia*... " i błędnie nazywa je gatunkami.
11. Czy proponowana metoda tj. wykorzystanie prądu o niskim natężeniu w eliminacji biofilmów, czyli tzw. płytki nazębnej mogłaby być stosowana profilaktycznie w gabinetach stomatologicznych z przeznaczeniem dla ogółu populacji? Jakie są ograniczenia?
12. Czy prąd o niskim natężeniu jest bezpieczny dla pacjenta, zwłaszcza do użytku domowego? Z czym można porównać działanie takiego urządzenia?
13. Z uwagi na wysoką aplikacyjność badań, jak Doktorantka wyobraża sobie wdrożenie (know-how) pomysłu? Kto może być zainteresowany otrzymanymi wynikami?

Wnioski końcowe

Pani mgr Anna Minkiewicz-Zochniak zapoznała się z literaturą przedmiotu badań, poprawnie sformułowała cel badawczy, eksperymenty zostały zaplanowane i przeprowadzone logicznie, a także wyciągnęła prawidłowe wnioski. Praca doktorska dotyczy aktualnej tematyki, wnosi wiele elementów nowości i ma charakter nie tylko poznawczy, ale również wysoce aplikacyjny. Według wiedzy Recenzenta tematyka badań podjęta przez Doktorantkę/współautorów publikacji wobec pacjentów z mukowiscydozą jest unikatowa w skali krajowej, jak i światowej.

W mojej opinii przedstawiony do recenzji zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie czterech oryginalnych artykułów naukowych spełnia wymagania merytoryczne i formalne stawiane pracom doktorskim zgodnie z art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz.U. z 2017 r., poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669). Wnoszę zatem o przyjęcie i podjęcie dalszych czynności w przewodzie doktorskim Pani mgr Anny Minkiewicz-Zochniak.

Adriana Nowak

dr hab. Adriana Nowak, prof. PŁ