



MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA
Kamenice 5, 625 00 Brno
IČO: 00216224
DIČ: CZ00216224

OPONENTSKÝ POSUDEK NA DIZERTAČNÍ PRÁCI

Ing. Katarzyny Szuszkiewicz (2016): *The Study of Effect on Controlled Release of Iodine on Bacterial Biofilm Eradication in Wounds*. Dizertační práce FCHT, Univerzita Pardubice, 131 pp.

Předložená dizertační práce je součástí mezioborového výzkumu zaměřeného na problematiku krytí ran s uvolňováním léčebných substancí, v tomto případě jódu a využití těchto krytí k léčbě polymikrobiálních biofilmových infekcí ran.

FORMÁLNÍ HODNOCENÍ PRÁCE

Dizertační práce, kterou jsem měla k dispozici jen v elektronické formě, má standardní členění vědecké práce, která je doplněna řadou grafických a obrazových příloh a tabulek. Problematika, kterou se autorka zabývá, je zpracována v úvodu práce a vychází ze souboru cca 70 položek použité literatury.

Cíl práce byl definován jako nalezení krytí účinného v eradikaci biofilmu. Problematika předložené práce je velmi široká a je proto poněkud obtížné se práci orientovat. V práci se totiž trochu nepřehledně střídají části týkající se charakteru potenciálně využitelných jodových sloučenin a dalších látek a kinetiky uvolňování jódu s částmi mikrobiologicky zaměřenými, tedy věnujícími se inhibičním vlastnostem jednotlivých látek či eradikaci biofilmu. V kapitole „Materiál a metody“ jsou některé postupy popsány vágně a u některých postupů či metod popis zcela chybí (nejsou zde např. zmíněny použité statistické metody a statistické zpracování výsledků) a vyskytují se zde i formální chyby (např. nesjednocené názvy producentů chemikálií apod.).

Kapitola „Výsledky a diskuze“, ač na první pohled působí dobře, tak při podrobnějším studiu odhaluje u práce i některé nedostatky. Autorka například neprezentuje získaná data a výsledky v takové formě, aby je bylo možné zhodnotit a ověřit tak správnost některých jejích tvrzení či učiněných závěrů. Její závěry a tvrzení se v této kapitole často opírají jen o vágně popsané výsledky (na str. 67 např. zmiňuje „z fotografie je patrné, že vyšší koncentrace vykazuje vyšší eradikační vlastnosti“ – chybí však uvedení skutečných výsledků a jejich statistické zhodnocení) apod. Výsledky jsou zpracovány a prezentovány řadou grafů, které sice uvedenou logaritmickou škálou zjednodušují orientaci v grafu samotném, ale snižují jeho výpovědní hodnotu tím, že chybí konkrétní získané hodnoty včetně charakteristik rozptylu. Tomu by pomohla např. tabulka s uvedenými absolutními hodnotami CFU jednotlivých mikrobů a charakteristik opakování měření (průměrná hodnota, rozptyl apod.).



Některé zde uvedené informace pak svědčí i o metodicky ne zcela správném postupu, kdy mělo být nepřesné či nevyhovující měření opakováno za standardizovaných podmínek a výsledky původních, špatných pokusů, vůbec neměly být brány v potaz (např. „při prvních pěti kultivacích *S. aureus* vykazoval snížený růst způsobený pasážováním kmenů“ - kultivace *S. aureus* měly být zopakovány a tyto původní se slabým nárůstem *S. aureus* vůbec neměly být brány v potaz, protože nižší a ještě k tomu růstově oslabené inokulum může značně zkreslit výsledky pokusů).

Získané výsledky jsou v této kapitole rovněž diskutovány a hodnoceny, diskuzi bych však vytkla malý rozsah a nedostatečné srovnání autorčiných výsledků s již publikovanými skutečnostmi a s jejich pomocí vysvětlit zjištěná fakta (např. odlišná citlivost různých mikrobů vůči testovaným substancím aj.). Kritické srovnání vlastních výsledků s výsledky jiných autorů je přitom základem správně uchopené diskuze.

Práce je díky šíři diskutovaného tématu poněkud nepřehledná a tím i méně čtivá, oceňuji však pečlivost, která byla vynaložena při přípravě textu, ten totiž obsahuje jen minimum formálních chyb či překlepů.

HODNOCENÍ VLASTNÍ PRÁCE

Cíl, který si autorka stanovila, se týká vysoce aktuální problematiky léčby polymikrobiálních infekcí a i pro zkušeného mikrobiologa by bylo jeho řádné zpracování velkou výzvou. Záměrem práce bylo nalezení krytí ran účinného v eradikaci polymikrobiálního biofilmu.

Ty metody a postupy, které jsou v práci popsány, jsou většinou vhodně zvoleny a odpovídají vytčenému cíli. Bohužel však chybí popis některých metod či postupů, které by mohly ovlivnit výsledek práce (např. zajištění stability zvoleného modelu a poměru mikrobů v něm), nebo jsou podstatné pro správné zhodnocení výsledků (např. statistické zpracování dat). Jako zcela zásadní problém, který mi brání práci odpovědně zhodnotit, však vnímám chybějící výsledky (konkrétně uvedené výsledky včetně charakteristiky rozptylu), na základě kterých bych mohla posoudit, zda autorka učinila správné závěry a zda je celá práce provedena metodicky správně.

Práce přináší řadu slibných poznatků, jako nedostatečné však hodnotím to, že výsledky autorka nepublikovala v žádném prvoautorském článku (v jediném zmíněném odborném článku byla publikována část metodiky - Kučera et al., 2014). Užitečný vzor sám o sobě není peer review recenzovaný výstup a jako takový jej nelze považovat za výsledek s dostatečnou výpovědní hodnotou o kvalitě práce.

Mezi nejzávažnější nedostatky práce patří:

- Chybějící výsledky. V části „Výsledky a diskuze“ chybí důležité informace o výsledcích, chybí např. charakteristiky rozptylu jednotlivých testování, jde mi zejména o uvádění průměrných hodnot a jejich směrodatné odchylky, autorka hovoří pouze o logaritmickém úbytku jednotlivých mikrobů po jejich vystavení účinkům testovaných krytí. Autorka



MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA
Kamenice 5, 625 00 Brno
IČO: 00216224
DIČ: CZ00216224

neuvádí počet opakování měření v rámci jednotlivých testování, což je z metodického hlediska nedostačující. Mnohodruhový biofilm je totiž velice fragilní společenstvo, které může být velice snadno ovlivněno i velice malými odchylkami testovacích podmínek (a to i včetně změny šarže kultivačního média aj.), a proto je pro získání validních výsledků nezbytné provést větší množství opakování a dobře je statisticky zhodnotit, aby byl vliv těchto odchylek na konečný výsledek minimalizován.

- Zcela chybí výsledky statistického zpracování výsledků práce. V práci sice autorka uvádí, že došlo ke statisticky signifikantnímu poklesu množství mikrobů, neuvádí však hodnoty testových statistik, což je pro posouzení statistické signifikance výsledku nezbytné. V kapitole „Materiál a metody“ se rovněž nenachází ani zmínka o zvolených statistických metodách. I nevhodně zvolená statistická metoda může znehodnotit jinak kvalitní výsledky výzkumu.
- Polymikrobiální biofilm je v některých ohledech velmi křehké společenstvo, jehož rovnovážný stav se může velmi snadno vychýlit ve prospěch některého konkrétního mikroba již jen malou odchylkou ve složení kultivačního média či kultivačních podmínek. Kolik provedla autorka opakování jednotlivých měření a jak zajistila opakovatelnost jednotlivých experimentů? Z fotografie biofilmu na str. 54 je na první pohled patrné, že se jedná o biofilm s výraznou převahou *Pseudomonas aeruginosa* a ne biofilm s druhovým složením 1:1:1:1:1.
- V práci chybí rovněž zmínka o zhodnocení baktericidního účinku testovaných substancí, tedy vyšetření baktericidních vlastností vůči planktonické formě sledovaných bakterií. Porovnání baktericidního účinku na bakteriální buňky s eradikačním účinkem na biofilm je přitom významnou součástí hodnocení využitelnosti těchto látek pro klinickomikrobiologickou praxi.

Přes tyto uvedené nedostatky lze konstatovat, že se autorce podařilo cílů práce dosáhnout a při předložení v práci chybějících dat a analýz lze práci doporučit k obhajobě. V rámci obhajoby dizertační práce však prosím autorku, aby předložila a doplnila chybějící informace a tím obhájila kvalitu předložené práce.

DOTAZY A NÁMĚTY PRO DISKUZII V RÁMCI OBHAJOBY DIZERTAČNÍ PRÁCE

- 1) Předložte v předložené práci chybějící výsledky, tedy skutečně naměřené výchozí a koncové hodnoty CFU jednotlivých mikrobů v rámci všech eradikačních pokusů, a to včetně jejich průměrné hodnoty, rozptylu získaných hodnot a počtu opakování jednotlivých měření. To platí i pro dílčí eradikační pokusy a testy prováděné v rámci jednotlivých fází zpracovávání předložené dizertační práce.
- 2) Předložte statistické analýzy jednotlivých výsledků, včetně zdůvodnění zvolených statistických metod. Ke statistickým analýzám doložte hodnoty testových statistik dle konkrétních použitých statistických metod.



MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA
Kamenice 5, 625 00 Brno
IČO: 00216224
DIČ: CZ00216224

3) Předložte metodiku testování polymikrobiálního biofilmu k zajištění stability polymikrobiálního biofilmu a reproducibility výsledků. Popište zejména, jakým způsobem bylo zajištěno, aby mikrobiální společenstvo v rámci biofilmu bylo ve Vámi udávaném poměru 1:1:1:1:1, pokud Vámi zvolené bakteriální druhy jsou známé odlišnou růstovou rychlostí. Předložte výsledky vyšetření schopnosti tvořit biofilm pro jednotlivé Vámi využitě kmeny mikrobů. Byla schopnost tvorby biofilmu u všech ve směsi použitých mikrobů exprimována stejně silně? Kolik opakování měla prováděná měření, jaké jsou charakteristiky opakovaných měření (průměrná hodnota, rozptyl apod.)?

Další dotazy k provedení práce z mikrobiologického hlediska:

- Proč autorka při kontrole sterility jednotlivých krytí kultivovala aerobní kontrolu pouze při 25° C a ne při 37° C? Jaké zvolený postup odpovídá Normě pro kontrolu sterility zdravotnických prostředků?
- Proč autorka kultivovala v části mikrobiologických pokusů kmeny při 35° C a v další části při 37° C?

ZÁVĚR

Domnívám se, že studentka prokázala své tvůrčí schopnosti a předkládá práci, která podle § 47 VŠ zákona 111/98 Sb. splňuje požadavky kladené v daném oboru na dizertační práci a práci doporučuji k obhajobě. Na základě úspěšné obhajoby, doplnění chybějících informací a zodpovězení dotazů, pak doporučuji udělení akademického titulu Ph.D.

V Brně, 15.6. 2016


Ing. Veronika Holá, Ph.D.

External examiner's assessment of doctoral dissertation "The Study of Effect on Controlled Release of Iodine on Bacterial Biofilm Eradication in Wounds" by Katarzyna Maria Szuszkiewicz

Presented dissertation works on the practical problem - developing of wound dressing using iodine generator. For this purpose author made a lot of experiments - she had to develop/use method for iodine formation, analytical methods for the determination of the kinetics of iodine release from the wound dressings and develop wound dressings with Iodine Generator. Together all these tasks are complex and go together to the main aim - wound dressing. So in this case the whole work is practical. Of course doctoral dissertation is also about science - and this aim was fulfilled by scientific work when one paper was presented at journal with Impact factor (Journal of Microbiological Methods; IF=1.857) and two other papers mentioned at Web of Science.

Dissertation itself consists of 131 pages when 5 pages are devoted to references (cca 75 items).

Background (23 pages) described a short introduction to the biofilms and wounds. It is my opinion that about this topic can be written some more extensive text based on higher number of scientific references, at the presented form it is a really short one.

Materials and method:

Any instrument and/or device could be assigned not only to the name of producer but also town and country where it originated.

Results:

At all graphs information about number of experiments are missing (as well as at many cases at the first half of the results information about error/deviation are missing). I suppose that these graphs are not based on one measurement only. These data should be important for reader to know how significant results and their differences are. Did author made some analysis of this significance (Student test etc)? Can these results be presented?

I know that this work has another configuration than purely "scientific" paper but till I lack more serious discussion with other preparations/papers. Can author present it at the oral presentation?

Literature:

Unfortunately references are not presented at the same style - sometimes are mentioned Volume XX, sometimes only XX, sometimes are missing also pages (e.g. Bjarnsholt 2007). Surprisingly volume and pages are missing also the author's paper.

All these comments are only minor cases that have no influence on the scientific level of the presented dissertation. I mainly highly appreciate the practical application of the presented results. Finally it is my pleasure to recommend the dissertation as the basis for procedure leading to obtain scientific degree PhD.

Praha, June 14, 2016



Prof. Ing. Ivan Mikšík, DrSc.

Institute of Physiology, Academy of Sciences
of the Czech Republic
Víteňská 1083
14220 Prague 4
Czech Republic