

Prof. dr hab. Anna Malm
Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
20-093 Lublin, ul. dr W. Chodźki 1
tel., fax 81 448-71-00

Lublin, dn. 14.08.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Pauliny Glajzner pt. „Adaptacja bakteryjnych patogenów zwierzęcych do nowego gospodarza – człowieka. Badania na modelu ziarenkowców gramdodatnich” wykonanej pod kierunkiem Promotora Pani prof. dr hab. n. farm. Eligii Szewczyk oraz Promotora pomocniczego – Pani dr n. farm. Magdaleny Szemraj w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Szereg drobnoustrojów, dla których pierwotnym gospodarzem jest organizm zwierzęcia, może przełamywać na różnych etapach bariery międzygatunkowe, prowadząc do wywołania chorób infekcyjnych u ludzi. Przenoszeniu patogenów zwierzęcych na nowego gospodarza sprzyja szereg czynników zewnętrznych, w tym czynniki demograficzne, środowiskowe, społeczno-ekonomiczne i kulturowe. Adaptacja patogenu zwierzęcego do organizmu człowieka związana jest ze zmianami w obrębie komórek drobnoustroju na poziomie fenotypowym i genotypowym, szczególnie w zakresie jego właściwości adhezyjnych i potencjału chorobotwórczego. W konsekwencji tych zmian adaptacyjnych, patogen zwierzęcy może stać się nowym czynnikiem etiologicznym wywołującym choroby infekcyjne u ludzi z możliwością całkowitego przystosowania się wyłącznie do nowego gospodarza.

Rozprawa doktorska Pani mgr farm. Pauliny Glajzner wpisuje się w ten aktualny nurt badawczy dotyczący oceny stopnia zagrożenia dla człowieka ze strony pojawiających się nowych patogenów odzwierzęcych wraz z poznaniem mechanizmów adaptacyjnych, umożliwiających im przełamanie barier międzygatunkowych. Chciałabym podkreślić, że część wyników badań włączonych do niniejszej rozprawy została opublikowana w trzech pracach, w tym jednej pracy przeglądowej oraz dwóch oryginalnych, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Wymienione prace ukazały się w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports (JCR): Journal of Medical Microbiology, Current Microbiology, Folia Microbiologica.

Celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było poszukiwanie możliwości oceny stopnia zagrożenia dla człowieka ze strony nowych patogenów zwierzęcych na modelu wybranych gatunków należących do dwóch rodzajów szeroko rozpowszechnionych bakterii Gram-dodatnich – *Streptococcus* (*S. dysgalactiae*, *S. gallolyticus*, *S. uberis*, *S. parauberis*) i *Staphylococcus* (*S. pseudintermedius*), pierwotnie izolowanych od zwierząt, znajdujących się na różnych etapach przełamania bariery międzygatunkowej. W toku wielokierunkowych badań zaplanowano ocenę zdolności adaptacji tych drobnoustrojów do organizmu nowego gospodarza – człowieka wraz z wytypowaniem markerów adaptacyjnych, odpowiedzialnych za kolonizację i inwazyjność patogenu, oraz określeniem potencjalnych opcji terapeutycznych w przypadku zakażenia

człowieka. Założono, że na podstawie uzyskanych wyników tych wielokierunkowych badań możliwe będzie wyselekcjonowanie cechy o kluczowym znaczeniu, jako markera, pozwalającego na ocenę zagrożenia dla ludzi szczepu zwierzęcego należącego do badanych gatunków.

Recenzowana praca doktorska składa się z rozdziałów typowych dla prac eksperymentalnych: „Wstęp”, „Założenia i cel pracy”, „Materiały”, „Metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Podsumowanie wyników”, „Wnioski z przeprowadzonych badań”, „Streszczenie”, „Summary” i „Piśmiennictwo”. W pracy wyodrębniono również „Wykaz skrótów”, „Spis tabel”, „Spis rycin” i „Aneks”. Dodatkowo, załączono informacje o dorobku naukowym Doktorantki, jak również oświadczenia współautorów publikacji, zawierających wyniki badań stanowiące część niniejszej rozprawy. Ogółem praca doktorska liczy 191 stron. Zawiera 24 tabele oraz 20 rycin. Ponadto, w „Aneksie” zamieszczono 54 tabele.

Obszerny „Wstęp” stanowi bardzo dobre wprowadzenie w tematykę recenzowanej rozprawy doktorskiej. Pani mgr farm. Paulina Glajzner przedstawiła w tym rozdziale zagadnienia związane z patogenami zwierzęcymi – wywoływanie chorób odzwierzęcych u ludzi (zoonoz) oraz pojawianie się nowych patogenów człowieka, pierwotnie występujących tylko u zwierząt. Ponadto, opisała przyczyny i przeszkody w przełamaniu barier międzygatunkowych i adaptacji drobnoustrojów pochodzenia zwierzęcego do nowego gospodarza - człowieka. Scharakteryzowała również gatunki bakterii z rodzaju *Streptococcus* i *Staphylococcus*, stanowiące przedmiot badań w ramach niniejszej rozprawy, w aspekcie ich potencjału zoonotycznego oraz patogenezы zakażeń i czynników chorobotwórczości związanych z procesami adhezji/kolonizacji, hamowaniem odpowiedzi immunologicznej, inwazyjnością i toksycnością. Doktorantka przedstawiła też problem występowania zjawiska lekooporności w obrębie badanych gatunków bakterii wraz z omówieniem możliwych opcji terapeutycznych w przypadku wystąpienia zakażenia szczepami opornymi/wieloopornymi u ludzi. Wstęp świadczy o ugruntowanej i szerokiej wiedzy Doktorantki w tematyce związanej z rozprawą doktorską.

W rozdziale „Materiały” Doktorantka opisała w dwóch podrozdziałach szczepy należące do badanych gatunków z rodzaju *Streptococcus* oraz *Staphylococcus* izolowane z materiałów pobranych od zwierząt i ludzi wraz z ich pochodzeniem oraz szczepy referencyjne z obydwu rodzajów pozyskane z różnych kolekcji drobnoustrojów (ATCC, NCTC, DSM, PCM) oraz szczepy wzorcowe i wskaźnikowe z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Czy wykorzystanie szczepów pochodzących z materiałów klinicznych pobranych od ludzi uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej?

Ponadto, w obydwu wspomnianych podrozdziałach Doktorantka opisała warunki przechowywania szczepów, podłoża mikrobiologiczne, odczynniki do badań fenotypowych i genetycznych oraz krążki antybiogramowe, jak również aparaturę i programy komputerowe wykorzystywane w badaniach. Synteza oligonukleotydów oraz sekwencjonowanie DNA zostało wykonane w ramach usług zleconych w Genomed S.A. Zaprononowany sposób prezentacji materiałów stosowanych w badaniach sprawił, że niektóre informacje zostały zdublowane.

Szczegółowy opis metodyki badań w rozdziale „Metody” również został przedstawiony w dwóch podrozdziałach, oddzielnie dla eksperymentów przeprowadzonych na modelu gatunków z rodzaju *Streptococcus* i *Staphylococcus*. Uzasadnieniem takiego sposobu prezentacji może być różniący się zakres

prowadzonych badań, odrębności toku identyfikacyjnego oraz niektórych badań fenotypowych, jak również badań genetycznych w obrębie obydwu rodzajów bakterii. Ponadto, w celu uniknięcia dublowania się informacji wprowadzono odnośniki do wcześniej opisanych metod.

Rozdziały „Materiały” i „Metody”, mimo moich uwag o charakterze technicznym, świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki w zakresie stosowanego w eksperymentach warsztatu badawczego zarówno w ocenie cech fenotypowych badanych szczepów (np. zdolność do wytwarzania proteaz i lipaz, rozkładu cukrów, tworzenia biofilmu oraz wyrastania w surowicy ludzkiej i bydlęcej, badanie aktywności streptokinazy, wykrywanie koagulazy oraz czynnika skupiania, oznaczanie lekowrażliwości), jak również badań genetycznych (wykrywanie genów, badanie ekspresji wybranych genów, MLST).

Zakres badań przeprowadzonych przez Doktorantkę jest bardzo szeroki i zgodny z celem pracy. Wyniki badań uzyskane w toku pracy zostały szczegółowo omówione w dwóch podrozdziałach oddzielnie dla obydwu modeli badawczych. Doktorantka wykonała ogromną pracę, opracowując wielokierunkową i wieloaspektową analizę przedstawionych wyników. Wyniki badań zostały zilustrowane w postaci 13 tabel i 18 rycin, a szczegółowe wyniki wszystkich przeprowadzonych badań zostały zamieszczone w postaci 54 tabel w „Aneksie”.

Doktorantka podkreśliła, że kluczowe znaczenie w badaniach realizowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej miała prawidłowa identyfikacja szczepów drobnoustrojów. Wstępna identyfikacja fenotypowa szczepów z rodzaju *Streptococcus* była potwierdzona lub pogłębiona z zastosowaniem metod genetycznych. Włączone do badań szczepy *Staphylococcus pseudintermedius*, pochodzące z kolekcji Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, zostały wcześniej zidentyfikowane genetycznie. Doktorantka wykazała dużą zmienność wśród badanych szczepów w zakresie cech fenotypowych warunkujących ich chorobotwórczość oraz profili lekowrażliwości. Wśród licznych wyników uzyskanych przez Doktorantkę na szczególną uwagę zasługują wyizolowanie i charakterystyka szczepów paciorkowców pochodzących od zwierząt o profilu badanych cech fenotypowych zbliżonym do szczepów ludzkich oraz szczepów paciorkowców pochodzących od ludzi o profilu badanych cech fenotypowych zbliżonym do szczepów zwierzęcych. Te dwie grupy szczepów, zdaniem Doktorantki, stanowią bardzo cenny materiał do dalszych badań w zakresie adaptacji tych patogenów do organizmu człowieka w oparciu o sekwencjonowanie całych genomów oraz typowanie/genotypowanie białka M. Ponadto, uzyskane wyniki stanowią ważną przesłankę do dalszych badań nad chorobotwórczością *S. gallolyticus*. Wyniki dotyczące lekooporności szczepów z rodzaju *Streptococcus* czy wielooporności szczepów z rodzaju *Staphylococcus* są istotną wskazówką o znaczeniu klinicznym w zakresie panelu antybiotyków możliwych do stosowania w zakażeniach wywołanych przez te szczepy.

W „Dyskusji” Doktorantka skoncentrowała się na wnikliwej analizie pięciu zagadnień, wynikających z przeprowadzonych badań, w zestawieniu z danymi literaturowymi: (i) identyfikacja badanych szczepów *S. dysgalactiae* i *S. uberis*, (ii) poszukiwanie cech istotnych dla patogenyzy zakażeń badanymi paciorkowcami, (iii) *S. gallolyticus* – nowy patogen ludzi, (iv) *S. pseudintermedius* – patogen zwierząt i człowieka, (v) zakażenia człowieka pochodzącymi od zwierząt szczepami paciorkowców i gronkowców – wyzwania terapeutyczne. Rozdział ten potwierdza ugruntowaną wiedzę Doktorantki w obszarze tej tematyki.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Doktorantka zaproponowała 8 wniosków. Podkreśliła konieczność opracowania sond genetycznych do prawidłowej identyfikacji gatunków bakterii z rodzaju *Streptococcus* i *Staphylococcus*. Wskazała na dużą zmienność fenotypową badanych szczepów, popierającą tezę o ich szerokim pangenie. Zwróciła uwagę na rozpowszechnienie u paciorkowców genów kodujących białka o charakterze adhezyjnym oraz hemolizyny. Wskazała również na istotne znaczenie u paciorkowców czynników przewyżających mechanizmy obronne gospodarza w możliwości przełamania barier międzygatunkowych. Zaznaczyła też, że w dalszej perspektywie należy rozważyć prowadzenie badań epidemiologicznych nad rozpowszechnieniem genów lekooporności u badanych gatunków bakterii. Zaproponowała dalsze, wspomniane wcześniej, kierunki badań.

Po przeczytaniu całości rozprawy doktorskiej, nasunęło mi się jednak pytanie, czy włączenie wyników uzyskanych dla szczepów *S. pseudintermedius*, niewątpliwie bardzo interesujących, było konieczne. W mojej opinii, badania na modelu różnych szczepów z rodzaju *Streptococcus* byłyby wystarczające dla zrealizowania celu recenzowanej pracy oraz zilustrowania pewnych zjawisk i tendencji zachodzących w procesie adaptacji patogenów zwierzęcych do nowego gospodarza, jak również problemów terapeutycznych związanych z zakażeniami wywołanymi przez te szczepy, zwłaszcza lekooporne.

Podsumowując, cel rozprawy doktorskiej pt. „Adaptacja bakteryjnych patogenów zwierzęcych do nowego gospodarza – człowieka. Badania na modelu ziarenkowców gramdodatnich” wykonanej przez Panią mgr farm. Paulinę Glajzner został zrealizowany. Recenzowana praca spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz.742). Stanowi oryginalne i bardzo cenne opracowanie dotyczące niepoznanych jeszcze dokładnie mechanizmów przełamania bariery międzygatunkowej przez drobnoustroje z rodzaju *Streptococcus* oraz *Staphylococcus* pochodzące od zwierząt. Praca ta jest również bardzo dobrym przykładem wielokierunkowego podejścia do rozwiązania złożonego problemu naukowego. Chciałabym podkreślić, że Doktorantka zaprezentowała się jako doświadczony badacz, posiadający ugruntowaną wiedzę oraz wysokie kwalifikacje w zakresie nowoczesnego warsztatu badawczego, potrafiący w sposób krytyczny analizować uzyskane wyniki, przygotowany do podejmowania nowych wyzwań i rozwiązywania nowych problemów.

W związku z powyższym zwracam się do Rady Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr farm. Pauliny Glajzner do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Zwracam się również do Wysokiej Rady o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej, co uzasadniam wysoką wartością naukową przeprowadzonych badań oraz opublikowaniem części badań w czasopiśmie z listy JCR.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej

prof. dr hab. n. farm. Anna Malm