

Kraków, 4 września 2023 r.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Pauliny Glajzner pt. „**Adaptacja bakteryjnych patogenów zwierzęcych do nowego gospodarza – człowieka. Badania na modelu ziarenkowców gramdodatnich**”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr farm. Pauliny Glajzner, przygotowana pod kierunkiem Promotora, Pani Prof. dr hab. farm. Eligii M. Szewczyk, profesora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi wpisuje się w tematykę ważnych naukowo i bardzo pożądaną badań mających na celu poznanie mechanizmów adaptacji zwierzęcych patogenów bakteryjnych do nowego gospodarza – człowieka, poznanie biologicznych markerów odpowiadających za przystosowanie do nowego gospodarza – za kolonizację i zakażenie, zjawisko zwane w epidemiologii przełamywaniem bariery międzygatunkowej w chorobach infekcyjnych, z dodatkowym ambitnym wątkiem zbadania możliwości terapeutycznych będących w dyspozycji lekarza w przypadkach rozwoju zakażenia człowieka tymi szczepami. Autorka dysertacji zainspirowała się zjawiskami transmisji i adaptacji wirusów w czasie pandemii ciężkiego ostrego zespołu płucnego SARS-2 / Covid-19, o czym informuje w „Wstępie”, co dowodzi zmysłu epidemiologicznego, nie tylko analitycznego, ale też syntetycznego konstruktywnego. Autorka zajęła się poszukiwaniem możliwości oceny stopnia zagrożenia ze strony nowych patogenów bakteryjnych człowieka polegających na określeniu cech mogących zakwalifikować je jako markery wirulencji, co niesłoby dodatkową wartość w postępie zaawansowanej diagnostyki i racjonalizacji procesu terapeutycznego.

Wszechobecność drobnoustrojów w biosferze, kolonizacja różnych nisz ekologicznych przez bakterie, są zjawiskami ekologicznymi dobrze poznanymi przez mikrobiologów. W ostatnich dwóch dekadach szczególną uwagę przywiązuje się do nowych infekcyjnych chorób człowieka pochodzących od zwierząt - antropozoonoz, aczkolwiek samo takie zjawisko, ogólnie opisywane było od dziesięcioleci, natomiast w ostatnich dekadach nabierało systematycznych cech. Przeniesienia patogenów od zwierząt na człowieka mają charakter powszechny; dzięki skutecznym barierom anatomicznym i fizjologicznym, włączając biocenozę fizjologiczną człowieka, nie skutkują zakażeniem, niemniej jednak w szczególnych sytuacjach dochodzi do poważnych zakażeń włącznie z zagrożeniem zdrowia publicznego. Przełamanie bariery międzygatunkowej następuje wtedy gdy u nowego gospodarza występują tzw. czynniki ułatwiające zakażenie a z drugiej strony, u drobnoustrojów z powodu organizacji genomu i zmienności genetycznej obecne są czynniki wirulencji, antygenowości, swoistość wobec żywiciela, cechy lekooporności i budowania biofilmu bakteryjnego.

Prof. dr hab. farm.

Jacek Międzobrodzki

Mikrobiolog,
Diagnosta laboratoryjny,
Specjalista zdrowia publicznego

Zakład Mikrobiologii

Wydział

Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

PL 30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 7

tel. +48(12) 664 63 71

tel. +48(12) 664 63 83

fax. +48(12) 664 69 02

jacek.miedzobrodzki@uj.edu.pl

Zjawiska przełamania bariery międzygatunkowej są z dużymi sukcesami poznawane w badaniach wirusowych odzwierciedlających choroby człowieka, natomiast w przypadkach bakteryjnego czynnika etiologicznego obserwuje się duże oczekiwania na postępy. W ostatnich latach badano mechanizm przełamania przez bakterie bariery międzygatunkowej skupiając uwagę na zjawisku dywergencji sekwencji genomowej (zachodzącej często i skuteczniej u wirusów) i na stabilności genomów, za co odpowiadają enzymatyczne mechanizmy naprawy DNA, gdzie enzymy pełnią funkcje inhibitorów rekombinacji międzygatunkowej, i system reparacji SOS będący kontrolerem zmian indukowanych w genomie i zmienności genetycznej. Na te zjawiska ma zawsze wpływ presja selekcyjna środowiska co powoduje, że ten sam patogen może mieć różne zdolności kolonizowania i zakażania gospodarza. Mechanizmy tych zjawisk zainspirowały Autorkę do badań, których zwięźleniem jest przedstawiona praca doktorska.

Wiedza przedstawiona w kolejnych podrozdziałach „Wstępu” ma fundamentalne znaczenie, porządkuje i systematyzuje dzisiejszy stan wiedzy na temat przełamania bariery międzygatunkowej przez patogenne wirusy i bakterie. Co więcej, pokazuje podstawy do rozwijania przyszłych badań oraz wskazuje możliwości aplikacyjne o poważnym znaczeniu w zaawansowanej diagnostyce medycznej laboratoryjnej i w racjonalizacji procesu terapeutycznego.

Odpowiedzią na przedstawione powyżej wyzwania jest dysertacja Pani mgr Pauliny Głajzner, która podjęła się ambitnego zadania oceny zdolności zaadaptowania wybranych gatunków bakterii z rodzajów Staphylococcus i Streptococcus do gospodarza, jakim jest człowiek. Autorka badała cechy drobnoustrojów warunkujące ich zdolności kolonizacyjne oraz inwazyjność; poszukiwała biomarkerów fenotypowych i genetycznych ważnych w przystosowaniu do nowego gospodarza. Jest to bardzo ważny kierunek badań. Przedłożona do oceny dysertacja przedstawia nowatorskie badania o wysokiej wartości naukowej i praktycznej.

Rozprawa doktorska Pani mgr farm. Pauliny Głajzner została przygotowana w Katedrze Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej, w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod opieką naukową Pani Prof. dr hab. n. farm. Eligii M. Szewczyk. Zespół kierowany przez Panią Prof. E. M. Szewczyk wyróżnia się ugruntowaną wysoką pozycją naukową dzięki bardzo dobrym publikacjom z dziedziny mikrobiologii klinicznej, dyscypliny diagnostyki molekularnej, z interesującymi odniesieniami epidemiologicznymi, co zdaniem recenzenta jest ważne w tego typu projektach, a w przypadku tego zespołu bardzo rzetelnie opracowywane i ogłaszane w wysoko punktowanych periodykach, indeksowanych w międzynarodowych bazach danych, jak Journal of Medical Microbiology, Folia Microbiologica, Microbiology, Current Microbiology, International Journal of Molecular Sciences i innych, a także w rodzimych periodykach o wzrastającym wskaźniku impact factor – Polish Journal of Microbiology i Advancements of Microbiology.

Rozprawa doktorska mgr P. Głajzner została przygotowana w formie dysertacji napisanej w języku polskim, zgodnie z kanonem przyjętym na uniwersytetach. Praca ma logiczny układ i czyta się ją ze zrozumieniem poszczególnych wątków badawczych. Składa się z konwencjonalnych części; wyjątkiem jest załączony w końcu rozdział 14 „Aneks”, który na 36 stronach (od 151 do 186) pokazuje 56 tabel oraz ich spis na str. 149. Zamieszczenie tych

tabel w „Aneksie” porządkuje rozprawę obfitującą w liczne wyniki, gdyż niezależnie od tego rozdział „Wyniki” zawiera tabele i ryciny. Objętość dysertacji jest spora, liczy 191 stron, zatem *wyodrębnienie zestawu tabel w „Aneksie” było bardzo dobrą decyzją ułatwiającą czytanie, jak również objętość dysertacji są usprawiedliwione i akceptowane biorąc pod uwagę złożoną tematykę projektu, liczbę metod badawczych i bardzo liczne wyniki wymagające precyzyjnego systematycznego przedstawienia i opracowania.*

Maszynopis jest poprzedzony przedstawieniem trzech publikacji (2 oryginalnych i 1 przeglądowej) ogłoszonych w wysoko punktowanych międzynarodowych periodykach, przedstawiających część wyników zawartych w rozprawie doktorskiej, po czym następuje „Spis treści” (6 stron). Całość na 191 stronach obejmuje kolejno następujące części: „Wykaz skrótów” (5 stron), „Wstęp” (26 stron), sformułowanie celów pracy w rozdziale 2 „Założenia i cel pracy” (1 strona), specyfikacja użytych materiałów (11 stron), przedstawienie stosowanych metod badawczych (19 stron), opis uzyskanych wyników (32 strony), „Dyskusja”: (23 strony), „Podsumowanie wyników” (2 strony), „Wnioski z przeprowadzonych badań” (2 strony), streszczenia w języku polskim i angielskim (3 + 3 strony), „Piśmiennictwo” (260 pozycji na 23 stronach), „Spis tabel” (1 strona), „Spis rycin” (1 strona), rozdział 14 „Aneks” (36 stron, skomentowany powyżej), „Dorobek naukowy” (2 strony) i ostatni rozdział 16 „Oświadczenia współautorów” określające ich wkład w trzy publikacje zawierające część wyników zawartych w rozprawie doktorskiej (3 strony).

Pierwszy rozdział „Wstęp” jest bardzo dobrym wprowadzeniem do dalszych części rozprawy. Uwagę zwraca rzetelne wprowadzenie w złożoną problematykę, wymagającą wiedzy z kilku dyscyplin, zasadniczo z biochemii molekularnej i genetyki wybranych gatunków bakterii ważnych w zakażeniach człowieka i zwierząt, ale także z ekologii i epidemiologii oportunistycznych patogenów, co znalazło odzwierciedlenie w tytułach podrozdziałów czy akapitów, a dotyczy zagadnień takich jak nabywanie zdolności zakażenia gospodarza innego gatunku, przełamywanie bariery międzygatunkowej, nowe choroby odzwiercące człowieka, przeszkody w uzyskaniu zdolności zakażenia człowieka, etapy nabywania zdolności patogennych dla nowego gospodarza, patogeny zwierzęce jako nowe patogeny człowieka i właściwości wybranych do badań gatunków ziarenkowców gramodatnich. Autorka interesująco opisuje potencjał pangenomu bakterii i zmienności genetycznych oraz wynikającej z tego plastyczności fenotypowej biochemicznej, ze wskazaniem roli horyzontalnego transferu genów i mutacji punktowych. Recenzent będzie zainteresowany wysłuchaniem Doktorantki na temat mechanizmów molekularnych HTG a także o genetycznych mechanizmach regulacji ekspresji i supresji genów kodujących białka ważne na różnych etapach rozwoju zakażenia. Rozdział ten znakomicie integruje obszary badawcze przedstawione w kolejnych etapach złożonego projektu. Po nieznacznym uzupełnieniu nadaje się do publikacji jako interesująca praca przeglądowa.

Cele pracy sformułowane w kolejnym rozdziale są racjonalne, logiczne i nie budzą wątpliwości pod względem przesłanek; są oryginalnym i wartościowym wkładem do nauki. Objęły one: i) wyselekcjonowanie kolekcji drobnoustrojów przełamujących bariery międzygatunkowe; ii) ocenę zdolności zaadaptowania wybranych gatunków do gospodarza; iii) poszukiwania czynników umożliwiających przystosowanie do nowego gospodarza. Nadrzędnym celem była ocena zagrożenia ze strony pojawiających się nowych patogenów co pozwoliłoby wskazać biomarkery do rozpoznania zdolności szczepu zwierzęcego do zakażenia człowieka.

*Kolejne rozdziały - 3. Materiały i 4. Metody przedstawiają materiał biologiczny, kolekcje drobnoustrojów, podłoża hodowlane i odczynniki, aparaturę i metody badawcze opisane właściwie i w sposób wystarczający aby czytelnik mógł ocenić prawidłowość eksperymentów i wypracować własny pogląd na temat wartości naukowej przedstawionych wyników. Badania zostały rozłożone racjonalnie na kilka etapów w sposób logiczny, po czym konsekwentnie je realizowano. Recenzent zwraca szczególną uwagę na prawidłowy dobór szczepów bakteryjnych. O ile wybór dwóch rodzajów ziarenkowców gramdodatnich – *Streptococcus* i *Staphylococcus* nie stanowił szczególnego wysiłku intelektualnego wobec założenia badawczego oceny przełamania bariery międzygatunkowej przez patogeny, to wybór poszczególnych gatunków w obrębie tych rodzajów, co więcej pozyskiwanie szczepów dzikich z pracowni diagnostycznych i szczepów kontrolnych, wzorcowych i wskaźnikowych z kilku renomowanych kolekcji - banków drobnoustrojów i kolekcji własnej Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, jak również zespół czynności polegający na opracowywaniu tych szczepów, przed przystąpieniem do szczegółowych badań genetycznych i biochemicznych, jak również przeprowadzone analizy z zastosowaniem zaawansowanych metod molekularnych MALDI-TOF, real-time PCR, MLST, sekwencjonowanie DNA, z wykorzystaniem technik informatycznych – programów MEGA11, Scion Image i apiweb, budzą bardzo wysokie uznanie. Opisane metody badawcze zostały dobrane prawidłowo w celu osiągnięcia zaplanowanych efektów. Recenzent nie zauważył w pracy błędów metodycznych.*

Najobszerniejszy w całej rozprawie rozdział „Wyniki” liczy 31 stron. Autorka uzyskała obfitość oryginalnych wyników, które sprawnie zaprezentowała dzieląc ten rozdział na szereg podrozdziałów ilustrowanych 22 tabelami i 33 rycinami (szczegółowe wyniki z poszczególnych etapów eksperymentów zawiera „Aneks”, opisany powyżej). Do najważniejszych osiągnięć mgr P. Głajzner należą: i) analizy genetyczne – sekwencjonowania DNA w celu identyfikacji i weryfikacji oceny fenotypowej oraz pokazania powiązań filogenetycznych między zsekwencjonowanymi genami 16 S rRNA wybranych szczepów ludzkich i zwierzęcych; ii) powiązania genetyczne pomiędzy uzyskanymi typami sekwencyjnymi ST analizowanych szczepów a występującymi na terenie Europy; iii) precyzyjna charakterystyka reakcjami PCR szczepów i podgatunków oraz komplementarnymi metodami hodowlanymi i testami biochemicznymi profili fenotypowych (enzymy, toksyny, adhezyny), lekooporności i biofilmu; genów odpowiedzialnych za kolonizację oraz cechy różnicujące szczepy a nie gatunki; iv) opisanie mechanizmów adaptacji patogenów zwierzęcych do organizmu człowieka; przełamania barier międzygatunkowych przez bakterie.

Są to poważne osiągnięcia naukowe. Recenzent zwraca uwagę na dodatkowe wartości wynikające z uzyskanych osiągnięć badawczych, jak wskazanie kierunków badań w celu racjonalizacji procesu zaawansowanej diagnostyki z rozwinięciem aplikacyjnym w rozumieniu wytypowania biomarkerów kolonizacji i adaptacji, co ma wysoką wartość w epidemiologii oraz finalnie na podniesienie efektywności procesu terapeutycznego w leczeniu chorób zakaźnych.

Biorąc pod uwagę dużo uzyskanych przez Doktorantkę wyników o wysokiej wartości poznawczej, kolejny rozdział „Dyskusja” wymagał szczególnej dyscypliny i logiki. Doktorantka wywiązała się sprawnie z tego wyzwania, komentując krytycznie swoje osiągnięcia odnosząc się do wiedzy i wyników innych autorów. Trafną decyzją Autorki było wprowadzenie podrozdziałów z tytułami oraz tabeli i ryciny w tym rozdziale liczącym 20 stron, co poważnie

ułatwia czytanie i zrozumienie złożonych zjawisk jakimi są mechanizmy kolonizacji, adaptacji i patogenności drobnoustrojów.

Kolejny rozdział „Wnioski” zawiera w zwięzłej formie sformułowane w 8 punktach konkluzje wynikające z osiągniętych wyników. Opierając się na całości wyników oraz na tych wnioskach Doktorantka dodatkowo formuje w 3 punktach sugestie wyphywające z pracy, odnoszące się do przyszłych badań. Pisze o trudnościach zebrania kolekcji drobnoustrojów do badań mechanizmów przełamania barier międzygatunkowych, o wiarygodności wyników wynikających z ograniczonej liczby gatunków i szczepów oraz krytycznie o danych statystycznych wobec zachodzącego zjawiska między różnymi gatunkami gospodarza. *Rozdział „Wnioski” pokazuje zdolność Autorki zarówno do budowania syntezy jak również dowodzi dojrzałości naukowej, co więcej zdolności widzenia perspektywicznego zachodzących zjawisk.*

Kolejne dwa rozdziały to streszczenia w językach polskim i angielskim (3 + 3 strony).

Rozdział 11. „Piśmiennictwo” obejmuje 260 pozycji na 23 stronach, w zdecydowanej większości ogłoszonych w ostatniej dekadzie. *Jest to dowód bardzo dobrego przygotowania Doktorantki do przeprowadzonych badań.* Całość pracy zwieńczają „Spis tabel” (24 na 1 stronie), „Spis rycin” 20 na 1 stronie), „Aneks” (36 stron, rozdział scharakteryzowany powyżej), „Dorobek naukowy” Autorki (2 strony) i oświadczenia współautorów ogłoszonych wspólnych publikacji (3 strony).

Strony edytorska i językowa. *Oceniana praca została przygotowana bardzo starannie. Tekst został napisany zwięzłym przejrzystym językiem, zdania są pełne i zrównoważone. Załączone ryciny są pokazane w atrakcyjnych formach przyciągających uwagę. Czytanie pracy budzi zainteresowanie czytelnika. Z racji obowiązku recenzent znajduje kilka uchybień: i) zjawiska policzalne nie określa się słowami „duża ilość” lecz „wysoka liczba”, i nie „zmniejsza” lecz „obniża”; ii) zdań nie zaczyna się od skrótów, ani od nazwy łacińskiej: str. 27, 98, 107, 109, 117; iii) w rozdziale „Piśmiennictwo” w publikacji Fabregas N i wsp. brak roku publikacji; iv) akcent emocjonalny włączony do informacji nt. oporności paciorkowców na antybiotyki, str. 29.*

Podsumowanie. Biorąc pod uwagę przedstawiony w dysertacji oryginalny dorobek naukowy Pani mgr Pauliny Głajzner recenzent stwierdza, że jest to dorobek solidny, wynikający z bardzo dobrej koncepcji i uzyskany dobrze dobranymi metodami badawczymi, zarówno klasycznymi zweryfikowanymi w praktyce diagnostycznej jak i metodami zaawansowanymi molekularnymi, biochemicznymi i genetycznymi, które są nowością naukową i pozwoliły uzyskać bardzo dobre wyniki; co więcej, wyznacza nowe kierunki badań i aplikacji. Spostrzeżenia te jednoznacznie wskazują na wysokie kwalifikacje Doktorantki. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana i zredagowana zgodnie z przyjętym kanonem uniwersyteckim i spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742).

Recenzent wnosi do Rady Nauk Farmaceutycznych na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pani mgr farm. Pauliny Głajzner do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie przedstawionej rozprawy doktorskiej. (Uzasadnienie jest załączone).

Kraków, 4 września 2023 r.

.....
Paulina Głajzner

Uzasadnienie

wniosku o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr farm. Pauliny Glajzner.

Rozprawa doktorska pt. „**Adaptacja bakteryjnych patogenów zwierzęcych do nowego gospodarza – człowieka. Badania na modelu ziarenkowców gramdodatnich**” zasługuje na wyróżnienie z następujących powodów:

1. Dostrzeżenia i opisanie złożonego zjawiska zachodzącego w biosferze mikrobiologicznej oraz odważnego sformułowania projektu badawczego w celu poznania zachodzących w nich mechanizmów ekologicznych i molekularnych – genetycznych i biochemicznych.

2. Podjęcia systematycznych, bardzo dobrze zaprojektowanych badań z doбором właściwie wybranych metod badawczych, zarówno zaawansowanych genetycznych jak i zweryfikowanych przez praktykę diagnostyczną konwencjonalnych metod hodowlanych i biochemicznych.

3. Uzyskania interesujących naukowo wyników pokazujących mechanizmy przełamania barier międzygatunkowych przez patogenne bakterie, co więcej otwierających nowe kierunki badań.

4. Wyosobnienia nowych typów genetycznych i zarejestrowania ich w międzynarodowym banku informacji o drobnoustrojach.

5. Wskazania wartości aplikacyjnych dotyczących wyróżnienia bakteryjnych biomarkerów patogenności w drobnoustrojach – w nowych szczepach kolonizujących człowieka, bardzo ważne w zaawansowanej diagnostyce; co ponadto ma duże znaczenie w skali badań ekologii drobnoustrojów i epidemiologii zakażeń, a perspektywicznie w racjonalizacji procesu terapeutycznego.

Kraków, 4 września 2023 r.

