

11 czerwca 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej
mgr Agnieszki Iwańskiej
pt. „Analiza mechanizmów wirulencji i adaptacji szczepów *Pseudomonas aeruginosa*
u chorych na mukowiscydozę”

Autorka rozprawy, Pani mgr Agnieszka Iwańska jest absolwentką Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu na kierunku Analityka Medyczna. Obecnie jest zatrudniona w Zakładzie Mikrobiologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc (IGiChP) w Warszawie. Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora prowadzone jest na podstawie art. 12 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz w związku z art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

Rozprawa doktorska pt. „Analiza mechanizmów wirulencji i adaptacji szczepów *Pseudomonas aeruginosa* u chorych na mukowiscydozę” dotyczy gatunku bakterii, który najczęściej izolowany jest z próbek wody, gleby lub powietrza, czyli ze środowiska życia człowieka. Gatunek ten ma jednakże wiele cech, które stanowią o jego unikalności i zdolności do wywoływania niebezpiecznych zakażeń u osób z niesprawnymi mechanizmami obrony immunologicznej. Najważniejszą z tych cech jest niezwykle plastyczność genomu tego gatunku bakterii, przejawiająca się zdolnością do nabywania nowych cech na drodze horyzontalnego transferu genów i wynikająca z niej ogromna zdolność do adaptacji do różnych warunków wzrostu. Jest to bakteria o wyjątkowo dużym mozaikowym genomie, liczącym do siedmiu milionów par zasad nukleotydowych.

Dwie grupy chorych są szczególnie narażone na zakażenia pałeczką *P. aeruginosa* – chorzy z ciężkimi oparzeniami i chorzy na mukowiscydozę. Pani mgr Agnieszka Iwańska zainteresowała się właściwościami szczepów *P. aeruginosa* tej drugiej grupy chorych, u których zakażenie tą pałeczką nie jest wyleczalne i może prowadzić do zgonu.

Postawiony w rozprawie cel pracy, dotyczący analizy genotypowej i fenotypowej szczepów *P. aeruginosa* wśród chorych na mukowiscydozę, uważam za bardzo ważny. Plastyczność genomu bakterii oznacza też jego zmienność w czasie i w zależności od miejsca występowania. Populacje szczepów tego gatunku różnią się między sobą znacznie, powinniśmy zatem mieć wiedzę o cechach genotypowych i wynikających z nich cechach fenotypowych szczepów w Polsce. Dane piśmiennictwa wskazują na możliwość wyodrębnienia różnych kładów z klonów epidemicznych tego gatunku po rozdzieleniu geograficznym szczepów.

Dla realizacji postawionego celu Doktorantka podjęła się realizacji czterech zadań badawczych, co pozwoliło na szeroką charakterystykę cech zjadliwości szczepów *P. aeruginosa* a także na śledzenie transmisji izolatów w badanej populacji chorych w kraju.

Uzasadnienie teoretyczne postawionego celu i zadań badawczych, przyjęte metody, uzyskane wyniki i ich dyskusja wraz z szeregiem aneksów, przedstawiających szczegółowe dane, zebrane zostały w obszernej, liczącej 219 stron, rozprawie. Rozprawa doktorska ma typowy dla tego rodzaju opracowań układ, wyróżnia się natomiast niezwykle starannym opracowaniem edytorskim i graficznym. Jedyny zarzut, który można postawić edycji pracy dotyczy bardzo małych ilustracji, których wielkość determinowała, jak myślę, chęć ograniczenia objętości rozprawy. Stało się to jednak ze szkodą dla jej zawartości, np. na Ryc. 11 morfotypy *P. aeruginosa* nie są rozróżnialne.

Pozytywnie zaskakuje natomiast niezwykle szeroki zakres piśmiennictwa, z którego korzystała Doktorantka i, co najważniejsze, jego aktualność. Wśród 221 przytoczonych pozycji piśmiennictwa, 109 pozycji, czyli prawie 50% zostało opublikowane w ciągu ostatnich pięciu lat. Trudno też byłoby wskazać publikację, którą Autorka pominęła z dostępnej najnowszej literatury przedmiotu. Podnosi to bardzo poziom dyskusji otrzymanych wyników i pokazuje, jak aktualnego tematu podjęła się Doktorantka w swojej pracy.

Tak szeroki panel danych piśmiennictwa pozwolił mgr Agnieszce Iwańskiej na napisanie wyczerpującego Wstępu, w którym omawia etiologię mukowiscydozy, charakteryzuje pałeczki *P. aeruginosa*, przedstawia ich udział w rozwoju mukowiscydozy wraz z podkreśleniem roli poszczególnych czynników zjadliwości w przebiegu zakażenia. Ze względu na aktualność informacji zawartych w omawianym rozdziale gorąco namawiałabym Autorkę na publikację tego materiału w dobrym, indeksowanym czasopiśmie naukowym.

W celu realizacji postawionych zadań badawczych Doktorantka użyła szeregu metod analitycznych. Zostały one prawidłowo dobrane. Dotyczy to zarówno technik zaczerpniętych z warsztatu klasycznej mikrobiologii, jak i nowoczesnych metod molekularnych, takich jak analiza restrykcyjna długości fragmentów DNA za pomocą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym. Badania wykonano prawidłowo, wprowadzono wymagane próbki kontrolne, pozwalające na ocenę poprawności stosowanych technik.

Za najważniejsze wyniki Doktorantki uważam przedstawienie procesu adaptacji szczepów *P. aeruginosa* w trakcie długotrwałej kolonizacji dróg oddechowych pacjentów z mukowiscydozą. Szczepy izolowane z przewlekłych zakażeń przejawiały niższą aktywność proteolityczną (za wyjątkiem aktywności elastolitycznej), obniżoną zdolność do ruchu typu swimming, swarming i twitching i wytwarzały mniej piocjaniny. Szczepy te były jednocześnie zdolne do tworzenia biofilmu o znacznej masie i wysokiej aktywności metabolicznej. Wytwarzały też aktywnie elastazę.

Transmisję szczepów *P. aeruginosa* w IGiCHP w latach 2012-2019 u chorych na mukowiscydozę Doktorantka oceniła analizując wielkości fragmentów restrykcyjnych DNA po ich rozdzieleniu w zmiennym polu elektrycznym. Jest to nowoczesna technika biologii molekularnej, pozwalająca na śledzenie rozprzestrzeniania się klonów poszczególnych szczepów w środowisku. Do tej analizy wybrała 120 izolatów *P. aeruginosa* pozyskanych od dziesięciu pacjentów. W rozprawie zamieszczona została charakterystyka kliniczna tych chorych, natomiast nie podano kryteriów doboru chorych do tej grupy badanej. Prosiłabym o uzupełnienie tej informacji podczas obrony pracy.

Wśród analizowanych szczepów *P. aeruginosa* znaleziono trzy genotypy wspólne dla dwóch (dwa) i trzech izolatów (jeden) i te trzy szczepy nazwano szczepami transmisyjnymi. Na podstawie analizy dokumentacji medycznej chorych stwierdzono, że byli oni hospitalizowani w podobnym czasie, co sugeruje wspólne źródło zakażenia tych pacjentów. Bardzo ciekawą i oryginalną obserwacją Doktorantki jest wykazanie, że określone cechy fenotypowe, takie jak wydzielanie proteaz, plicjaniny oraz zdolność do ruchu typu twitching istotnie różnicowały izolaty transmisyjne od pozostałych, o unikatowych genotypach, w grupie poddanej ocenie. Doktorantka wykazała też, że u pięciu pacjentów można wyodrębnić szczepy przetrwałe, czyli szczepy, które bytują w płucach chorego przez dłuższy czas, pomimo stosowania leczenia przeciwbakteryjnego; przykładowo od pacjenta KP pozyskano w ciągu siedmiu lat badań 13 izolatów *P. aeruginosa* o wysokim pokrewieństwie genetycznym.

Doktorantka poszukiwała mechanizmów warunkujących wystąpienie tego zjawiska. Podała analizie dane kliniczne chorych oraz cechy zjadliwości wyosobnionych izolatów. Wśród oznaczanych w tej pracy cech charakterystycznych dla pałeczek tego gatunku nie udało się wyodrębnić cechy unikalnej, wspólnej dla wszystkich badanych izolatów. Natomiast stwierdzono, że izolaty pozyskane w okresach stabilności klinicznej przejawiają istotnie częściej fenotyp śluzowy i zdolność do ruchu typu swimming w porównaniu do izolatów pozyskanych podczas zaostrzenia choroby.

Oceniając prezentację wyników rozprawy należy podkreślić wnikliwość Doktorantki. Stawia ona prawidłowe i aktualne pytania i logicznie prowadzi prezentację wyników, co pozwala na udzielenie poprawnych odpowiedzi. Taki sposób opracowania i przedstawienia wyników ułatwił ich późniejszą interpretację i omówienie na tle piśmiennictwa światowego w rozdziale Dyskusja.

Rozdział ten jest dobrze i ciekawie napisany, co podkreśla dojrzałość naukową Doktorantki. Pokazuje, że wyniki uzyskane w ocenianej rozprawie są unikalne i wnoszą ważne dane do wiedzy o zakażeniach *P. aeruginosa* u chorych na mukowiscydozę. Doktorantka zaznacza, że nie analizowano dotychczas cech zjadliwości u szczepów *P. aeruginosa* izolowanych od tych chorych w różnych grupach wiekowych. Wykazuje, że badania przedstawione w ocenianej rozprawie mogą zostać wykorzystane w praktyce; przykładowo przy konstrukcji nowych urządzeń do badań przesiewowych w kierunku zakażenia pałeczkami *P. aeruginosa*. Za pomocą tych urządzeń możliwa byłaby analiza poziomu plicjaniny jako wskaźnika obecności wytwarzających ją pałeczek. Ciekawym fragmentem dyskusji jest analiza zasadności badania zdolności szczepów bakteryjnych do tworzenia biofilmu w warunkach *in vitro* i wnikliwa interpretacja uzyskanych wyników. Doktorantka też dociekliwie analizuje istotne wyniki wskazujące na brak wspólnych profili lekooporności i cech zjadliwości nawet w populacji izolatów o wysokim podobieństwie genetycznym.

Za ważne uważam też uzupełnienie rozprawy doktorskiej aneksami, w których przedstawiono wyniki jednostkowe. Pozwala to czytelnikowi na wykonanie własnej analizy uzyskanych przez Doktorantkę wyników i postawienie własnych wniosków. Jest to zgodne z obecnym trendem przedstawiania szczegółowych wyników badań w aneksach, proponowanym przez wiodące czasopisma naukowe.

Na podstawie uzyskanych wyników w ocenianej rozprawie doktorskiej postawiono siedem wniosków, które mają charakter opisowy. Natomiast z omawianej pracy płynie jeszcze jeden, niezwykle istotny wniosek praktyczny, o którego rozważenie prosiłabym Doktorantkę w trakcie obrony pracy. Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie na konieczność podjęcia badań ukierunkowanych na opracowanie nowego schematu diagnostyki mikrobiologicznej w grupie chorych na mukowiscydozę, w którym uwzględniona zostałaby i poddana ocenie, w tym badaniu lekowrażliwości, większa liczba izolatów z jednej próbki materiału klinicznego.

Do ocenianej rozprawy doktorskiej mam jeszcze kilka uwag, głównie dotyczących stylu wypowiedzi:

1. Str. 18: Czy możemy mówić o „ilości” *Pseudomonas*? Bakterie są policzalne.
2. Str. 18: Nie jest możliwe „zasiedlenie ludzkiej mikroflory” przez *P. aeruginosa*. Ponadto termin mikroflora nie jest już używany i został zastąpiony przez terminy mikrobiom, mikrobiota.
3. Str. 28: „Elastaza B posiada znacznie większą wirulencję” – o wirulencji mówimy w odniesieniu do organizmu, nie białka.
4. Str. 29: „Pili.... są zdolne do szybkiej kolonizacji” – kolonizuje drobnoustrój, całą komórkę.
5. Str. 34: Czy możemy mówić o oporności biofilmu, czy też o jego tolerancji na antybiotyki?
6. Str. 65: „Ocena aktywności proteolitycznej i elastynolitycznej”. Elastyna jest proteazą.
7. Str. 80: „Absorbancja biomasy przy OD550” – to jest pomiar absorbancji dla formazanu, produktu reakcji enzymatycznej.

Uwagi te nie umniejszają wartości naukowej rozprawy. Podsumowując stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Iwańskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, pokazuje samodzielność naukową Doktorantki i jej dużą wiedzę teoretyczną w uprawianej dyscyplinie. Spełnia zatem wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017, poz. 1789).

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Iwańskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki medyczne.

Ponadto proszę o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej ze względu na znaczenie uzyskanych wyników dla wiedzy o zakażeniach pałeczkami *P. aeruginosa* u chorych z mukowiscydozą, pracowitość wykonanych analiz a także interesujące przedstawienie otrzymanych wyników i ich dojrzałą dyskusję. Oceniana rozprawa doktorska wyróżnia się aktualnością poruszanych zagadnień, stanowiąc ważny element obecnie prowadzonych badań ukierunkowanych na poprawę leczenia chorych z mukowiscydozą.

Prof. dr hab. n. med. Elżbieta Anna Trafny
Centrum Inżynierii Biomedycznej IOE WAT
Warszawa