



Uniwersytet
Wrocławski

Wydział Nauk Biologicznych
Instytut Genetyki i Mikrobiologii

ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław
tel. +48 71 325 62 13
fax +48 71 325 21 51
e-mail: sekretariat@microb.uni.wroc.pl
www.microb.uni.wroc.pl

Prof. dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa, prof UW
Zakład Biologii Patogenów i Immunologii
Instytut Genetyki i Mikrobiologii
Uniwersytet Wrocławski
ul. Przybyszewskiego 63-77
51-148 Wrocław
tel. +48 71 37 56 290
fax. +48 71 325 21 51
email. zuzanna.drulis-kawa@microb.uni.wroc.pl

Wrocław, 2015-11-08

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Lucyny Jalońskiej

pt. „Wpływ preparatów przeciwbakteryjnych w stężeniach subinhibicyjnych na antybiotykooporność i wirulencję *Aeromonas* spp., *Enterobacter hormaechei* i *Escherichia coli*”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Lucyny Jalońskiej, została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Kaznowskiego w Zakładzie Mikrobiologii, Instytutu Biologii Eksperymentalnej, Wydziału Biologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Praca poświęcona jest badaniom dotyczącym wpływu antybiotyków, w stężeniach subinhibicyjnych, na indukcję oporności bakterii na te preparaty oraz na zmiany w wirulencji szczepów. Lekooporność bakterii na powszechnie stosowane w lecznictwie i produkcji żywności, antybiotyki i preparaty przeciwbakteryjne, to narastający wciąż globalny problem. Bakterie patogenne i środowiskowe są pod stałą presją selekcyjną inhibicyjnych i subinhibicyjnych stężeń antybiotyków z różnych przyczyn, których źródłem może być nieprawidłowo leczony pacjent, masowa hodowla zwierząt, produkcja żywności i intensywnie prowadzone rolnictwo. Presja antybiotykowa w konsekwencji może prowadzić do zmian fenotypowych wywołanych modyfikacją w ekspresji niektórych genów oraz, jako efekt wtórny generowania silnie toksycznych reaktywnych form tlenu, powodować zmiany genotypowe i uruchamianie genów stresu RpoS. Podsumowując, obecność antybiotyków w stężeniach subinhibicyjnych powodzić może do zmian w wirulencji szczepów bakteryjnych. Literatura podaje, że zmiany mogą być zarówno korzystne z punktu widzenia terapii (zmiany w strukturze LPS, czy utrata otoczek), jak i niepożądane, w tym zwiększenie produkcji niektórych toksyn i czynników odpowiedzialnych za inwazyjność bakterii, czy intensywnie tworzone biofilm.

Doktorantka postawiła sobie kilka głównych zadań do zrealizowania w celu wyjaśnienia powyższych kwestii, w tym oceny korelacji pomiędzy presją antybiotykową a generowaną opornością u bakterii, jak też wpływu leków na zmiany w wirulencji, w tym na adhezję i inwazyjność do komórek nabłonkowych, czy indukcję apoptozy i poziom ekspresji genów kodujących wybrane cytotoksyny.

Wybrała trzy preparaty: ciprofloksacynę, ampicylinę oraz kanamycynę, jako reprezentantów głównych i najczęściej stosowanych grup antybiotyków: fluorochinolonów, betalaktamów oraz aminoglikozydów. Bakterie poddawane presji to przedstawiciele *Aeromonas*, *Enterobacter* i *E.coli*, pałeczek Gram-ujemnych powszechnie występujących w środowisku i florze jelitowej ludzi i zwierząt. Materiał do badań stanowiło ogółem 31 szczepów, w tym 11 *Aeromonas hydrophila* i *A. veronii* biotyp sorbia, izolowane między innymi z kału pacjentów w Polsce i Hong Kongu. Drugą grupą badawczą było 12 izolatów *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* i subsp. *steigerwaltii* wyhodowanych z różnych materiałów klinicznych, w tym z moczu, krwi, rany, czy odbytu. Trzecia grupa szczepów to *E.coli* serotyp O157:H7 w ilości 8 izolatów, z czego część posiadała geny Shiga-toksyny, udostępnionych przez Zakład Higieny Weterynaryjnej w Bydgoszczy Oddziału Terenowego w Toruniu. I od razu moje pierwsze pytanie, czym kierowała się Doktorantka w takim doborze szczepów? Dlaczego akurat te gatunki oraz szczególnie serotyp O157:H7 *E.coli* zostały wybrane do badań?

W pierwszym etapie pracy Doktorantka uzyskiwała mutanty bakteryjne poprzez hodowle kilkudniową w podłożu zawierającym wybranych antybiotyków w stężeniu 0,5 i 0,25 MIC minimalnego stężenia hamującego i oceniła poziom MIC dla poszczególnych antybiotyków u uzyskanych izolatów. Szczepy zostały zakwalifikowane do trzech grup: (1) u których doszło do zwiększenia wartości MIC; (2) u których doszło do spadku MIC, oraz (3) u których nie zaobserwowano zmian MIC. W tym miejscu pojawia się pytanie jaka wartość zmian w MIC była w Doktorantki znacząca i stanowiła podstawę do kwalifikacji poszczególnych izolatów. Po drugie, czy zmiana we wrażliwości była cechą stałą? Czy weryfikowano izolaty na przykład po kilkukrotnych pasażach w podłożu wolnym od antybiotyków? Ciekawe byłoby też sprawdzenie konsekwencji zmiany wrażliwości na wybrany antybiotyk w stosunku do wrażliwości na pozostałe dwa lub więcej preparatów.

Kolejne etapy badań Doktorantki dotyczyły oceny zmian w wirulencji uzyskanych izolatów w stosunku do bakterii wyjściowych. Najpierw oceniana była zdolność do adhezji i inwazyjności do komórek HeLa (ludzkiego raka szyjki macicy). Badania te wykonano na szczepach *Enterobacter hormaechei* i *E.coli*. Wykazano, że presja antybiotykowa przyczyniła się do spadku adhezji, a do wzrostu inwazyjności bakterii, niezależnie od stosowanego leku. Powstaje jednak pytanie, jakie

kryteria zostały przyjęte do uznania, że zmiany w odczytach wartości adhezji, czy inwazyjności są znaczące? Na rycinie 11 i 12 oraz w tabeli 16 umieszczono skomasowane wyniki dla obu gatunków razem, co wydaje się niezbyt fortunne, ze względu na duże różnice w biologii tych bakterii. Generalnie, analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic w adhezji i inwazji pomiędzy szczepami wyjściowymi a bakteriami uzyskanymi podczas presji antybiotykowej.

Następnie przetestowano efekt cytotoksyczny przesączy pochodowlanych oraz cytotoksyczność typu „cell contact” na linii komórkowej HeLa. Podobnie jak w poprzednich eksperymentach pogrupowano szczepy względem spadku, wzrostu i braku zmian danej cechy. I ponownie nasuwa się pytanie o kryteria znaczących zmian, w celu przypisania do danej grupy. Analiza wyników, choć przedstawiona skrótowo, załączona na końcu rozdziału przedstawia faktyczne wnioski z przeprowadzonych badań dotyczących cytotoksyczności ogółem.

Kolejnym zadaniem w projekcie było określenie zdolności bakterii do indukcji procesu apoptozy linii HEP-2 komórek nabłonkowych raka krtani. Testy te zostały wykonane dla bakterii *Enterobacter hormaechei* uzyskanych przy presji ciprofloksacyny. Niestety Doktorantka nie wyjaśnia, dlaczego wybrała inną niż poprzednia linię do analiz oraz tylko tą grupę bakterii.

Pod koniec rozdziału „Wyniki”, Doktorantka zamieściła eksperyment dotyczący identyfikacji genów wirulencji, w tym genu *act* kodującego aerolizynę *Aeromonas* oraz genów *stx1* i *stx2* toksyny Shiga 1 i 2 u szczepów *E.coli*. W analizie PCR wykazana została obecność *stx1* i *stx2* tylko u dwóch szczepów z kolekcji ATCC, z których ATCC 43888 jest opisany w kolekcji jako pozbawiony genów toksyczności. Ostatni element pracy to weryfikacja zmian w ekspresji genów kodujących aerolizynę i rpoS u 18 wybranych izolatów *Aeromonas* pochodzących od trzech szczepów wyjściowych oraz zmian w ekspresji genów *stx1*, *stx2* i rpoS u sześciu mutantów jednego szczepu *E.coli*. Rezultaty tych analiz były trudne do interpretacji ze względu na duży rozrzut wyników i małą liczbę powtórzeń. Moje generalna uwaga do sposobu przedstawiania wyników w tej pracy, to, że nie powinna być przedstawiana jako procentowy udział w poszczególnych grupach bakterii, ponieważ liczebność szczepów wynosiła od 8 do 12 sztuk.

Na pochwałę pracy zasługuje dobór metodologii, który uważam za bardzo dobrze uzasadniony, nie tylko merytorycznie w/w potrzebami, ale także godnym uznania przygotowaniem merytorycznym i praktycznym Doktorantki. W pracy wykorzystano szereg analiz z wykorzystaniem procedur EUCAST, hodowli komórkowych oraz metod genetycznych, w tym PCR w czasie rzeczywistym.

W doktoracie, Pani mgr Lucyna Jabłońska, zastosowała układ oraz sposób prezentacji typowy i powszechnie przyjęty dla prac doświadczalnych w naukach biologicznych. Dysertacja zawiera ogółem 150 stron, w tym 28 rycin, 27 tabel oraz 217 pozycji bibliograficznych, głównie angielskich. Praca jest prawidłowo zorganizowana w rozdziały i podrozdziały adekwatnie do

prezentowanych treści. Tekst pracy jest napisany starannie, językiem poprawnym, przejrzystym i zrozumiałym unikającym żargonu naukowego lub zapożyczeń językowych. Zabrakło mi jednak płynnej narracji i wprowadzenia czytelnika w kolejne podrozdziały, zwłaszcza wynikowe, oraz podsumowania każdego etapu z wyjaśnieniem: co dalej i dlaczego.

Postawione cele omawianej pracy zostały osiągnięte i podsumowane w 10 punktach w rozdziale wnioski, z tym że ostatni punkt mówiący o konieczności udoskonalenia strategii efektywnego użycia terapeutyków przeciwbakteryjnych przy równoczesnym zapobieganiu rozwojowi szerzenia się antybiotykooporności to raczej ogólne stwierdzenie, nie wynikające bezpośrednio z pracy. Ponieważ efekty badań Doktorantki zostały podsumowane dość ogólnikowo, chciałbym zapytać, jaki element nowości charakteryzuje Pani pracę i czym się różnią wyniki tu uzyskane od dotychczasowych doniesień literaturowych Krzemińskiej i współautorów, Wojnicz i współautorów, czy Jayaraman i współpracowników.

Po dokładnym zapoznaniu się z przedstawioną mi do oceny pracą, jestem przekonana, że zakres wykonanych badań i uzyskanych wyników, spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Przeprowadzone badania dowodzą dużych umiejętności Doktorantki w poprawnym posługiwaniu się nowoczesnymi metodami badawczymi oraz interpretacji uzyskiwanych rezultatów. Nie wnoszę istotnych zastrzeżeń do merytorycznej strony pracy i jednocześnie mam nadzieję, że zasugerowane przez mnie poprawki/uwagi będą pomocne Doktorantce w przygotowaniu przyszłej publikacji.

Podsumowanie.

Stwierdzam, że Doktorantka wykonała dobrą pracę badawczą. Zamierzenia badawcze zostały osiągnięte. Wyniki badań i wysnute z nich wnioski przedstawione w rozprawie, mają dużą wartość naukową. Rozprawa została napisana poprawnie i przejrzysto pod względem językowym i edytorskim. Pani mgr Lucyna Jabłońska wykazała się bardzo szeroką wiedzą podstawową, jak i wiedzą specjalistyczną w tematyce dysertacji oraz umiejętnościami stosowania badawczych metod i technik w zakresie współczesnej mikrobiologii i biologii molekularnej. Przedstawiona do oceny rozprawa, w moim przekonaniu, spełnia wymagania stawiane ustawowo rozprawom doktorskim, dlatego przedstawiam Radzie Wydziału Biologii, Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, wniosek o dopuszczenie mgr Lucyny Jabłońskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

Kierownik
Zakładu Biologii Patogenów
i Immunologii

Dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa