



**Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu**  
**Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy**  
**Katedra i Zakład Mikrobiologii**  
**Kierownik: prof. dr hab. Eugenia Gospodarek-Komkowska**  
**ul. M. Skłodowskiej - Curie 9, 85 - 094 Bydgoszcz**  
**tel.: (052) 585-40-47, 585-44-80, 585-36-09**  
**e - mail: [kizmikrob@cm.umk.pl](mailto:kizmikrob@cm.umk.pl)**



L. Dz. KZM/291/XII/15

Bydgoszcz, 02.12.2015 r.

**Szanowny Pan**

**Prof. dr hab. Bogdan Jackowiak**  
**Dziekan**  
**Wydziału Biologii**  
**Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza**  
**w Poznaniu**  
**61-614 Poznań**  
**ul. Umultowska 89**

W załączeniu przesyłam:

- recenzję w formie papierowej pracy doktorskiej Pani mgr Lucyny Jabłońskiej (1 egzemplarz)  
 (skan recenzji z podpisem wysłałam na adresy e-mail: [karolka@amu.edu.pl](mailto:karolka@amu.edu.pl),  
[ramol@amu.edu.pl](mailto:ramol@amu.edu.pl)),

oraz wypełnione dokumenty:

- oświadczenie osoby nie będącej pracownikiem UAM dla celów podatkowych (1 egzemplarz),
- umowę o dzieło (2 egzemplarze),
- rachunek do umowy.

Z poważaniem

  
**KIEROWNIK**  
 Katedra i Zakład Mikrobiologii  
 prof. dr hab. n. med.  
*Eugenia Gospodarek-Komkowska*



**Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu**  
**Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy**  
**Katedra i Zakład Mikrobiologii**  
**Kierownik: prof. dr hab. Eugenia Gospodarek-Komkowska**  
**ul. M. Skłodowskiej - Curie 9, 85 - 094 Bydgoszcz**  
**tel.: (052) 585-40-47, 585-44-80, 585-36-09**  
**e - mail: [kizmikrob@cm.umk.pl](mailto:kizmikrob@cm.umk.pl)**



L. Dz. KZM/291/XII/15

Bydgoszcz, 02.12.2015 r.

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Lucyny Jabłońskiej, p.t.:

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

Jednym z istotnych problemów związanych ze stosowaniem antybiotyków, jest wzrost oporności na te leki wśród drobnoustrojów. Czynnikiem sprzyjającym temu zjawisku jest używanie antybiotyków w sposób nieracjonalny, np. w zakażeniach wirusowych, stosowanie zbyt niskich dawek. Znacznie bardziej dramatycznym zjawiskiem jest powszechne stosowanie antybiotyków w sektorach pozamedycznych i to w sposób niekontrolowany, tj. w hodowli zwierząt, uprawie roślin, w tym ozdobnych, przemyśle przetwórczym i kosmetycznym, a następnie utrzymywanie się ich w stężeniach podprogowych, tam gdzie mogą występować drobnoustroje, tj. w glebie, wodzie, przetworzonej żywności, kosmetykach, odpadach, ściekach. Stosowanie antybiotyków do wyżej wymienionych celów nie jest monitorowane, przez co w wyniku presji antybiotykowej dochodzi do selekcji szczepów opornych, rozwoju nowych cech drobnoustrojów, nie zawsze korzystnych dla zdrowia publicznego. Takie drobnoustroje mają strategie adaptacyjne do życia w danym środowisku i do pokonywania barier w postaci zmieniających się warunków, jak i pokonywania barier gatunkowych oraz rozwoju zakażenia.

Biorąc pod uwagę wzrost częstości występowania szczepów wieloantybiotykoopornych i konsekwencje z tego wynikające, uważam wybór tematu pracy za niezwykle ważny i aktualny, zwłaszcza w świetle wyczerpywania się zasobów skutecznych leków, sprzyjania łatwości nabywania mechanizmów lekooporności i powstawania szczepów z cechami świadczącymi o potencjale adaptacyjnym do zasiedlania i utrzymywania się w nowych warunków środowiska, jak i globalnej wręcz transmisji.

Opierając się na powyższych przesłankach, Doktorantka zaprojektowała badania mające na celu wyjaśnienie wpływu wybranych antybiotyków użytych w stężeniach subinhibicyjnych na zmianę lekowrażliwości oraz wirulencji pałeczek *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii* biotyp *sorbia*,

*Escherichia coli* i *Enterobacter hormaechei* – gatunków bakterii występujących w środowisku i mogących wywołać zakażenia u ludzi i zwierząt.

Praca została przygotowana jako opracowanie monograficzne według schematu typowego dla prac doświadczalnych. Część wstępna jest obszernym opracowaniem, na które składa się szereg podrozdziałów uwzględniających opis leków przeciwbakteryjnych, charakterystykę pałeczek będących przedmiotem rozprawy, ich czynników wirulencji i oporność na antybiotyki.

Autorka pracy uwzględniła w swoich badaniach ogółem 31 szczepów pałeczek Gram-ujemnych, w tym 8 *Escherichia coli*, 12 *Enterobacter hormaechei* i 11 *Aeromonas* spp. Czy Doktorantka osobiście izolowała 12 szczepów *E. hormaechei* od chorych? W jaki sposób je identyfikowała? Czy każdy szczep kliniczny izolowano od innego chorego? Czy pochodziły one z przypadków zakażeń, czy z przypadków kolonizacji? Nie informuje też, z jakiego okresu pochodzą szczepy uwzględnione w badaniach. Autorka podaje, że posługiwała się wzorcowym szczepem *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140™ z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych (American Type Culture Collection, ATCC), jednak nie podaje czemu on służył? Czym kierowała się przy jego wyborze do badań własnych?

Badane szczepy poddawała przez 5 dni działaniu ampicyliny, kanamycyny i ciprofloksacyny w stężeniach 0,25 i 0,5 wartości najmniejszych stężeń hamujących wzrost bakterii (Minimal Inhibitor Concentration, MIC). Następnie oznaczała ich wrażliwość na te same antybiotyki oraz dodatkowo, na streptomycynę i tetracyklinę. Po ekspozycji bakterii na antybiotyki określała również ich właściwości adhezyjne, inwazyjne, cytotoksyczne na poziomie ekspresji genów kodujących toksyny metodą Real-time PCR, zdolność indukcji procesu apoptozy wobec komórek nabłonkowych. Czym kierowała się Doktorantka przy wyborze wymienionych leków przeciwbakteryjnych do swoich badań?

W rozdziałach Materiał i Metody zostały szczegółowo opisane wszystkie procedury stosowane w pracy. W części dotyczącej oceny wartości MIC antybiotyku zabrakło mi informacji o stosowanych szczepach wzorcowych. Zatem, co było kontrolą poprawności przeprowadzenia tej oceny? Według jakich rekomendacji tę ocenę przeprowadzono? Jakie powiększenie stosowano w mikroskopie fluorescencyjnym podczas oceny zdolności bakterii do indukcji apoptozy komórek nabłonkowych Hep-2? W tabelach 4 i 5 Doktorantka podaje, jako źródło starterów „niniejsza praca”, to znaczy, że sama je zaprojektowała?

Rozdział Wyniki podzielono na stosowne podrozdziały i przedstawiono z wykorzystaniem licznych tabel i rycin wraz z szeregiem obliczeń statystycznych. Dokumentacja wyników została

przygotowana w sposób przejrzysty. Przydałoby się podsumowanie cząstkowych wyników w postaci zestawienia najważniejszych stwierdzeń umieszczonych na końcu każdego podrozdziału.

Ważnym osiągnięciem Doktorantki jest wykazanie u badanych szczepów poddawanych działaniu subMIC antybiotyków wzrostu wartości MIC i jego zależności od gatunku bakterii, użytego antybiotyku, jego stężenia i czasu ekspozycji. Poddawanie badanych pałeczek działaniu antybiotyku w stężeniu 0,5 wartości MIC wywołało u ponad 90% szczepów zmniejszenie wrażliwości na ten lek.

Cennym wynikiem uzyskanym przez Panią mgr Lucynę Jabłońską jest udokumentowanie wśród badanych szczepów poddanych działaniu antybiotyków obniżenie prawie u 70% szczepów zdolności adhezyjnych do komórek nabłonkowych oraz u 75% wzrostu inwazji do komórek HeLa. Bardzo ciekawym przedsięwzięciem była ocena wpływu leków przeciwbakteryjnych na zjawisko apoptozy komórek nabłonkowych przez uwzględnione w pracy szczepy bakteryjne. Autorka wykazała wpływ ciprofloksacyny w stężeniach subMIC na indukowanie tego procesu przez szczepy *E. hormaechei*. Obserwowane przez Doktorantkę zmiany w cytotoksyczności badanych szczepów po ekspozycji na działanie antybiotyków, zależą od zastosowanego antybiotyku, jego stężenia i gatunku bakterii. Podkreślenia wymaga wzrost cytotoksyczności, najczęściej wykazywany wśród szczepów *E. hormaechei* namnażanych w środowisku 0,25 subMIC ampicyliny i kanamycyny.

W mojej opinii, należy podkreślić wagę tego typu badań, które powinny być ostrzeżeniem i wskazówką dla wszystkich, którzy stosują antybiotyki w sposób nieracjonalny oraz opracowaniem strategii, które powinny być rekomendacjami dla wszystkich obszarów w celu ograniczenia stosowania antybiotyków i używania ich w stężeniach terapeutycznych tylko w profilaktyce i leczeniu zakażeń.

Powyższe wyniki Doktorantka uznała nie tylko za przyczynę efektu zmian w ich lekooporności, ale także za ważny mechanizm zmieniający wirulencję badanych szczepów wybranych gatunków pałeczek Gram-ujemnych. Stwierdziła również, że podobne zjawiska mogą występować w naturze, co może wpływać na ich występowanie, rozsiew i utrzymywanie w środowisku, transmisję oraz rozwój zakażeń u ludzi i zwierząt. Zakażenia, których czynnikiem etiologicznym są szczepy bakterii o podwyższonym potencjale wirulencji i podwyższonych wartościach MIC antybiotyków są bardziej kosztowne w leczeniu z uwagi na cięższy przebieg i trudności w leczeniu. Jednym z najcenniejszych przedsięwzięć przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej było wykazanie, że ekspozycja czynników zakaźnych na działanie antybiotyków może spowodować wzrost ich inwazyjności do komórek nabłonkowych i zmianę cytotoksyczności. Doktorantka stwierdziła też zależność tych cech

od gatunku, a nawet od szczepu badanych pałeczek, rodzaju i stężenia antybiotyku oraz czasu bakterii wystawionych na działanie leków ujętych w badaniach.

Uzyskane wyniki Autorka wnikliwie analizuje w rozdziale Dyskusja. W dojrzały sposób interpretuje własne wyniki w odniesieniu do wyników innych autorów.

Na tle przedstawionych rozważań szczególnego podkreślenia wymaga próba wyjścia poza ocenę wyłącznie przeciwdrobnoustrojowego działania antybiotyków, ocena polegająca na analizie ich wpływu na zmianę lekooporności i wirulencji z uwzględnieniem czynników istotnych w rozwoju zakażenia. Takie złożone podejście w badaniu przeciwdrobnoustrojowego działania antybiotyków jest unikatowe. Dyskusję oparto na dobrze dobranym, aktualnym piśmiennictwie, którego cytowanie nie budzi zastrzeżeń.

Pod względem redakcyjnym praca została przygotowana starannie.

Mgr Lucyna Jabłońska w projektowaniu doświadczeń wykazała znajomość tematu i umiejętność łączenia wiedzy z zakresu różnych metod oraz teorii z praktyką. Oceniała wyniki własnych badań na tle innych autorów i to w sposób krytyczny. Analizując wyniki wielokierunkowych badań własnych, Doktorantka sformułowała 10 wniosków, które są odpowiedzią na postawione cele, jednak należałoby przedstawić je w sposób bardziej spójny, co dałoby też mniejszą ich liczbę. Ponadto, wniosek nr 10 radziłabym wykreślić, gdyż nie wynika on z badań własnych.

Z obowiązku recenzenta, oprócz wyżej wymienionych spostrzeżeń, muszę podać, że Wstęp jest zbyt obszerny i zawiera czasem zbędne opisy. We Wstępie, I rozdział „Preparaty przeciwbakteryjne” ujmuje treści nieadekwatne do tytułu. Doktorantka opisuje antybiotyki i chemioterapeutyki, a nie preparaty przeciwbakteryjne. Zatem proszę o wyjaśnienie, co to jest „preparat przeciwbakteryjny”?

Pracę wzbogaciłby wykaz rycin (fotografii), tabel. Brak też zgody Komisji Bioetycznej na przeprowadzenie badań naukowych, chyba, że Wydział tego nie wymaga.

Co Doktorantka rozumie pod pojęciami: „przypadki szczepów”, „preparaty lecznicze”, „terapeutyki” „odporność”, „oporność”, „błony komórkowe”, „dawka, stężenie, poziom” w odniesieniu do antybiotyku/chemioterapeutyku?

Doktorantka stosuje niewłaściwe określenia, np. „infekcja”, „substancje chemiczne produkowane przez drobnoustroje”, „produkcja czynników wirulencji”, „terapia”, „powodują

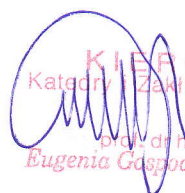
zakażenia”, „spektrum”, „mechanizm patogenezы angażuje”, „szeroko rozpowszechniony” „płukano”. Brak też konsekwencji w opisach, np. h/godziny, min/minuty.

Ponadto, skróty wprowadza się wraz z pierwszym zastosowaniem pełnej nazwy i po to, by z nich konsekwentnie korzystać w dalszej części pracy. W tytułach nie powinno stosować się skrótów i stawiać na końcu kropki. W alfabecie polskim nie ma litery „α” i „β”, tak więc, nie „α–hemolizyny”, „β–laktamy”, a alfa-hemolizyny, beta-laktamy. Stosując nazwy gatunkowe drobnoustrojów zawsze za pierwszym razem ich użycia, podaje się pełną nazwę rodzajową i gatunkową. W pracach naukowych wartości % podaje się z jednym miejscem po przecinku.

Wszystkie uwagi szczegółowo zaznaczyłam w recenzowanym egzemplarzu rozprawy.

Podsumowując, wyniki uzyskane przez Doktorantkę mają walory zarówno poznawcze, jak i praktyczne. Stosowane różne metody badawcze, klasyczne, jak i nowoczesne do realizacji zaplanowanych doświadczeń, zastosowanie różnych obliczeń statystycznych w odniesieniu do uzyskanych wyników badań, umiejętność korzystania z piśmiennictwa i jego właściwy dobór do prowadzonej dyskusji na tle wyników własnych oraz formułowanie wniosków wynikających z własnych badań, świadczą o dobrym przygotowaniu Doktorantki do pracy badawczej.

Stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa doktorska **Pani mgr Lucyny Jabłońskiej**, p.t.: **„Wpływ preparatów przeciwbakteryjnych w stężeniach subinhibicyjnych na antybiotykooporność i wirulencję *Aeromonas* spp., *Enterobacter hormaechei* i *Escherichia coli*”** spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przedstawionym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku O stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, i dlatego z pełnym przekonaniem wnoszę do Wysockiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie **Pani mgr Lucyny Jabłońskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Mikrobiologii  
prof. dr hab. n. med.  
Eugenia Gospodarek-Komkowska