Łódź, 10.08.2023

Prof. dr hab. Adam Jaworski
Emerytowany profesor zw. Uniwersytetu Łódzkiego
telefon: 607-356-577

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Anny Kawalec zatytułowanej „Charakterystyka fenotypowa i molekularna szczepów z rodzaju *Lactobacillus* jako podstawa opracowania możliwości farmakoterapii ginekologicznej”.

Praca doktorska mgr inż. Anny Kawalec została wykonana w Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Jana Bobra w Krakowie. Promotorem pracy był prof. dr hab. Wiesław Barabasz, a funkcję promotora pomocniczego spełniała dr Anna Białecka. Oceniana praca doktorska ma postać bardzo obszernej monografii (122 stron wydruku komputerowego), obejmującej 8 podstawowych rozdziałów: *Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Streszczenie w języku polskim*. Jako doświadczony recenzent prac doktorskich i habilitacyjnych wiem, że taka forma prac doktorskich i habilitacyjnych jest wciąż stosowana, ale w ostatnich kilkunastu latach większość ocenianych przeze mnie rozpraw miała postać zbioru opublikowanych prac doświadczalnych i autorskiego podsumowania najważniejszych uzyskanych wyników. Osobiście preferuję doktoraty, habilitacje w postaci opublikowanych prac doświadczanych, a jeżeli z jakiegoś powodu było to niemożliwe, to oczekiwałem chociażby dobrze opracowanego streszczenia w języku angielskim.

Nie jestem lekarzem, ale z zainteresowaniem przeczytałem bardzo dobrze opracowany wstęp, w którym w oparciu o obficie cytowane dane literaturowe Doktorantka przedstawiła informacje na temat aktualnej systematyki bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (NCB, z 2021 roku), scharakteryzowała mikrobiotę pochwy, jako bardzo złożony ekosystem, który podlega zmianom w składzie i spełnianej funkcji w zależności od wielu uwarunkowań fizjologicznych kobiety oraz różnych uwarunkowań środowiskowych. Omówiła rolę szczepów fermentacji mlekowej w ochronie dróg rodnych kobiet przed zakazaniem bakteriami patogennymi i grzybami. Stwierdza, że łatwa kolonizacja i dominacja bakterii kwasu mlekowego są podstawową cechą zdrowego mikrobiomu dróg rodnych kobiet. Ważna część wstępu, ściśle związana z tematem i celami pracy doktorskiej, jest poświęcona alternatywnej, niekonwencjonalnej farmakoterapii. Szybko narastająca oporność bakterii na większość stosowanych antybiotyków jest w obecnych czasach poważnym problemem. Trwają więc poszukiwania skutecznej i bezpiecznej terapii z wykorzystaniem szczepów bakterii kwasu mlekowego. Jak pisze Doktorantka, Polskie Towarzystwo Ginekologów i Położników wprowadziło w 2020 roku rekomendacje, które wskazują 7 związków o działaniu antybakteryjnym, wśród nich bakterie kwasu mlekowego, które powinny być stosowane w leczeniu bakteryjnych stanów zapalenia pochwy. W końcowej części Doktorantka omawia, z dużym znawstwem, fenotypowe i molekularne metody identyfikacji bakterii mlekowych i ich różnicowania w obrębie rodzaju, gatunku, a nawet szczepów o określonych właściwościach fenotypowych. Przywołuje wytyczne FAO/WHO zalecające stosowanie nowoczesnych i wiarygodnych metod identyfikacji i różnicowania bakterii.

Cele pracy doktorskiej mgr inż. Anny Kawalec, przedstawione na 20-tej stronie monografii, zrozumiałem jako ważne cele etapowe o charakterze poznawczym, na

drodze realizacji dwóch celów kierunkowych: po pierwsze, stworzenia unikatowego banku bardzo dobrze scharakteryzowanych szczepów bakterii mlekowych, izolowanych z wymazów pochwy od 350 pacjentek, po drugie, opracowanie strategii terapii zakażeń bakteryjnych dróg rodnych kobiet, przy pomocy celowo dobranych zespołów określonych szczepów, charakteryzujących się pożądanymi cechami fizjologiczno-biochemicznymi, zgodnymi z wytycznymi FAO/WHO. Ważnym, niejako „warsztatowym" celem pracy było także porównanie trzech molekularnych metod gatunkowej identyfikacji szczepów *Lactbacillus:* MALDI–TOF, sekwencjonowania podjednostki 16S rRNA oraz testu biochemicznego API 50 CH.

Jeżeli dobrze zrozumiałem temat i cele pracy doktorskiej mgr inż. Anny Kawalec, to moja ocena będzie dotyczyć wyników uzyskanych w realizacji 3 celów etapowych:

1. **Ustalenia różnorodności gatunkowej i szczepowej *Lactobacillus* spp w kolekcji 104 czystych kultur bakterii mlekowych wyizolowanych z pobranych wymazów dróg rodnych kobiet.**
2. **Fenotypowej, biochemicznej i molekularnej charakterystyki zidentyfikowanych gatunków *Lactobacillus* spp.**
3. **Analizy lekooporności badanych szczepów *Lactobacillus* spp.**

Sądzę, że kierunkowe cele, wspomniane w tytule ocenianej pracy doktorskiej i szerzej dyskutowane w świetnie napisanej dyskusji pracy doktorskie będą realizowane w ramach nowego, poważnego projektu badawczego np. pracy habilitacyjnej. Czy mam rację?

Nie mam uwag krytycznych do części metodycznej pracy. Realizacja celów pracy została bardzo dobrze zaplanowana. Kolejne doświadczenia izolacji, hodowli, badań makroskopowych i mikroskopowych bakterii mlekowych prowadzono zgodnie z obwiązującymi w badaniach mikrobiologicznych procedurami. Do specjalistycznych badań identyfikacji gatunkowej 104 szczepów, ich zróżnicowania genetycznego i charakterystyki właściwości biochemicznych wprzęgnięto nowoczesną, specjalistyczną aparaturę i zaawansowane programy bioinformatyczne do analizy „morza" uzyskanych danych, a także dobrze dobrane metody molekularne, biochemiczne i mikrobiologiczne. W szczególności chciałbym wymienić nowoczesną, niezwykle precyzyjna metodę spektometrii masowej typu MALDI–TOF do identyfikacji i różnicowania badanych szczepów, sekwencjonowania, technikę sekwencjonowania podjednostki 16S rRNA, test biochemiczny API 50 CH do badania metabolizmu węglowodanów, umożliwiający także identyfikację części badanych gatunków *Lactobacillus spp.*

Wyrażam przekonanie, że uzyskane wyniki przy zastosowaniu nowoczesnych „narzędzi" i tak bogatego warsztatu badawczego, poddane dodatkowo zaawansowanej analizie bioinformatycznej, bardzo dobrze udokumentowane w monografii, są w pełni wiarygodne.

Mam trzy pytania do Doktorantki, dotyczące organizacji przeprowadzonych, wieloletnich i bardzo kosztownych badań poznawczych. Po pierwsze, Doktorantka pisze, że identyfikacja szczepów przy pomocy spektrometru mas typu MALDI=TOFi była wykonana w Laboratorium Mikrobiologii Jagiellońskiego Centrum Innowacji, zaś sekwencjonowanie DNA w Centrum Badań DNA w Poznaniu.

Chciałbym zapytać mgr inż. Annę Kawalec, czy te analizy przeprowadzono w ramach współpracy naukowej, czy też odpłatnej usługi? Ja osobiście preferuję dobrze ułożoną współpracę naukową, bo przynosi korzyści obu stronom oraz wzbogaca warsztat naukowy i wiedzę. Drugie pytanie dotyczy źródeł finansowania tych ponad 10-letnich badań poznawczych i diagnostycznych mikrobiomu dróg rodnych kobiet. Chciałbym także zapytać o udział innych pracowników naukowych, pracowników Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek, w realizacji niektórych eksperymentów, czy analiz wyników opisanych w JEJ pracy doktorskiej.

Przechodząc do oceny uzyskanych wyników, bardzo dobrze udokumentowanych i krytycznie opisanych w monografii doktorskiej oświadczam, że nie jestem w stanie ocenić szczegółowo wszystkich, powiedziałbym „morza" wyników, ponadto nie dostrzegam takiej potrzeby. Ograniczę swoją opinię do tych wyników, które uznałem, po pierwsze, za najważniejsze, nowe o charakterze poznawczym i otwierające możliwość formułowania nowych, interesujących badań poznawczych. Po drugie, za ważne uznaję także wyniki, które, moim zdaniem, stwarzają szansę opracowania w niezbyt odległym czasie nowego preparatu/probiotyku, w postaci konsorcjum celowo dobranych szczepów bakterii mlekowych dla farmakoterapii ginekologicznej.

Dużym osiągnięciem mgr inż. Anny Kawalec, opisanym w pracy doktorskiej, jest stworzenie unikatowego banku 104 szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* spp. izolowanych z dróg rodnych kobiet, wszechstronnie scharakteryzowanych na poziomie ich właściwości fenotypowych i genotypowych. Zastosowane nowoczesne techniki pozwoliły zidentyfikować, z wysoką pewnością 12 gatunków, wśród których 4 gatunki okazały się dominujące: *L. crispatus , L. gaserii, L. iners, L. Jensenie* (po 20 szczepów każdego gatunku.) Analiza wygenerowanych dendrogramów uwidoczniła bardzo duże zróżnicowanie gatunkowe badanej kolekcji, a także pozwoliła na ustalenie pokrewieństwa między badanymi szczepami. Co ciekawe, okazało się, że w dendrogramie *L. crispatus* znajdują się dwie grupy bardzo blisko spokrewnionych szczepów, zaś w dendrogramie *L. gaserii* jedna grupa dominująca i jeden spokrewniony szczep.

Za bardzo ważne uznaję wyniki, które wskazują, że technika MALDI-TOF jest wiarygodną metodą identyfikacji rodzajowej i gatunkowej bakterii, głębokiego różnicowania szczepów wewnątrz gatunków, a także ustalania filogenetycznego pokrewieństwa w obrębie gatunków i szczepów. Niestety z racji bardzo dużych kosztów aparatury i oprogramowanie, technika ta nie jest jeszcze dostępna w diagnostyce klinicznej, epidemiologii, ekologii, czy filogenezie świata bakterii. Pouczające są wyniki porównania tej techniki z biochemiczną metodą API 50 CH, przedstawione w tabeli 14. I tak, identyfikacja gatunkową z wysoką pewnością uzyskano dla 53 %, szczepów badanej kolekcji, z niską pewnością dla 25 %, natomiast przy zastosowaniu techniki MALDI-TOF, odpowiednio 98% i 6%. Zrozumienie wyników i końcowego wniosku, dotyczącego porównanie stopnia poprawności identyfikacji gatunkowej szczepów badanej kolekcji, techniką MALDI-TOF i metodą sekwencjonowania podjednostki 16S rRNA, nastręczyło mi pewnych trudności. Na stronie 85 Doktorantka pisze cyt. *"Analizy z użyciem sekwencjonowania potwierdziły poprawność identyfikacji spektrometrii mas MALDI-TOF".* Porównując wyniki identyfikacji techniką MALDI-TOF, przedstawione w tabeli 6 dla 104 szczepów, z wynikami identyfikacji metodą sekwencjonowania, przedstawionymi w tabeli 15 dla 12 wybranych szczepów tej kolekcji, nie DOSTRZEGAM zgodności nawet dla jednego szczepu. Pytam więc, czy numeracja szczepów w tych 2 tabelach jest odmienna, czy, być może, czegoś nie rozumiem?

Doceniam wkład pracy mgr inż. Anny Kawalec w badania enzymatycznych uzdolnień 104 szczepów. W testach biochemicznych sprawdziła zdolność wszystkich szczepów do rozkładu, wykorzystania 49 węglowodanów. W tabelach nr. 10, 11, 12 przedstawiła „morze" wyników, które, jak rozumiem, są bazą danych i mogą być bardzo przydatne w analizie bardziej ogólnych właściwości biologicznych poszczególnych gatunków i szczepów w zgromadzonej kolekcji bakterii mlekowych. Podobnie oceniam wyniki badań produkcji nadtlenku wodoru, przedstawione w tabeli nr 19. Okazało się, że wszystkie badane gatunki *Lactobacillus* mają zdolność produkcji nadtlenku wodoru. Większość szczepów w obrębie gatunków *L. crispanus i L. jensenii* charakteryzuje się bardzo wysoką lub wysoką zdolnością produkcji nadtlenku wodoru. Ciekawe, że zaledwie 2 szczepy gatunku *L. inners* takiej zdolności nie posiadały.

W tym miejscu chciałbym zapytać, czy jest możliwość podporządkowania niektórych uzdolnień biochemicznych badanych gatunków i szczepów do większej lub mniejszej zdolności kolonizacji dróg rodnych kobiet? Czy istnieje jakaś korelacja między aktywnością enzymatyczną gatunków i szczepów a składem mikrobiomu dróg rodnych Polek, w którym dominują w równym stopniu, jak wykazała Doktorantka, 4 gatunki, zaś 8 gatunków stanowi bardzo niewielką jego część składową?

W charakterystyce właściwości bakterii niezwykle ważnym jest ustalenie ich oporności na antybiotyki, sulfonamidy i inne leki. Stąd, z uwagą analizowałem wyniki przedstawione w rozdziale 4.9 (tabela nr 20 i rys. 49), z racji przyszłych zastosowań badanych szczepów jako probiotyków. Doktorantka zbadała oporność 40 szczepów należących do 4 dominujących gatunków w badanej kolekcji, na 8 najczęściej stosowanych antybiotyków terapii klinicznej: wankomycynę. kandamycynę, streptomycynę, erytromycynę, klindamycynę, tetracyklinę, chloramfenikol i ampicylinę. Uzyskane wyniki oceniam jako bardzo interesujące. Okazało się, że wszystkie badane szczepy, należące do 4 dominujących gatunków (*L. crispatus, L jensenii, L. gasseri, L. iners.)* są wrażliwe jedynie na ampicylinę i gentamycynę. Natomiast dla pozostałych antybiotyków ujawniono bardzo różne profile oporności dla różnej liczby szczepów badanych gatunków.

Badania oporności na antybiotyki zostały wykonane przydatną, ale prostą metodą oceny wartości minimalnych stężeń hamujących wzrost bakterii (MIC). Proponuję uzupełnienie tych bardzo ważnych badań głębszymi metodami molekularnymi, które pozwolą na ustalenie lokalizacji genów lekooporności w komórkach badanych szczepów baterii mlekowych (plazmidy, fagi, chromosomy), oraz ich locus (transpozony, integrony). Będzie to konieczne, by wykluczyć z planowanych probiotyków szczepy zdolne do łatwej, szybkiej, horyzontalnej transmisji genów wysokiej oporności na antybiotyki

W podsumowaniu oceny rezultatów pracy doktorskiej mgr inż. Anny Kawalec stwierdzam, że uzyskane wyniki zostały bardzo dobrze udokumentowane w postaci ładnych, czytelnych rysunków, tabel i wykresów. Zwarty opis kolejnych wyników, bez zbędnych komentarzy, pozwala czytelnikowi na własną ocenę ich wartości naukowej. Sformułowane 4 wnioski końcowe oceniam jako w pełni uprawnione. Cele pracy zostały w pełni zrealizowane. Zabrakło mi jednak wniosku wskazującego na dużą aplikacyjną wartość uzyskanych wyników o charakterze poznawczym.

Bardzo wysoko oceniam świetnie napisaną, obszerną *Dyskusję*, która po niewielkich poprawkach, uzupełnieniach, powinna być opublikowana w postaci artykułu poglądowego w jednym z specjalistycznych polskich lub zagranicznych czasopism naukowych. Ostatni akapit tej dyskusji zaczynający się od zdania cyt. *"Szeroko*

udokumentowana rola gatunków Lactobacillus, zasiedlających drogi rodne kobiet jest niepodważalna.” **oraz kolejne zdania i myśli są syntetycznym, bardzo trafnym podsumowaniem własnych wyników na tle dokonań światowych oraz przemyślanym planem dalszych badań, które muszą być zrealizowane, by osiągnąć cel, jakim jest opracowanie nowego, bezpiecznego probiotyku dla farmakoterapii ginekologicznej. Dodam, że cytowana w monografii doktorskiej mgr inż. Anny Kawalec *Literatura* jest obfita (118 pozycji) i dobrze dobrana, w dużej części z ostatnich 5-10 lat.**

Wnioski końcowe

W świetle wyżej przedstawionej bardzo pozytywnej oceny całej monografii doktorskiej mgr inż. Anny Kawalec stwierdzam z całym naukowym przekonaniem, że praca doktorska mgr inż. Anny Kawalec spełnia wszystkie warunki określone w art. 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2023 roku o stopniach naukowych oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2017 r., poz. 1789 z pożn. zm.). Stwierdzam, że mgr inż. Anna Kawalec jest już doświadczoną naukowczynią, bardzo dobrze przygotowaną do pracy naukowej w dziedzinie mikrobiologii klinicznej i mikrobiologii molekularnej.

Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne UJ o dopuszczenie mgr inż. Anny Kawalec do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę także o rozważenie możliwości wyróżnienia pracy doktorskiej mgr inż. Anny Kawalec stosowną nagrodą za osiągnięcie naukowe jakim jest stworzenie unikatowej w Polsce dużej kolekcji wszechstronnie scharakteryzowanych szczepów bakterii mlekowych, izolowanych z dróg rodnych 350 kobiet. Wyrażam pogląd, że Zgromadzona kolekcja tych szczepów umożliwi opracowanie w niezbyt odległym czasie nowego probiotyku bardzo przydatnego w terapii bakteryjnych i grzybowych infekcji dróg rodnych kobiet. Dodam, że część wyników opisanych w pracy doktorskiej została upowszechniona w obiegu naukowym w postaci 4 prac doświadczalnych opublikowanych w specjalistycznych czasopismach naukowych.

Prof. dr hab. nauk biologicznych Adam Jaworski