Recenzja rozprawy doktorskiej na stopień doktora
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

Pani mgr inż. Anny Kawalec

pt. "Charakterystyka fenotypowa i molekularna szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jako podstawa opracowania możliwości farmakoterapii ginekologicznej"

Promotor: prof. dr hab. Wiesław Barabasz
Promotor pomocniczy: dr Anna Białecka

Od wielu lat jednym z ważnych problemów zdrowotnych u kobiet są zakażenia układu moczowo-płciowego. Tym bardziej, że często mają one charakter przewlekły, trudny w leczeniu ze skłonnością do nawrotów. Najczęściej dochodzi do infekcji pochwy, tj. bakteryjnego zapalenia pochwy (BV, bacterial vaginosis), drożdżakowego zapalenia sromu i pochwy oraz zakażenia spowodowanego przez rzęsistki *Trichomonas vaginalis*. Ogromną rolę w profilaktyce jak i w leczeniu infekcji oraz zapobieganiu nawrotom zakażenia ma prawidłowa mikrobiota pochwy. Dlatego tak ważne jest poznanie składu mikrobiota pochwy, jego funkcjonowania i współzależności w warunkach fizjologicznych oraz zmienionych chorobowo. Oprócz konwencjonalnej antybiotykoterapii w leczeniu infekcji pochwy i zapobieganiu jej nawrotom stosowane są preparaty probiotyczne zawierające bakterie typowe dla prawidłowej mikrobioty pochwy. Głównym składnikiem probiotyków są bakterie kwasu mlekowego (LAB), w tym z rodzaju *Lactobacillus*.

Rozprawa doktorska Pani mgr Anny Kawalec wpisuje się w ten ważny i aktualny temat badawczy. Jako model badawczy Doktorantka wybrała szczepy bakterii z dawnego rodzaju *Lactobacillus*, które izolowała z wymazów z pochw pacjentek Centrum Badań Mikrobiologicznych i Autoszczepionek im. Jana Bobra w Krakowie, gdzie wykonywana była praca prezentowana w niniejszym przewodzie doktorskim. Wstępnej analizie poddano 350 wymazów z pochw, dla których przeprowadzono ocenę stopnia czystości pochwy wg Kuczyńskiego w modyfikacji Kasprowicza. Do badań w przedstawionej rozprawie doktorskiej Pani mgr A. Kawalec wyselekcjonowała 120 próbek materiału klinicznego reprezentujących stopnie fizjologiczne czystości pochwy, od 0/I do II. W ocenie mikroskopowej tych wymazów widoczne były jedynie bakterie LAB (stopnie czystości 0/I, I oraz I/II od łącznie 44 kobiet) lub bakterie LAB z pojedynczymi innymi bakteriami i/lub grzybami (stopień czystości II od 76 kobiet).

Rozprawa doktorska przedstawiona jest w formie tradycyjnej – wszystkie materiały zebrano w pisemnym opracowaniu. Rozprawa doktorska liczy 122 stron druku, a jej układ jest typowy. Napisana jest w przystępny sposób, a jej logiczny układ ułatwia czytelnikowi śledzenie realizacji celów postawionych w pracy oraz analizę uzyskanych wyników. Niezmiernie cenne są tabele zawierające bezpośrednio odczytane wyniki dla wszystkich izolatów, co znacznie ułatwia śledzenie przeprowadzonej przez Doktorantkę analizy tych danych i ich interpretacji. Pomocny jest także załączony na początku rozprawy wykaz Skrótów stosowanych w pracy.

W 14-stronnicowym Wstępie do rozprawy Doktorantka rzeczowo przedstawia aktualną wiedzę dotyczącą czterech zagadnień ściśle związanych z tematyką pracy: (I) przedstawia systematykę bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wymieniając gatunki istotne

klinicznie, (II) analizuje skład mikrobioty pochwy kobiet zdrowych i w czasie toczącego się zakażenia, (III) porusza problem antybiotykoterapii i stosowania preparatów probiotycznych w leczeniu zakażeń pochwy, w tym probiotyków zawierających LAB oraz (IV) charakteryzuje metody fenotypowe i molekularne stosowane w identyfikacji bakterii LAB. Wstęp stanowi dobre teoretyczne wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej i w pełni uzasadnia wybór tematyki badawczej pracy.

Doktorantka postawiła trzy cele (a według Recenzenta dwa cele) w prezentowanej rozprawie doktorskiej:

(I) Analizę różnorodności gatunków szczepów *Lactobacillus* sp. występujących w mikrobiomie pochwy kobiet w okresie rozrodczym, poprzez ich identyfikację;

(II/III) Scharakteryzowanie profilu fenotypowego (w tym biochemicznego i lekowrażliwości) oraz profilu molekularnego szczepów w obrębie gatunków z rodzaju *Lactobacillus*.

Postawione cele w pełni odzwierciedlają pierwszą część tytułu rozprawy doktorskiej tj. „Charakterystyka fenotypowa i molekularna szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* jako podstawa opracowania możliwości farmakoterapii ginekologicznej". Według Recenzenta zabrakło w pracy celu, który obejmowałby analizę uzyskanych przez Doktorantkę wyników pod kątem zaproponowania nowej terapii zawierającej szczepy wyizolowane w niniejszej pracy doktorskiej jak sugeruje druga część tytułu rozprawy – proszę Doktorantkę o komentarz w tej sprawie.

Część eksperymentalna rozprawy doktorskiej została wykonana prawidłowo. Eksperymenty zostały zaplanowane logicznie z jasno postawionym celem. W rozdziale nr 3. Materiały i Metody, przedstawiono szczegółowo metodykę wykorzystaną przez Panią mgr A. Kawalec w rozprawie doktorskiej, z wyjątkiem podrozdziału 3.4.1.5. dotyczącego sekwencjonowania 16 S rRNA. Bardzo proszę Doktorantkę o przedstawienie swojego udziału w tym etapie pracy i uszczegółowienie metodyki którą wykonywała.

Ponadto na potrzeby pracy Doktorantka opracowała Kartę Charakterystyki dla każdego badanego szczepu *Lactobacillus* sp., która zawierała następujące informacje: wywiad zebrany od pacjentek, adnotacje o pobraniu dodatkowego materiału, stopień czystości pochwy, ocenę morfologii kolonii na podłożach PK i MRS, szczegółowe wyniki testów API 50 CH i ostateczny wynik identyfikacji tą metodą, wynik identyfikacji przy użyciu systemu MALDI-TOF, wyniki sekwencjonowania, dane o zdolności do produkcji nadtlenku wodoru oraz antybiogram. Zebranie takich spersonalizowanych danych o każdym szczepie uważam za bardzo cenne i o dużym potencjale wykorzystania w przyszłości do dalszych badań naukowych.

W recenzowanej pracy doktorskiej zastosowano cały szereg metod zarówno:

(1) cytologiczno-mikrobiologicznych (tj. mikroskopowa ocena stopnia czystości pochwy, izolacja bakterii z wymazu z pochwy poprzez posianie materiału klinicznego na szereg podłoży, identyfikacja gatunkowa bakterii przy użyciu testów API 50 CH i analiza danych z tych testów dotyczących szerokiego panelu cech biochemicznych badanych szczepów, badanie zdolności szczepów do wytwarzania nadtlenku wodoru, określenie profili lekooporności szczepów metodą E-testów),

(2) mikrobiologiczno-molekularnych (tj. identyfikacja izolatów w spektrofotometrze mas typu MALDI-TOF i analiza danych z tych testów dotyczących rozkładu widm białek bezpośrednio w komórce bakteryjnej, w tym utworzenie dendrogramów i macierzy korelacji CCI; sekwencjonowanie 16S rRNA i analiza otrzymanych danych),

(3) statystycznych (szereg testów np. test ANOVA czy test niezależności chi-kwadrat).

Stosowanie rozmaitych, poprawnie dobranych metod świadczy o dobrym opanowaniu warsztatu badawczego i umiejętności jego wykorzystania przez Doktorantkę.

Doktorantka prowadziła badania na 111 szczepach, które wyizolowała z 120 wymazów z pochw kobiet. Pomimo podania w rozdziale 3.4.1.2. szeregu podłoży, których użyto w pracy do posiewu pobranego materiału klinicznego, to w Wynikach nie opisano dokładnie, na których z nich wyrosły i o jakiej morfologii kolonie szczepów z rodzaju *Lactobacillus*. Czy była widoczna mikrobiota towarzysząca? Z których podłoży wybrano i na jakiej podstawie, izolaty do dalszych badań identyfikacyjnych? Bardzo proszę Doktorantkę o przedstawienie na obronie tej części wyników pracy, w połączeniu z informacją o stopniu czystości pochwy danego materiału klinicznego.

Uzyskane w pracy wyniki Doktorantka przedstawiła w 16 tabelach, na 31 rycinach i na 5 fotografiach. Jednakże tabela nr 7. nie zawiera wyników ale zasady interpretacji, i powinna być podana w rozdziale Materiały i Metody. Ponadto w przypadku małej liczby badanych szczepów z danego gatunku nie powinno podawać się wyników w procentach ale w liczbie szczepów, które posiadają daną cechę np. na rycinie nr 49. Generalnie wszystkie tabele, ryciny i fotografie zawarte w pracy są czytelne oraz pomocne w interpretacji uzyskanych przez Doktorantkę wyników.

Dokładna analiza uzyskanych wyników oraz ich skondensowana dyskusja na 10 stronach rozprawy doktorskiej, połączona ze wskazaniem uzyskanych przez innych badaczy rezultatów, została przeprowadzona w sposób poprawny, z analizą dostępnego piśmiennictwa przedmiotu. Zacytowane piśmiennictwo jest aktualne, obszerne, i obejmuje 118 artykułów oraz dwie strony internetowe.

W rozdziale nr 6. Wnioski, postawione przez Doktorantkę w czterech punktach wnioski uważam za niepełne. Bardzo proszę Doktorantkę aby je uzupełniła i przedstawiła na obronie pracy doktorskiej pełne wnioski wypływające z tych 4 punktów podsumowania wyników które podaje na str. 113.

W rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Anna Kawalec w wyniku wykonanych eksperymentów i przeprowadzonej analizy uzyskała szereg interesujących wyników. Za najcenniejsze elementy rozprawy doktorskiej uważam:

1. Izolację, identyfikację do poziomu gatunku i charakterystykę dużej puli 104 szczepów z rodzaju *Lactobacillus* z wymazów z pochw zdrowych kobiet. Badanie pokrewieństwa izolatów przy wykorzystaniu widm białek z systemu MALDI-TOF pokazało różnice między szczepami w obrębie danego gatunku jak i różnice między poszczególnymi gatunkami. Natomiast wykazanie zdolności produkcji nadtlenku wodoru przez większość otrzymanych szczepów jest ważną informacją o spełnieniu warunku wytwarzania związków przeciwbakteryjnych przez szczepy kliniczne LAB, pod kątem prowadzenia dalszych badań nad możliwością ich zastosowania jako szczepów probiotycznych.
2. Niezmiernie ważnym aspektem pracy było badanie lekowrażliwości metodą E-testów i wyznaczenie wartości MIC dla szczepów reprezentujących 4 najliczniej wyizolowane gatunki, po 10 szczepów z każdego gatunku. Łącznie dla 40 szczepów określono ich profile wrażliwości na antybiotyki i chemioterapeutyki. Dobór antybiotyków do badania i zasady interpretacji uzyskanych wyników Doktorantka przeprowadziła zgodnie z zaleceniami EFSA. Doktorantka wykazała najczęściej występującą oporność na chloramfenikol u 10/10 szczepów *L. gasseri*, klindamycynę u 5/10 i kanamycynę u 4/10 szczepów z w/w gatunku, a także na wankomycynę u 5/10 szczepów *L. crispatus*. U żadnego z 40 wytypowanych do badań szczepów nie stwierdzono oporności jedynie na ampicylinę i gentamycynę. Pomimo, iż wymagania FAO/WHO dla szczepów probiotycznych nie zawierają informacji o ich pożądanych profilach lekowrażliowści to niezmiernie ważne jest określenie lekowrażliwości szczepów i mechanizmów ewentualnej lekooporności. Występowanie w obrębie

ruchomych elementów genetycznych genów warunkujących oporność na leki praktycznie wyklucza dany szczep jako potencjalny drobnoustrój probiotyczny.

Bardzo proszę Doktorantkę aby wyjaśniła nasuwające się wątpliwości i odpowiedziała na następujące pytania:

1. W pracy Doktorantka wykonywała na bieżąco izolację bakterii z próbek materiału klinicznego pobieranego w latach 2012 – 2023. Czy nie była konieczna zgoda komisji bioetycznej?
2. Bardzo proszę o komentarze i odpowiedzi na wcześniej zadane pytania w tej recenzji rozprawy doktorskiej.
3. Jaki schemat postępowania proponuje Doktorantka aby prawidłowo przeprowadzić ocenę bioróżnorodności mikrobiota pochwy i efektywnie wyizolować bakterie z grupy LAB.
4. Na rycinie nr 1. Doktorantka przedstawia systematykę bakterii z rodzaju *Lactobacillus* podając nazwy gatunkowe w oparciu o dane z NCBI. Bardzo proszę Doktorantkę o pokazanie na slajdzie zmienionej systematyki zaprezentowanych na rycinie gatunków. Zmiany w systematyce zostały opublikowane przez Zheng i wsp. *I. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2020, 70, 2782-2858.
5. W rozdziałach Wyniki, jak i Dyskusja, Doktorantka podaje jedynie wyniki rozkładu cukrów odczytane z testów API 50 CH. Bardzo proszę o krótką dyskusję tego elementu pracy. Jakie znaczenie mają te wyniki dla fenotypowej charakterystyki gatunków w obrębie rodzaju *Lactobacillus*?
6. W rozdziale Wyniki na Rycinie nr 46. Doktorantka pokazuje jak wyglądała produkcja nadtlenku wodoru przez badane szczepy i jej ocenę w skali +++, ++, +, –. Natomiast w tabeli nr 19. Doktorantka zastosowała jedynie skalę 0/1 przy określeniu tej cechy. Bardzo proszę o podanie wyników w pełnej skali poczynając od produkcji na +++.

Ponadto rozprawa doktorska zawiera liczne drobne uchybienia, nieprawidłowości stylistyczne zdań, niepoprawne sformułowania, określenia żargonowe oraz skróty myślowe.

Jednakże przedstawione powyżej uwagi nie umniejszają zasadniczej zawartości merytorycznej pracy, którą oceniam pozytywnie.

Wniosek:

W oparciu o powyższą recenzję, stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Kawalec spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień doktora zgodnie z art. 13 ust. 1 Ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce" z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r., poz. 1789 z późn. zm.) w związku z art.179 ust. 3 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. oraz wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne, Wydziału Farmaceutycznego, Uniwersytetu Jagiellońskiego – Collegium Medicum w Krakowie o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Kawalec do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Warszawa, dnia 08.09.2023 r.

Warszawski Uniwersytet Medyczny
Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
i Bioanalizy
A. Laudy
dr hab. n. farm. Agnieszka E. Laudy