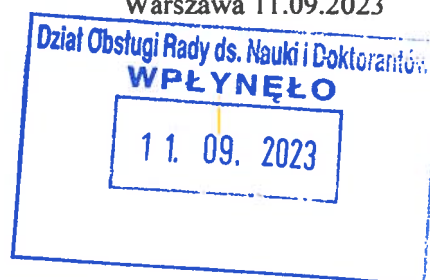


Dr hab. Aneta Agnieszka Bartosik
Pracownia Segregacji DNA i Cyklu Życiowego Proteobakterii
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Pawińskiego 5a
02-106 Warszawa
e-mail: aneta2@ibb.waw.pl
tel.: (+48 22) 592 1212

Warszawa 11.09.2023



Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani magister Alicji Słoczyńskiej pt.

„Udział karbapenemaz i pomp MDR w oporności szczepów klinicznych *Acinetobacter baumannii* na karbapenemy”

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Alicji Słoczyńskiej stanowi podstawę ubiegania się w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Badania opisane w pracy zostały wykonane w Zakładzie Mikrobiologii Farmaceutycznej i Bioanalizy Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM), pod opieką naukową dr hab. Agnieszki Ewy Laudy. Podjęta w pracy tematyka stanowi ważny z diagnostycznego, terapeutycznego, epidemiologicznego punktu widzenia i dobrze rozwijający się nurt badań naukowych prowadzonych w grupie promotora pracy. O istotności podjętej tematyki świadczy fakt, że badania te uzyskały dwukrotnie finansowanie w ramach wewnętrznych projektów badawczych WUM „Młodzi Naukowcy” w roku 2016 (FW15/PM2/16) oraz 2018 (FW15/PM1/18). Co ważne Doktorantka pełniła rolę kierownika, jak i głównego wykonawcy projektów. Prowadząc badania Pani mgr Alicja Słoczyńska mogła korzystać z doświadczenia, wiedzy i bogatego zaplecza badawczego stworzonego przez opiekuna pracy, współpracowników i uczelnię. Część prac opisanych w rozprawie wykonana została także w ramach stażu programu Erasmus+ odbytego w 2016 roku w Wielkiej Brytanii w laboratorium National Infection Service (Public Health England, Porton Down, Salisbury) pod opieką dr Matthew Wanda.

Ważnym problemem współczesnej medycyny jest walka z drobnoustrojami wywołującymi infekcje, które nie mogą być wyleczone ze względu na brak skutecznych terapeutyków. Rosnące i nieumiejętne wykorzystanie antybiotyków w leczeniu, jak i produkcji żywności, hodowli zwierząt doprowadziło do powstania szczepów bakterii opornych na wiele dotychczas stosowanych antybiotyków. W szpitalach narasta problem zakażeń związanych z występowaniem szczepów wielolekoopornych wywołujących infekcje trudne do wyleczenia, stwarzających ogromne niebezpieczeństwo dla osób po operacjach, o obniżonej odporności czy przewlekle chorych. Do

najczęściej izolowanych bakterii wielolekoopornych należą *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* sp., określane jako patogeny *ESKAPE*, które „uciekają” (ang. *escape*), nie poddają się działaniu antybiotyków, ze względu na wykształconą oporność, a wywoływane przez nie infekcje są bardzo trudne do wyleczenia. Niewrażliwość bakterii na stosowane antybiotyki i ich narastająca wielolekooporność związane są z ewolucją bakterii i wykształceniem mechanizmów oporności umożliwiających przeżycie bakterii w obecności związków przeciwdrobnoustrojowych. Mechanizmy oporności można generalnie podzielić na wewnętrzne (wrodzone, naturalne) oraz nabyte. Do pierwszych zaliczyć można niską przepuszczalność błony zewnętrznej, występowanie pomp umożliwiających usunięcie antybiotyków z komórki czy też produkcję enzymów inaktywujących antybiotyki. Do drugich należą nabyte mutacje w genach chromosomalnych warunkujące lub zwiększające oporność na antybiotyki lub pozyskiwanie genów warunkujących oporność na drodze horyzontalnego transferu często z udziałem ruchomych elementów genetycznych. Ten ostatni typ jest szczególnie niebezpieczny ze względu na możliwość rozprzestrzeniania się wśród różnych gatunków bakterii, które mogą współwystępować w środowisku szpitalnym i być przyczyną trudno wyleczalnych infekcji i stanowić w dalszych etapach źródło rozprzestrzeniania się szczepów wielolekoopornych.

Acinetobacter baumannii jest jedną z najczęściej izolowanych bakterii wielolekoopornych wśród pacjentów szpitali, a stosowane przez lata w kuracjach karbapenemy (imipenem, meropenem), jako leki „ostatniej szansy”, stają się nieskuteczne. Głównym celem pracy doktorskiej Pani mgr Alicji Słoczyńskiej było określenie udziału w oporności *A. baumannii* na karbapenemy dwóch niezależnych mechanizmów opartego na działaniu karbapenemazy z rodziny CHDL (ang. *carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase*) oraz pomp błonowych MDR (ang. *multidrug resistance*).

Rozprawa doktorska Pani mgr Alicji Słoczyńskiej ma charakter hybrydowy, zawierając kopię trzech publikacji naukowych stanowiących jej podstawę, a także rozdziały charakterystyczne dla klasycznych rozpraw doktorskich jak: Wykaz skrótów, Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wprowadzenie, Założenia i cel pracy, Uzyskane wyniki i dyskusja, Podsumowanie, Wnioski, Piśmiennictwo. Dodatkowo na wstępie dysertacji dołączono opis dorobku naukowego Doktorantki, obejmujący pięć publikacji (w tym trzy stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej) oraz sześć doniesień na ogólnopolskich i międzynarodowych konferencjach. W rozprawie zamieszczono także Opinię Komisji Bioetycznej oraz oświadczenia współautorów o ich udziale w przygotowaniu publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

Recenzowana rozprawa doktorska obejmuje trzy spójne tematycznie artykuły naukowe: jeden przeglądowy opublikowany w 2015 roku w czasopiśmie *Postępy Mikrobiologii*, którego współczynnik oddziaływania IF wynosi 0,236 (15 pkt MEiN) oraz dwa oryginalne opublikowane w 2021 i 2023 roku w międzynarodowym czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences*, którego współczynnik oddziaływania IF wynosi 6,208 (140 pkt MEiN). Łączny współczynnik IF dla wszystkich pozycji to 12,652 (295 pkt MEiN).

Wszystkie trzy publikacje stanowiące podstawę dysertacji są wieloautorskie. Doktorantka jest w nich pierwszym autorem, a udział w przygotowaniu manuskryptów i przeprowadzonych badaniach wynosi 85% w przypadku pracy przeglądowej z 2015 roku, 65% w przypadku pracy oryginalnej z 2021 roku i 60% w pracy oryginalnej z 2023 roku. Można tym samym bez wahania uznać, że Pani mgr Alicja Słoczyńska była w nich wiodącym autorem i badaczem i zgodnie ze stosowną Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule z zakresu sztuki (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.), spełnia wymagane kryteria, stawiane aktualnie przed autorami rozpraw doktorskich. Potwierdzeniem tego faktu, jest opis wkładu współautorów prac, zamieszczony w prezentowanych publikacjach oryginalnych, a także dołączone oświadczenia współautorów, wskazujące na dominujący udział Pani mgr Alicji Słoczyńskiej w przygotowaniu i przeprowadzeniu kluczowych etapów części eksperymentalnej opisywanych badań, analizie i interpretacji uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów. Na uwagę zasługuje fakt, iż Doktorantka jest nie tylko pierwszym autorem, ale także autorem korespondencyjnym w przypadku pracy przeglądowej, co świadczy o jej zaangażowaniu, dużej wiedzy i świetnym rozeznaniu w podjętej tematyce badawczej i cennym naukowym zainteresowaniu, skłaniającym już na wczesnych etapach studiów doktoranckich do zaznajamiania się z literaturą naukową i zgłębiania tematyki podjętej w rozprawie doktorskiej, czego efektem było powstanie i wiodące współautorstwo pracy przeglądowej.

Tytuł rozprawy doktorskiej opisuje poruszaną tematykę i odzwierciedla cele i zakres badań. Praca jest napisana klarownie, syntetycznie i stanowi bardzo wartościową lekturę.

Wprowadzenie stanowi dobrze przemyślany wstęp do tematyki podjętej w pracy badawczej będącej podstawą rozprawy doktorskiej. Na 17 stronach, w zwięzły sposób Doktorantka opisała zagadnienia związane z opornością bakterii na antybiotyki, epidemiologią zakażeń i mechanizmami oporności na antybiotyki *A. baumannii*, ruchomymi elementami genetycznymi, które stanowią rezerwuar wysp oporności u *A. baumannii*. Osobny rozdział poświęcono także metodom wykorzystywanym w monitorowaniu zakażeń bakteryjnych, w tym tych wywoływanych przez szczepy *A. baumannii*, umożliwiającym genotypowanie w obrębie gatunku, takich jak: elektroforeza w zmiennym polu elektrycznym (PFGE), sekwencjonowanie genów metabolizmu podstawowego (MLST) czy sekwencjonowanie najnowszej generacji. Wprowadzenie było streszczeniem i uzupełnieniem wstępów publikacji oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, a także pracy przeglądowej, która sama w sobie stanowi znakomity wstęp do podjętej tematyki badawczej, ale z racji opublikowania jej w 2015 roku, we wprowadzeniu dysertacji znalazły się potrzebne odniesienia i dane pochodzące z najnowszych doniesień literaturowych i aktualnych danych epidemiologicznych.

Rozdział Założenia i cel pracy, zawiera właściwie sformułowane cele pracy, którymi było znalezienie przyczyn oporności na karbapenemy kolekcji izolatów klinicznych *A. baumannii* niewrażliwych na imipenem. W szczególności określenie udziału w oporności *A. baumannii* na karbapenemy dwóch niezależnych mechanizmów: opartego na działaniu karbapenemaz z rodziny CHDL oraz pomp błonowych MDR. Aby osiągnąć cel zaplanowano szczegółowe zadania badawcze obejmujące: wyselekcjonowanie szczepów *A. baumannii* do badań; charakterystykę

kolekcji szczepów pod kątem lekowrażliwości i genotypowania z wykorzystaniem metody PFGE, MLST, obecności sekwencji insercyjnych i genów kodujących karbapenemazy oraz pompy MDR i badanie ich aktywności metodami fenotypowymi, a także sekwencjonowanie pełnych genomów wybranych szczepów *A. baumannii* w poszukiwaniu mutacji genetycznych, które mogą mieć wpływ na oporność na karbapenemy, ze szczególnym uwzględnieniem regionu *adeRS-adeABC*, kodującego system regulatorowy AdeRS pompy błonowej AdeABC.

Materiały i metody wykorzystywane przez Doktorantkę zostały opisane w dwóch pracach oryginalnych włączonych do rozprawy doktorskiej. Wykorzystywane do realizacji zadań badawczych metody mikrobiologiczne, genetyczne i molekularne zostały szczegółowo opisane, umożliwiając odtworzenie warunków eksperymentów. Warto podkreślić, że zastosowane techniki i metody badawcze zostały umiejętnie dobrane i świadczą o bardzo dobrym warsztacie metodycznym Doktorantki.

Wyniki rozprawy doktorskiej wraz z dyskusją zawarte zostały na 14 stronach w rozdziale 8. Uzyskane wyniki i dyskusja. Rozdział ten stanowi syntezę i streszczenie oryginalnych prac wchodzących w skład dysertacji. Na stawiane cele Doktorantka systematycznie odpowiadała dobrze zaplanowanymi badaniami, których wyniki pozwalały na uzyskanie odpowiedzi i osiągnięcie postawionych celów. Uzyskane wyniki zostały starannie opracowane, syntetycznie opisane i przedyskutowane, stanowiąc podstawę dwóch opublikowanych prac oryginalnych z dobrze dobranymi figurami, wykresami i schematami ułatwiającymi ich analizę i percepcję. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały także przedyskutowane w oparciu o aktualny stan wiedzy, w odniesieniu do najnowszych osiągnięć i badań w poruszonym temacie, z odpowiednio dobraną i cytowaną literaturą. Dyskusja skupia się na podsumowaniu uzyskanych wyników i odniesieniu ich do najnowszych danych literaturowych i epidemiologicznych.

W pierwszej z dwóch publikacji oryginalnych będących podstawą rozprawy doktorskiej, Doktorantka badała 61 izolatów klinicznych *A. baumannii* pod kątem lekowrażliwości, podobieństwa genetycznego i obecności genów kodujących karbapenemazy oraz sekwencji insercyjnych, które mogły przyczynić się do występującej oporności na często stosowane karbapenemy (imipenem, meropenem). Badania pokazały, że wszystkie 61 izolatów *A. baumannii* niesie zlokalizowany chromosomalnie gen *bla_{OXA-51-like}*, który występuje naturalnie we wszystkich szczepach tej bakterii. Dodatkowo u 59 izolatów, wykryto obecność co najmniej jednego z nabytych genów kodujących oksycylinazy (OXA), jak *bla_{OXA-24-like}* (u 39 izolatów), *bla_{OXA-23-like}* (u 14 izolatów), *bla_{OXA-58-like}* (u 6 izolatów), wskazując na dominację wariantu *bla_{OXA-24-like}*, co jest zgodne z innymi doniesieniami z Polski, ale inaczej niż na świecie, gdzie wariantem dominującym jest *bla_{OXA-23-like}*.

W dalszych etapach pracy, przeprowadzono sekwencjonowanie genomów 15 wybranych szczepów *A. baumannii* i analizy typu MLST, które pozwoliły na przydzielenie badanych izolatów do klonu ST2 wg schematu Pasteura i oraz do 5 typów sekwencyjnych ST195, ST208, ST208/ST1806, ST348 i ST425 wg schematu Oxfordzkiego.

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę pokazały także, że u 14 izolatów *bla_{OXA-23-like}*-dodatnich występowała sekwencja insercyjna *IS_{Aba1}*, a u 6 szczepów *bla_{OXA-58-like}*-dodatnich sekwencja insercyjna *IS_{Aba3}*. Co ważne sekwencje insercyjne występowały w sąsiedztwie genów

bla_{OXA}, mogąc wpływać na ich ekspresję. U dwóch badanych izolatów niekodujących nabytych genów *bla_{OXA}*, a kodujących jedynie występujący naturalnie u *A. baumannii* gen *bla_{OXA-51-like}*, zidentyfikowano występowanie sekwencji inercyjnej *ISAbal* poprzedzającej ten gen.

Pani mgr Alicja Słoczyńska przeprowadziła także badania potwierdzające aktywność fenotypową karbapenemaz z wykorzystaniem m.in. testu biochemicznego CarbAcineto NP, uzyskując jednoznacznie pozytywne wyniki dla większości szczepów z genami *ISAbal-bla_{OXA-23-like}* (n=12/14) oraz *bla_{OXA-24-like}* (n=34/39). Dla niektórych izolatów uzyskano wyniki niejednoznaczne, choć na podstawie wartości MIC zakwalifikowane były one do szczepów opornych na imipenem. Może być to tłumaczone niską ekspresją genów kodujących karbapenemazy, a oporność na karbapenemy może wynikać z obecności innych mechanizmów oporności, np. aktywności pomp błonowych.

Uzyskane wyniki w pierwszej części rozprawy doktorskiej skłoniły Doktorantkę do zbadania wpływu aktywności pomp błonowych na oporność badanych wcześniej izolatów *A. baumannii* na karbapenemy. Wyniki te opisane zostały w drugiej pracy oryginalnej opublikowanej w 2023 roku stanowiącej podstawę dysertacji. Z danych literaturowych wynikało, że dwie pompy AbeM oraz AdeABC były najczęściej powiązane z nadawaniem oporności na karbapenamy u *A. baumannii*. AbeM to pompa z rodziny MATE (ang. *multidrug and toxic compound extrusion*). Pompa AdeABC należy do rodziny RND (ang. *resistance nodulation cell division*), a w jej skład wchodzi transporter błony wewnętrznej AdeB, kanał w błonie zewnętrznej AdeC i łączący je w periplazmie łącznik AdeA.

Aby określić aktywność fenotypową pomp typu *efflux* w nadawaniu oporności na karbapenemy *A. baumannii* Doktorantka wykorzystwała inhibitory pomp. Zastosowano L-fenyloalanino-L-arginino- β -naftylamid (PA β N) działający selektywnie na AdeB, poprzez łączenie się z jego centrum aktywnym oraz karbonylocyjanek 3-chlorofenylohydrazonu (CCCP) działający nieselektywnie. Badano wartości MIC imipenemu i meropenemu bez i w obecności inhibitorów pomp, dla wszystkich badanych wcześniej 61 izolatów *A. baumannii*. U 13 z 61 izolatów zaobserwowano istotne spadki (minimum 4-krotne przyjęte za istotne) wartości MIC meropenemu w obecności PA β N, u trzech z nich dodatkowo także redukcję MIC imipenemu. Jedynie u dwóch szczepów z badanej kolekcji zaobserwowano spadek MIC imipenemu w obecności CCCP.

Jako dopełnienie przeprowadzonych analiz, w pracy zbadano także w wybranych 15 szczepach *A. baumannii* poziom ekspresji genu kodującego transporter AdeB, a dodatkowo także geny *adeRS* kodujące regulatorowy system dwuskładnikowy kontrolujący ekspresję operonu *adeABC*. Poziom ekspresji mierzono względem szczepu wzorcowego *A. baumannii* ATCC 17978. U wszystkich badanych szczepów zaobserwowano nadekspresję genu *adeB*, a trzy szczepy (AB 96, 129, 185) o najwyższych poziomach ekspresji (od 49- do 67-krotnego), w badaniach pokrewieństwa genotypowego metodą PFGE, wykazywały bliskie pokrewieństwo i przynależność do jednego klastra, jak pokazano w PO1. Zawierały one gen *bla_{OXA-23-like}*, który był poprzedzony sekwencją *ISAbal*. Izolaty te różniły się wartościami MIC karbapenemów oraz wynikami testu biochemicznego CarbAcineto NP.

Dopełnieniem charakterystyki wybranych do wnikliwszych analiz 15 izolatów *A. baumannii* było zsekwencjonowanie ich genomów i zidentyfikowanie mutacji, zmian w sekwencjach genów kodujących białka związane z nadawaniem bakterii oporności na karbapenemy, w tym pompy AdeABC, system regulatorowy AdeSR, pompy AbeM oraz system regulatorowy BaeSR, który także zaangażowany jest w kontrolę ekspresji genów kodujących pompy, a dodatkowo także mobilnych elementów genetycznych. U wszystkich 15 szczepów zidentyfikowano wspólny zbiór mutacji w sekwencjach warunkujących zmiany aminokwasowe w białkach AdeA, AdeR, AdeS, BaeS w porównaniu do sekwencji szczepu referencyjnego *A. baumannii* ATCC 17978, oraz u niektórych szczepów dodatkowe zmiany. Zidentyfikowano m.in. insercję zawierającą IS*Aba1*, która prowadziła do powstania skróconej formy białka AdeR. Sekwencja IS*Aba1* zawiera silne promotory, które mogą wpływać na wzrost ekspresji genów *adeABC* kodowanych rozbieżnie względem *adeSR*.

U trzech izolatów AB 96, 129, 185 charakteryzujących się najwyższymi poziomami ekspresji genu *adeB*, wykryto luki w odczycie sekwencji pomiędzy genem *adeR* a *adeA*. Ponowne zsekwencjonowanie wybranego genomu izolatu AB 96, umożliwiające odczyt długich fragmentów sekwencji, pozwoliło uzyskać pełną sekwencję genomu wraz z brakującym regionem. Pomiędzy genami *adeR* i *adeA* wykryto długą, liczącą 13,5 kb sekwencję oflankowaną skierowanymi w tą samą stronę sekwencjami IS*Aba1*. Sekwencja ta wykazywała podobieństwo do fragmentu wyspy oporności AbaR25. Dodatkowo dogłębna analiza genomu izolatu AB 96 ujawniła występowanie pełnej wyspy AbaR25 o długości 46,5 kb oraz drugiego fragmentu wyspy o długości 16,5 kb w dwóch różnych regionach genomu. Wyspa oporności AbaR25 zawiera transpozon Tn6022, a dodatkowo transpozon Tn2006 z genem *bla_{OXA-23}*.

Dodatkowo uzyskane wyniki zsekwencjonowania dla 15 izolatów umożliwiły przeprowadzenie analizy filogenetycznej opartej na SNP i dokładniejsze określenie różnic genetycznych pomiędzy analizowanymi szczepami.

Uzyskane przez Panią mgr Alicję Słoczyńską wyniki, pozwoliły odpowiedzieć na pytanie co może być przyczyną zwiększonej oporności na karbapenemy badanych izolatów *A. baumannii*. Obecność fragmentu wyspy oporności AbaR25 w rejonie *adeSR-adeABC*, skutkująca skróceniem genu *adeR* i występowanie sekwencji IS*Aba1* z silnym promotorem, w odpowiedniej orientacji, tuż przed operonem *adeABC* wyjaśniają podwyższony poziom ekspresji genu *adeB* w izolacie AB 96 i tym samym zwiększoną aktywność pompy AdeB. W szczepie tym, stwierdzono dwukrotne występowanie w genomie nabytego genu *bla_{OXA-23}*, znajdującego się w obrębie transpozonu, oflankowanego sekwencją inercyjną IS*Aba1* z silnym promotorem, co umożliwiała zwiększoną ekspresję tego genu i w konsekwencji zwiększoną aktywność kodowanej karbapenemazy OXA-23. Dla wielu izolatów klinicznych *A. baumannii* dominującą rolę w oporności na karbapenemy przypisywano zwiększonej aktywności karbapenemaz typu CHDL. Badania przeprowadzone przez Doktorantkę dowodzą, że także pompy typu *efflux*, jak system AdeABC mają istotne znaczenie w obniżaniu wrażliwości szczepów na karbapenemy. Co ważne zidentyfikowano elementy genetyczne, które mogą wpływać na ekspresję genów warunkujących oporność na karbapenemy. Występowanie wysp oporności, transpozonów, sekwencji inercyjnych niosących silne promotory,

jak ISAbal, w odpowiedniej orientacji i sąsiedztwie mogą znacząco przyczyniać się do wzrostu ekspresji takich genów.

Uzyskane przez Panią mgr Alicję Słoczyńską wyniki, są szczególnie cenne w kontekście poznania mechanizmów związanych z rozprzestrzenianiem antybiotykooporności u bakterii i poszukiwania metod ograniczających to zjawisko.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam listę zauważonych nieścisłości, braków, niedociągnięć, ewentualnych sugestii itp.:

- str. 40/41 – „U szczepów z badanej puli potwierdzono” - brak informacji do jakiej puli badanych szczepów odnoszą się dalsze informacje: 61 izolatów czy 15 tych, które były sekwencjonowane;
- str. 43 - u 13 z 61 izolatów zaobserwowano istotne spadki wartości MIC meropenemu w obecności PAβN - wypunktowano nazwy 12 izolatów;
- w moim odczuciu Fig. 1 i Fig. 2 PO2 powinny znaleźć się w suplemencie do publikacji wraz z pokazaną translacją prezentowanych sekwencji nukleotydowych i wyraźnym zaznaczeniem wykrytych mutacji i podstawień lub delecji aminokwasowych (np. jedna figura w suplemencie zamiast Fig. 1 i Figury S1 dla AdeS);
- str. 44, Tabela 3; str.84-86, Tabela 2 PO2 oraz materiały i metody PO2 (str. 92-94) - brak opisu metody RT-qPCR badającej poziom ekspresji genów kodujących pompy w wybranych szczepach *A. baumannii*, tj. w jakich warunkach zbierano materiał do analizy, jak izolowano RNA, jak przeprowadzano odwrotną transkrypcję i qPCR, czy i jakie geny referencyjne wykorzystywano w analizach, jak analizowano wyniki, jakich odczynników używano w zastosowanych procedurach. Z potrzebnych informacji w PO2 znalazły się jedynie sekwencje wykorzystywanych starterów (Tabela 3, str. 94);
- str. 107, pkt.9; str. 108, pkt. 10; str. 14, 3 akapit – błędnie podana wielkość fragmentu wyspy oporności AbaR25 – jest „13,5 pz”, powinno być „13,5 kb”; jest „16,5 kb”, powinno być „16,5 kb”.

Należy jednak podkreślić, że wypunktowane nieliczne niedociągnięcia, braki nie umniejszają bardzo wysokiej, pozytywnej ocenie rozprawy doktorskiej i uzyskanych wyników przez Panią mgr Alicję Słoczyńską.

Mam kilka pytań, kwestii, które nasunęły się po lekturze tej rozprawy, które zamieszczam poniżej, prosząc Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas obrony:

1. Czym można tłumaczyć tak gwałtowny (ponad dwukrotny) wzrost liczby wykrywanych izolatów *A. baumannii*, w tym tych opornych na karpapenemy w 2021 roku, zgodnie z danymi przedstawionymi na Rycinie 1? Czy znane są adekwatne statystyki z dwóch ostatnich lat?
2. Na jakiej podstawie dokonano selekcji 15 wybranych szczepów *A. baumannii*, których genomy zostały zsekwencjonowane? Czy uzyskano odczyty pełnych genomów wszystkich 15 szczepów, umożliwiające ich złożenie i zdeponowanie w publicznych bazach danych?
3. Czy można zaproponować genezę pojawienia się w trzech niezależnych miejscach genomu izolatu AB 96 całej wyspy AbaR25, jak i dwóch jej niezależnych fragmentów? Czy jest to zjawisko często spotykane wśród szczepów *A. baumannii*, czy było badane? Czy znane są preferencyjne miejsca insercji wysp oporności takich jak AbaR25 w genomach *A. baumannii*?

4. Nawiązując do poprzedniego pytania, w Tabeli 4, str. 48 rozprawy doktorskiej przedstawiono charakterystykę fragmentów lub całej wyspy oporności AbaR25 zidentyfikowanych w genomie szczepu AB 96. Warto byłoby uzupełnić dane przedstawione w tabeli o informację jakie geny znalazły się w sąsiedztwie AbaR25 czy Δ 2AbaR25 i przedyskutować czy elementy te mogą wpływać na zaburzenia ekspresji sąsiadujących genów i czy geny te mogą mieć także wpływ na modulację oporności na karbapenemy lub inne związki antybakteryjne.

Podsumowując, warto podkreślić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi znaczący wkład w rozwój dyscypliny. Wysoko oceniam wartość merytoryczną wyników prezentowanych w pracy. Umiejętnie dobrane metody, wykorzystane w charakterystyce kolekcji klinicznych izolatów *A. baumannii* niewrażliwych na imipenem, umożliwiły określenie mechanizmów nadających oporność na karbapenemy. Oprócz aktywności karbapenemazy, określanej dotychczas jako dominujący mechanizm, oryginalnym wynikiem jest wykazanie, że także zwiększona aktywność pomp, jak system AdeABC, ma istotne znaczenie w obniżaniu wrażliwości szczepów klinicznych *A. baumannii* na karbapenemy. Przedstawiono także analizy pokazujące przyczyny stojące za zwiększaniem ekspresji genów kodujących karbapenemazy czy pompy, a związanych z obecnością mutacji w określonych genach, ale także ruchomych elementów genetycznych w tym sekwencji inercyjnych, które mogą dostarczać silny promotor umożliwiający ekspresję sąsiadującego genu, np. *adeA*.

Recenzowana praca i uzyskane wyniki ujawniają zaangażowanie, samodzielność i dużą wiedzę Doktorantki, tak w zakresie poruszanych zagadnień naukowych, jak i stosowanych metod, co potwierdza umiejętność Pani mgr Alicji Słoczyńskiej do prowadzenia samodzielnej pracy naukowej. Podjęte w rozprawie doktorskiej zagadnienie badawcze i uzyskane oryginalne wyniki opublikowane w dwóch oryginalnych pracach charakteryzują się wysokimi walorami poznawczymi, naukowymi, o dużym znaczeniu diagnostycznym, terapeutycznym i aplikacyjnym.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w stosownej ustawie (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce Dz.U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Z pełnym przekonaniem i poparciem zwracam się z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Alicji Słoczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na wysoki poziom naukowy prezentowanej rozprawy oraz poznawcze i praktyczne znaczenie przedstawionych wyników oraz fakt ich opublikowania w postaci dwóch oryginalnych artykułów naukowych, wnioskuję o nagrodzenie rozprawy stosownym wyróżnieniem.

Dr hab. Aneta Bartosik