



Warszawa, 5 września 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr farmacji Alicji Słoczyńskiej

pt: „Udział karbapenemaz i pomp MDR w oporności szczepów klinicznych *Acinetobacter baumannii* na kabapenemy”

Przedmiotem badań ocenianej rozprawy są izolaty *Acinetobacter baumannii*, gatunku bakterii szczególnie niebezpiecznego dla hospitalizowanych pacjentów. Dotyczy to zwłaszcza pacjentów oddziałów intensywnej terapii, chorych z immunosupresją, wyniszczonych. Zakażenia wywołane *A. baumannii* są istotnym problemem w placówkach opieki medycznej. Drobnoustroje te mają wysoką zdolność do przetrwania w środowisku szpitala, wydzielają liczne czynniki zjadliwości, tworzą biofilm i przejawiają oporność na wiele środków dezynfekcyjnych. Leczenie zakażeń wywołanych przez *A. baumannii* stanowi wyzwanie ze względu na liczne mechanizmy oporności na antybiotyki, prowadzące do selekcji szczepów wielolekoopornych. Ciągłe monitorowanie wrażliwości tych drobnoustrojów na antybiotyki i molekularnych mechanizmów warunkujących zjawisko oporności jest koniecznością współczesnej medycyny i farmacji i prowadzi do zmniejszenia ryzyka nieskutecznego leczenia ciężko chorych pacjentów.

Rozprawa doktorska mgr Alicji Słoczyńskiej dotyczy zatem jednego z najbardziej istotnych problemów zdrowia publicznego – *A. baumannii* został uznany przez Światową Organizację Zdrowia za jeden z najgroźniejszych drobnoustrojów z grupy ESKAPE, tj. bakterii najsukuteczniej unikających skutecznej eradykacji za pomocą antybiotyków.

Ocenianą rozprawę mgr Alicji Skoczyńskiej stanowi zbiór opublikowanych trzech artykułów naukowych, powiązanych ze sobą tematycznie. Spośród tych trzech artykułów, jeden jest artykułem przeglądowym zamieszczonym w indeksowanym w *Web of Science* kwartalniku *Postępy Mikrobiologii*, pozostałe dwa artykuły oryginalne zostały opublikowane w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* o wysokim współczynniku wpływu (IF ponad 6.0). Liczba punktów Ministerstwa Edukacji

i Nauki przypisana temu miesięcznikowi wynosi 140. Każda z wymienionych prac jest publikacją wieloautorską. Oświadczenia współautorów publikacji, przytoczone w rozprawie, jednoznacznie wskazują na istotny udział Doktorantki w opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu części eksperymentalnej, zbieraniu piśmiennictwa, interpretacji i dyskusji wyników oraz opracowaniu manuskryptów złożonych do redakcji. Udział Doktorantki jest szacowany na 60-85% wkładu wymaganego w powstanie każdej z tych trzech publikacji.

Oceniana rozprawa doktorska zawiera obszerne Wprowadzenie do tematyki badawczej. Jest to bardzo ciekawy fragment rozprawy, który powinien zostać opublikowany jako praca przeglądowa, ponieważ podsumowuje najnowsze wyniki badań tego drobnoustroju, z uwzględnieniem nowo poznanych mechanizmów lekooporności. Pierwsza publikacja z ocenianego cyklu omawia podobne zagadnienia, jednak ukazała się osiem lat temu, w 2015 roku. We Wprowadzeniu do rozprawy doktorskiej zaktualizowano wiedzę o lekooporności i mechanizmach warunkujących to zjawisko u *A. baumannii*. Porównanie treści publikacji przeglądowej z 2015 roku i obecnie napisanego rozdziału dobitnie pokazuje gwałtowne nabywanie/poznawanie mechanizmów oporności na antybiotyki przez *A. baumannii* i stanowi bardzo ciekawy wątek w rozważaniach Autorki.

Autorka rozprawy szczegółowo analizuje na poziomie molekularnym mechanizmy oporności na karbapenemy wśród izolowanych w Polsce, niewrażliwych na imipenem szczepów *A. baumannii*. Przedmiotem badań było 61 izolatów tego gatunku, pozyskanych w trakcie rutynowej diagnostyki w jednym z warszawskich szpitali szerokoprofilowych. Dla izolatów tych wykonano szereg analiz, w tym analizy fenotypowe i molekularne dotyczące mechanizmów oporności na antybiotyki i karbapenemy. Do detekcji genów kodujących determinanty oporności i pompy błonowe systemu efflux wykorzystano metodę PCR z użyciem samodzielnie zaprojektowanych starterów. Tu mam pierwsze pytanie do Doktorantki: w jaki sposób potwierdzano specyficzność starterów i jakie próbki kontrolne uwzględniano w tych analizach? Podobnie Doktorantka opisuje zastosowanie odwróconej metody PCR w czasie rzeczywistym do oceny ekspresji genów kodujących białka systemu pomp błonowych. Niestety nie znalazłam szczegółów metodycznych dotyczących warunków prowadzenia tej reakcji ani też opisu próbek, użytych jako próbki kontrolne.

Wszystkie badane izolaty poddano analizie pokrewieństwa genetycznego za pomocą analizy wielkości fragmentów restrykcyjnych DNA genomowego po ich rozdziale metodą elektroforezy w zmiennym polu elektrycznym (PFGE). Wśród 61 badanych izolatów tożsame wzory restrykcyjne (identyczne) u więcej niż dwóch izolatów można zaobserwować w czterech pulsotypach, wyróżnionych przez Doktorantkę. Są to pulsotypy: A, I, J i O zawierające odpowiednio 5, 7, 3 i 4 izolaty o identycznych wzorach makrorestrykcji. Są to zatem izolaty *A. baumannii* pozyskane od różnych pacjentów, występujące w danym szpitalu w podobnym okresie czasu. Jest to bardzo interesująca obserwacja wskazująca na aktywną transmisję wielolekoopornych szczepów *A. baumannii* pomiędzy pacjentami tego warszawskiego szpitala. Ta interpretacja wyników różni się od zamieszczonej przez Doktorantkę w publikacji. Autorka opierała się na analizie statystycznej, natomiast istotna jest zawsze wizualna weryfikacja rozkładu fragmentów restrykcyjnych (prążków), wskazująca nieco odmienną interpretację. Prosiłabym Doktorantkę o omówienie w trakcie obrony znaczenia uzyskanych wyników typowania genetycznego dla epidemiologii zakażeń lekoopornymi szczepami *A. baumannii* w szpitalu objętym badaniem.

Spośród 61 izolatów *A. baumannii* 15 poddano sekwencjonowaniu pełnogenomowemu w aparacie firmy Illumina. Niestety nie jest podana metodyka sekwencjonowania – zakładam, że było to sekwencjonowanie rozproszone. W zbiorach zdeponowanych w GenBank amerykańskiej bazy NCBI również nie znalazłam tych informacji. Dodatkowo DNA jednego izolatu *A. baumannii* sekwencjonowano metodą nanoporową i ten fragment eksperymentów jest opisany wystarczająco szczegółowo. Czy możliwe byłoby uzupełnienie szczegółów metodycznych dotyczących sekwencjonowania pełnogenomowego w aparacie firmy Illumina?

Przeprowadzone eksperymenty z zastosowaniem najnowszych technik biologii molekularnej dowiodły istnienia nowych, opisanych po raz pierwszy mechanizmów oporności izolatów *A. baumannii* wyosobnionych z próbek klinicznych w Polsce. Wykazano, że u 1/3 badanych izolatów występują sekwencje insercyjne funkcjonujące jako silne promotory w ekspresji genów *bla_{CHDL}*. Badane izolaty mają geny kodujące pompy błonowe *adeABC* i *abeM*, aktywne w usuwaniu karnapenemów z cytoplazmy komórek bakterii. Ekspresja genu kodującego *adeB* jest znacznie zwiększona u badanych szczepów, co potwierdza aktywny udział pomp systemu efflux w fenotypowej oporności

na karbapenemy. Doktorantka przeprowadziła szczegółową analizę sekwencji aminokwasowych białek dwuskładnikowego systemu regulatorowego AdeRS, wykazując szereg mutacji w kodujących je genach u badanych 15 izolatów. Wskazała na wystąpienie zjawiska włączenia sekwencji insercyjnej *ISAba1*, będącej fragmentem wyspy oporności AdeR25 do genomu *A. baumannii* zwiększającego ekspresję operonu *adeABC*, grupującego geny kodujące pompy błonowe systemu efflux. Tym samym po raz pierwszy wykazała możliwość funkcjonowania nowego mechanizmu oporności na karbapenemy ziarniakopalczek *A. baumannii* polegającego na ekspresji nabytych karbapenemaz i nadekspresji genów kodujących pompy błonowe systemu efflux. Jest to istotne osiągnięcie naukowe zachęcające inne zespoły do prowadzenia badań potwierdzających występowanie tego zjawiska u lekoopornych szczepów *A. baumannii*, pochodzących z innych rejonów świata.

Stąd jednoznacznie mogę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dotyczącego zarówno monitorowania obecności lekoopornych szczepów, jak i prowadzenia nadzoru nad pojawiającymi się nowymi mechanizmami oporności. Ma zatem istotne znaczenie praktyczne, zwiększając skuteczność stosowanych w zakażeniach *A. baumannii* terapii przeciwbakteryjnych.

Na podstawie przeglądowej publikacji Autorki, w której odegrała ona jako współautorka wiodącą rolę, znakomicie napisanego Wprowadzenia do ocenianej rozprawy doktorskiej oraz wyczerpującej Dyskusji wyników własnych stwierdzam, że Doktorantka ma znaczną wiedzę teoretyczną w uprawianej dziedzinie. Zna metody badawcze i aktualne piśmiennictwo tematu, potrafi też wysnuć prawidłowe wnioski z uzyskanych wyników. Szeroki warsztat badawczy i znaczący udział Doktorantki w opracowaniu koncepcji prac eksperymentalnych są bezpośrednimi przesłankami wskazującymi na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Ponadto analizy bioinformatyczne, pozwalające na pełen wgląd w zmiany genetyczne prowadzące do selekcji wielolekoopornych szczepów *A. baumannii*. Doktorantka przeprowadziła osobiście. Podała uzyskane wyniki wnikliwej ocenie i dyskusji, zaprezentowała wyniki w postaci oryginalnych rycin. Ten fragment rozprawy oceniam bardzo wysoko. Stanowi on o jej unikalności i skłania mnie do postawienia wniosku o wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska Pani mgr Alicja Skoczyńskiej spełnia zatem wszystkie warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Alicji Skoczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr n. med. Elżbieta Anna Trafny

Centrum Inżynierii Biomedycznej IOE

Wojskowa Akademia Techniczna