

Lublin, dn. 27.04.2022 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr anal. med. Marceliny Jaworskiej pt. „Charakterystyka bakteryjnego elementu mikrobiomu układu moczowego u pacjentów dializowanych i u pacjentów po transplantacji nerki” wykonanej pod kierunkiem Promotora Pani prof. dr hab. n. med. Marzeny Gajęckiej oraz Promotora pomocniczego Pani dr hab. n. med. Justyny Karolak w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Mikrobiom człowieka, zlokalizowany w różnych miejscach anatomicznych takich, jak przede wszystkim skóra, górne drogi oddechowe, układ pokarmowy czy układ moczowo-płciowy, jest niezbędną składową organizmu gospodarza konieczną do utrzymania stanu zdrowia. Z drugiej strony, podkreśla się istotny związek mikrobiomu z różnymi jednostkami chorobowymi o charakterze zarówno miejscowym jak i ogólnoustrojowym. Mikrobiom układu moczowego, zwany też urobiomem, jest jeszcze niedostatecznie poznany w tych obydwu aspektach. Nieliczne dane literaturowe sprawiają, że wiedza na temat jego składu i znaczenia, zwłaszcza u pacjentów dializowanych oraz u pacjentów po transplantacji nerek, jest ograniczona. Zatem, podejmowanie takich badań jest w pełni uzasadnione. W ten nurt badawczy wpisuje się recenzowana dysertacja. Należy podkreślić, że badania włączone do ocenianej pracy doktorskiej były realizowane przez Panią mgr Marcelinę Jaworską w ramach projektu PRELUDIUM 2015/19/N/NZ6/01780 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. „Ukryte patogeny – identyfikacja czynników etiologicznych zakażeń układu moczowego u pacjentów dializowanych i po przeszczepie nerki z zastosowaniem sekwencjonowania 16S rRNA”.

Głównym celem badań recenzowanej rozprawy była identyfikacja uropatogenów z zakażeń układu moczowego oraz charakterystyka bakteryjnego elementu mikrobiomu układu moczowego u pacjentów dializowanych i u pacjentów po transplantacji nerki. Realizację tego celu zaplanowano poprzez przeprowadzenie badań w ramach następujących celów szczegółowych: (i) ocenę mikrobiologiczną prób moczu, pochodzących od pacjentów dializowanych i po transplantacji nerki oraz od osób bez dysfunkcji układu moczowego, z wykorzystaniem metod mikrobiologii klasycznej, (ii) ustalenie profili lekowrażliwości mikroorganizmów izolowanych z prób moczu, (iii) opracowanie protokołu izolacji bakteryjnego DNA z prób moczu oraz izolacja bakteryjnego DNA, (iv) charakterystyka bakteryjnego elementu mikrobiomu w próbach moczu w badanych grupach oraz

wskazanie potencjalnych markerów wskaźnikowych zakażeń bakteryjnych układu moczowego na podstawie wyników sekwencjonowania 16S rRNA i analiz danych bioinformatycznych.

Recenzowana dysertacja liczy 160 stron. Zasadnicza część pracy zawiera rozdziały typowe dla prac o charakterze eksperymentalnym: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody badawcze, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim i Piśmiennictwo. Ponadto, uwzględniono Spis tabel, rycin i załączników, Załączniki oraz Informacje o aktywności naukowej Doktorantki. W pracy umieszczono też słowa kluczowe oraz Wykaz skrótów.

We Wstępie Doktorantka przedstawiła obszernie problematykę zakażeń układu moczowego (ZUM) na podstawie przeglądu aktualnego piśmiennictwa, obejmującą klinikę, epidemiologię, patogenezę, etiologię i leczenie tych infekcji, ze szczególnym uwzględnieniem grup pacjentów wysokiego ryzyka – chorych dializowanych i po przeszczepie nerki. Ponadto, omówiła zasady diagnostyki laboratoryjnej ZUM oparte o klasyczne metody mikrobiologiczne, zwracając również uwagę na możliwości stosowania nowoczesnych technik sekwencjonowania (NGS – Next Generation Sequencing) oraz ich ograniczenia w diagnostyce ZUM. Przedstawiła też aktualny stan wiedzy na temat mikrobiomu układu moczowego (urobiomu) i jego znaczenia w fizjologii i patologii tego układu, wskazując na konieczność prowadzenia dalszych badań w tym zakresie, zwłaszcza u pacjentów dializowanych i po transplantacji nerki. Wstęp zawiera aktualne i istotne treści, stanowiące szczegółowe uzasadnienie podjętego tematu badawczego oraz świadczy o Jej rozległej i ugruntowanej wiedzy zarówno jako mikrobiologa jak również jako diagnosty laboratoryjnego.

Badania w ramach recenzowanej rozprawy doktorskiej realizowano po otrzymaniu zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Osoby uczestniczące w tych badaniach zostały zakwalifikowane do trzech grup: pacjentów dializowanych, pacjentów po transplantacji nerki oraz osób bez dysfunkcji układu moczowego; każda z grup liczyła po 50 osób. W kwalifikacji pacjentów do badań uczestniczyli lekarze-klinicyści. Materiał badawczy stanowiło 150 prób moczu pobranych od wymienionych pacjentów, po 50 prób z każdej grupy. Doktorantka szczegółowo opisała procedury postępowania z próbkami moczu w celu przeprowadzenia badań z użyciem klasycznych technik mikrobiologicznych (posiew moczu, identyfikacja drobnoustrojów, ocena ilościowa drobnoustrojów, profile lekowrażliwości izolatów, wykrywanie mechanizmów lekooporności) oraz odpowiedniego przygotowania i zabezpieczenia tych prób do dalszych badań przy użyciu technik biologii molekularnej (izolacja DNA, sekwencjonowanie fragmentów genu 16S rRNA). Szczegółowo również przedstawiła procedury dotyczące wykonania poszczególnych badań zgodnie z aktualnie obowiązującymi rekomendacjami i standardami, wykorzystując swoją wiedzę w zakresie zasad prowadzenia badań naukowych oraz zasad diagnostyki laboratoryjnej.

Należy podkreślić, że zakres badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej, zgodny z postawionymi celami badawczymi, jest imponujący. W pierwszym etapie Doktorantka scharakteryzowała pacjentów dializowanych i po transplantacji nerki włączonych do badań w oparciu o wskaźniki demograficzne (wiek, płeć) i kliniczne (choroby, będące przyczyną dysfunkcji nerek, przeprowadzenia zabiegu przeszczepu nerki, włączenia dializoterapii). Analiza prób moczu pobranych od obydwu grup pacjentów przy użyciu klasycznych metod mikrobiologicznych wykazała, że ogółem u 30% osób stwierdzono znamiennej bakteriurię z identyfikacją czynnika etiologicznego ZUM, u kolejnych 30% mocz określono jako jałowy, a z 54% wyhodowano drobnoustroje poniżej miana, oznaczającego znamiennej bakteriurię; obserwowano różnice w zależności od płci i grupy pacjentów. Najczęstszym patogenem ZUM okazała się *Escherichia coli* (80% vs 67%). Wśród wyizolowanych 30 uropatogenów, wykryto tylko 4 szczepy, posiadające mechanizmy oporności na antybiotyki – 2 metycylinooporne izolaty *Staphylococcus haemolyticus*, 1 izolat *Enterobacter cloacae complex* oraz 1 izolat *Kocuria krisinae* o fenotypie MLS_B. Świadczy to o wysokiej lekowrażliwości tej populacji szczepów. W przeciwieństwie do tego, w grupie kontrolnej (osoby bez dysfunkcji układu moczowego), w przypadku 32% prób moczu określono jako jałowy, a z 68% wyhodowano drobnoustroje poniżej miana, oznaczającego znamiennej bakteriurię; obserwowano różnice w zależności od płci.

Kolejny etap badań obejmował badanie mikrobioty układu moczowego w oparciu o identyfikację wszystkich drobnoustrojów, które wyrosły na danym podłożu ze wszystkich prób moczu pobranych od 3 grup badanych osób. Ogółem z 32% prób moczu wyhodowano 1 drobnoustrój, a z 30% – co najmniej 2 mikroorganizmy. Największym zróżnicowaniem cechowały się drobnoustroje izolowane z prób moczu od pacjentów po przeszczepie nerki (16 rodzajów), a nieco mniejszym od pacjentów poddawanych dializoterapii (12 rodzajów). W przeciwieństwie do tego, z prób moczu pobranych od osób z grupy kontrolnej zidentyfikowano tylko 4 rodzaje drobnoustrojów. Należy zaznaczyć, że z moczu pobranego od wszystkich badanych osób izolowano gronkowce koagulujące, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* alfa-hemolizujące oraz *E. coli*, ale z różną częstością. Ponadto, izolowano drobnoustroje występujące tylko w próbach moczu od pacjentów z dysfunkcją układu moczowego (np. *Kocuria* spp.), lub typowe dla próbek moczu od pacjentów poddawanych dializoterapii (np. *Proteus mirabilis*) czy po przeszczepie nerki (np. *Achromobacter denitrificans*). Należy podkreślić, że w opisanych powyżej badaniach stosowano poszerzony panel pożywek mikrobiologicznych w porównaniu do rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej moczu, co umożliwiło wyhodowanie większej grupy drobnoustrojów.

Następny etap, stanowiący zasadniczą część recenzowanej pracy, dotyczył badań nad mikrobiomem układu moczowego u pacjentów dializowanych i po transplantacji nerki oraz osób z grupy kontrolnej w oparciu o analizę wyników sekwencjonowania regionów V3 i V4 genu 16S rRNA w próbkach bakteryjnego DNA pozyskanych z moczu. Kluczowe znaczenie dla wyników tych badań

ma odpowiednie przygotowanie próbek DNA, które muszą spełniać założone kryteria jakościowe i ilościowe. Zastosowanie procedury opracowanej przez Doktorantkę umożliwiło uzyskanie 148/150 (98,7%) próbek, spełniających wspomniane wyżej kryteria. Analiza składu mikrobiomu układu moczowego obejmowała ocenę i porównanie występowania bakterii w próbach moczu w poszczególnych grupach badanych osób na kolejnych poziomach taksonomicznych takich jak: typ, klasa, rząd, rodzina, rodzaj i gatunek. Ogółem bakterie stanowiły 99,6-99,9% drobnoustrojów w próbach moczu. W toku badań zidentyfikowano następujące taksony bakterii: 12 typów, 24 klasy, 35 rzędów, 59 rodzin, 76 rodzajów oraz 27 gatunków bakterii, przy czym część z tych taksonów występowała tylko w określonych grupach pacjentów. Ponadto, dokonano analizy występowania zidentyfikowanych taksonów w poszczególnych grupach w zależności od płci pacjentów. Doktorantka oceniła również istotne statystycznie zróżnicowanie składu mikrobiomu układu moczowego w obrębie komponenty bakteryjnej w badanych grupach pacjentów, określając 32 wskaźniki różnicujące, reprezentujące różne poziomy taksonomiczne. Stwierdziła też istotne różnice składu mikrobiomów ogółem pomiędzy wszystkimi badanymi grupami oraz pomiędzy grupą pacjentów dializowanych lub po przeszczepie nerki w porównaniu do grupy osób bez dysfunkcji układu moczowego, jednak nie wykazała istotnej różnicy porównując mikrobiomy pacjentów dializowanych i po transplantacji nerki. Największą różnorodnością charakteryzował się mikrobiom pacjentów dializowanych, a najmniejszą różnorodność stwierdzono u osób bez dysfunkcji układu moczowego.

W końcowym etapie części badawczej Doktorantka przedstawiła porównanie wyników w zakresie identyfikacji drobnoustrojów na poziomie rodzaju w próbach moczu, stosując techniki klasyczne (hodowlane + biochemiczne) i molekularne. Choć liczba rodzajów zidentyfikowanych metodami molekularnymi była znacznie wyższa, to jednak niektóre rodzaje bakterii wykryto tylko przy użyciu metod hodowlanych. Porównanie to pozwoliło również na wytypowanie rodzajów bakterii występujących tylko u pacjentów dializowanych lub u pacjentów po przeszczepie nerki, które można zidentyfikować technikami klasycznymi lub molekularnymi. Ponadto, przeanalizowała skład mikrobiomu u pacjentów dializowanych i po przeszczepie nerki z dodatnim i negatywnym wynikiem klasycznego posiewu moczu, wskazując rodzaje bakterii, które mogą być potencjalnymi markerami ZUM w obydwu grupach pacjentów, tj. *Finegoldia*, *Leptotrichia* i *Corynebacterium*.

W Dyskusji Doktorantka przedstawiła szczegółową i krytyczną analizę uzyskanych wyników w odniesieniu do aktualnych danych piśmiennictwa, koncentrując się na następujących zagadnieniach: (i) przewlekła niewydolność nerek jako problem zdrowotny w aspekcie zdrowia publicznego, (ii) zakażenia układu moczowego u pacjentów dializowanych i po transplantacji nerki, (iii) znaczenie techniki pobierania moczu do rutynowych badań mikrobiologicznych oraz badań urobiomu w aspekcie wiarygodności wyników, (iv) problem zakażeń układu moczowego u pacjentów dializowanych i po transplantacji nerki oraz ich etiologia, (v) profile lekowrażliwości uropatogenów, (vi) ocena częstości występowania w moczu różnych gatunków bakterii w oparciu o klasyczne metody

diagnostyczne w zależności od statusu pacjenta, (vi) mikrohom (urobiom) i jego znaczenie dla nauki oraz praktyki (potencjalne znaczenie kliniczne i diagnostyczne), ze szczególnym uwzględnieniem pacjentów dializowanych i po transplantacji nerki.

Pięć sformułowanych przez Doktorantkę wniosków podsumowuje założenia i najważniejsze osiągnięcia pracy, jak również perspektywy dalszych badań. Przy tak rozległym zakresie eksperymentów oraz ogromnej liczbie wyników o różnym ciężarze gatunkowym, nie było to łatwym zadaniem. W jednym z wniosków Doktorantka podkreśliła, że metoda sekwencjonowania 16S rRNA cechuje się wyższą czułością i swoistością w porównaniu z metodami klasycznymi opartymi o hodowle drobnoustrojów i ich identyfikację biochemiczną. Chciałabym prosić Doktorantkę o wyrażenie opinii podczas obrony rozprawy doktorskiej na temat ograniczeń metody sekwencjonowania fragmentów genu 16S rRNA w identyfikacji drobnoustrojów (bakterii).

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr anal. med. Marceliny Jaworskiej pt. „Charakterystyka bakteryjnego elementu mikrobiomu układu moczowego u pacjentów dializowanych i u pacjentów po transplantacji nerki” wykonana pod kierunkiem Promotora Pani prof. dr hab. n. med. Marzeny Gajęckiej oraz Promotora pomocniczego Pani dr hab. n. med. Justyny Karolak w Katedrze i Zakładzie Genetyki i Mikrobiologii Farmaceutycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu spełnia kryteria formalne i merytoryczne stawiane tym pracom. Stanowi oryginalną i bardzo wartościową monografię, posiadającą ważny aspekt teoretyczny i praktyczny. Cel pracy został zrealizowany, a uzyskane wyniki badań prowadzonych wieloaspektowo i wielokierunkowo dostarczyły nowych i ważnych informacji na temat mikrobioty i mikrobiomu układu moczowego u pacjentów poddawanych dializoterapii oraz pacjentów po przeszczepie nerki w aspekcie znaczenia tych drobnoustrojów jako potencjalnych markerów diagnostycznych. Chciałabym podkreślić, że Doktorantka zaprezentowała się jako doświadczony badacz, posiadający ugruntowaną wiedzę oraz wysokie kwalifikacje w zakresie nowoczesnego warsztatu badawczego, przygotowanym do podejmowania nowych wyzwań i rozwiązywania nowych problemów.

W związku z powyższym zwracam się do Kapituły Kolegium Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr anal. med. Marceliny Jaworskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Zwracam się również z wnioskiem o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej, co uzasadniam wysoką wartością naukową przeprowadzonych badań i ich oryginalnością oraz realizacją tych badań w ramach projektu zewnętrznego uzyskanego w postępowaniu konkursowym.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej


prof. dr hab. n. farm. Anna Małm