



**POLITECHNIKA  
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY

dr hab. Beata Krawczyk, prof. uczelni PG  
e-mail: beakrawc@pg.edu.pl  
tel. 583472383; 583472302  
Politechnika Gdańska Wydział Chemiczny  
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii  
80-233 Gdańsk, ul. G. Narutowicza 11/12

Gdańsk 17.06.2024

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ  
Mgr Dominiki Szczerbiec**

**pt. „Wpływ drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* izolowanych z moczu na patogenność *Proteus mirabilis* i rozwój infekcyjnej kamicy moczowej”**

Recenzja została przygotowana na wniosek Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne

**1. Ocena formalna rozprawy doktorskiej**

Rozprawa doktorska Pani mgr Dominiki Szczerbiec pt. „Wpływ drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* izolowanych z moczu na patogenność *Proteus mirabilis* i rozwój infekcyjnej kamicy moczowej” została przygotowana w Katedrze Biologii Bakterii, Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Torzewskiej, prof. uczelni UŁ, jako Promotora.

Dysertacja to zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie trzech prac naukowych eksperymentalnych, w renomowanych czasopismach z listy JCR (Molecules, wyd. MDPI, IF:4.6, Pkt MEiN: 140; Scientific Reports, wyd. Nature, IF:4.6; International Journal of Molecular Science, wyd. MDPI, IF:5.5). Łączny IF prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej to 14,8. Wszystkie prace są wysoko punktowane na liście MEiN, łączna punktacja wynosi 630 (po 140 pkt. za publikację). Prace zostały opublikowane w latach 2022 i 2024. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem ze znacznym udziałem 60-70%. Doktoranta do pracy dołączyła również nieopublikowane na ten czas wyniki badań, które zostały umieszczone w rozdziale pt. „Wyniki nieopublikowane”

**Wykaz prac stanowiących podstawę dysertacji naukowej:**

**Publikacja 1. Szczerbiec, D., Piechocka, J., Głowacki, R., & Torzewska, A. (2022). Isolated from urine and their antimicrobial activity against uropathogenic *Proteus mirabilis*.**

Molecules (Basel, Switzerland), 27(17), 5557.

<https://doi.org/10.3390/molecules27175557>

**Publikacja 2. Szczerbiec, D., Bednarska-Szczepaniak, K., & Torzewska, A. (2024).** Antibacterial properties and urease suppression ability of *Lactobacillus* inhibit the development of infectious urinary stones caused by *Proteus mirabilis*. Scientific Reports, 14(1), 943. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51323-0>

**Publikacja 3. Szczerbiec, D., Słaba, M., & Torzewska, A. (2024).** Substances secreted by *Lactobacillus* spp. from the urinary tract microbiota play a protective role against *Proteus mirabilis* infections and their complications. International Journal of Molecular Sciences, 25(1), 103 <https://doi.org/10.3390/ijms25010103>

## 2. Ocena układu rozprawy doktorskiej

Układ rozprawy doktorskiej jest według mnie nietypowy. Uważam, że konstrukcja pracy nie jest do końca przemyślana. Pierwsze strony rozprawy doktorskiej to wykaz publikacji naukowych opublikowanych przez Doktorantkę, tych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, jak i pozostałego dorobku publikacyjnego nie wchodzącego w skład dysertacji oraz wykaz aktywności naukowej konferencyjnej. Pozostały dorobek naukowy najczęściej umieszcza się na końcu dysertacji. Aby wprowadzić czytelnika w temat rozprawy, jako pierwszy rozdział powinno umieścić się streszczenie (abstrakt w języka polskim i angielskim) oraz cel pracy, następnie można przejść do tła teoretycznego problemu i przeglądu literatury ze spisem referencji. W przedstawionej mi do oceny dysertacji, cel i zadania badawcze zostały zamieszczone tuż po wstępie, a po nich załączono 3 wydruki publikacji i opisano wyniki nieopublikowane. Bardziej przejrzyste byłoby podać przedmiot i cel dysertacji oraz każdą publikację traktować z osobna, dokonując skróconego opisu publikacji, wskazując na element nowości pracy, istotny wkład w naukę oraz na koniec wskazać wyraźny udział doktoranta w koncepcji, realizacji i koordynacji badań oraz przygotowaniu manuskryptu. Tutaj też można by dołączyć oświadczenia współautorów. Tego typu dysertacje oparte na publikacjach nie zawsze oddają zaangażowanie Doktoranta w eksperymenty, dlatego poza oświadczeniami warto wyraźnie podkreślić w tekście co było jej udziałem. Następnymi rozdziałami są: *Posumowanie wyników i wnioski*, *Wnioski końcowe* oraz *Dyskusja*. Te rozdziały oceniam pozytywnie. Jednakże rozdział *Posumowanie wyników i wnioski* można by umieścić po każdej publikacji a *Wnioski końcowe* potraktować jako konkluzje z tych 3 publikacji stanowiących podstawę dysertacji i połączyć z wynikami nieopublikowanymi.

Na końcu zamieszczono streszczenie dysertacji w języku polskim i angielskim oraz zamieszczono wykaz literatury oraz oświadczenia współautorów. Wydawałoby się, że wszystko uwzględniono w dysertacji, jednak w moim mniemaniu jest tutaj lekki chaos.

Być może taki układ został przyjęty na Uczelni jako norma, stąd moje uwagi nie traktuję jako zarzutów.

**2.1. Wstęp rozprawy doktorskiej** uwzględnia wszystkie niezbędne zagadnienia związane z patogennością *Proteus mirabilis* oraz naturalną mikrobiotą układu moczowego, w tym bakteriami z rodzaju *Lactobacillus*, które są przedmiotem badania w tej dysertacji. We wstępie opisano budowę komórki *P. mirabilis* oraz jej czynniki wirulencji. Zabrakło mi

wskazania różnic jakie występują podczas procesu inwazji *P. mirabilis* w stosunku do *E. coli* (UPEC). **Proszę o kilka słów wyjaśnienia.**

Bezpośrednim skutkiem aktywności ureazy produkowanej przez *Proteus mirabilis* i generowania amoniaku jest wzrost lokalnego pH. W drogach moczowych zasadowe pH prowadzi do wytrącania jonów wapnia i magnezu oraz tworzenia kamieni moczowych składających się z fosforanu amonowo-magnezowego (struwitu) i fosforanu wapnia (apatytu). Poruszony został również problem dysbiozy układu moczowego oraz podejście związane z leczeniem *Lactobacillus* jako probiotykiem, które to z powodu produkcji różnych zewnątrz-cząsteczkowych związków np. kwasów organicznych, zakwaszają na powrót środowisko moczu. Wstęp jest napisany poprawnym, naukowym językiem i ogranicza się ściśle do tematyki doktoratu.

Wartość dysertacji Pani mgr Dominiki Szczerbiec znacznie by zyskała na wartości, jeżeli w pracy znalazła by się publikacja o charakterze pracy przeglądowej pokazująca obecny stan wiedzy na temat problemów kamicy nerkowej oraz prewencji np. z zastosowaniem bakterii probiotycznych czy postbiotyków.

## **2.2. Metodyka badawcza i stosowane techniki**

Przy realizacji zadań badawczych Doktorantka zastosowała różnorodną metodologię, wymagającą umiejętności i doświadczenia. Ograniczę się tylko do tych doświadczeń, które wykonywała Doktorantka: mikrobiologia klasyczna (izolacja bakterii *Lactobacillus* i *P. mirabilis*) oraz spektrometria mas MALDI/TOF do identyfikacji gatunkowej bakterii; oznaczanie ilościowe kwasu mlekowego metodą spektrofotometryczną; badanie wpływu kwasów organicznych na wzrost *P. mirabilis* i zdolność do tworzenia biofilmu (test MTT); metoda spektrofotometryczna z użyciem jodku propidyny do oceny stanu błony komórkowej bakterii *P. mirabilis* jako narzędzie oceny przeżywalności; mikrosopia kontrastowo-fazowa do oceny tworzenia się kryształów apatytu i struwitu przez *P. mirabilis* w obecności *Lactobacillus*; ocena aktywności enzymatycznej ureazy w obecności *Lactobacillus* (kinetyka reakcji enzymatycznej) w produkcji amoniaku (metoda fenolowo-podchlorynowa); praca na linii komórek nabłonka pęcherza moczowego (HCV-29) i ocena cytotoksyczności *P. mirabilis* (testy MTT i LDH). Udział Doktorantki w planowaniu i przeprowadzeniu badań eksperymentalnych oceniam jako wiodący.

Prace eksperymentalne są bardzo dobrze zaplanowane, co świadczy o doświadczeniu Promotora i wykorzystaniu współpracy z osobami o innych umiejętnościach (np., w przypadku publikacji nr 2, w której opublikowano symulację dokowania kwasu mlekowego (ligand) do ureazy (matryca)(badania *in silico*).

Podsumowując, wszystkie eksperymenty są dobrze zorganizowane. **Techniki i metody pomiarowe są prawidłowo stosowane.** Metody stosowane w pracy badawczej są **odpowiednie do celów i hipotezy sformułowanej w rozprawie.** Autorka **bardzo dobrze opanowała zastosowane techniki badawcze.**

## **3. Ocena zastosowanego piśmiennictwa**

Literatura to 172 pozycje. Cytowania pochodzą z ostatnich 15 lat, są też pozycje bardzo „świeże” z lat 2020-2023.

#### 4. Ocena celu badawczego

Dysertacja naukowa Pani mgr Dominiki Szczerbiec dotyczy zakażeń układu moczowego o etiologii *Proteus mirabilis*, udziału tych bakterii w tworzeniu infekcyjnych kamieni moczowych. Zaniedbane infekcje mogą doprowadzić do niebezpiecznych powikłań, np. kamicy nerkowej a nawet sepsy. W ZUM ważne jest poznanie mechanizmów interakcji patogen-gospodarz, ale również jest istotne poznanie sposobów zapobiegania ZUM, niwelowania ich skutków oraz alternatywnych sposobów wspomagania leczenia kamicy nerkowej. Doktorantka odnosi się do roli ochronnej jaką może spełniać naturalna mikrobiota układu moczowego, tj. bakterii z rodzaju *Lactobacillus* w ZUM.

**4.1. Cel badawczy – tezy badawcze i cele pracy doktorskiej, które postawiono przed Doktorantką są sformułowane w sposób zrozumiały i konkretny.** Celem pracy naukowej Doktorantki było zbadania wpływu bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na patogenność *P. mirabilis* i potwierdzenie znaczenia tych bakterii w tworzeniu infekcyjnych kamieni nerkowych w układzie *in vitro*. Założono, że bakterie *Lactobacillus* posiadają aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec uropatogennej bakterii *P. mirabilis*, stad celem pracy było wskazanie, które z substancji wydzielanych przez *Lactobacillus* są istotne dla zmniejszenia populacji patogennych bakterii, zbadanie wpływu tych bakterii na adhezję i cytotoksyczności uropatogennej bakterii *P. mirabilis* w stosunku do komórek nabłonka moczowego. Podjęto również próbę wyjaśnienia wstępnych etapów tworzenia się infekcyjnych kamieni moczowych – struwitu oraz badano proces agregacji kryształów prowadzących do powstania kamieni moczowych.

**4.2. Realizacja zadań badawczych.** W rozdziale opisującym realizację zadań badawczych Doktorantka jest bardzo oszczędna. Każdą publikację analizuje tylko w kilku zdaniach. Uważam, że omówienie wyników powinno być potraktowane dokładniej. Tutaj Doktorantka zastosowała minimalizm. Brakuje mi również wyraźnego określenia swojego udziału w badaniach i własnych przemyśleń.

W przypadku wyników nieopublikowanych, powinien być umieszczony w tym rozdziale krótki wstęp, a dopiero później powinno się przejść do materiałów i metod oraz omówienia wyników. Wskazane byłoby, aby potraktować nieopublikowane jeszcze wyniki pracy jako wstęp do nowego manuskryptu gotowego do opublikowania.

Niemniej, wszystkie zadania badawcze zostały zrealizowane, tematyka badawcza jest spójna. Opublikowane badania zostały dobrze zaplanowane a wyniki w solidnie przedyskutowane.

#### **Stwierdzono, że:**

- Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* wydzielają kwasy organiczne specyficznie gatunkowo np. *L. crispatus* i *L. gasseri* wydzielają poza kwasem mlekowym i bursztynowym również kwas cytrynowy. Siła działania antybakteryjnego na *P. mirabilis* zależy nie tylko od gatunku *Lactobacillus*, ale również od szczepu. Wyjaśniono również mechanizm działania kwasów organicznych na *P. mirabilis* (zaburzenie funkcji błony komórkowej u *P. mirabilis*)

- Niektóre szczepy *Lactobacillus*, a w szczególności *L. gasseri* wykazują zdolność do hamowania krystalizacji mineralnych składników moczu i tym samym powstawania kryształów struwitu i apatytu.
- Zasugerowano mechanizm hamowania tworzenia infekcyjnych kamieni moczowych w obecności *Lactobacillus*. Udowodniono, że ma on związek z oddziaływaniem izoformy L-kwasu mlekowego z ureazą *P. mirabilis* i blokowaniem aktywności tego enzymu.
- Pokazano, że polisacharydy i białka zewnątrzkomórkowo wydzielane przez *Lactobacillus* mają wpływ na agregacje kryształów struwitu. Proces ten jest specyficzny gatunkowo (*L. jensenii* wpływa na zwiększenie kryształów; *L. gasseri* hamuje powstawanie kryształów).
- Pozakomórkowe substancje wydzielane przez *L. gasseri* mogą redukować adhezję uropatogennej *P. mirabilis* do komórek nabłonka pęcherza moczowego (badania *in vitro* na linii komórkowej HCV-29), a substancje wydzielane przez *L. gasseri* obniżają efekt cytotoksyczności wobec komórek pęcherza moczowego spowodowany obecnością *P. mirabilis*.

**Zastosowane metody, interpretacja i prezentacje wyników opublikowanych odpowiadają międzynarodowym standardom**, co zostało również docenione i zaakceptowane przez recenzentów artykułów ujętych w dysertacji naukowej.

Tematyka badawcza Doktorantki nawiązuje do obecnego trendu badania mechanizmów ZUM i powstawania kamieni nerkowych. Moim zdaniem zamierzony cel stanowiący podstawę Doktoratu został osiągnięty.

## 5. Praktyczne zastosowanie uzyskanych wyników

Uzyskane wyniki badań przedstawione w dysertacji naukowej mogą być przydatne w cenie przydatności wybranych gatunków/szczepów *Lactobacillus* u pacjentów z zidentyfikowaną infekcją *P. mirabilis* jako probiotyków lub postbiotyków, które będą wspomagały leczenie ZUM oraz zapobiegały tworzeniu kamieni nerkowych.

## 6. Pozostałe uwagi

Wyniki badań Doktorantki były finansowane w ramach programu „Inicjatywa Doskonałości-Uczelnia badawcza (IDUB) – Doktoranckie Granty Badawcze pt. „Zewnątrzkomórkowe substancje wydzielane przez *Lactobacillus* jako czynnik modulujący krystalizację w infekcyjnej kamicy moczowej powodowanej przez *Proteus mirabilis*”.

Pani Dominika Szczerbiec jest również współautorem 2 publikacji o łącznym IF 11,473 oraz 210 pkt według listy MEiN. Prace opublikowano w roku 2021. W nich Doktorantka nie jest wiodącym współautorem. Dorobek ten nie wchodzi w skład rozprawy doktorskiej.

Aktywność naukowa to również udział w 3 konferencjach naukowych zagranicznych w latach 2021, 2022 i 2023 oraz w 4 konferencjach o zasięgu krajowym (współautor 4 posterów i 1 prezentacji ustnej).

## **7. Pytania do Doktorantki**

1. Jakie zmiany jakościowe i ilościowe zachodzą na poziomie komensalnej mikroflory w przypadku ZUM ?
2. Jakie cechy powinien spełniać szczep bakterii, aby mógł być uznany za probiotyczny?
3. Nawiązując do przeciwdrobnoustrojowego działania kwasów organicznych wydzielanych przez *Lactobacillus* na *P. mirabilis*, doktorantka bada przeżywalność uropatogennej bakterii poprzez barwienie jodkiem propidyny i stosowanie spektrofotometry. W jaki inny sposób można oznaczyć czy bakteria jest żywa czy martwa, oczywiście poza metodami klasycznej mikrobiologii?
4. W składzie sztucznego moczu Doktorantka nie zastosowała jonów żelaza, proszę wyjaśnić dlaczego? Wiadomo, że żelazo jest podstawą różnych procesów życiowych bakterii, wobec tego jak radzi sobie z tym *Lactobacillus* ?
5. Jak odróżnić kamienie struwitowe od kamieni apatytowych?

## **8. Podsumowanie**

Badania prowadzone przez Doktorantkę oraz uzyskane wyniki są ważnymi etapami zrozumienia interakcji jakie zachodzą w układzie moczowym między mikroflorą komensalną a patogenami. Patogeneza ZUM o etiologii *Proteus mirabilis* jest co prawda znana, podobnie jak przyczyna powstawania kamieni nerkowych, ale związek wytwarzania kamieni nerkowych w zależności od składu mikroflory w układzie moczowym jest tematem cały czas aktualnym i wymagającym wyjaśnienia.

Prace są wysokiej jakości i zostały docenione przez recenzentów i edytora w czasopiśmie naukowym. Każda z przedstawionych prac wnosi nowości naukowe, metodologia badawcza jest rzetelnie przedstawiona a wyniki udokumentowane. Udział Doktorantki w powstawaniu publikacji naukowych pod względem koncepcyjnym, wykonawczym oraz edytorskim oceniam wysoko.

## **9. Wniosek końcowy**

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Dominiki Szczerbiec odpowiada wymogom Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668) stawianym pracom doktorskim. W związku z tym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie mgr Dominiki Szczerbiec do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Podpis  
dr hab. Beata Krawczyk, prof. uczelni PG