



UNIwersytet Medyczny w Lublinie
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
ul. dr W. Chodźki 1, 20-093 Lublin; tel. (fax) 81-448-71-00

Lublin, 16.06.2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Dominiki Szczerbiec

pt. „Wpływ drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus* izolowanych z moczu na patogenność *Proteus mirabilis* i rozwój infekcyjnej kamicy moczowej” wykonanej w Katedrze Biologii Bakterii, Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Torzewskiej, prof. Uł.

Podstawa wykonania recenzji

Podstawą wykonania recenzji rozprawy doktorskiej było pismo Przewodniczącej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne prof. dr hab. Agnieszki Marczak z dnia 16.04.2024 roku wystosowane zgodnie z decyzją wyżej wymienionej Komisji z dnia 16.04.2024 r. Postępowanie doktorskie prowadzone jest w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ocena podjętej tematyki badawczej

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska dotyczy bardzo ważnego i aktualnego problemu badań nad poszukiwaniem nowych interwencji w leczeniu lub zapobieganiu rozwoju infekcyjnej kamicy moczowej u ludzi. Kamica moczowa jest chorobą, której częstość występowania wynosi 1–13%, w zależności od regionu geograficznego, a liczba zachorowań i zgonów z powodu tej choroby stale rośnie, podczas gdy wiek osób cierpiących na kamicy moczową ma tendencję malejącą. Za to zjawisko może odpowiadać wiele czynników, wśród których wymienia się dietę, klimat, aktywność fizyczną lub otyłość, co w obecnym świecie wyraźnej zmiany zachowań społecznych wskazuje na potrzebę zwrócenia uwagi na ten problem. Bakterie z gatunku *Proteus mirabilis* zostały wybrane do badań przez Doktorantkę bardzo słusznie, ponieważ są częstym czynnikiem odpowiedzialnym za powikłaną postać zakażeń układu moczowego, a infekcje układu moczowego z udziałem tych drobnoustrojów mogą prowadzić do powstawania kamieni struwitowych nazywanych również infekcyjnymi

kamieniami moczowymi. Bakterie z rodzaju *Proteus* są izolowane nawet z 70% kamieni tego typu. Infekcyjna kamica moczowa jest wyjątkowo wymagająca w leczeniu, charakteryzująca się częstymi nawrotami a nieleczona może prowadzić do ciężkich powikłań, ze śmiertelnością osiagającą nawet 30%. Dlatego też cel prowadzonych badań, czyli ocena wpływu drobnoustrojów z rodzaju *Lactobacillus*, należących do naturalnej mikrobioty dróg moczowych na patogenność *P. mirabilis* oraz tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych *in vitro*, wydaje się warty zainteresowania i pogłębiania istniejącej wiedzy. Wybór tematyki badawczej jest zatem w pełni uzasadniony oraz bardzo istotny z naukowego, poznawczego i w konsekwencji praktycznego punktu widzenia nauk biologicznych i farmaceutycznych. W mojej opinii założone cele zostały osiągnięte i udokumentowane w recenzowanych publikacjach naukowych o zasięgu międzynarodowym, a badania wykonano w ramach projektu naukowego o tytule: „Zewnątrzkomórkowe substancje wydzielane przez *Lactobacillus* jako czynnik modulujący krystalizację w infekcyjnej kamicy moczowej powodowanej przez *Proteus mirabilis*” w ramach Doktoranckich Grantów Badawczych „Inicjatywa Doskonałości-Uczelnia Badawcza” (7/DGB/IDUB/2022).

Ogólna charakterystyka rozprawy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska jest cyklem publikacji naukowych, w skład którego wchodzi trzy oryginalne publikacje z listy JCR czasopism punktowanych MEiN, o łącznym współczynniku IF równym 14,8 (PK 420). Są to czasopisma o zasięgu międzynarodowym powołujące niezależnych recenzentów oceniających wartość naukową pracy badawczej. Fakt ten oraz pierwsze autorstwo Doktorantki potwierdzają zasadność przygotowania dysertacji doktorskiej w takiej formie. Artykuły naukowe są w sposób oczywisty połączone spójną tematyką chronologicznie opublikowanych prac:

1. Szczerbiec D., Piechocka J., Głowacki R., Torzewska A. Organic acids secreted by *Lactobacillus* ssp. isolated from urine and their antimicrobial activity against uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Molecules*. 2022, 27, 5557. IF: 4,6 (2022), Punktacja MEiN: 140 pkt
2. Szczerbiec D., Bednarska-Szczepaniak K., Torzewska A. Antibacterial properties and urease suppression ability of *Lactobacillus* inhibit the development of infectious urinary stones caused by *Proteus mirabilis*. *Sci. Rep.* 2024, 14, 934. IF: 4,6 (2022), Punktacja MEiN: 140 pkt.
3. Szczerbiec D., Słaba M., Torzewska A. Substances Secreted by *Lactobacillus* spp. From the Urinary Tract Microbiota Play a Protective Role against *Proteus mirabilis* Infections and Their Complications. *Int. J. Mol. Sci.* 2024, 25, 103. IF: 5,6 (2022), Punktacja MEiN: 140 pkt

Prace są wieloautorskie, a rozprawa zawiera opis wkładu Pani Dominiki Szczerbiec oraz pozostałych współautorów wraz z ich odpowiednimi oświadczeniami. Doktorantka jest we wszystkich pracach włączonych do dysertacji pierwszym autorem i określiła swój wkład od 60-70%, co wynika ze współudziału w przygotowaniu koncepcji prac, aktywnym udziale w

planowaniu doświadczeń, ich wykonaniu oraz analizie i interpretacji wyników. Doktorantka brała udział w przygotowaniu manuskryptów, ale nie korespondowała z wydawnictwem. Wkład ten należy ocenić jako znaczący i wskazujący na pracę własną Doktorantki.

Poza załączonymi wydrukami opublikowanych prac, rozprawa zawiera rozdziały typowe dla dysertacji doktorskich, takie jak Wstęp, Cel pracy, Podsumowanie Wyników i Wnioski, Dyskusja oraz spis piśmiennictwa, obejmujący 172 pozycji literaturowych, krajowych i zagranicznych, głównie z dwóch ostatnich dekad, uporządkowanych według kolejności cytowania. Ponadto, na początku dysertacji zamieszczono wykaz używanych skrótów, a na końcu pracy są umieszczone streszczenia w j. polskim i angielskim, oraz oświadczenia współautorów.

Dołączony do dysertacji opis aktywności naukowej Doktorantki jest dowodem, że aktywnie prezentowała wyniki swoich badań na konferencjach naukowych i włączyła się dodatkowo do zespołowej pracy naukowej.

Rozprawa doktorska jest napisana w zwięzłym i syntetycznym stylu oraz wykazuje odpowiednią jakość naukową. Język jest poprawny stylistycznie. Chciałabym zwrócić uwagę na nieprawidłowe użycie w tekście terminu „odporność” w stosunku do bakterii, które jak wiemy mogą być co najwyżej „oporne” na działanie różnych czynników. W całości rozprawa spełnia wymagania formalne.

Ocena merytoryczna rozprawy

Wspólnym tematem zawartych w pracy doktorskiej zainteresowań badawczych Pani mgr Dominiki Szczerbiec jest ocena potencjalnie przydatnych bakterii probiotycznych możliwych do zastosowania wobec patogennych *P. mirabilis* oraz ich wpływ na tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych *in vitro*. Przeprowadzona została analiza wpływu szczepów *Lactobacillus* na każdy etap tworzenia infekcyjnych kamieni moczowych: adhezję uropatogenów do nabłonka, wrażliwość na czynniki antybakteryjne pałeczek z rodzaju *Lactobacillus*, krystalizację składników mineralnych moczu oraz agregację powstałych kryształów.

Na dwudziestu pięciu stronach Wstępu, wchodzącego w skład dysertacji, Autorka charakteryzuje znaczenie kliniczne bakterii z gatunku *Proteus mirabilis* w kontekście zakażeń układu moczowego i tworzenia infekcyjnych kamieni moczowych zwracając uwagę na duży problem nawracania choroby i jej leczenia. Wstęp wprowadza czytelnika również w tematykę naturalnej mikrobioty dróg moczowych z naciskiem na szczepy z rodzaju *Lactobacillus*, ich właściwości antagonistyczne wobec patogenów i możliwość ich wykorzystania w leczeniu chorób związanych z układem moczowym. W tym miejscu pragnę zwrócić uwagę, że taksonomia rodziny Lactobacillaceae została uaktualniona i opublikowana w the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) 15 kwietnia 2020 r. Według nowej klasyfikacji powinny zostać nazwane gatunki wymienione w tekście Wstępu, m. in. *Limosilactobacillus reuteri*, *Lacticaseibacillus casei*, *Levilactobacillus brevis*.

Założone cele Doktorantka realizowała etapowo stosując zarówno tradycyjne metody hodowlane jak i zaawansowane techniki mikroskopowe, spektrometryczne, kolorymetryczne, dobrane odpowiednio do postawionych sobie celów szczegółowych. W publikacji nr 1 Doktorantka opisała izolację i identyfikację klinicznych szczepów, które zostały użyte w badaniach założonych w celu pracy. Wyizolowane szczepy z rodzaju *Lactobacillus*, wykazywały działanie przeciwbakteryjne, hamując wzrost (wnikając przez błonę komórkową i zaburzając funkcje komórkowe) oraz tworzenie biofilmu badanych patogenów *P. mirabilis* z różną intensywnością, która była związana z ilością i rodzajem kwasów organicznych produkowanych przez te bakterie probiotyczne. Wyniki tych badań wskazujące, że kwasy organiczne wydzielane przez *Lactobacillus* mają potencjał w zapobieganiu i leczeniu ZUM oraz mogą mieć wpływ na choroby związane z infekcjami dróg moczowych, jak rozwój infekcyjnych kamieni moczowych, uzasadniają kontynuację badań prowadzonych przez Doktorantkę. W kolejnej publikacji opisane zostały wybrane szczepy *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. jensenii* oraz *L. gasseri*), które hamowały krystalizację mineralnych składników moczu w obecności badanych szczepów *P. mirabilis*. Badania potwierdziły fakt, że właściwości probiotyczne mają charakter szczepowy i wytypowano szczep *L. gasseri* 35.3 o najsilniejszych zdolnościach hamujących krystalizację, w przeciwieństwie do najstabilniej aktywnego szczepu *L. jensenii* 22.2. W tej samej publikacji został określony prawdopodobny mechanizm hamowania tworzenia infekcyjnych kamieni moczowych związany z wpływem wytwarzanego przez szczepy *Lactobacillus* spp. kwasu mlekowego na aktywność enzymu ureazy. Wyniki kinetyki reakcji enzymatycznej oraz badania *in silico* wykazały, że kwas mlekowy hamuje aktywność ureazy poprzez oddziaływania kompetycyjne z centrum aktywnym enzymu. W ostatniej publikacji nr 3 zaprezentowano wyniki wskazujące, że substancje wydzielane przez *L. gasseri* 35.3 hamują adhezję badanych szczepów *P. mirabilis* KP i 5628 do nabłonka pęcherza moczowego nawet do 70%. Dodatkowo, stwierdzono hamowanie cytotoksyczności wobec komórek HCV-29 oraz hamowanie krystalizacji składników moczu indukowaną szczepami *P. mirabilis* poprzez substancje zewnątrzkomórkowe *Lactobacillus*, głównie *L. gasseri* 35.3 zarówno w układzie bez nabłonka dróg moczowych jak i w obecności komórek pęcherza moczowego. W tym etapie badań dowiedziono, że *L. gasseri* 35.3 wyróżnia się wytwarzaniem wysokich stężeń kwasu L-mlekowego, który jak wykazano we wcześniejszych doświadczeniach ma właściwości hamujące aktywność ureazy.

W dysertacji znalazła się również część badań niepublikowanych, na podstawie których stwierdzono, że składniki zewnątrzkomórkowe, głównie polisacharydy wytwarzane przez badany szczep *L. jensenii* 22.2 wpływają na proces agregacji struwitu. Chociaż jak wspomniała Doktorantka, uzyskane wyniki powinny zostać potwierdzone, a i zakres badań poszerzony.

Dyskusja rozprawy zarówno w dysertacji jak i w prezentowanych publikacjach przedstawia Autorkę jako rozważnego naukowca, który umiejętnie dyskutuje własne, uzyskane wyniki z danymi prezentowanymi przez innych autorów potwierdzając, że ma rozeznanie w temacie badawczym i potrafi krytycznie analizować dane. Wnioski wyciągnięte

przez Doktorantkę wpływają z badań i rzetelnie wskazują na osiągnięcie przez nią celów badawczych.

Biorąc pod uwagę powyższe, zdecydowanie można stwierdzić, że przedłożona praca jest opracowaniem nie tylko interesującym, ale przede wszystkim ważnym. W mojej ocenie wartość merytoryczna osiągnięć przedstawionych w pracy jest wysoka, nie tylko z czysto poznawczego punktu widzenia, ale także w związku ze stosunkowo dużym potencjałem aplikacyjnym. Pojawia się tutaj pytanie o możliwość wykorzystania tych danych w praktyce leczniczej i profilaktyce. Czy może pojawiły się jakieś pomysły w jakiej postaci i w jaki sposób można by zastosować badane przez Doktorantkę preparaty oraz jakie kolejne kroki powinny zostać powzięte w celu wdrożenia tych wyników? Szczególnie wyróżnia się tu jeden szczep probiotyczny o bardzo obiecujących cechach i potencjale patentowym.

Całościowa ocena wartości naukowej

W trakcie czytania rozprawy doktorskiej nabrałam przekonania, że Pani mgr Dominika Szczerbiec opanowała umiejętność planowania, a następnie wytrwałej realizacji badań naukowych. Wykazała pełne zrozumienie zagadnień teoretycznych z zakresu tematu badawczego, znajomość zastosowanych zaawansowanych technik laboratoryjnych oraz potrafi merytorycznie zinterpretować uzyskane wyniki, podsumować i krytycznie omówić wyniki własne w odniesieniu do publikacji innych autorów. Uważam, że końcowe wnioski w pełni wpływają z otrzymanych wyników i ich analiza tworzy powiązaną i logiczną całość. Doktorantka wykorzystwała doświadczenia własne, oraz bardzo dobrego zespołu badawczego, co stanowi gwarancję rzetelności i poprawności uzyskanych wyników badań. Podjęcie przez Doktorantkę niniejszego tematu badawczego uważam za uzasadnione i niezwykle ważne, zarówno pod względem poznawczym jak i praktycznym.

Pragnę podkreślić, iż wartość merytoryczna niniejszej rozprawy doktorskiej jest bardzo wysoka, dlatego **wniosuję o jej wyróżnienie**. Rozprawa przedstawia wyniki, które mają potencjał aplikacyjny, co może mieć duże znaczenie dla zdrowia publicznego. W mojej opinii, prowadzone przez Doktorantkę badania wpływu postbiotyków na zjadliwość bakterii *Proteus mirabilis* oraz tworzenie infekcyjnych kamieni moczowych *in vitro* są oryginalne i pionierskie, a wartość badań została jeszcze wzmocniona poprzez wykorzystanie zaawansowanych narzędzi badawczych. Dostarczają one interesujących i ważnych danych w temacie rozwoju nowych interwencji w leczeniu infekcyjnej kamicy moczowej, ale wyniki te mogą być rozszerzone również na inne jednostki chorobowe o takiej samej etiologii. Pragnę podkreślić, że w dobie narastania oporności wśród bakterii wywołujących zakażenia u ludzi i zwierząt, niezwykle cenne są wszystkie wysiłki naukowców skierowane na badania nad możliwością zastosowania alternatywnych metod leczenia lub jego wspomaganie jak również badania nad metodami profilaktyki zakażeń. Na szczególne wyróżnienie zasługuje osiągnięcie Doktorantki w pozyskiwaniu funduszy na badania naukowe. Była ona kierownikiem projektu w ramach Doktoranckich Grantów Badawczych „Inicjatywa Doskonałości-Uczelnia Badawcza”, dzięki któremu sfinansowane zostały badania w ramach pracy doktorskiej.

Dodatkowo, rozprawa doktorska jest cyklem publikacji naukowych, w skład którego wchodzi trzy oryginalne publikacje z listy JCR czasopism punktowanych MEiN, o łącznym współczynniku IF równym 14,8 (PK 420) co jest wartością przekraczającą wymagania i zdecydowanie zasługującą na wyróżnienie.

Wnioski końcowe

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Dominiki Szczerbiec spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.). Na tej podstawie wnioskuję do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o **dopuszczenie mgr Dominiki Szczerbiec do dalszych etapów postępowania doktorskiego**. Jednocześnie, ze względu na wysoki poziom prezentowanej pracy, wnioskuję o **wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej**.

dr hab. n. farm. Izabela Korona-Głowniak