

Prof. dr hab. Wanda Małek
Zakład Genetyki i Mikrobiologii
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Akademicka 19
20-033 Lublin
E-mail: wanda.malek@poczta.umcs.lublin.pl

Lublin, 11.05.2016r.

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR PIOTRA MAJEWSKIEGO
PT. „MOLEKULARNE PODSTAWY OPORNOŚCI NA KARBAPENEMY WŚRÓD
KLINICZNYCH SZCZEPÓW *ENTEROBACTER CLOACAE*”**

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Piotra Majewskiego została wykonana w Zakładzie Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku pod bezpośrednim kierownictwem Pani Prof. dr hab. n. med. Elżbiety Anny Trynieszewskiej i promotora pomocniczego Pana dr n. med. Piotra Wieczorka. Badania przedstawione w rozprawie zostały sfinansowane z dotacji projakościowej Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego w ramach projektu 52-KNOW-2013 „Molekularne mechanizmy oporności na karbapenemy wśród szczepów *Enterobacter cloacae*”, którego kierownikiem był Doktorant.

Narastająca wielolekooporność bakterii na antybiotyki to jeden z ważniejszych problemów współczesnej medycyny związany z kumulowaniem się różnych mechanizmów oporności na różne grupy leków co w istotny sposób ogranicza skuteczność terapii w chorobach infekcyjnych i stanowi przedmiot zainteresowania naukowców całego świata. Do leków wykazujących aktywność względem wielolekoopornych patogenów należą karbapenemy o szerokim spektrum działania i wysokiej aktywności bakteriobójczej, ale trzeba także zaznaczyć, że coraz częściej izoluje się mikroorganizmy odporne na te antybiotyki. Zatem, wszystkie nowe osiągnięcia naukowe w kierunku lepszego poznania mechanizmów lekooporności, pokrewieństwa genetycznego, a co za tym idzie dróg rozprzestrzeniania się patogenów są ważne nie tylko ze względów naukowych, ale i potencjalnie aplikacyjnych w terapii chorób infekcyjnych.

Z powyższych względów, podjęty przez mgr Piotra Majewskiego temat badawczy uważam za merytorycznie istotny, a uzyskane w trakcie wykonywania pracy doktorskiej wyniki niewątpliwie, wnoszą do nauki światowej nowe informacje i mają wpływ na jej rozwój.

Rozprawa doktorska Pana Piotra Majewskiego ma typowy układ tego rodzaju prac naukowych. Liczy 186 stron i składa się z następujących rozdziałów: Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Piśmiennictwo i dodatkowo zawiera wykaz tabel, rycin i skrótów. W tekst rozprawy Doktorant wkomponował 31 tabel i 66 rycin. W różnych miejscach pracy doktorskiej mgr Piotr Majewski powołuje się na 390 pozycji literatury głównie z ostatnich lat co potwierdza aktualność problemu będącego przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Zawarty na 34 stronach „Wstęp: podzielony jest na podrozdziały obejmujące dwa główne zakresy tematyczne. Jeden z nich dotyczy charakterystyki antybiotyków β -laktamowych, a w szczególności karbapenemów, mechanizmów ich działania, właściwości, wykorzystania, mechanizmów oporności i interakcji tych mechanizmów, drugi zaś związany jest z taksonomią bakterii rodzaju *Enterobacter*, do którego należy *Enterobacter cloacae*, charakterystyki i chorobotwórczości *E. cloacae* i naturalnych mechanizmów oporności tych bakterii. Rozdział ten opracowany jest w oparciu o bardzo bogatą literaturę, jest logiczny, wyczerpujący i dobrze uzasadnia podjęte cele badawcze, które uważam za ambitne i merytorycznie istotne. Moje drobne uwagi, które nie obniżają wartości merytorycznej tego rozdziału dotyczą:

1. Braku opisu skrótów użytych w Tabeli 1, tj. $T_{1/2}$, C_{max}
2. Stwierdzenia na str. 29, β -laktamazy wykazują pewien stopień **homologii** z wybranymi DD-peptydazami. Według mnie powinno być „...pewien stopień podobieństwa sekwencji aminokwasowej...”.
3. Zdania na str. 40, „...*Enterobacter sakazakii* został przeniesiony do nowego gatunku *Cronobacter*...” i podana jest tylko nazwa rodzajowa.

Cele pracy, opisane w kolejnym rozdziale, są przedstawione dokładnie oraz jednoznacznie i uważam je za poważne wyzwanie naukowe, których realizacja nie była zadaniem łatwym i wymagała przeprowadzenia wielu badań różnymi specjalistycznymi technikami.

Rozdział „Materiały i metody” został podzielony na dwie podstawowe części. W pierwszej z nich Autor przedstawił materiał badaczy, tj. szczepy *E. cloacae* z kolekcji Zakładu Diagnostyki Mikrobiologicznej i Immunologii Infekcyjnej UM w Białymstoku pochodzące od pacjentów hospitalizowanych. 44 z nich to bakterie oporne na co najmniej jeden związek przeciwbakteryjny z grupy karbapenemów (R), a 21 to wrażliwe na karbapenemy izolaty stanowiące grupę kontrolną (S). W drugim podrozdziale Doktorant opisał metody fenotypowe wykorzystane w badaniach, tj.: dotyczące biochemicznej

identyfikacji izolatów *E. cloacae*, oceny ich lekowrażliwości, detekcji: ESBL, cefalosporynazy AmpC i karbapenemaz metodą dyfuzyjno-krażkową oraz biochemiczny test Carba-NP do identyfikacji aktywności karbapenemaz jak i metody molekularne włączając izolację i oczyszczanie genomowego DNA i RNA, łańcuchową reakcję polimerazy do amplifikacji badanych genów, analizę produktów reakcji PCR, ilościową reakcję polimerazy (qPCR) do oceny poziomu ekspresji genów, metodę MLST do określenia pokrewieństwa genetycznego badanych szczepów i analizę statystyczną przy udziale oprogramowania Statistica 12 wykorzystując różne testy w analizie danych. Wszystkie techniki badawcze zostały szczegółowo opisane i dobrze dobrane do realizacji celów pracy. Dokładny i klarowny opis metod badawczych zawsze pochwalam gdyż takie podejście ułatwia interpretację wyników i pozwala na powtórzenie procedury bez większych problemów. Mam trzy drobne uwagi. Jedna dotyczy Ryciny 2. W opisie jest informacja, że w detekcji β -laktamaz i cefalosporynazy AmpC są wykorzystane dwa podłoża, tj. z kloksacyliną i bez kloksacyliny, a na zdjęciu jest tylko jedna płytka, zatem proszę o kilka słów wyjaśnienia. Druga odnosi się do skróconej formy słowa rybonukleaza, który powinno się pisać RNaza, trzecia słowa „harpin” moim zdaniem powinno się pisać struktura szpilki do włosów.

W kolejnym rozdziale „Wyniki” Doktorant jasno omówił wszystkie uzyskane wyniki i zamieścił je na 57 stronach, proporcjonalnie do wielkości zadania. Zostały one nie tylko dobrze opisane, ale także klarownie przedstawione na rycinach i w tabelach. Pierwszy etap badań dotyczył odsetka szczepów *E. cloacae* pochodzących od pacjentów z różnych klinik i oddziałów intensywnej terapii i opieki medycznej. Zdecydowanie najwięcej szczepów (43,2%) pochodziło z oddziałów intensywnej opieki medycznej, a ich głównym źródłem był materiał pobrany z układu oddechowego (30,8%) i moczowego (23,1%). Z układu moczowego i oddechowego pochodził również największy odsetek szczepów *E. cloacae* opornych na karbapenemy, tj., odpowiednio 34,1% i 20,5%.

Drugim wątkiem recenzowanej pracy była wrażliwość badanych izolatów *E. cloacae* na pięć antybiotyków z grupy karbapenemów i cztery leki z grupy cefalosporyn. Doktorant wykazał, że ertapenem charakteryzuje się najwyższą wartością MIC w grupie szczepów opornych na karbapenemy, a najniższą doripenem i biapenem, podczas gdy w grupie szczepów wrażliwych na karbapenemy najmniej aktywnym karbapenemem okazał się imipenem.

W oparciu o wartości MIC, zgodnie z kryterium EUCAST, mgr Piotr Majewski sklasyfikował badane szczepy (z dwóch grup badanych) jako wrażliwe, średniowrażliwe i odporne oraz ocenił ich procentowy skład. Wykazał, że wszystkie szczepy z grupy opornych na

karbapenemy są odporne na ertapenem, a także na cefalosporyny, podczas gdy wszystkie szczepy z grupy wrażliwych na karbapenemy były wrażliwe na wszystkie badane antybiotyki z grupy karbapenemów, a najaktywniejszą substancją z grupy cefalosporyn, względem tych bakterii, był cefepim (71% szczepów wrażliwych).

Ze względu na coraz częstsze występowanie pałeczek Gram-ujemnych wytwarzających β -laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym (ESBL), Doktorant określił częstość występowania mechanizmu ESBL w grupie badanych szczepów *E. cloacae* opornych na przynajmniej jeden związek z grupy karbapenemów (R) i w grupie szczepów wrażliwych na karbapenemy (S). Stosując test „dwóch krążków” stwierdził podobną częstość mechanizmu ESBL wśród wrażliwych jak i opornych szczepów, odpowiednio 48% i 41%. Stosując inhibitory karbapenemaz nie wykazał enzymatycznej oporności na karbapenemy w populacji szczepów badanych, jakkolwiek wykorzystując test „Carba-NP” wykazał aktywność karbapenemazy w dwóch izolatach, R3 i R4, co zostało potwierdzone poprzez amplifikację genu *bla_{oxa-48}* kodującego nabytą karbapenemazę i analizę jego sekwencji. Moje pytanie do Doktoranta dotyczy stopnia podobieństwa sekwencji zamplifikowanego genu *bla_{oxa-48}* do sekwencji referencyjnych genów tej karbapenemazy z bazy danych, jako że nie znajduję tej informacji w pracy doktorskiej.

Następny etap badań dotyczył analizy relatywnych zmian poziomu ekspresji genów kodujących chromosomalną cefalosporynazę AmpC i genów kodujących białka porynowe OmpF i OmpC. Na potrzeby analizy statystycznej, Doktorant zastosował przekształcenie logarytmiczne otrzymanych wartości krotności zmian (FC) poziomu ekspresji genów względem genów szczepu referencyjnego stanowiącego punkt odniesienia. Wszystkie patogeny z grupy „R”, z wyjątkiem R4, wykazały hiperprodukcję transkryptu genu *ampC*, a większość z nich (53%) wykazała relatywny spadek ekspresji genu kodującego białko OmpF, podczas gdy w populacji szczepów *E. cloacae* wrażliwych na karbapenemy, relatywny spadek ekspresji genu *ompF* mgr Piotr Majewski zanotował jedynie u 19% szczepów. Jeśli idzie o gen *ompC* to relatywny spadek ekspresji tego genu został stwierdzony znacznie częściej w grupie szczepów „S” (33%) niż w wśród szczepów „R” (9%), w której to grupie aż 55,8% izolatów ujawniło zwiększoną ekspresję *ompC*.

Wysoko oceniam pomysł mgr Piotra Majewskiego przydzielenia szczepom *E. cloacae* określonych genotypów (9) w oparciu o balans porynowy *ompF/ompC*, który obrazuje relatywne zmiany ekspresji genów *ompF* i *ompC* jak i analizę stopnia polaryzacji balansu porynowego w kierunku ekspresji genu *ompC* co może mieć związek z rozwojem oporności na karbapenemy.

Za bardzo ważne zadanie uważam również analizę porównawczą zależności wartości MIC poszczególnych antybiotyków z poziomem zmian ekspresji genów *bla_{ampC}* oraz genów *ompF* i *ompC* wykorzystując współczynnik korelacji Pearsona. Na podstawie tej analizy mgr Piotr Majewski wykazał, że relatywny spadek ekspresji genu *ompF* koreluje dodatnio z wartościami MIC antybiotyków β -laktamowych. Ujemną korelację Autor wykazał między wartościami MIC antybiotyków β -laktamowych a relatywnymi zmianami poziomu ekspresji genu *ompC*, który koduje białko porynowe tworzące kanał o małej średnicy. Mgr Piotr Majewski określił również korelację między wartościami wskaźnika derepresja-polaryzacja (WDP) a wartościami MIC antybiotyków β -laktamowych.

Ostatni etap badań Doktoranta to analiza pokrewieństwa genetycznego badanych szczepów *E. cloacae* w oparciu o analizę porównawczą sekwencji siedmiu genów metabolizmu podstawowego wykorzystując technikę MLST. Stosując tę metodę mgr Piotr Majewski opisał pięć unikatowych alleli genów i pięć nowych typów sekwencyjnych (ST). Pokrewieństwo poszczególnych typów sekwencyjnych badanych szczepów *E. cloacae*, Doktorant zobrazował na filogramie, który wskazuje na wysoki stopień zróżnicowania typów sekwencyjnych wśród szczepów wrażliwych na karbapenemy, bez dominującego typu sekwencyjnego, podczas gdy w populacji szczepów „R” zdecydowanie dominuje typ sekwencyjny ST-89 (88,6% izolatów) co sugeruje ich klonalne pochodzenie i rozprzestrzenianie się wśród pacjentów Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego i Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego w Białymstoku.

Na koniec omawiania tej części pracy doktorskiej, dwie drobne uwagi dotyczące: braku objaśnień niektórych skrótów użytych w tabelach i na rycinach oraz takich stwierdzeń jak, np. hiperprodukcja bakteryjnego enzymu klasy C (str. 78), wskaźnik poziomu hiperprodukcji cefalosporynazy, do dyskusji, bo przecież Doktorant badał poziom ekspresji genów, a nie poziom białek.

Uzyskane przez Doktoranta wyniki zostały omówione w rozdziale „Dyskusja” na tle dostępnych danych głównie z najnowszej literatury przedmiotu. Rozdział ten napisany jest bardzo dojrzałe i komunikatywnie, a jego lektura nie pozostawia wątpliwości, że mgr Piotr Majewski bardzo dobrze zna aktualny stan wiedzy w zakresie prowadzonych badań. Doktorant rzeczowo i wszechstronnie konfrontuje wyniki własne z danymi z literatury. Z „Dyskusji” jednoznacznie wynika jak ważne zadanie zostało podjęte w pracy doktorskiej przez mgr Piotra Majewskiego i jak ogromnie złożone są problemy badane przez Doktoranta. Rozprawę kończą wspomniane wcześniej „Wnioski”, „Streszczenie” w języku polskim i angielskim, „Piśmiennictwo” oraz informacja o finansowaniu badań. Żaden z tych rozdziałów

nie budzi moich zastrzeżeń. Wnioski zostały sformułowane adekwatnie do uzyskanych wyników i wyraźnie wskazują na duże znaczenie poznawcze przeprowadzonych badań. W syntetyczny i klarowny sposób został opracowany rozdział „Streszenie”, w którym Autor, po krótkim wstępie dotyczącym narastającej antybiotykooporności i zagrożeń z tym związanych, przedstawił swój materiał badawczy i najważniejsze uzyskane wyniki. Rozdział ten Doktorant zakończył refleksją, że coraz częstsze występowanie wielolekoopornych bakterii może doprowadzić do takiej sytuacji jaka miała miejsce przed wprowadzeniem do leczenia pierwszego leku przeciwbakteryjnego. Spis literatury jest staranny, a zgromadzona literatura została umiejętnie wykorzystana w rozdziale „Wstęp” i „Dyskusja”.

Reasumując stwierdzam, że szeroko zakrojone i pracochłonne badania zostały przeprowadzone prawidłowo pod względem metodycznym. Tak wykonane badania uwiarygodniają uzyskane wyniki i wyciągnięte wnioski, a ich niewątpliwe znacznie poznawcze z pewnymi aspektami aplikacyjnymi jest niezwykle ważne.

Wniosek końcowy

Mając na uwadze przedstawione dane dotyczące formalnej, metodycznej i merytorycznej oceny pracy doktorskiej Pana mgr Piotra Majewskiego pt. „Molekularne podstawy oporności na karbapenemy wśród klinicznych szczepów *Enterobacter cloacae*” stwierdzam, że rozprawa stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe i wnosi nowe dane do nauki. Doktorant wykazał się bardzo dobrą znajomością literatury przedmiotu, umiejętnością wykorzystania nowoczesnych technik badawczych i dużą konsekwencją w realizacji założonych celów.

W świetle powyższych danych uważam, że rozprawa doktorska mgr Piotra Majewskiego spełnia wszystkie wymogi stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Pana mgr Piotra Majewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, ze względu na bardzo wysoki poziom merytoryczny i metodyczny ocenianej rozprawy oraz bardzo staranne i przejrzyste opracowanie uzyskanych wyników, stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o wyróżnienie recenzowanej pracy doktorskiej mgr Piotra Majewskiego stosowną nagrodą.



Prof. dr hab. Wanda Małek