

Warszawa, dn.29.10.2013 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Klaudii Polakowskiej

pt.” Badania genetycznych i fenotypowych determinant specyficznej wobec gospodarza wirulencji szczepów *Staphylococcus aureus* z wykorzystaniem modeli In vivo „.

Gronkowce należą do najbardziej rozpowszechnionych gatunków bakterii wykazując niezwykle „wszechstronne” umiejętności interakcji z organizmem gospodarza, poczynając od komensalizmu poprzez łagodne zakażenia miejscowe do uogólnionych infekcji o piorunującym często przebiegu połączonych z wysoką śmiertelnością. Nie wszystkie gatunki gronkowców wywołują zakażenia. Na szczególną uwagę zasługuje *Staphylococcus aureus*, który jest jednym z najważniejszych czynników etiologicznych zakażeń człowieka, będąc jednocześnie ważnym składnikiem tzw. „normalnej” flory zasiedlając bezobjawowo błony śluzowe np. nosogardło, przewód pokarmowy. Pomimo ponad stu lat prowadzonych badań nad biologią gronkowca złocistego i poznania ogromnej liczby wytwarzanych przez niego czynników biologicznie czynnych ciągle brak odpowiedzi, na pytanie które z nich odgrywają kluczową rolę w zakażeniu, nie tylko w poszczególnych jego etapach ale także w postaciach zakażeń.

W związku z powyższym przedstawiona mi do oceny Rozprawa wpisuje się w ważną tematykę badawczą.

Praca ma układ klasyczny aczkolwiek w dotychczas recenzowanych przeze mnie pracach streszczenia zazwyczaj znajdowały się na końcu rozprawy. Umieszczenie ich na początku (polsko – angielskojęzyczna wersja) wydaje się korzystniejsze pokazując w całości poruszane problemy. Bardzo przydatnym jest załączenie przed wstępem bardzo szczegółowego słowniczka skrótów zastosowanych w Rozprawie.

Wstęp zawarty jest na 18-u stronach i podzielony jest na 5 głównych podrozdziałów, z których w dwóch wydzielono bardziej szczegółowe podpunkty.

W tematykę gatunku *Staphylococcus aureus* wprowadza pierwszy z podrozdziałów podając pewne dane historyczne oraz taksonomiczne a także dane na temat czynników ryzyka, poszczególnych postaci zakażeń u ludzi, w tym zespołów chorobowych, za które odpowiedzialne są toksyny gronkowca złocistego. Jest też krótkie odniesienie do zakażeń

u drobiu powodowanych przez *S. aureus*, w tym wspomniany jest nowy zespół chorobowy, bakteryjna martwica chrząstki z zapaleniem szpiku kostnego.

Trudno mi zaakceptować pewne sformułowania. Co oznacza chroniczna choroba wirusowa? Zakażenia szpitalne to także zakażenie miejsca operowanego. Rozumiem, że chodzi o osoby przyjmujące dożylnie środki odurzające. Trudno zgodzić się z informacją, że jęczmień jest stanem zagrażającym życiu. Powinno być zespół skóry oparzonej (nb w dalszej części pracy tak właśnie jest sformułowany). Ta część o charakterze medycznym wymaga niewielkiego uporządkowania.

W dalszej części tego podrozdziału wspomniano o głównych fenotypach oporności u szczepów pochodzenia ludzkiego i wskazano na niewielką liczbę rozproszonych danych dotyczących izolatów zwierzęcych. Nie jest już prawdą, że MRSA oznacza oporność na wszystkie antybiotyki beta-laktamowe. A ceftobiprol? I ceftarolina?

Ostatnia partia poświęcona jest pokazaniu zmienności i różnorodności szczepów *S. aureus* dzięki zdolności pozyskiwania drogą horyzontalną (plazmidy, transpozony, fagi) genów zarówno warunkujących oporność na antybiotyki jak i zjadliwość. Podkreślona jest ogromna rola ruchomych elementów genetycznych w „kreowaniu” nowych cech gronkowca złocistego. Zwrócono uwagę na ogromną rolę fagów (transdukcja) w przenoszeniu fragmentów DNA między komórkami gronkowca kodujących zarówno oporność na antybiotyki, sole metali jak i czynniki wirulencji. Jest wiele dowodów wskazujących na przenoszenie kaset genowych między gatunkami rodzaju *Staphylococcus* warunkujących oporność na metycylinę, natomiast nie znam prac mówiących o przenoszeniu oporności na wankomycynę ze szczepów odzwierzęcych do *S. aureus* izolowanych od ludzi.

W podrozdziale o czynnikach wirulencji syntetycznie przedstawiono najważniejsze z nich i poddano szczegółowemu omówieniu systemy regulacji ich ekspresji, ze szczególnym naciskiem na *agr*. Szeroko omówiono proteazy i ich rolę w patogenności gronkowca złocistego. Jest to od lat jeden z najważniejszych obszarów badań naukowych zespołu Wydziału UJ, w którym wykonana została recenzowana przeze mnie Rozprawa.

Ciekawie przedstawiono epidemiologię zakażeń szczególnie metody typowania molekularnego i ich rolę i to nie tylko w dochodzeniu epidemiologicznym. Wskazano, że

wybór metod zależny jest od stawianych pytań. Jest kilka niefortunnych sformułowań jak bakterie MRSA (?), Hospital –acquired, Community –acquired (powinno być associated) „...” z obniżoną wrażliwością glikopeptydu” (s.24/25). Należałoby wspomnieć także o genie *mecC*.

Ostatni podrozdział opisuje modele biologiczne stosowane w badaniach patogenności gronkowców. Szczegółowo opisuje modele zastosowane w Rozprawie.

Cel pracy jest szeroki i jasno sformułowany.

W kolejnej części następuje szczegółowy opis materiałów i metod (33 s). Na podkreślenie zasługuje ich bogactwo i różnorodność. Nie jest do końca dla mnie zrozumiała zastosowana metoda oznaczania lekowrażliwości i stosowane podłoża zarówno do hodowli jak i wykonania antybiogramu gronkowców. Wg jakich zaleceń została ona wykonana? Czy nie zaszło przy opracowywaniu Rozprawy zamienienie podłoży. (MH vs TSA)

Część Wyniki jest bardzo bogata (36s). Na podkreślenie zasługuje identyfikacja wybranych do doświadczeń szczepów zarówno za pomocą metod fenotypowych jak i weryfikacja jej przez zastosowanie metod genetycznych (*gen gap*) co pozwoliło mieć pewność co do poprawności przynależności ich do określonego gatunku.

Ciekawa i starannie opracowaną jest część dotycząca badań na modelach doświadczalnych *in vivo*. Słusznie wybrano model zarodka kurzego *G. gallus* do badania właściwości biologicznych szczepów pochodzenia drobiowego i skonstrastowano z badaniem na modelu *C. elegans* celem ustalenia specyficzności gatunkowej działania szczepów. Wykazano, że wybór do badań zarodka kurzego był słuszny i wskazywał na zróżnicowanie w aktywności biologicznej poszczególnych szczepów w zależności od ich cech zjadliwości. Udało się wyselekcjonować 8 szczepów gronkowca o wysokiej wirulencji. Ciekawym wynikiem jest także wykazanie niskiej zjadliwości szczepów *S. xylosus*, stanowiących naturalną florę bakteryjną skóry drobiu. Zachowanie szczepów różnych gatunków gronkowca w modelu *C. elegans* nie korespondowało z wynikami uzyskanymi na zarodkach kurzych a szczepy *S. xylosus* wykazywały wirulencję wyższą niż pozostałe.

W kolejnej części dokonano oceny fenotypowej aktywności proteolitycznej i hemolitycznej szczepów *Staphylococcus* pochodzenia drobiowego a także ich wrażliwości na wybrane antybiotyki i podjęto próbę skorelowania ich z właściwościami biologicznymi. Wytwarzanie

proteaz było częstsze niż hemolizyny a ze względu na szeroką wrażliwość na antybiotyki nie było możliwe ustalenie korelacji między tymi cechami. Antybiotykooporność jednak nie jest uważana za cechę zjadliwości utrudnia ona jedynie prowadzenie terapii.

Bardzo szeroko opisano wyniki typowania molekularnego wskazując zarówno klonalny charakter rozprzestrzeniania się gronkowców jak i pozyskiwanie nowych cech genetycznych drogą horyzontalnego przekazywania genów (MGE). Ważną rolę w tym procesie stanowi transdukcja i koniugacja.

W końcowej części tego rozdziału podjęto próbę skorelowania cech szczepów gronkowców z ich działaniem biologicznym przede wszystkim w badaniach na modelu zarodka kurzego, który uznano za lepszy model badawczy i bardziej specyficzny dla szczepów pochodzenia drobiowego niż *C. elegans*. Wykazano, że wszystkie wirulentne szczepy posiadają plazmid pAvX kodujący proteazę cysteinową. Należą one do grupy *agr* II i zazwyczaj do typu ST5 i jednego z czterech typów *spa* (t002, t062, t0127 , t3478). Inne metody typowania molekularnego wskazały także na ich podobieństwa.

Szczególną uwagę poświęcono badaniom przy użyciu szczepu charakteryzującego się wysoką produkcją stafopainy C (ch24) i dodatkowo ją wzmacniając poprzez wprowadzenie konstruktu plazmidowego zawierającego sekwencję kodującą stafopainę C (pALC/P2/stp). Wprowadzano go także do szczepów Newman i laboratoryjnego szczepu RN4220 oraz kilku wybranych szczepów *S. aureus* i dla porównania szczepów *S. xylosus*. Wykazano niższą przeżywalność zarodków po wprowadzeniu do nich szczepów *S. aureus* transformowanych plazmidem pALC/P2/stp wskazując na rolę stafopainy C w wirulencji. Fakt niskiej wirulencji *S. xylosus* mimo wprowadzenia do nich plazmidu noszącego gen stafopainy świadczy, że do uzyskania przez nie zjadliwości potrzeba więcej czynników, inne genetyczne tło. Wyniki są bogato ilustrowane wykresami, zdjęciami i tabelami co zwiększa ich czytelność.

Po rozdziale Wyniki następuje obszerna dyskusja wyników badań własnych na tle dokonań innych uczonych (literatura światowa). Podkreślono znaczenie czynników wirulencji w zależności od postaci i etapu zakażenia gronkowcowego. Odniesiono się krytycznie do różnych modeli doświadczalnych wskazując na istotność zastosowania właściwego modelu do źródła (gospodarza) pochodzenia szczepu. Szeroko przedyskutowano metody typowania molekularnego i ich przydatność. Trudno się zgodzić, że kasety typu IV nie niosą innych

genów oporności niż *mecA* i że są jedynie u szczepów powodujących zakażenia pozaszpitalne. Coraz częściej są obecne wśród *S. aureus* odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne. Niefortunnie użyto sformułowania „... kasety te odpowiedzialne są za zakażenia pozaszpitalne”.. . To nie kasety ale *S. aureus* jest odpowiedzialny za zakażenia. W dalszej części także nieszczęśliwe sformułowania „..wywoływania infekcji w różnych gospodarzach”.....” niektóre linie nie są ograniczone.”, ...”ST1 jest częstym klonem infekcji u ludzi..”...” w ludzkiej a nie w ptasiej patogenezie..”..unikania gronkowcowego białka „

W sposób interesujący i kompetentny przedyskutowano czynniki wirulencji i ich współdziałanie w procesie patogenezы zakażeń gronkowcowych odnosząc się zarówno do wyników uzyskanych w przedstawionej Rozprawie jak i danych dostępnych w literaturze światowej.

Rozprawa kończy się podsumowaniem i 7-ma wnioskami. Niektóre z nich mają charakter wyników a nie wniosków i powinny być zmodyfikowane. Pracę zamyka część Piśmiennictwo zawierająca 262 pozycje.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że wybór tematu był bardzo trafny a cele badawcze postawione przejrzyste. Doktorantka wykazała się szeroką znajomością tematu i nowoczesnych metod, które pozwoliły jej na zrealizowanie postawionego celu. Dyskusja pokazała jej znaczne odczytanie i umiejętność prezentacji wyników własnych w kontekście wyników pochodzących z wiodących grup badawczych na świecie. Uchybienia językowe wymagają poprawy ale nie zmniejszają jakości merytorycznej Rozprawy.

Rozprawa doktorska mgr Klaudii Polakowskiej pt.” Badania genetycznych i fenotypowych determinant specyficznej wobec gospodarza wirulencji szczepów *Staphylococcus aureus* z wykorzystaniem modeli *in vivo*„ spełnia wymogi stawiane tego typu rozprawom i dlatego wnoszę, do Wysokiej Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie mgr Klaudii Polakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof.dr hab. med. Waleria Hryniewicz