Łódź. 28.02.2022

Prof. dr hab. Adam Jaworski
Emerytowany prof. zw. Uniwersytetu Łódzkiego
obecnie
Wykładowca Genetyki i Biologii Medycznej
Państwowa Wyższa Szkoła Wschodnioeuropejska w Przemyślu

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Anny Podgórskiej
pt. *„Analiza genów kodujących 16S rRNA, z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji w celu identyfikacji bakteryjnych czynników etiologicznych infekcyjnego zapalenia wsierdzia”.*

Praca doktorska mgr inż. Anny Podgórskiej została zrealizowana pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Lutyńskiej w Zakładzie Biologii Medycznej Narodowego Instytutu Kardiologii im. Stefana Kardynała Wyszyńskiego, Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie. Praca ma postać bardzo obszernej monografii (211 stron) przygotowanej w typowy sposób dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych i medycznych. Praca obejmuje wstęp (21stron), założenia i cele pracy, wyniki (62 strony, w tym 51 rycin i tabel), dyskusję (24 strony), piśmiennictwo (232 pozycje). Zachowane są zatem odpowiednie proporcje pomiędzy częścią teoretyczną, częścią doświadczalną i dyskusją. Zwraca uwagę liczba cytowanych prac i artykułów (232 pozycje, w większości z ostatnich 10 lat, w tym opublikowanych w latach 2020 2021).

Z naukowej ciekawości chciałbym zadać Doktorantce i Pani Promotor następujące pytanie, jakie powodami, przesłankami kierowały się, decydując się na opracowanie pracy doktorskiej w postaci bardzo obszernej monografii, a nie 1-2 prac doświadczalnych (w oparciu o rozdziały Wyniki, Dyskusja) i znaczącego artykułu przeglądowego (w oparciu o Wstęp) ? Jestem bardzo doświadczonym recenzentem prac doktorskich i habilitacyjnych. Stąd wiem, że od około 10 lat prace doktorskie, habilitacyjne w postaci monografii są rzadko opracowywane, szczególnie w dziedzinie biologii eksperymentalnej, biologii i genetyki molekularnej, biochemii, biofizyki, czy też mikrobiologii i wirusologii. Jest kilka powodów, do których zaliczam: monografie są czytane przez nielicznych zainteresowanych, a dobra praca doświadczalna lub artykuł przeglądowy jest bardziej dostępny i dociera do wielu czytelników. W rozwoju kariery naukowej liczą się przede wszystkim opublikowane prace doświadczalne, upowszechniane w światowym obiegu naukowym w uznanych specjalistycznych, czasopismach naukowych. Wiem także, że wielu samodzielnych pracowników naukowych niechętnie podejmuję się recenzji monografii doktorskich i habilitacyjnych, chociaż dobrze wiedzą, że jest to obowiązek samodzielnego pracownika naukowego, nauczyciela akademickiego, a nie zwykłe „dorabianie” do pensji.

Z uwagą i dużym zainteresowaniem zapoznałem się z postawioną hipotezą badawczą i bardzo ambitnymi celami pracy doktorskiej mgr inż. Anny Podgórskiej. Założono, że większość drobnoustrojów patogennych kolonizujących zastawki/krew mogą stanowić drobnoustroje „*wybredne*” (jak napisano w pracy) lub dotychczas nie opisane (*w pracy chyba błędnie nazwano je opisanymi)* lub *nie poddających się mikrobiologicznym metodom hodowalnych* .Te ostatnie ja nazwałbym drobnoustrojami niehodowalanymi, bo dotychczas nie potrafimy jeszcze stworzyć odpowiednich pożywek i warunków dla ich hodowli. Zatem, sformułowany pierwszy cel pracy: opracowanie wiarygodnej metodyki metagenomicznej dla

analizy populacji drobnoustrojów, obecnych w zastawkach i w krwi pacjentów z rozpoznaniem klinicznym IZW, poddanych zabiegom chirurgicznym, przy zastosowaniu sekwencjonowania nowej generacji (NGS) genu 16S rRNA - uznaję za bardzo ambitny i ważny. Założono bowiem, że powodzenie w realizacji tego wyzwania może stworzyć szansę wykorzystania metagenomicznej analizy do precyzyjnej identyfikacji tych drobnoustrojów, które są czynnikami etiologicznymi infekcyjnego zapalenia wsierdzia (IZW).

Sformułowane cele pracy doktorskiej mgr inż. Anny Podgórskiej oceniam jako realizację jednego z ważnych wyzwań naukowych, z którymi zapoznałem się w 2019 roku, wypełniając obowiązki jednego z recenzentów dorobku naukowego, w postępowaniu o nadanie dr hab. Annie Lityńskiej tytułu profesora nauk medycznych. Wówczas, w swojej recenzji pisałem z uznaniem *„Dr hab. Anna Lutyńska podjęła w Instytucie Kardiologii wielokierunkowe działania, których kierunkowym celem jest przyśpieszenie badań poznawczych i aplikacyjnych z zakresu dziedziczenia chorób układu sercowo-naczyniowego, identyfikacji i wczesnego wykrywania mechanizmów oporności drobnoustrojów na leki oraz rosnących zagrożeń epidemiologicznych patogenami alarmowymi, a także wiele innych ważnych wyzwań dotyczących chorób serca i układu krwionośnego, w tym relacji między układem odpornościowym człowieka i komórkami ściany naczyniowej w procesie odrzucania przeszczepu".*

Nie jestem lekarzem, ale z bardzo dużym zainteresowaniem przeczytałem bardzo dobrze napisany pierwszy rozdział *Wstępu* na temat choroby serca, jakim jest infekcyjne zapalenie wsierdzia. Dużo nauczyłem się na temat charakterystyki tej groźnej dla życia choroby, epidemiologii, czynników ryzyka, powikłań, diagnostyki, leczenia i zapobiegania. Sądzę, że ten tekst jest prawie gotowy do publikacji (o ile nie był już opublikowany) w jednym z naukowych, a także popularno-naukowym czasopism. Artykuł taki spotka się zapewne z zainteresowaniem wielu czytelników, bo przecież choroby serca i układu krążenia są od wielu lat na pierwszym miejscu wszystkich zgonów w Polsce.

W drugim rozdziale części teoretycznej pracy, Doktorantka, omawia z dużym znawstwem zastosowania genomiki i metagenomiki, jako nowoczesnych narzędzi molekularnych w głębszym poznawaniu ogromnego świata bakterii, w szczególności bakterii trudno hodowalnych i niehodowalnych. Przywołuje przykłady wykorzystania sekwencjonowania genu 16S rRNA w diagnostyce klinicznej tych bakterii, które są przyczyną ciężkich zakażeń zagrażających życiu. Cytuje pracę opublikowaną w 2017 roku wskazującą przydatność amplifikacji i sekwencjonowania genu 16S rRNA w diagnostyce bakterii izolowanych z tkanek serca pacjentów poddawanych operacjom kardiochirurgicznym.

Nie wnoszę żadnych krytycznych uwag do rozdziału Materiały i Metody, opracowanego bardzo dokładnie, powiedziałbym skrupulatnie, krok po kroku, poczynając od obiektu badań, zastawek i krwi obwodowej pobranych od dwóch grup pacjentów, odpowiednio, ze zdiagnozowanym i wykluczonym zespołem IZW. Opisuje zastosowane metody i techniki hodowli i klasycznej mikrobiologicznej diagnostyki bakterii, następnie metod izolacji i oczyszczania DNA, amplifikacji zmiennych fragmentów 16S rRNA, tworzenia bibliotek fragmentów DNA, kończąc na opisie wysoko przepustowych, nowoczesnych technikach sekwencjonowania oraz zaawansowanych programów analizy bioinfomatycznej zgromadzonych, ogromnych baz danych.

W tym miejscu mam następujące pytanie do Doktorantki. Które z bardzo dobrze zaplanowanych etapów realizacji tego ogromnego i zapewne bardzo kosztownego projektu pracy doktorskiej zostały wykonane przez Doktorantkę i grupę jej współpracowników w laboratoriach Narodowego Instytutu Kardiologii w Warszawie, a które we współpracy naukowej z partnerami z innych ośrodków naukowych w Polsce, czy też poprzez płatną usługę w specjalistycznych, komercyjnych ośrodkach badawczych ?

W uzasadnieniu sformułowanych celów swojej pracy doktorskiej mg inż. Anna Podgórska pisze, że jednym z celów pracy była *„Ocena przydatności zastosowania analizy metagenomów bakterii do wykrywania czynników etiologicznych IZW „w odniesieniu do konwencjonalnych metod mikrobiologicznych*". Mając to na uwadze, z zainteresowaniem zapoznałem się z wynikami perfekcyjnie wykonanej przez Doktorantkę diagnostyki mikrobiologicznej skolonizowanych przez bakterie zastawek lub ich fragmentów oraz próbek krwi obwodowej pobranych od 63 pacjentów ze zdefiniowanym IZW. Okazało się, że w posiewach na podłoża hodowlane 63 próbek krwi pobranych od chorych ze zdefiniowanym rozpoznaniem IZW, wzrost bakterii uzyskano w 16 z nich (25%). Dalsza gatunkowa identyfikacja wyhodowanych bakterii ujawniła obecność w poszczególnych próbach gronkowców (56,25%), paciorkowców (25%), pałeczek (12,5%). Badania mikrobiologiczne umożliwiły wykrycie w dodatnich posiewach czynnika etiologicznego IZW w 9 przypadkach (14%). Wśród tych 9 dodatnich posiewów zastawek lub ich fragmentów enterokoki wyhodowano w 3 przypadkach (33,3%), gronkowce wyhodowano w 2 przypadkach (22,2%), pałeczki wyhodowano w 4 przypadkach (44,4%). Przeprowadzone badania metagenomiczne fragmentów zastawek umożliwiły identyfikację bakteryjnego DNA w znacznie większej liczbie analizowanych próbek podczas gdy klasycznymi metodami mikrobiologii wykrywalność patogenów w posiewach krwi sięgała 25%. Co więcej, wśród 47 ujemnych posiewów krwi, analiza metagenomiczna pozwoliła na gatunkową identyfikację DNA bakteryjnego aż w 25 fragmentach badanych zastawek (53%). Z zastosowaniem techniki NGS wśród ujemnych posiewów krwi wykryto DNA wielu groźnych patogenów: 5 gatunków gronkowców (*S. aureus, S. haemolyticus, S. epidermidis*, 8 gatunków paciorkowców (*S. anginosus, S.mutans,S. constellatus, S. bovis, S. sanguinis, S. gordonii*), *L. rhamnosus, B. quintana, Neisseriasp., K. granulomatis, P.stutzeri, E.faecalis* oraz *G.adiacens*.

Resumując, analiza metagenomiczna zmiennych fragmentów bakteryjnego genu kodującego 16S rRNA pozwoliła na wykrycie czynników etiologicznych IZW (DNA bakteryjnego), które nie mogły być zidentyfikowane specjalistycznymi metodami mikrobiologii lekarskiej. Ponadto, udało się, po raz pierwszy w Polsce, zidentyfikować DNA *B.quintana* wśród prób od pacjentów ze zdefiniowanym IZW. Nie jestem lekarzem, ale podzielam pogląd Doktorantki, że identyfikacja czynnika etiologicznego metodami współczesnej metagenomiki (identyfikacji DNA określonego gatunku, szczepu bakterii) u pacjentów z infekcyjnym zapaleniem wsierdzia, może pomóc w ich leczeniu, poprzez możliwe zastosowanie bardziej ukierunkowanej, celowanej, terapii, np. antybiotykoterapii.

Chciałbym podkreślić, że dokumentacja wyników, uzyskanych na kolejnych etapach realizacji nakreślonych celów poznawczych i aplikacyjnych, w postaci dobrze zaplanowanych tabel i ładnych, czytelnych, kolorowych rycin „umila" czytanie i studiowanie tej pracy, a oszczędne autorskie omówienia kolejnych rezultatów ułatwia ich zrozumienie, ale wcale nie wyklucza możliwie innej ich interpretacji.

W podsumowaniu oceny rozdziału Wyniki stwierdzam, że wszystkie wyniki są bardzo dobrze udokumentowane. Zaś zastosowanie w realizacji celów pracy nowoczesnych metod i technik mikrobiologicznych i molekularnych z wykorzystaniem najnowszej aparatury badawczej, a także biegłość „warsztatowa" Doktorantki i innych wykonawców - uprawniają mnie do stwierdzenia, że uzyskane wyniki są w pełni wiarygodne, a cztery wnioski końcowe, sformułowane na stronie 175 monografii, są uprawnione.

Dyskusja stanowi w ocenianej monografii doktorskiej obszerny (24 strony), bogaty w treści rozdział i mogłaby być rozważana, moim zdaniem, jako interesujący materiał dla przygotowania oddzielnego artykułu przeglądowego. Po przeczytaniu tej bardzo dobrze napisanej dyskusji mogę powiedzieć, że mgr inż. Anna Podgórska ma dużą, aktualną wiedzę

na temat różnych aspektów i wyzwań dotyczących infekcyjnego zapalenia wsierdzia, w tym mikrobiologicznych i molekularnych metod i technik analizy i identyfikacji czynników etiologicznych tej groźnej choroby. Z dużym znawstwem i swobodą przytacza dane bogato cytowanej literatury światowej, wskazuje ich wady i zalety w analizie krwi obwodowej i fragmentów zastawek, konfrontując je umiejętnie z zastosowaną w jej pracy doktorskiej innowacyjną metodą, z wykorzystaniem strategii 16S rRNA/PCR/NGS/sekwencjonowanie metodą Sangera. Przytacza dane z publikowanych w ostatnich latach prac, w których dyskutuje się duże nadzieje wiążące się z walidacją kliniczną procedur identyfikacji drobnoustrojów przy pomocy różnych odmian reakcji PCR, połączonych z sekwencjonowaniem zarówno gatunkowo swoistych fragmentów DNA genu 16S rRNA, jak i fragmentów typowych dla określonych grup bakterii. Nadzieje, jak pisze, wiąże się także z szerokim zastosowaniem analiz metegenomicznych nie tylko bakterii, ale również grzybów. Kolejnym, wymienionym w *Dyskusji* wyzwaniem jest opracowanie metagenomicznej metody typu „shot gun", pozwalającej na ujawnienie leko-wrażliwości patogenów, walidację klinicznych badań serologicznych w kierunku *T. whipplei*, *Bartonella* sp., *Chlamydia* sp., *Legionella* sp., *Brucella* sp. i *Mycoplasma*, a także obniżenie częstości wyników fałszywie ujemnych w diagnostyce klinicznej.

W zakończeniu niniejszej recenzji chciałbym powiedzieć, że od 20 lat z uwagą śledzę rozwój badań poznawczych i aplikacyjnych populacji mikroorganizmów w różnych środowiskach i akumulację nowych, często zaskakujących wyników, uzyskiwanych przy zastosowaniu wciąż doskonalonych „narzędzi" molekularnych i genetycznych. Szczególne moje zainteresowanie budzą realizowane w ostatnich 10 latach ogromne projekty analizy mikrobiomu człowieka, jaki i jego części składowych. Analizy metagenomów, metatranskryptomów, metaproteomów, metabolomów ludzi dostarczają wyników, które bardzo znacząco wzbogacają naszą wiedzę o strukturze i roli biologicznej naszego mikrobiomu w „zdrowiu i w chorobie". Cieszę się, że takie projekty są dużym powodzeniem realizowane w Uczelniach i Instytutach Polskiej Akademii Nauk, w tym przez zespół prof. dr hab. Anny Lutyńskiej w Narodowym Instytucie Kardiologii w Warszawie.

Wnioski końcowe

W świetle wyżej przedstawionej, bardzo pozytywnej oceny całej monografii doktorskiej mgr inż. Anny Podgórskiej, w tym uznania dla znacznej wartości naukowej uzyskanych wyników o charakterze poznawczym i aplikacyjnym stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wymogi Ustawy o Szkolnictwie Wyższym, stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora w dyscyplinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Rady Naukowej Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii w Warszawie o dopuszczenie mgr inż. Anny Podgórskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wyrażam pogląd, że praca doktorska mgr inż. Anny Podgórskiej zasługuje, w mojej opinii, na stosowne wyróżnienie, ze względu na rangę podjętego tematu, ambitny cel i uzyskane, bardzo obiecujące wyniki. Z postawieniem formalnego wniosku wstrzymam się jednak do czasu udzielenia mi odpowiedzi przez mgr inż. Annę Podgórską na sformułowane w niniejszej recenzji pytania.