Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD PARAZYTOLOGII
ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 62 68 | +48 71 375 62 14
fax +48 71 325 21 51

zpar@uwr.edu.pl | www.mikrobiologia.uni.wroc.pl

Dr hab. Marcin Popiołek, prof. UWr

Wrocław, 20.10.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Lepczyńskiej pt.

„Regulacja proliferacji *Blastocystis* ST3 (Protista) i mikrobioty jelitowej probiotykami oraz wybranymi lekami *in vitro*"

Blastocystis sp. należy obecnie do grupy najczęstszych patogenów jelitowych człowieka, a obserwowana częstość przypadków kolonizacji ludzi przez tego pierwotniaka jest wyższa niż notowana dla *Giardia, Entamoeba* czy *Cryptosporidium*. Jego frekwencja w ogólnej populacji krajów uprzemysłowionych przekracza 5% i sięga 30-60% w krajach rozwijających się. Blastocystoza może przebiegać bezobjawowo, ale może także manifestować się ciężkimi symptomami, zwłaszcza u pacjentów z obniżoną odpornością. Takie rozpowszechnienie w populacji ludzkiej jak i udokumentowany potencjał zoonotyczny w naturalny sposób rodzą pytania o wpływ tego pasożyta na zdrowie publiczne, zwiększając tym samym zainteresowanie środowiska naukowego tym ważnym zagadnieniem biologii medycznej. Pomimo ostatnich, znaczących postępów w gromadzeniu wiedzy na temat biologii *Blastocystis* sp., wiele aspektów epidemiologii, a zwłaszcza patogenezy tej parazytozy, nadal pozostaje nieznanych lub słabo zbadanych. Sytuacja taka pozostawia wciąż szerokie pole do poszukiwania kluczowych mechanizmów biologicznych i dróg inwazji tego pasożyta oraz wyjaśnienia jego klinicznego wpływu na ludzkie zdrowie. W tym kontekście temat rozprawy doktorskiej mgr Małgorzaty Lepczyńskiej dobrze wpisuje się w aktualnie obowiązujące trendy współczesnej parazytologii medycznej.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się z dwóch oryginalnych artykułów naukowych, opublikowanych w języku angielskim w latach 2019-2021, oraz podsumowującego uzyskane wyniki łącznika w formie manuskryptu. Obie prace, dotyczące regulacji proliferacji *Blastocystis* ST3 i mikrobioty jelitowej w warunkach *in vitro* probiotykami oraz lekami stosowanymi w dolegliwościach żołądkowych, ulokowano w renomowanych czasopismach o międzynarodowym zasięgu, legitymujących się wysokim, sumarycznym współczynnikiem wpływu (IF) równym 7,762.

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD PARAZYTOLOGII
ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 62 68 | +48 71 375 62 14
fax +48 71 325 21 51

zpar@uwr.edu.pl | www.mikrobiologia.uni.wroc.pl

Autoreferat integrujący, będące podstawą rozprawy, publikacje został napisany starannie i przejrzyście. Posiada standardową strukturę, obejmującą: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki badań, podsumowanie i wnioski oraz wykorzystaną literaturę. Całość suplementują trzy załączniki, zawierające manuskrypty publikacji, ich analizę bibliometryczną oraz oświadczenia współautorów.

W podzielonym na sześć podrozdziałów "Wstępie", Autorka zapoznaje czytelnika z najważniejszymi aspektami biologii *Blastocystis*: taksonomią, budową oraz cyklem rozwojowym. W oparciu o trafnie dobrane piśmiennictwo omawia nadal jeszcze dość kontrowersyjny „status" *Blastocystis*, jako organizmu komensalnego *vs.* pasożytniczego. Opisuje jego patogenezę, zwracając uwagę na relacje łączące notowane objawy z dotychczas opisanymi podtypami. Wspomina także o zależnej od rozmieszczenia geograficznego specyficzności żywicielskiej. W dalszej części charakteryzuje mikrobiotę jelitową, a także zachodzące między nią a *Blastocystis* interakcje. Omawia znaczenie i rolę bakterii probiotycznych, a także inhibitorów pompy protonowej i blokerów H2, w alternatywnych terapiach leczenia niektórych parazytoz jelitowych. Przedstawiony przegląd jest opracowany w sposób przejrzysty i logiczny. Co ważne, nie jest przesadnie rozbudowany, koncentruje się na sednie problemu i umiejętnie wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane i wykorzystywane w dalszej części rozprawy. "Wstęp" płynnie przechodzi w rozdział przedstawiający jasno sprecyzowane cele pracy.

W bardzo zwięźle napisanym rozdziale "Materiał i metody" Autorka wymienia wykorzystany do badań podtyp pierwotniaka, użyte szczepy bakterii i grzyby drożdżopodobne, a także zawiesiny zawierające metabolity mikroorganizmów. Przedstawia rodzaje i sposób prowadzenia eksperymentów, w tym hodowli ksenicznej i aksenicznej oraz hodowli badanych mikroorganizmów z dodatkiem różnych stężeń leków. W przeciwieństwie do umiejętnie i trafnie wyważonej puli informacji przedstawionej we „Wstępie", jak i w „Wynikach badań", lektura tego fragmentu rozprawy budzi, w moim odczuciu, pewien niedosyt. Poza dość skrótowym opisem wspomnianych metod, Doktorantka nie wspomina w tym miejscu np. o jakiejkolwiek analizie statystycznej. Być może intencją Autorki było uniknięcie zbyt dużego powtórzenia treści zawartej w opublikowanych artykułach, jednak tak lakonicznie jej przedstawienie nie oddaje, chociażby „włożonego" w jej wykonanie, nakładu pracy.

Konstrukcja rozdziału „Wyniki badań pracy doktorskiej" jest spójna i logiczna, a opis uzyskanych wyników został podzielony na dwie części, nawiązując do dołączonych artykułów. Podstawą osiągnięcia

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD PARAZYTOLOGII
ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 62 68 | +48 71 375 62 14
fax +48 71 325 21 51

zpar@uwr.edu.pl | www.mikrobiologia.uni.wroc.pl

naukowego mgr Małgorzaty Lepczyńskiej są dwa, opublikowane w czasopismach o wysokim wskaźniku IF, artykuły:

1) Lepczyńska M., Dzika E. 2019. The influence of probiotic bacteria and human gut microorganisms causing opportunistic infections on *Blastocystis* ST3. Gut Pathogens, 11, 6; (IF: 3,274; MNiSW: 70 pkt),
2) Lepczyńska M., Dzika E., Chen W., Lu Ch. 2021. Influence of proton pump inhibitors and histamine receptor 2 antagonists on *Blastocystis* ST3 and selected microorganisms of intestinal microbiota in vitro. Clinical and Translational Gastroenterology, 12(4): e00325; (IF: 4,488; MNiSW: 140 pkt).

Zarówno sumaryczny IF (7,762) prac, będących podstawą rozprawy doktorskiej, jak i liczbę punktów MNiSW (210) uważam za wysoką. Obie publikacje są, mniej lub bardziej, współautorskie czego nie postrzegam jako słabej strony osiągnięcia. Prace te powstały we współpracy zarówno z Promotorką, jak i (w przypadku drugiej publikacji) ze współautorami pochodzącymi z ośrodków zagranicznych, co wskazuje na cenną umiejętność nawiązywania przez Doktorantkę współpracy naukowej. W obydwu publikacjach mgr Małgorzata Lepczyńska jest pierwszym, a zarazem korespondencyjnym autorem, a deklarowany przez Doktorantkę udział we wszystkich pracach waha się w przedziale od 70 do 90%, co w przypadku publikacji współautorskich, wskazuje na wiodącą rolę mgr Małgorzaty Lepczyńskiej w procesie ich powstawania, zarówno na etapie koncepcyjnym, jak i wykonawczym. Dotychczasową zauważalność analizowanych publikacji w środowisku naukowym, mierzoną liczbą ich cytowań, nazwałbym na ten moment umiarkowanie optymistyczną. Na ogólną liczbę 5 wykazanych cytowań, wszystkie pochodzą tylko z jednej ale najwcześniej (2019 r.) opublikowanej pracy. W moim odczuciu pokazuje to jedynie, że zauważalność i wzrost liczby cytowań, zwłaszcza drugiej - najnowszej, bo opublikowanej w 2021 roku, pracy pozostaje tylko kwestią czasu.

Merytoryczna ocena, będących podstawą rozprawy doktorskiej, publikacji została już dokonana na etapie kilku niezależnych i międzynarodowych recenzji redakcyjnych, a tematyka oraz ranga czasopism, w których zostały opublikowane, wydają się być wystarczającym gwarantem ich niekwestionowanej i wysokiej wartości naukowej. Lektura włączonych do autoreferatu artykułów tylko utwierdziła mnie w powyższym przekonaniu.

W pierwszej publikacji zbadano wpływ wybranych bakterii probiotycznych (*Lactobacillus rhamnosus, Lactococcus lactis, Escherichia coli i Enterococcus faecium)* oraz mikroorganizmów

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD PARAZYTOLOGII
ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 62 68 | +48 71 375 62 14
fax +48 71 325 21 51

zpar@uwr.edu.pl | www.mikrobiologia.uni.wroc.pl

oportunistycznych jelita (*Candida albicans* i *C. glabrata*), a także ich metabolitów na rozwój *Blastocystis* ST3 w warunkach *in vitro*. Drugą pracę poświęcono, analizie wrażliwości wybranych mikroorganizmów jelitowych na najczęściej przyjmowane terapeutyki w leczeniu dolegliwości żołądkowo-jelitowych. W tym celu prowadzono hodowle *Blastocystis* ST3, *L. rhamnosus*, *E. faecium*, *E. coli* i *C. albicans* z dodatkiem trzech różnych stężeń leków z grupy IPP – pantoprazolu i esomeprazolu oraz blokerów H2 – ranitydyny i cymetydyny. Uzyskane wyniki okazały się nie tylko interesujące, ale i bardzo ważne z czysto medycznego punktu widzenia. W tym kontekście do najbardziej istotnych osiągnięć recenzowanej rozprawy zaliczam: (1) udowodnienie, że testowane szczepy bakterii probiotycznych z rodzajów *Lactobacillus* i *Lactococcus*, oraz *Enterococcus faecium* mogą zakłócać cykl komórkowy oraz destabilizować proliferację *Blastocystis*. Taki wynik mocno wspiera zasadność stosowania probiotyków w zwalczaniu, a zwłaszcza w profilaktyce blastocystozy, samodzielnie lub jako suplementów standardowo prowadzonej farmakoterapii; (2) ukazanie, że wybranie inhibitory pompy protonowej - pantoprazol i esomeprazol funkcjonalnie hamują namnażanie podtypu 3 *Blastocystis* oraz drożdżopodobnych grzybów *Candida albicans* w hodowlach komórkowych *in vitro*, co stwarza dodatkowe możliwości wykorzystania tych leków w eradykacji objawowej blastocystozy lub kandydozy; (3) wykazanie, że w warunkach *in vitro*, pantoprazol stymuluje wzrost proliferacji bakterii *Lactobacillus rhamnosus* i *Escherichia coli*, wywołując tym samym korzystne zmiany w naturalnej mikrobiocie jelitowej, odpowiedzialnej za obronę przed patogenami.

Jestem przekonany, że uzyskane przez Autorkę wyniki zostaną wykorzystane przy planowaniu lub modyfikacji współczesnej farmakoterapii ludzkiej blastocystozy.

Z obowiązku recenzenta, chciałbym podzielić się kilkoma uwagami lub sugestiami, które nasunęły mi się podczas lektury rozprawy.

- Sposób cytowania literatury w tekście wydaje się nieco odmienny od przyjętych kanonów. Kolejność cytowanych w nawiasach publikacji jest ustalona alfabetycznie, a nie w oparciu o rosnące daty ukazywania się prac. W mojej opinii, ta druga forma jest poprawna i powszechne uznawana za właściwą.
- Korzystając ze źródeł internetowych, np. bazy CDC, dobrym zwyczajem jest podawać datę ich pobrania. Pozwala to uniknąć nieścisłości lub niezgodności, związanych np. z często pojawiającymi się aktualizacjami zamieszczanych w portalach internetowych informacji.

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD PARAZYTOLOGII
ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 62 68 | +48 71 375 62 14
fax +48 71 325 21 51

zpar@uwr.edu.pl | www.mikrobiologia.uni.wroc.pl

- Używając nazwy rodzajowej *Blastocystis* bez określenia konkretnego podtypu, należałoby, w zależności od poruszanego kontekstu, rozważyć zasadność dołączania skrótu „sp" lub „spp".
- Jak już wyżej wspomniałem, uważam że treść rozdziału poświęconego szeroko rozumianej metodologii jest zbyt oszczędna i lakoniczna. Ponadto zabrakło w nim np. ważnej informacji o zastosowanej analizie statystycznej. W niniejszej, coraz częściej wykorzystywanej formie przedstawiania rozpraw doktorskich, to właśnie łączący publikacje „autoreferat" jest dla Autora ostatnią szansą pokazania, rozmachu, zaangażowania czy włożonego w wykonane badania nakładu pracy. Choćby tylko z tego powodu, może warto z takiej możliwości korzystać.

Ponieważ wyniki przeprowadzonych badań zostały już z sukcesem ogłoszone i, co widać po rosnących wskaźnikach cytowań, funkcjonują w środowisku naukowym, wymienione wyżej uwagi mają charakter czysto „edytorski" i w żaden sposób nie umniejszają merytorycznej wartości recenzowanej rozprawy.

Podsumowując, uważam, że Doktorantka w pełni zrealizowała założone cele. Recenzowana rozprawa dostarcza nowych i istotnych, zarówno dla biologii mikropasożyta jak i medycyny praktycznej, danych wyjaśniających wciąż polemiczne kwestie dotyczące patogeniczności *Blastocystis*, jak i szeroko rozumianych czynników regulujących jego proliferację oraz rozwój.

W świetle powyższych danych, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Małgorzaty Lepczyńskiej spełnia warunki określone w art. 13, ust. I ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym, z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, biorąc pod uwagę istotność zbadanego zagadnienia, sposób jego realizacji oraz wysoką jakość publikacji naukowych jakie ukazały się na bazie uzyskanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie niniejszej rozprawy.

Marcin Popiołek