Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Prof. dr hab. Danuta Kosik-Bogacka
Samodzielna Pracownia Botaniki Farmaceutycznej
Katedra Biologii i Parazytologii Medycznej
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Szczecin, 15.10.2021 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Lepczyńskiej pt. „Regulacja proliferacji *Blastocystis* ST3 (Protista) i mikrobioty jelitowej probiotykami oraz wybranymi lekami *in vitro*" wykonanej w Katedrze Biologii Medycznej, Szkoły Zdrowia Publicznego, Collegium Medicum Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. biol. Ewy Dzikiej.

Ocena formalna:

Rozprawę doktorską stanowi cykl dwóch spójnych tematycznie publikacji dotyczących wpływu wybranych mikroorganizmów wchodzących w skład mikrobioty jelitowej na proliferację *Blastocystis* spp. Ponadto zbadanie wrażliwości pierwotniaków z rodzaju *Blastocystis* i wybranych gatunków mikrobioty jelitowej na inhibitory pompy protonowej i antagonistów receptorów histaminowych typu 2 w hodowlach *in vitro*. Prace te są publikacjami oryginalnymi, które zostały opublikowane w latach 2019-2021 w czasopismach o zasięgu międzynarodowym indeksowanych w bazie *Journal Citation Reports*. Są to następujące prace:

1. Lepczyńska M, Dzika E. The influence of probiotic bacteria and human gut microorganisms causing opportunistic infections on *Blastocystis* ST3. *Gut Pathog* 2019;11:6.
2. Lepczyńska M, Dzika E, Chen W, Lu CY. Influence of proton pump inhibitors and histamine receptor 2 antagonists on *Blastocystis* ST3 and selected microorganisms of intestinal microbiota *in vitro*. *Clin Transl Gastroenterol* 2021;12:e00325.

Prace te są opracowaniami zbiorowymi, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (*impact factor*, IF) czasopism, w których zamieszczono prace zgodnie z rokiem opublikowania wynosi 7.762, a punktacja według Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW) 210.

Temat rozprawy doktorskiej Pani mgr Małgorzaty Lepczyńskiej w pełni oddaje problematykę badawczą rozprawy. Układ pracy doktorskiej jest zgodny z zasadami przyjętymi dla tego typu opracowań, a na podkreślenie zasługuje duża syntetyczność, systematyczność i przejrzystość wynikająca z właściwie przyjętej koncepcji przygotowania rozprawy. Zawarto w niej kolejno stronę tytułową, przejrzysty spis treści, wykaz skrótów, streszczenie rozprawy w językach polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki badań, podsumowanie i wnioski oraz piśmiennictwo, a także dołączono kopie publikacji i analizę bibliometryczną tych prac. Do rozprawy doktorskiej zostały dołączone pisemne oświadczenia współautorów wyżej wymienionych publikacji o ich udziale procentowym w przygotowaniu poszczególnych prac. Na tej podstawie można stwierdzić, że wkład pracy Doktorantki w przygotowaniu omawianych publikacji był wiodący (od 70 do 80%). Polegał on na udziale w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przeprowadzeniu doświadczenia, pracach laboratoryjnych, interpretacji uzyskanych wyników badań i przygotowaniu publikacji. Świadczy to o dużym zaangażowaniu i dojrzałości badawczej Doktorantki.

Ocena merytoryczna:

Podjęte przez Doktorantkę badania dotyczą bardzo ważnego problemu związanego z naukami biologicznymi. Pierwotniaki z rodzaju *Blastocystis* bytują w przewodzie pokarmowym ssaków. W populacji ludzkiej częstość występowania *Blastocystis* spp. waha się od 1,5–10% u ludności krajów rozwiniętych do 30–50% w krajach rozwijających się. Patogeniczność, sposób transmisji, różnorodność genetyczna, specyficzność żywicielska i leczenie nadal nie są dobrze poznane. Patogeniczność *Blastocysis* spp. jest kwestią sporną, ponieważ u części osób inwazja przebiega bezobjawowo. Przebieg inwazji prawdopodobnie zależy od intensywności zarażenia *Blastocystis* spp. i czasu trwania inwazji oraz podtypu *Blastocystis* spp. Obecnie na podstawie różnorodności genetycznej w genie kodującym małą podjednostkę rybosomalnego RNA wyodrębniono 24 podtypy *Blastocystis* spp. U ludzi zidentyfikowano dziesięć podtypów (ST1-ST9 i ST12), a podtyp 3 *Blastocystis* spp. (ST3) jest najczęściej wykrywany w kale. Jedynie u pacjentów z objawami klinicznymi włączane

jest leczenie. Najczęściej stosowanym lekiem jest metronidazol. U pacjentów, u których leczenie metronidazolem jest nieefektywne zwykle zaleca się zastosowanie trimetoprimu z sulfametoksazolem. Niektórzy badacze sugerują, że pierwotniaki z rodzaju *Blastocystis* mogą powodować zmiany w mikrobiocie jelitowej. Jednak pomimo wielu badań do tej pory jednoznacznie nie określono interakcji pomiędzy *Blastocystis* spp., a mikrobiotą jelitową. W związku z tym podjęte przez Panią mgr Małgorzatę Lepczyńską badania są w pełni uzasadnione i aktualne.

W streszczeniu Doktorantka podsumowała zagadnienia omówione w publikacjach. We wprowadzeniu Pani mgr Małgorzata Lepczyńska w sposób syntetyczny omówiła pierwotniaki z rodzaju *Blastocystis* i mikrobiotę jelitową oraz interakcje między nimi, a także scharakteryzowała inhibitory pompy protonowej i antagonistów receptorów histaminowych typu 2. Cele badawcze pracy doktorskiej zostały dobrze uzasadnione. W rozdziale materiał i metody opisano krótko metodykę badań. Doktorantka wykorzystała nowoczesne narzędzia badawcze oraz metody dobrze dobrane do potrzeb badań własnych. Następnie Doktorantka omówiła wyniki badań opierając się na danych zawartych w publikacjach.

W pierwszej pracy Doktorantki zamieszczonej w *Gut Pathogens* określono wpływ bakterii fermentacji mlekowej i wybranych gatunków mikrobiota oraz ich metabolitów na rozwój ST3 w warunkach *in vitro*. Stwierdzono, że *Lactobacillus rhamnosus* i *L. lactis* wpływały hamująco na proliferację *Blastocystis* spp. w hodowli ksenicznej i aksenicznej. Natomiast *Escherichia coli* i *Enterococcus faecium* początkowo działały stymulująco, a następnie hamująco na namnażanie się pierwotniaków. W hodowlach tych stwierdzono także znaczny wzrost ilości form ameboidalnych *Blastocystis* spp. Nie zauważono natomiast wpływu *Candida albicans* i *C. glabrata* na rozwój pierwotniaków. Również niewielkie zmiany w pH środowiska wywołane przez badane mikroorganizmy i ich metabolity nie wpłynęły na rozwój *Blastocystis* spp. Na podstawie przedstawionych wyników badań stwierdzono, że szczepy *L. rhamnosus*, *L. lactis* i *E. faecium* zaburzają cykl komórkowy *Blastocystis* spp.

Praca opublikowana w *Clinical and Translational Gastroenterology* stanowi kontynuację badań opisanych w poprzedniej publikacji. Przeanalizowano wrażliwość *Blastocystis* spp. i mikrobioty jelitowej na inhibitory pompy protonowej (pantoprazol i esomeprazol) oraz antagonistów receptorów histaminowych typu 2 (ranitydynę i cymetydynę). Stwierdzono, że pantoprazolu wpłynął hamująco na proliferację *Blastocystis* spp., a oddziaływanie to było silniejsze niż działanie metronidazolu i esomeprazolu. Pantoprazol stymulował namnażanie *L. rhamnosus* i *E. coli*, natomiast hamował rozwój *C.*

albicans. Wykazano także związek pomiędzy wartością pH środowiska, a intensywnością proliferacji mikroorganizmów. Na podstawie przedstawionych wyników badań stwierdzono, że inhibitory pompy protonowej wpływają na zamiany pH środowiska, co powoduje zmiany składu gatunkowego i liczebność mikrobioty jelitowej. Podsumowanie i wnioski wynikają z przeprowadzonej analizy wyników badań.

Jako recenzent muszę jednak zwrócić uwagę na pewne nieścisłości, które nie obniżają wysokiej wartości naukowej ocenianej pracy:

1) użyto nieprecyzyjnego określenia - oportunistyczne mikrobiota jelita,
2) pierwotniaki z rodzaju *Blastocystis* nie są stałym składnikiem mikrobioty jelitowej,
3) wątpliwości moje budzi część wniosku zamieszczonego w pracy o wykorzystaniu *Enterococcus faecium* w profilaktyce blastocystozy; obecnie bakterie te zaliczane są do patogenów wielolekoopornych wywołujących między innymi infekcje dróg moczowych, zakażenia ran pooperacyjnych oraz zapalenia wsierdzia,
4) należy używać skróty sp. lub spp. po nazwie rodzajowej; w niektórych fragmentach pracy Doktorantka ich używa, w innych pomija.

Przedstawione do oceny prace mają dużą wartość merytoryczną. Są oryginalnymi opracowaniami aktualnego i istotnego problemu dotyczącego wpływu mikrobioty jelitowej oraz inhibitorów pompy protonowej i antagonistów receptorów histaminowych typu 2 na proliferację *Blastocystis* spp. W badaniach po raz pierwszy określono hamujący wpływ bakterii probiotycznych i *Escherichia coli*, a także inhibitorów pompy protonowej na proliferację *Blastocystis* spp. Wyniki tych badań w znacznym stopniu poszerzają wiedzę z zakresu epidemiologii *Blastocystis* spp.

Problem badawczy podjęty przez Doktorantkę jest bardzo istotny, opracowanie zawiera elementy nowatorskie i wnosi nowe dane w zakresie biologii medycznej. Świadczy to także o bardzo dobrej znajomości przedstawionego problemu i umiejętności posługiwania się różnymi metodami badawczymi. Badania były dobrze zaplanowane, przeprowadzone, a ich wyniki opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych. Są one nowatorskie i mają charakter poznawczy. Doktorantka wykazał się dużymi umiejętnościami w krytycznym omówieniu otrzymanych wyników. Wysoki poziom naukowy opublikowanych prac i znaczący w nich udział Doktorantki dokumentuje bardzo dobrze opanowany przez nią warsztat badawczy.

Uzasadnienie:

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani Magister Małgorzaty Lepczyńskiej w pełni spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 z ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr. 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami), dlatego wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani Magister Małgorzaty Lepczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na nowatorski charakter badań, ich kompleksowość i dużą wartość merytoryczną wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Małgorzaty Lepczyńskiej.

PROFESOR
Katedry Biologii i Parazytologii Medycznej
prof. dr hab. n. med. i n. zdr. Danuta Kosik-Bogacka