

Warszawa, dn. 26.06.2015r.

dr hab. Anna Lutyńska, prof. nadzw. NIZP-PZH
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa
e-mail: alutynska@pzh.gov.pl; tel: (22) 54 21 213

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Mariusza Worka pt. „Diagnostyka molekularna i epidemiologia dermatofitów izolowanych od pacjentów województwa podkarpackiego ”

Przedstawiona rozprawa doktorska mgr Mariusza Worka została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Adama Jaworskiego oraz promotora pomocniczego - dr Macieja Wnuka na Wydziale Biologiczno-Rolniczym Uniwersytetu Rzeszowskiego. Praca poświęcona jest opracowaniu i zastosowaniu zoptymalizowanych analiz polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych amplikonów, polimorfizmu temperatury topnienia selektywnie amplifikowanych fragmentów restrykcyjnych oraz genomowej fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, pozwalających na między i wewnątrzgatunkowe różnicowanie dermatofitów izolowanych na terenie województwa podkarpackiego jako szybkich i swoistych alternatyw klasycznej diagnostyki oraz wiarygodnych narzędzi epidemiologii molekularnej.

Badania wykonane w 16 krajach Europy w ramach programu Projektu Achilles wskazują, że częstość występowania samej grzybicy paznokci może dotyczyć ¼ badanych populacji i wzrasta z wiekiem pacjentów. Z kolei, badania ankietowe 45 tys. pacjentów z objawami grzybicy w Europie wykonane w 2005 r. potwierdziły, że zaledwie 3,4% lekarzy pierwszego kontaktu oraz 39,6% dermatologów zleca wykonanie badań diagnostycznych w celu wdrożenia terapii. Szacuje się zatem, że ok. 50% pacjentów pozostaje niewłaściwie zdiagnozowanych wyłącznie na podstawie objawów klinicznych. Z punktu widzenia poprawności postępowania medycznego, aspektów prawnych i ekonomicznych, stosowanie leków przeciwgrzybiczych o działaniu ogólnoustrojowym bez laboratoryjnego potwierdzenia czynnika etiologicznego pozostaje nieuzasadnione ze względu na ryzyko ograniczonej skuteczności terapii oraz wystąpienia reakcji ubocznych, szczególnie u pacjentów, u których objawy kliniczne faktycznie nie mają związku z zakażeniami dermatofitami. Niedoskonałości leczenia dermatomykoz wiążą się również z niedoskonałościami klasycznej diagnostyki dermatofitów, ponieważ ok. 30-50% mikroskopowo potwierdzonych przypadków grzybicy nie może zostać zidentyfikowanych na poziomie gatunku.

Opracowanie i zastosowanie nowych narzędzi dla celów diagnostyki i epidemiologii dermatofitów jako wiodący cel pracy doktorskiej jest zatem merytorycznie uzasadniony ze względu na niską wiarygodność wyników klasycznej diagnostyki oraz postęp wiedzy z zakresu biologii molekularnej wykorzystany przez doktoranta do rozwiązania problemu naukowego. Cele szczegółowe pracy dotyczyły określenia tożsamości zgromadzonej kolekcji dermatofitów metodami fenotypowymi oraz wybranymi technikami molekularnymi na poziomie rodzaju/gatunku/szczepu, opracowanie metody fluorescencyjnej genomowej hybrydyzacji *in situ*, porównanie wyników tożsamości dermatofitów uzyskanych metodami fenotypowymi i molekularnymi, ustalenie stopnia wewnątrzgatunkowego zróżnicowania struktury klonalnej z próbą identyfikacji klonu dominującego oraz określenie wrażliwości dermatofitów na wybrane związki pochodzenia roślinnego.

Materiałem badawczym doktoranta była kolekcja 86 szczepów dermatofitów, wyizolowanych od pacjentów województwa podkarpackiego w latach 2011-2013 oraz trzy szczepy referencyjne *Trichophyton mentagrophytes* (var. *Trichophyton interdigitale*) CBS 120357, *Trichophyton rubrum* CBS 120358 oraz *Microsporum canis* CBS 113480, pochodzące z holenderskiej kolekcji szczepów w Utrechcie. Biorąc pod uwagę unikatowość kolekcji oraz fragmentaryczność danych dotyczących występowania zakażeń dermatofitami, badaną kolekcję szczepów dermatofitów można uznać za wystarczająco reprezentatywną pod względem postawionych celów pracy. Analiza epidemiologiczna zakażeń dermatofitami została przeprowadzona po uzyskaniu akceptacji właściwej Komisji Bioetycznej z zastosowaniem danych zgromadzonych w ankietach epidemiologicznych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska posiada klasyczny układ z podziałem na wstęp, cel pracy, materiały i metody badań, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w j. polskim i j. angielskim, dorobek naukowy, bibliografię, aneks 1 zawierający informacje o wielu, płci i rodzaju materiału klinicznego pobranego od pacjentów jako źródła izolacji szczepów, aneks 2 z formularzem ankiety epidemiologicznej zakażeń dermatofitami, oraz spis skrótów. Dysertacja zawiera 99 stron, w tym 10 tabel i 24 rycin oraz 122 pozycji piśmiennictwa, z których 68% i 46% pochodzi odpowiednio z ostatnich 10 i 5 lat.

We wstępie pracy doktorant przedstawił aktualny stan wiedzy dotyczący taksonomii, podziału, biologii, chorobotwórczości, mechanizmów patogenazy, w tym warunków ekspresji czynników zjadliwości decydujących o przebiegu zakażenia oraz charakterystykę faz cyklu życiowego dermatofitów. Doktorant scharakteryzował antropofilne dermatofity jako główną przyczynę dermatomykoz, chorób o wysokim poziomie rozpowszechnienia oraz nawrotowości, związanych z rzadkim ryzykiem rozwoju postaci zakażeń ogólnoustrojowych, czynniki wpływające na wzrost liczby niepowodzeń terapeutycznych, a także rolę dermatofitów geofilnych i zoofilnych jako potencjalnych czynników ryzyka zakażeń dla człowieka. Czynniki ryzyka rozwoju dermatomykoz wymienione przez doktoranta uzupełniłabym o predyspozycje genetyczne, uprawianie sportów, narażenie na czynniki środowiskowe oraz warunki demograficzne. Doktorant przedstawił dostępne dane na temat epidemiologii dermatofitów w Europie i Ameryce Północnej oraz Polsce z odniesieniem się do czynników środowiskowo-kulturowych wpływających na różnice częstości występowania postaci dermatomykoz oraz dominujących gatunków na przykładach Grecji oraz Turcji w porównaniu do Kuwejtu oraz Chin. Standardy fenotypowej diagnostyki dermatofitów doktorant omówił w odniesieniu do uzyskiwanych: siły różnicującej, powtarzalności, specyficzności, czasochłonności oraz częstej konieczności jednoczesnego zastosowania kilku metod. Trafnie zostały wskazane problemy związane z interpretacją wyników tj. zmienność fenotypowa, pleomorfizm oraz wytwarzanie morfologicznych mutantów np. w wyniku nieskutecznego i długotrwałego leczenia. Następnie, doktorant scharakteryzował zalety szeregu metod genotypowych wprowadzonych do kanonu diagnostyki wielu mikroorganizmów oraz dotychczas opisane rozwiązania metodologiczne zoptymalizowania diagnostyki dermatofitów z uwzględnieniem ich zalet i potencjalnych ograniczeń. Wstęp pracy zatem stanowi merytoryczne i szczegółowe uzasadnienie dla postawionego problemu badawczego, poprawnie zdefiniowanego celu pracy oraz wyboru zastosowanej metodologii.

W celu określenia przynależności gatunkowej badanej kolekcji szczepów dermatofitów doktorant w pierwszym etapie oceniał cechy hodowli i morfologii kolonii oraz charakter wzrostu, morfologię konidiów i grzybni z zastosowaniem często czasochłonnych procedur zapewniających podniesienie siły różnicującej stosowanych metod fenotypowych. Analiza fenotypów 86 klinicznych szczepów dermatofitów umożliwiła doktorantowi zaklasyfikowanie 63 szczepów do gatunku *Trichophyton interdigitale*, 18 – do *Trichophyton rubrum* oraz 5 - do *Microsporum canis*. Przeprowadzona przez doktoranta analiza ankiet epidemiologicznych, wykazała, że zakażenia dermatofitami najczęściej występowały u pacjentów między 19-60 r.ż. Udział zakażeń wśród mężczyzn był największy w grupach do 18 i powyżej 60 r.ż., z kolei wśród kobiet pozostawał wysoki w każdym wieku poza grupą do 18 r.ż. Najczęściej występującymi postaciami dermatomykoz były grzybica paznokci, występująca u ponad połowy badanych pacjentów. Gatunek *Trichophyton interdigitale* został zidentyfikowany jako najczęstsza przyczyna diagnozowanej fenotypowo grzybicy paznokci i stóp, a *Trichophyton rubrum* – najczęściej wywoływał grzybicę paznokci, skóry gładkiej ciała i stóp.

W kolejnym etapie pracy, w celu gatunkowego potwierdzenia tożsamości fenotypowo zidentyfikowanych gatunków badanych szczepów, doktorant przeprowadził amplifikację fragmentu operonu DNA regionu ITS-5,8 S rDNA, a uzyskane produkty poddawał trawieniu z wykorzystaniem trzech różnych enzymów restrykcyjnych. Analiza polimorfizmu uzyskanych fragmentów restrykcyjnych potwierdziła prawidłowość wyników fenotypowej identyfikacji w przypadku wszystkich szczepów gatunku *Microsporum canis* i 90,7% szczepów gatunków z rodzaju *Trichophyton*. Doktorant krytycznie ustosunkował się do otrzymania niejednoznacznych wyników profilowania PCR-RFLP dwóch szczepów fenotypowo zidentyfikowanych jako *Trichophyton interdigitale* i *Trichophyton rubrum*, przy czym wykonana analiza in

silico genomów szczepów referencyjnych pod względem liczby oraz miejsc trawienia zastosowanych enzymów restrykcyjnych *Mva*I i *Hinf*I potwierdziła, że otrzymane profile nie stanowiły artefaktów. Autor postawił hipotezę, że w dwóch przypadkach szczepów o niejednoznacznych profilach PCR-RFLP mogło dojść do mutacji w regionach lub genach markerowych, prowadzących do modyfikacji profili, indukowanych np. długim leczeniem lub wielokrotnym pasażowaniem. W celu potwierdzenia tej hipotezy dla celów przygotowania publikacji, proponuję wykonać sekwencjonowanie regionów markerowych ITS1-2, przeanalizować tryb wdrożonej terapii oraz zapisy archiwalne pasażowania w/w szczepów. Należy podkreślić, że zastosowana technika PCR-RFLP umożliwiła prawidłowe zaklasyfikowanie niemal 10% błędnych wyników fenotypowego oznaczenia tożsamości badanej kolekcji szczepów.

W celu jednoznacznego potwierdzenia przynależności gatunkowej dwóch szczepów o niejednoznacznych profilach PCR-RFLP, fenotypowo zaklasyfikowanych do gatunków *Trichophyton interdigitale* i *Trichophyton rubrum*, doktorant opracował i zastosował fluoroscencyjną genomową hybrydyzację *in situ* GISH, co świadczy o dociekliwości naukowej doktoranta w rozwiązywaniu problemu badawczego. Wyznakowane genomowe DNA szczepów referencyjnych, doktorant poddawał hybrydyzacji z uprzednio odpowiednio przygotowanymi strzępkami w/w szczepów dermatofitów, a sygnał sondy wykrywał w mikroskopie fluoroscencyjnym. Fenotypowo zidentyfikowane gatunki szczepów *Trichophyton interdigitale* i *Trichophyton rubrum*, o niejednoznacznych wynikach profilowania PCR-RFLP, zostały ostatecznie potwierdzone z użyciem sondy genomowej referencyjnego szczepu *Trichophyton interdigitale* wyrażone pozytywnym sygnałem detekcji, odpowiednio w 97% i 3,5% analizowanych strzępek. Dodatkowo fenotypowo zidentyfikowany gatunek *Trichophyton rubrum* o niejednoznacznym wyniku PCR-RFLP został potwierdzony z użyciem sondy genomowej referencyjnego szczepu *Trichophyton rubrum*, wyrażony pozytywnym sygnałem fluorescencji w 85% analizowanych strzępek. Nowatorskie zastosowanie techniki GISH do gatunkowego potwierdzania identyfikacji dermatofitów, stanowiło przyczynę zgłoszenia patentowego (404901, 2013). Poziom czułości sond genomowych *Trichophyton rubrum* i *Trichophyton interdigitale* doktorant oszacował odpowiednio na 82-94% i 96-98%, a poziom dopuszczalnego niespecyficznego sygnału, odpowiednio 10% i 4%. Zastosowanie techniki GISH, wymagało od doktoranta merytorycznej wiedzy i wysokich umiejętności praktycznych w celu otrzymania wiarygodnych wyników hybrydyzacji, na które ma wpływ wiele czynników tj. poziom strawienia ściany grzybni, właściwy poziom rozproszenia strzępek, odpowiedni wiek grzybni, wiarygodne wyznaczenie akceptowalnego poziomu niespecyficznego wiązania podczas znakowania, stosowanie odpowiednich procedur ograniczenia poziomu tła oraz zachowanie powtarzalnych warunków doświadczalnych.

Dla celów epidemiologii molekularnej doktorant zastosował genotypowanie, pozwalające na detekcję szczepowo-swoistych fragmentów restrykcyjnych DNA o identycznej długości, ale o różnych temperaturach topnienia w zależności od zawartości par GC w sekwencjach mikrosatelitarnych (GACA)₄ lub (GTG)₄ zastosowanych jako startery w reakcji PCR. Ocenę wykrytego zróżnicowania profili wśród 28 szczepów *Trichophyton interdigitale* wyizolowanych z obszaru Podkarpacia doktorant odniósł do wyników wykonanych we współpracy z Zakładem Genetyki Drobnoustrojów Uniwersytetu Łódzkiego. Większość szczepów gatunku *Trichophyton interdigitale* z obszaru Podkarpacia tj. 96%, została zakwalifikowana do klonu T/iA (4% - do klonu T/iB), podczas gdy na obszarze Polski zidentyfikowano występowanie 3 klonów Ti/A (z podtypami Ti/A1 i Ti/A2), Ti/B oraz Ti/C. Z kolei, zastosowanie metody PCR MP z udziałem starterów dla sekwencji mikrosatelitarnych (GTG)₅, pozwoliło na zakwalifikowanie szczepów z regionu Podkarpacia do klonu Ti/a, podczas gdy na obszarze Polski dotychczas wykryto 6 grup profili Ti/a-Ti/f. Struktura klonalna *Trichophyton interdigitale* z regionu Podkarpacia, wykazała zatem stosunkową homogenność badanej populacji, co może wskazywać na pewną odrębność uwarunkowań lub czynników ryzyka. Niewątpliwie zasadna jest krytyczność doktoranta w odniesieniu do liczby 28 analizowanych szczepów uzasadniająca brak możliwości ustalenia pokrewieństwa filogenetycznego i powiązań epidemiologicznych między pacjentami oraz konieczność podjęcia dalszych badań z udziałem większej kolekcji szczepów.

W pracy doktorskiej przeprowadzono także ocenę aktywności przeciwgrzybiczych diosminy, kurkuminy, argininy, rutyny, hesperdyny i kwercetyny wobec trzech referencyjnych gatunków, wykonanych zgodnie z powszechnie akceptowanymi zasadami metodyki EUCAST. Otrzymane wyniki potwierdziły, że *Trichophyton rubrum* był najbardziej wrażliwym, a *Trichophyton mentagrophytes* - najmniej wrażliwym gatunkiem na większość zastosowanych związków. Najsilniejszym inhibitorem wzrostu okazała się kurkumina, a w przypadku najwyższych badanych stężeń kwercetyny, hesperdyny oraz diosminy z grupy flawonoidów, doktorant obserwował przejściowy efekt cytostatyczny. Dostępne dane piśmiennictwa nie potwierdzały dotychczas tak obiecujących wyników aktywności kurkuminy, co może wynikać z zoptymalizowanego przez doktoranta zakresu badanych stężeń i rozwiązań metodycznych. Przedstawione wyniki badań aktywności kurkuminy oraz związków z grupy flawonoidów wskazują na zasadność dalszego ich kontynuowania w celu potwierdzenia możliwości ich potencjalnego zastosowania jako np. substancji pomocniczych leków przeciw dermatofitom.

Dyskusja jest naukowo dojrzałym spojrzeniem doktoranta na wyniki pracy w odniesieniu aktualnego stanu wiedzy na temat szeroko pojętego zagadnienia problematyczności zakażeń dermatofitami. W sposób uporządkowany, a zarazem brawurowo naukowo dojrzały, jednocześnie z dużą dozą pokory oraz krytycyzmu doktorant przeprowadza czytelnika przez kolejne etapy pracy odnosząc otrzymane wyniki do obserwacji innych autorów. Niewątpliwą zaletą dyskusji jest krytyczne spojrzenie na potencjał różnicowania zastosowanych narzędzi fenotypowania oraz genotypowania dermatofitów przez pryzmat realiów praktyki diagnostyki mykologicznej i klinicznej. Dermatomykozy jako powszechnie rozpoznany na świecie problem epidemiologiczny z możliwością bezobjawowego nosicielstwa sięgającego 30-70% i ryzyka rozwoju objawów narastającego z wiekiem, stanowią problem kliniczny związany z błędną diagnozą kliniczną, laboratoryjną, podjętą terapią empiryczną lub terapią wynikającą z błędnej diagnostyki, narastającą opornością szczepów, lub wysokim ryzykiem niepowodzeń terapeutycznych. Wyniki przedstawione w pracy doktorskiej potwierdzają trudności klasycznych metod fenotypowych, ponieważ badania fenotypowe wykonane przez doktoranta z należytą starannością wskazują, że jeden przypadek fenotypowej gatunkowej identyfikacji na niemal 10 może być w niewłaściwie klasyfikowany. Wynik ten jest w moim odczuciu i tak pozytywny, ponieważ z danych piśmiennictwa wynika, że błędy oznaczeń fenotypowych z różnych przyczyn mogą dochodzić nawet do 40%. Przeprowadzona przez doktoranta analiza udziału gatunków dermatofitów w odniesieniu do postaci grzybic w oparciu o analizowane ankiety epidemiologiczne pacjentów może stanowić element uzupełniający dane na temat częstości udziału poszczególnych gatunków dermatofitów identyfikowanych w odniesieniu do postaci klinicznej grzybic.

Podsumowanie rozprawy stanowi 5 wniosków wyprowadzonych przez doktoranta na podstawie krytycznie ocenionych wyników badań, które należy uznać za prawidłowe.

O nowatorskim charakterze pracy doktorskiej świadczy opracowane zoptymalizowanych narzędzi diagnostycznych opartych na analizach sekwencji markerowych, które z pewnością mogą uzupełniać i korygować gatunkową identyfikację dermatofitów z udziałem klasycznych metod. Opracowanie metody GISH, stanowiącej zgłoszenie patentowe, świadczy o przygotowaniu merytorycznym oraz wysokich umiejętnościach doktoranta dotyczących doboru i projektowania starterów, doboru warunków reakcji, oraz optymalizacji zaproponowanych układów detekcji i potwierdza prawidłowy dobór schematów badawczych do osiągnięcia zamierzonego celu. Opracowane przez doktoranta rozwiązania metodyczne po zgromadzeniu większej kolekcji szczepów mogą w sposób wiarygodny posłużyć do opracowania reprezentatywnego modelu genetycznej struktury populacji i ustalenia pokrewieństwa między poszczególnymi gatunkami dermatofitów izolowanymi w Polsce, w tym Podkarpacia.

Ze względu na interesujące rozwiązania naukowe postawionej hipotezy badawczej proszę doktoranta o dodatkowe wyjaśnienia odnośnie: (1) uzasadnienia wyboru konkretnych szczepów referencyjnych, w odniesieniu do ich pochodzenia, a w szczególności różnic w obrębie „kompleksu” *Trichophyton mentagrophytes* (2) stosowanych kontroli pozytywnych i negatywnych w każdej z

zastosowanych metod genotypowania oraz wyjaśnienia w jaki sposób określona została ich powtarzalność (3) wyjaśnienia dlaczego profilowanie genetyczne metodą PCR MP z zastosowaniem sekwencji mikrosatelitarnych (GACA)₄ lub (GTG)₄ zostało wykonane dla 28 szczepów *Trichophyton interdigitale* skoro analizowana kolekcja szczepów tego gatunku zawierała (po wykluczeniu błędów fenotypowej diagnostyki) 58 szczepów; (4) brak zastosowania różnicowania *Microsporum canis* techniką PCR MP autor wytłumaczył brakiem różnicowania zastosowanej techniki w przypadku tego gatunku. Interesujące jest czy doktorant podjął próbę różnicowania wewnątrzgatunkowego 18 szczepów *Trichophyton rubrum* i z jakim efektem? (5) podania informacji odnośnie sposobu monitorowania liczby dokonanych pasażów szczepów referencyjnych oraz klinicznych przed zastosowaniem ich do badań w kontekście możliwości wpływu na osiąganą czułość i specyficzność metod; (6) skomentowania poziomu dopuszczalnego niespecyficznego sygnału w metodzie GISH, który jak doktorat podaje powinien mieścić się w granicach 1-5%, a w przypadku sondy *T. rubrum* osiągnął poziom 10%; oraz (7) przedstawienia swojego stanowiska odnośnie praktycznego zastosowania techniki PCR-RFLP do potwierdzania gatunkowego wyizolowanych szczepów dermatofitów oraz ich potencjalnego zastosowania bezpośrednio w materiale klinicznym w odniesieniu do możliwości jakie niesie ze sobą zastosowanie innych genów jako markerów tożsamości gatunkowej, np. w reakcji multiplex PCR i w kontekście wymagań walidacyjnych.

Praca napisana jest poprawnym językiem. Na moją opinię nie mają wpływu drobne edytorskie niedociągnięcia, tj. np. nie zawsze konsekwentne stosowanie zapisów enzymów restrykcyjnych z uwzględnieniem kursywy dla pierwszego członu, rzadkich pomyłek edytorskich pisowni gatunku *Trichophyton mentagrophytes*, braku oznakowania 5'-3' dla sekwencji adapterów i starterów w metodzie MP-PCR, niekonsekwentnego określenia terminu w opisie kolumny, w której zawarte są dane określające lokalizację grzybicy wyizolowanych szczepów, tj. „źródło” w tabeli 6 lub rodzaj grzybicy w tabeli 8, braku podania oznakowania szczepów referencyjnych na ryc. 21 i 22..

Recenzowana praca stanowi oryginalne i samodzielne rozwiązanie problemu badawczego, została zaplanowana i zrealizowana prawidłowo i dowiodła dużej wiedzy teoretycznej oraz praktycznej doktoranta. Stwierdzam, że praca pana mgr Mariusza Worka w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim ujęte w Ustawie z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 ze zmianami) i niniejszym wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie pana mgr Mariusza Worka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Lutyńska

Warszawa, dnia 26.06.20015 r.