

Prof. dr hab. Teresa Korniłowicz-Kowalska
Katedra Mikrobiologii Środowiskowej
Pracownia Mykologiczna
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 02.07.2015r.

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

Niniejsza recenzja została przygotowana w odpowiedzi na pismo Pana Prof. dr hab. Zbigniewa Czerniakowskiego Dziekana Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego z dnia 22 czerwca 2015 roku informujące, że decyzją Rady Wydziału zostałam powołana na recenzenta pracy doktorskiej Pana mgr Mariusza Worka wykonanej pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Adama Jaworskiego, promotora pracy (emerytowany Profesor Zakładu Genetyki Drobnoustrojów Uniwersytetu Łódzkiego) oraz Pana Dr Macieja Wnuka, jako promotora pomocniczego (Zakład Genetyki Pozawydziałowego Zamiejscowego Instytutu Biotechnologii i Nauk Podstawowych Uniwersytetu Rzeszowskiego).

1. Ocena problematyki badawczej i formalna analiza pracy

Tematyka badawcza, podjęta w recenzowanej pracy doktorskiej, dotyczy trudnego a zarazem niezwykle ważnego, zwłaszcza z medycznego punktu widzenia, zagadnienia jakim jest diagnostyka dermatofitów. Dotychczasowa, rutynowo prowadzona identyfikacja tych chorobotwórczych grzybów oparta o cechy fenotypowe, morfologiczno-biochemiczne, nastręcza duże problemy i może w efekcie prowadzić do niewłaściwego rozpoznania czynnika etiologicznego grzybic skóry. Spowodowane jest to głównie wielopostaciowością dermatofitów i ich zmiennością fenotypową. Szczepy izolowane z przypadków chorobowych, często odbiegają morfologicznie od charakterystycznych dla danego gatunku cech, np. nie wytwarzają makrokonidiów lub nie zarodnikują tworząc jedynie płone grzybnie, co *de facto* uniemożliwia oznaczenie ich metodami tradycyjnymi. Konsekwencją błędnej identyfikacji gatunkowej może być podjęcie niewłaściwego leczenia, a w przypadku dochodzeń epidemiologicznych nieprawidłowych ustaleń dotyczących rozprzestrzeniania tych patogenów w środowisku ludzi i zwierząt. W tym kontekście badania podjęte przez Pana mgr

Mariusza Worka i otrzymane przez Niego wyniki wychodzą naprzeciw oczekiwaniom praktyki klinicznej w zakresie diagnostyki dermatofitów oraz ich epidemiologii.

Oceniana rozprawa stanowi 100-stronicowe opracowanie podzielone na 8 zasadniczych rozdziałów: Wstęp (1), Cel pracy (2), Materiały i metody badań (3), Wyniki (4), Dyskusja (5), Wnioski (6), Streszczenie (7) i Bibliografia (8) obejmująca 122 pozycje literatury. Do pracy dołączono Aneks zawierający listę szczepów wraz z danymi o pacjentach oraz wzór ankiety epidemiologicznej. Dokumentację pracy stanowią 23 rysunki, z czego 5 to schematy dotyczące przebiegu zastosowanych w pracy technik molekularnych, dwa inne przedstawiają model biodegradacji natywnej keratyny i morfogenezę dermatofitów a pozostałe 16 prezentują wyniki badań, z których 7 to zdjęcia elektroforegramów a 2 to obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego. Obok tego, otrzymane rezultaty zebrano w 10 tabelach, z których dwie zilustrowano fotografiami: jedna dotyczy mikromorfologii zidentyfikowanych 3 gatunków dermatofitów, druga morfologii kolonii 3 referencyjnych szczepów dermatofitów, poddanych działaniu związków o aktywności przeciw dermatofitowej. Poszczególne tabele i wykresy są czytelne a ich umieszczenie w tekście pracy ułatwia analizę pracy. Wyjątek stanowią Ryc. 12, 13, 14 przedstawiające zdjęcia płytek ze wzrostem wybranych szczepów badanych dermatofitów rosnących na podłożu Sabourauda. Wydaje się, że korzystniejsze byłoby sfotografowanie 1-punktowo szczepionych płytek niż zdjęcia z wieloma koloniami na jednej płytce. Ponadto, zdjęcie spod mikroskopu przedstawiające zarodnikującą grzybnię badanych 3 gatunków dermatofitów: *Trichophyton interdigitale*, *T. rubrum* i *Microsporum canis*, dołączone do opisu podanego w tabeli 5, są mało wyraźne. Należy je powiększyć i zaznaczyć skalę wielkości, ponieważ w aktualnym obrazie mikrokonidia *T. interdigitale* i *T. rubrum* są nie tylko słabo widoczne, ale i nie odróżnialne.

Z formalnego punktu widzenia zaletą pracy jest przystępność, zwięzłość i podział na niezbyt obszerne rozdziały, zdarzają się natomiast, stosunkowo często, błędy literowe.

Merytoryczna ocena pracy

Rozprawa doktorska Pana mgr Mariusza Worka dotyczy molekularnej identyfikacji i różnicowania wewnątrzgatunkowego dermatofitów wyizolowanych z materiału klinicznego pobranego od pacjentów z terenu województwa podkarpackiego. Dodatkowym, w aspekcie terapeutycznym, elementem pracy była ocena wrażliwości dermatofitów na wybrane związki biologicznie czynne, roślinnego pochodzenia. Zadania badawcze przyporządkowane tym celom obejmowały:

- wyizolowanie z materiału klinicznego pobranego od chorych (okres grudzień 2011-lipiec 2013) szczepów dermatofitów i ich oznaczenie do gatunku w klasycznym toku postępowania, czyli w oparciu o cechy fenotypowe;
- weryfikację molekularną przynależności gatunkowej zgromadzonej kolekcji szczepów;
- przeprowadzenie wewnątrzgatunkowego różnicowania szczepów *Trichophyton interdigitale* – najczęściej diagnozowanego gatunku wśród badanych dermatofitów;
- przeprowadzenie analizy epidemiologicznej zakażeń dermatofitami na Podkarpaciu w oparciu o wyniki badań klinicznych, mykologicznych, molekularnych i informacje o pacjentach wynikające z dokumentacji medycznej (m.in. wiek, płeć);
- zbadanie wrażliwości analizowanych 3 gatunków dermatofitów na niektóre flawonoidy i polifenole, na podstawie reakcji szczepów referencyjnych.

Przyjęty zakres badań oraz właściwy dobór i opracowanie metod analitycznych stworzyły spójną całość co zaowocowało wieloma osiągnięciami dotyczącymi diagnostyki chorobotwórczych szczepów dermatofitów oraz epidemiologii tych patogenów.

Autor łącznie zgromadził 86 szczepów dermatofitów wyizolowanych z materiału klinicznego w Pracowni Mykologii Zakładu Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej Wojewódzkiego Zespołu Specjalistycznego w Rzeszowie. Szczepy izolowano metodą wykładania fragmentów zakażonych tkanek na podłoże Sabourauda z chloramfenikolem i aktidionem. W pierwszej części badań własnych, czyste kultury grzybów oznaczano do gatunku w oparciu o cechy morfologiczne kolonii i zarodników a następnie weryfikowano je przy pomocy kryteriów genetycznych i cytogenetycznych stosując odpowiednio metodę PCR-RFLP i fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*. W efekcie identyfikacji fenotypowej badane szczepy oznaczono do 3 gatunków: *Trichophyton interdigitale*, *T. rubrum* i *Microsporum canis*, wśród których najliczniej reprezentowany był *T. interdigitale*. Identyfikacja molekularna badanych szczepów metodą PCR-RFLP w oparciu o region markerowy ITS1-5,8S-ITS2 operonu rDNA, przy zastosowaniu uniwersalnej pary starterów ITS1 i ITS4 oraz 3 enzymów restrykcyjnych w ponad 90% potwierdziła identyfikację fenotypową. We wszystkich przypadkach kontrolę stanowiły szczepy referencyjne pochodzące z holenderskiej kolekcji CBS. Dla dwóch szczepów, spośród badanych, analiza restrykcyjna okazała się niewystarczająca z uwagi na odmienne wzory profili restrykcyjnych w stosunku do przyjętych standardów. Dla tego celu Autor wykorzystał nowatorską, w odniesieniu do dermatofitów, metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* co wiązało się z konstrukcją znakowanych

biotyną i wykrywanych fluorescencyjnie sond genetycznych. Ten etap zaowocował patentem oraz publikacją w impaktowanym czasopiśmie o profilu metodycznym (Journal of Microbiological Methods), w której to pracy Pan mgr Mariusz Worek jest pierwszym autorem. W kolejnej części badań, Autor przeprowadził genotypowanie 28 szczepów *T. interdigitale*, posługując się metodą PCR-MP w układzie z enzymem BamHI oraz z zastosowaniem, jako starterów reakcji PCR mikrosatelitarne sekwencje genomowe (GACA)₄ i (GTG)₅. Rezultaty tych badań również zostały już opublikowane, jako część współautorskiej pracy opublikowanej w Polish Journal of Microbiology. Badania te ujawniły w obrębie populacji *T. interdigitale* 2 genotypy, z których jeden był dominujący. Doświadczalną część pracy Autor zakończył testowaniem 6 wybranych związków biologicznie czynnych roślinnego pochodzenia, jako inhibitorów wzrostu i rozwoju badanych gatunków dermatofitów.

W świetle rezultatów przeprowadzonych badań do szczególnie wartościowych, oryginalnych osiągnięć naukowych Pana mgr Mariusza Worka zaliczam:

w obszarze stwierdzeń ogólnych;

- potwierdzenie konieczności wprowadzenia do diagnostyki klinicznej metod molekularnych, jako pewnych i szybkich technik identyfikacji czynników etiologicznych zakażeń grzybiczych, co w przyszłości ograniczyłoby ryzyko błędów w diagnostyce i leczeniu grzybic powierzchniowych,
- wskazanie na potrzebę stosowania technik molekularnych dla celów analizy epidemiologicznej dermatofitów, w szczególności badania szlaków transmisji horyzontalnej oraz analizy struktury szczepowej/klonalnej tych grzybów;

w obszarze osiągnięć szczegółowych;

- zastosowanie agaru owsianego jako podłoża stymulującego sporulację trudnozarodnikujących szczepów klinicznych. Zaproponowana modyfikacja może być wykorzystana w praktyce, jako uzupełnienie standardowo prowadzonej procedury identyfikacji gatunkowej dermatofitów,
- stwierdzenie możliwości zastosowania niektórych substancji biologicznie czynnych roślinnego pochodzenia jako czynników wspierających leczenie grzybic skóry,
- potwierdzenie odpowiedniości metody PCR-RFLP w odniesieniu do identyfikacji gatunkowej dermatofitów z wykorzystaniem wewnętrznych transkrybowanych sekwencji przerywnikowych (ITS) genu rRNA, jako markera molekularnego,

- zastosowanie po raz pierwszy metody PCR-MP do genotypowania szczepów *T. interdigitale* wyizolowanych z terenu Podkarpacia,
- opracowanie i skonstruowanie specyficznych, o dużej czułości sond molekularnych, znakowanych znacznikiem wykrywanym immunochemicznie, do szybkiej detekcji 3 gatunków dermatofitów *M. canis*, *T. interdigitale* i *T. rubrum*, bezpośrednio w preparatach mikroskopowych. Osiągnięcie to jest poważnym wkładem Autora w rozwój metodologii badań diagnostycznych dermatofitów,
- wskazanie na metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z wykorzystaniem sondy genetycznej, jako uzupełniającej metody identyfikacji gatunkowej dermatofitów, co stanowi istotne *novum* pracy,
- za ważne, z epidemiologicznego punktu widzenia, należy uznać ujawnienie przez Autora istnienia 2 różnych genotypów w obrębie populacji *T. interdigitale*, najczęstszego sprawcy dermatomykoz u mieszkańców województwa podkarpackiego.

Otrzymane wyniki mają dużą wartość naukową oraz aplikacyjną. Przyczyniają się, bowiem do dalszego ugruntowania metod molekularnych w diagnostyce dermatofitów a szerzej grzybów strzępkowych oraz stanowią wkład w unowocześnianie i doskonalenie metod stosowanych w praktyce klinicznej oraz epidemiologii grzybic. Nie bez znaczenia jest też fakt, że techniki biologii molekularnej są nie tylko wiarygodne i czułe, ale także szybkie, pozwalające skrócić do kilku dni a nawet godzin, trwającą kilka tygodni tradycyjną procedurę identyfikacyjną dermatofitów. W tym miejscu należy także zauważyć, że na osiągnięty przez Pana mgr Mariusza Worka sukces badawczy składa się również znakomity warsztat, a więc posługiwanie się wysoko zaawansowanymi i najnowocześniejszymi technikami molekularnymi i cytogenetycznymi. Wykazał się On również najświeższą wiedzą z zakresu biologii, genetyki i epidemiologii dermatofitów, o czym świadczy opracowanie części teoretycznej pracy („Wstęp”). Na podkreślenie zasługuje przy tym fakt, że Autor nie usiłował napisać wszystkiego co wiadomo o dermatofitach i dermatomykozach człowieka oraz ich diagnostyce i epidemiologii lecz skoncentrował się na problematyce, która ściśle wiązała się z realizowanym celem pracy doktorskiej. Zaprezentowana umiejętność świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktoranta. Znajduje ona również potwierdzenie w sposobie poprowadzenia dyskusji wyników (rozdział „Dyskusja”), w której obok zwyczajowo już przyjętej zasady konfrontacji wyników badań własnych z danymi innych autorów dokonał krytycznej oceny dotychczasowego stanu badań w zakresie diagnostyki i epidemiologii molekularnej dermatofitów oraz stosowanych metod molekularnych – także w kontekście

trudności związanych z diagnostyką grzybic. W treści tego rozdziału znalazły się również dodatkowe informacje dotyczące weryfikacji uzyskanych danych doświadczalnych. Autor porównał bowiem otrzymane profile restrykcyjne produktów PCR z profilami wygenerowanymi *in silico*, czyli w oparciu o dostępne bazy danych, uzyskując pełną zgodność. Podnosi to wartość merytoryczną pracy. Takie pogłębione dyskusje wyników nie zdarzają się zbyt często w pracach doktorskich.

Ostatni rozdział badań własnych Autora obejmuje 5 zwięzłych i wyważonych wniosków, wypływających z przeprowadzonych badań i będących równocześnie odpowiedzią na postawione cele pracy.

W trakcie czytania pracy zauważyłam kilka drobnych niedociągnięć (obok tych zanotowanych wcześniej) oraz nasunęły mi się pewne wątpliwości.

1. Nie jest jasne czy materiał szczepowy otrzymany przez Autora z przyszpitalnej Pracowni Mykologicznej był już wcześniej zdiagnozowany gatunkowo metodami rutynowymi, czy też był to materiał nieoznaczony? Powinno to być wyraźnie określone. Jeżeli Autor otrzymał szczepy już oznaczone do gatunku to czy ponownie je identyfikował fenotypowo? A jeśli tak, to czy otrzymał identyczne wyniki? Jeśli jednak Autor sam izolował i oznaczał szczepy dermatofitów to dane zawarte w tabeli 2 (str. 30) zamieszczonej w rozdziale „Materiał i metody badań” należy przenieść do rozdziału „Wyniki” albowiem są to już rezultaty badań własnych Autora.
2. Nazwy gatunków, które były przedmiotem badań powinny mieć dodany skrót nazwiska autora lub autorów, którzy jako pierwsi opisali i nazwali gatunek, przykładowo *Microsporum canis* (E. Bodin) E. Bodin. Zapis taki wystarczy dla porządku przedstawić jedynie raz, np. na początku, gdy podany jest wykaz gatunków.
3. Zdjęcia dotyczące wpływu testowanych związków chemicznych na wzrost liniowy i morfologię kolonii (Tab. 9) są mało wyraźne.
4. Dlaczego w badaniach aktywności przeciw dermatofitowej wybranych związków biologicznie czynnych użyto jedynie szczepy referencyjne, pomijając szczepy kliniczne? Miałoby to większe znaczenie praktyczne.
5. Należy poprawić stylistycznie brzmienie wniosku nr 1, a wniosek nr 2 moim zdaniem należy rozdzielić na dwa odrębne wnioski.
6. Przy przygotowaniu pracy do druku w części metodycznej proponowałbym połączyć podrozdziały 3.4 i 3.5 jako jeden pt.: „Izolacja i identyfikacja dermatofitów”.

Poczynione uwagi nie mają generalnie wpływu na merytoryczną ocenę pracy a drobne niejasności czy niedociągnięcia bez przeszkód można skorygować.

Wniosek końcowy

Praca doktorska Pana mgr Mariusza Worka stanowi wartościowe, pod wieloma względami unikatowe, osiągnięcie naukowe w dziedzinie nauk biologicznych, dotyczące molekularnej diagnostyki i epidemiologii dermatofitów – sprawców grzybic powierzchniowych człowieka. W szczególności wyniki badań tej pracy pogłębiają i poszerzają dotychczasowy stan wiedzy dotyczący molekularnych kryteriów identyfikacji gatunkowej dermatofitów oraz dostarczają nowych informacji na temat wewnątrzgatunkowego zróżnicowania genotypowego tych grzybów. Genotypowaniem dermatofitów, jak dotychczas, zajmują się nieliczne ośrodki naukowe na świecie, w Polsce jedynie Zakład Genetyki Drobnoustrojów Uniwersytetu Łódzkiego. Za niezwykle ważne należy uznać również to, że dysertacja doktorska Pana mgr Mariusza Worka zawiera istotne, z punktu widzenia praktyki klinicznej, przesłanki do których należy: potwierdzenie konieczności wprowadzenia metod molekularnych do diagnostyki laboratoryjnej grzybic oraz skonstruowanie specyficznych gatunkowo, o wysokiej czułości, sond molekularnych z przeznaczeniem do identyfikacji dermatofitów. Przedłożoną do recenzji rozprawę wysoko oceniam, także z uwagi na warsztat metodyczny. Przygotowanie rozprawy wymagało od Autora bardzo dobrej znajomości, umiejętności doboru i dostosowania do przedmiotu badań, różnych technik biologii molekularnej co zaowocowało m.in. skonstruowaniem wspomnianych sond molekularnych.

Uznaję więc ocenioną pracę doktorską za spełniającą wymagania stawiane rozprawom doktorskim i stosownie do odpowiednich przepisów Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych, wnioskuję do Wysockiej Rady Wydziału Biologiczno-Rolniczego Uniwersytetu Rzeszowskiego o dopuszczenie Pana mgr Mariusza Worka do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz publicznej obrony.

Ponadto biorąc pod uwagę aktualność podjętej problematyki, wartość poznawczą pracy i jej znaczenie dla praktyki medycznej, zawarte w pracy elementy nowości i jej wysoki poziom metodyczny, dodatkowo poparty zgłoszeniem patentowym oraz opublikowaniem części wyników w czasopismach z Impact Factor wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej Pana mgr Mariusza Worka stosowną nagrodą.

Jolanta Karu-Tomiś-Konelska