

Wzrost 6.02.2019  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
M. Podgórska Okoń  
WYDZIAŁ LEKARSKI  
Katedra i Zakład

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO	
wpl. dnia	04-02-2019
L.dz. DL	
Znak sprawy DL	



GDYŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
WYDZIAŁ NAUK O ZDROWIU Z ODDZIAŁEM PIELĘGNIARSTWA I INSTYTUTEM MEDYCYNY MORSKIEJ I TROPIKALNEJ

INSTYTUT MEDYCYNY MORSKIEJ I TROPIKALNEJ  
ZAKŁAD PARAZYTOLOGII TROPIKALNEJ  
ul. Powstania Styczniowego 9B  
81-519 GDYNIA  
tel. 58 349 19 45



Dr hab. n. med. Beata Szostakowska  
Katedra Medycyny Tropikalnej i Parazytologii  
Zakład Parazytologii Tropikalnej  
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 01.02.2019.

## RECENZJA

**osiągnięcia naukowego mgr Magdaleny Szydłowicz pt. „Zastosowanie metod molekularnych w ocenie prewalencji oraz występowania wariantów genotypowych *Pneumocystis jirovecii* u pacjentów z wybranymi grupami ryzyka”**

Rodzaj *Pneumocystis* obejmuje kilka gatunków jednokomórkowych grzybów o wysokiej specyficzności żywicielskiej, wykazujących tropizm do komórek nabłonkowych płuc. Ze względu na brak możliwości hodowli *Pneumocystis in vitro*, dopiero opracowanie w latach 80. ubiegłego wieku metod molekularnych umożliwiło szybki postęp badań nad tym ważnym, a mało poznanym patogenem. *Pneumocystis jirovecii*, uprzednio klasyfikowany jako *P. carinii*, wywołuje jedną z najczęstszych i najpoważniejszych infekcji oportunistycznych u ludzi z niedoborami immunologicznymi. Pacjenci niebędący nosicielami wirusa HIV, a narażeni na infekcje *Pneumocystis*, to osoby, którym podaje się leki immunosupresyjne i cytotoksyczne w przebiegu m.in. chorób nowotworowych i po przeszczepieniu narządów, a także cierpiące z powodu różnych chorób płuc. Inwazja *P. jirovecii* może mieć charakter objawowy (PcP) lub bezobjawowy, który w sprzyjających okolicznościach może rozwinąć się w chorobę u nosiciela lub być przyczyną transmisji do osób bardziej podatnych na rozwój choroby. W Polsce badania nad prewalencją *P. jirovecii* są wyrzutowe. Ponadto, brak danych na temat różnicowania genetycznego szczepów izolowanych od ludzi w Polsce. Podjęcie więc tego tematu jest bardzo cenne i nowatorskie w skali kraju. Dobrana metodyka łączy klasyczne badania mikroskopowe z najnowocześniejszymi technikami molekularnymi.

Osiągnięcie naukowe zostało przedstawione w postaci skryptu, w skład którego wchodzi streszczenia osiągnięcia w języku polskim i angielskim oraz cyklu trzech, spójnych tematycznie publikacji wraz z oświadczeniami współautorów o ich wkładzie w powstanie poszczególnych publikacji.

Streszczenie jest zwarte (3 strony maszynopisu) lecz w pełni wyczerpujące. Zawiera syntetyczną informację na temat *Pneumocystis jirovecii*, jasno sprecyzowane cele podjętych badań, metodykę badawczą i osiągnięte rezultaty wraz z ich podsumowaniem. Jest też jest poprawne pod względem formalno-językowym.

Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich publikacji, a w trzeciej - również autorem korespondującym. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach zagranicznych o szerokim zasięgu i wysokim wskaźniku cytowań IF (łącznie 7,384) oraz punktacji MNiSW (łącznie 95).

Pierwsza z prac to publikacja poglądowa, w której rola Doktorantki polegała na zebraniu i opracowaniu literatury źródłowej (przy udziale pozostałych autorów) oraz napisaniu manuskryptu i jego przygotowaniu do publikacji. W obu pracach oryginalnych Jej udział polegał na przygotowaniu materiału klinicznego do badań, wykonaniu znacznej większości badań laboratoryjnych oraz ich analizie, napisaniu manuskryptów i ich przygotowaniu do publikacji.

W publikacji poglądowej pt. „*Pneumocystis jirovecii* – from a commensal to pathogen: clinical and diagnostic review” przedstawiona została w sposób wyczerpujący aktualna wiedza na temat tego patogena, w oparciu o najważniejsze i najnowsze dane literaturowe: biologia i patogeniczność *P. jirovecii*, drogi szerzenia, grupy ryzyka, u których może dojść do rozwoju PcP, mechanizmy choroby i czynniki ryzyka, a także stosowane obecnie metody leczenia i diagnostyki, wraz z zaletami i wadami poszczególnych z nich. Szczególnie cenny w tej publikacji poglądowej jest moim zdaniem rozdział dotyczący zróżnicowania genetycznego w obrębie gatunku *P. jirovecii*, w powiązaniu z danymi klinicznymi i epidemiologicznymi. Wprowadzenie technik molekularnych, które umożliwiły wykrywanie punktowych mutacji w DNA do badań nad *Pneumocystis*, stało się punktem wyjścia do szukania zależności między właściwościami poszczególnych izolatów (patogeniczność, lekooporność, zdolność do infekcji określonych osób, rozprzestrzenienie geograficzne i in.) a ich profilem genetycznym. Tym samym niniejszy poglądowy artykuł jest uzasadnieniem podjętych przez Doktorantkę badań przedstawionych w kolejnych dwóch publikacjach oryginalnych.

W publikacja drugiej, pt. „Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in colonized patients with various pulmonary diseases”, przedstawiono wyniki badań 105 pacjentów Kliniki Pulmonologii i Nowotworów Płuc Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, zaś trzecia publikacja z cyklu, pt. „Prevalence and genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in renal transplant recipients – preliminary report” przedstawia wyniki podobnych badań, lecz dotyczących biorców przeszczepu nerki (w liczbie 72 osób), hospitalizowanych w Klinice Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej UM we Wrocławiu. Obie grupy pacjentów należą do grup ryzyka zarażenia tym oportunistycznym patogenem, więc podjęcie badań było jak najbardziej słuszne.

Materiał od pacjentów obu grup był analizowany mikroskopowo (z zastosowaniem fluorescencji pośredniej do barwienia cyst i trofozoitów *P. jirovecii*) oraz z wykorzystaniem technik

molekularnych (amplifikacja fragmentów wybranych genów metodą nested PCR) przy zastosowaniu najnowszych metod stosowanych we wiodących ośrodkach na świecie.

Przedstawiono prewalencję *P. jirovecii* w badanych grupach ryzyka wraz z intensywnością zarażenia, co w połączeniu z danymi klinicznymi pozwoliło na ocenę czy inwazja jest kolonizacją, czy pneumocystozowym zapaleniem płuc. PcP stwierdzono u jednego pacjenta – biorcy przeszczepu nerki. U pozostałych pacjentów stwierdzono kolonizację, co stanowi jednak duże niebezpieczeństwo rozwoju choroby, która w tych grupach ryzyka może mieć ciężki przebieg. Detekcja DNA tego patogena pomimo uzyskania negatywnego wyniku badania mikroskopowego, kwalifikowało pacjentów do grupy skolonizowanych. Znaczne (ponad dwukrotne) zwiększenie wykrywalności inwazji przy zastosowaniu metod molekularnych dowodzi zasadności ich wprowadzenia do diagnostyki infekcji *P. jirovecii*.

W przypadku części izolatów nie udało się przeprowadzić analizy zróżnicowania w genach *DHPS* i *SOD*. Nie jest to wynikiem błędów metodycznych i nie umniejsza w żadnej mierze wartości pracy. Doktorantka, w oparciu o literaturę, dobrze wytłumaczyła to zjawisko, iż przyczyną była mała intensywność inwazji, co przy niskokopijności tych genów spowodowało niepowodzenie amplifikacji. Niska intensywność inwazji, co jest charakterystyczne w przypadkach kolonizacji, pozwoliło na wykrycie patogena poprzez amplifikację mitochondrialnego genu *LSUrRNA*, który występuje w genomie w dużej liczbie kopii i analizę zróżnicowania genetycznego w jego obrębie.

Doktorantka wnikliwie przeanalizowała zależności pomiędzy występowaniem poszczególnych wariantów genotypowych *P. jirovecii* a wybranymi parametrami klinicznymi i demograficznymi. W dyskusjach w obu publikacjach podała możliwe przyczyny wykrytych korelacji oraz porównała swoje wyniki z rezultatami uzyskanymi w innych ośrodkach badawczych na świecie. Wykazała się przy tym bardzo dobrą znajomością piśmiennictwa światowego. Zauważyła również, że uzyskane przez Nią wyniki nie zawsze są zbieżne z podobnymi analizami dokonanymi w innych ośrodkach na świecie i wnioskuje, iż powodem mogą być różnice w dystrybucji poszczególnych genotypów w różnych rejonach geograficznych. Wynik taki, co słusznie podkreśla Doktorantka, wskazuje na konieczność dalszych badań, prowadzonych podobnymi technikami w różnych ośrodkach badawczych. Ja uważam, iż wskazane byłoby także przeprowadzenie podobnej analizy wśród personelu medycznego oddziałów, z których pochodzili pacjenci badani w niniejszych dwóch pracach oryginalnych. Takie badania rzuciłyby światło na rolę personelu medycznego w transmisji i utrzymywaniu się określonych genotypów *P. jirovecii* w badanych populacjach. Jest to ważne w kontekście ostatniego zdania Streszczenia: „Wyniki analizy różnorodności genotypowej sugerują natomiast, że pacjenci o szczególnych cechach mogą być bardziej narażeni na infekcję patogenu o specyficznym genotypie, lub też specyficzne czynniki mogą wpływać na rozwój określonych genotypów *Pneumocystis* występujących u takich pacjentów”. W związku z tym proszę o odpowiedź na pytanie: czy Doktorantka planuje kontynuację i poszerzenie podjętych badań?

Pragnę mocno podkreślić, że w badaniach na materiale od pacjentów, jego uzyskanie wymaga umiejętności dobrej współpracy z klinicystami i dobrej organizacji pracy. Uzyskanie tak dużej liczby prób klinicznych stanowi atut prezentowanej dysertacji i świadczy o posiadaniu wymaganych cech przez Doktorantkę.

Moja uwaga krytyczna dotyczy sposobu przedstawienia oświadczeń o udziale współautorów w powstaniu publikacji oryginalnych. W przypadku gdy autorów jest 9 czy 11, identyczne sformułowania w oświadczeniach kilku współautorów: „planowanie badań”, „wykonanie badań”, „analiza wyników” są niejasne. Należałoby podać procentowy udział poszczególnych współautorów.

#### **Wniosek końcowy.**

W rozwiniętych krajach patogeny oportunistyczne stanowią coraz poważniejszy problem zdrowotny. Z tego względu podjęcie przez Doktorantkę badań nad *P. jirovecii*, będącym ważnym patogenem oportunistycznym, są w pełni uzasadnione.

Zastosowana przez Doktorantkę metoda detekcji tego patogena w materiale klinicznym metodami molekularnymi, oparta na najnowszej literaturze światowej, może zostać wdrożona do rutynowych badań pacjentów z grup ryzyka, zarówno w ośrodku, w którym badania wykonano, jak i w innych ośrodkach leczniczych w kraju.

Uzyskane wyniki, opublikowane w uznanych czasopismach o zasięgu światowym, stanowią uzupełnienie, wciąż fragmentarycznej, wiedzy na temat prevalencji i zróżnicowania genotypowego *P. jirovecii* u pacjentów należących do dwóch grup ryzyka o dane z Polski i zachęcają do kontynuacji podjętych badań, zarówno w obu analizowanych grupach ryzyka jak oraz innych grupach ryzyka i w innych ośrodkach w kraju.

**Podsumowując, z przyjemnością stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr biotechnologii Magdaleny Szydłowicz spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 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 późn. zm.). W związku z tym, mam zaszczyt prosić Wysoką Radę Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Magdaleny Szydłowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na wysoką wartość osiągnięcia naukowego wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.**

*dr hab. n. med. Beata Szostakowska*