

R e c e n z j a rozprawy doktorskiej

p.t. Zastosowanie metod molekularnych w ocenie prewalencji oraz występowania wariantów genotypowych *Pneumocystis jirovecii* u pacjentów z wybranymi grupami ryzyka

przygotowanej przez mgr Magdalena Szydłowicz

Promotor: Prof. dr hab. Andrzej Hendrich

Promotor Pomocniczy: dr Marta Kicia

Pneumocystis jirovecii jest kosmopolitycznym, jednokomórkowym organizmem eukariotycznym, zaliczanym w przeszłości do pierwotniaków, który w wyniku rozwoju badań molekularnych został reklasyfikowany do królestwa grzybów. Jest to jeden z 5 gatunków rodzaju *Pneumocystis*, szeroko rozpowszechniony wśród mieszkańców Europy i Ameryki Północnej, jedyny - wywołujący zapalenie płuc u ludzi, najczęściej będących w stanie immunosupresji. Badania serologiczne przeprowadzone u dzieci poniżej 4 r.ż. wykazały obecność przeciwciał swoistych dla *P. carinii* u 75% z nich, co świadczy o tym, że patogen ten występuje powszechnie w bioferze, a źródłem zarażenia jest prawdopodobnie człowiek chory. Rezerwuarem mogą być też zdrowi o sprawnym układzie immunologicznym, u których występuje nosicielstwo. Brak jest danych epidemiologicznych na temat występowania pneumocystozy, a w piśmiennictwie znajdują się pojedyncze doniesienia na ten temat, także z Polski.

Dobrze się więc stało, że zagadnieniem występowania *Pneumocystis jirovecii* zajęła się mgr Magdalena Szydłowicz, której opracowanie p.t. *Zastosowanie metod molekularnych w ocenie prewalencji oraz występowania wariantów genotypowych *Pneumocystis jirovecii* u pacjentów z wybranymi grupami ryzyka* stanowi przedmiot ocenianej rozprawy doktorskiej, przygotowanej pod kierunkiem Pana Profesora Andrzeja Hendricha. Wybór tematu uważam za interesujący, w pełni zasadny i wychodzący na przeciw aktualnym problemom mykologii medycznej.

Na rozprawę doktorską składa się cykl, spójnych tematycznie, 3 publikacji (1 przeglądowa i 2 oryginalne) opublikowanych w języku angielskim, w renomowanych czasopismach, tj. *Parasitology Research* i *Medical Mycology*, o łącznym IF= 6,853 i punktacji MNiSW = 90, a mianowicie:

- 1) Sokulska M.^a, Kicia M., Wesołowska M., Hendrich A.B. 2015: *Pneumocystis jirovecii*: from a commensal to pathogen - clinical and diagnostic review. *Parasitol Res*, 114:3577 - 3585, doi:10.1007/s00436-015-4678-6;
- 2) Sokulska M.^a, Kicia M., Wesołowska M., Piesiak P., Kowal A., Lobo M.L., Kopacz Ż., Hendrich A.B., Matos O. 2018: Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in colonized patients with various pulmonary diseases. *Med Mycol*, 56 (7):809-815, doi: 10.1093/mmy/myxl21;
- 3) Szydłowicz M., Jakuszko K., Szymczak A., Piesiak P., Kowal A., Kopacz Ż., Wesołowska M., Lobo M.L., Matos O., Hendrich A.B., Kicia M. 2018: Prevalence and genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in renal transplant recipients - preliminary report. *Parasitol Res*, doi: 10.1007/s00436-018-6131-0.

Uwaga ^a - nazwisko aktualne: Szydłowicz.



We wszystkich wymienionych publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem; pozostali autorzy każdej z prac podpisali oświadczenia o ich udziale w wydrukowanych opracowaniach. Wynika z nich, że mgr M. Szydłowicz miała decydujący udział w badaniach, których wyniki są prezentowane w powyższych artykułach.

Pierwsza praca jest przejrzystym przeglądem piśmiennictwa dot. budowy i cyklu życiowego, patogenności oraz wykrywania *Pneumocystis jirovecii*, a także zapobiegania, wykrywania i leczenia pneumocystozowego zapalenia płuc. Publikacja ta, przygotowana w oparciu o 72 pozycje bibliograficzne z lat 1976-2014, stanowi doskonały wstęp do pozostałych artykułów.

Cele rozprawy: 1. ocena prevalencji *P. jirovecii*; 2, rozróżnienie pomiędzy kolonizacją a pneumocystozowym zapaleniem płuc; 3. analiza różnorodności genotypowej *Pneumocystis* występujących w wybranych grupach ryzyka: biorców przeszczepu nerki oraz pacjentów z różnymi chorobami układu oddechowego zostały zrealizowane w dwu pracach oryginalnych.

W pracach oryginalnych wykorzystano badanie pobranych materiałów biologicznych (popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe, plwocina) w mikroskopie fluorescencyj-

nym z zastosowaniem zestawu Mono-Fluo *P. jirovecii* (Bio-Rad) oraz izolowanie z nich DNA grzyba, a następnie przeprowadzona została analiza polimorfizmów pojedynczego nukleotydu metodą gniazdowego PCR z zastosowaniem specyficznych starterów (zewnątrznych i wewnętrznych) w celu zwiększania wrażliwości standardowej techniki łańcuchowej reakcji polimerazy. Do badań pobrano materiał od 105 pacjentów Kliniki Pulmonologii i Nowotworów Płuc oraz 72 biorców przeszczepu nerek hospitalizowanych w Klinice Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej. *Pneumocystis jirovecii* wykryto w immunofluorescencji pośredniej odpowiednio u 7,62% i 4,16%, zaś metodami biologii molekularnej u 16,2% oraz 11,1% chorych z poszczególnych grup. Tylko w jednym przypadku, u biorcy nerki, rozpoznano pneumocystozowe zapalenie płuc, zaś pozostałych zbadanych, u których wykryto *P. jirovecii* uznano za osoby skolonizowane przez tego grzyba. Genotypowanie wykazało następujące genotypy: *mtLSU* rRNA -genotyp 1, 2 i 3; *CYB* - *CYB* 1, 2, 5, 6, 7 i 8; *DHPS* - genotyp 1, a także *SOD-SOD* 1 i 2. Stwierdzono, że mutanty *CYB* występowały u chorych z nowotworami płuc, *CYB* 2 u leczonych przeciwgrzybowo biorców nerek oraz genotyp dziki *mtLSU* rRNA u osób młodych i w krótkim okresie po przeszczepie. Zbadani pacjenci należą do grup ryzyka zakażenia *Pneumocystis jirovecii*, przy czym genotyp grzyba może zależeć zarówno od cech żywiciela (m.in. wieku, stanu odporności, liczby komórek kwasochłonnych we krwi, przyjmowanych leków), jak również środowiska jego występowania. W artykułach oryginalnych uwzględniono 71 pozycji bibliograficznych z lat 1981-2017.

Uzyskane wyniki mają znaczenie nie tylko poznawcze, ale także praktyczne.

Wszystkie prace zostały poddane ocenie przez niezależnych recenzentów w procesie publikacji i uzyskały pozytywne opinie, dlatego ich wartość merytoryczna nie podlega dyskusji i dodatkowej ocenie.

* * *

Po przeczytaniu pracy nasuwają się następujące uwagi: ▲ przy omawianiu pracy już wykonanej nie używamy słowa „badanych”, lecz „zbadanych”, bo to już stało się faktem; ▲ wątpliwość budzi wartość diagnostyczna materiału w postaci plwociny, ponieważ po pierwsze zazwyczaj zamiast plwociny uzyskuje się ślinę pacjenta, po drugie nawet jeżeli jest to plwocina to "przechodzi" ona przez gardło i jamę ustną, a więc tak na prawdę występujące w tym materiale mikroorganizmy nie koniecznie muszą pochodzić z dolnych dróg oddechowych; ▲ warto byłoby, moim zdaniem, określić poziom

Prof. zw. dr hab. n. med. Piotr Kurnatowski
PWSZ im. Angelusa Silesiusa w Wałbrzychu

swoistych przeciwciał u zbadanych (co oczywiście już w chwili obecnej nie jest możliwe), a także określić u osób "zdrowych", w odpowiedniej grupie wiekowej, prevalencję *Pneumocystis jirovecii*.

Powyższe uwagi w niczym nie umniejszają wartości ocenianej rozprawy doktorskiej.

* * *

Temat badań ma duże znaczenie poznawcze. Pragnę zwrócić uwagę, że Doktorantka wykazała się dobrą znajomością aktualnej wiedzy w zakresie tematyki podjętych badań, dowiodła, że potrafi planować i realizować badania naukowe, wysnuwać wnioski wynikające z uzyskanych rezultatów, a także prawidłowo redaguje prace naukowe stanowiące rozprawę doktorską.

Reasumując otrzymaną do recenzji dysertację p.t. *Zastosowanie metod molekularnych w ocenie prevalencji oraz występowania wariantów genotypowych *Pneumocystis jirovecii* u pacjentów z wybranych grup ryzyka* przygotowaną przez mgr Magdalenę Szydłowicz oceniam wysoko; stanowi ona rozwiązanie problemu naukowego określonego celem pracy i odpowiada warunkom rozprawy doktorskiej.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dn. 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późn. zm.).

Stawiam przeto wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Magdaleny Szydłowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

2019.01.17

Prof. dr hab. med.
PIOTR KURNATOWSKI

