



WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD PARAZYTOLOGII
ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 62 68 | +48 71 375 62 14
fax +48 71 325 21 51

zpar@uwr.edu.pl | www.mikrobiologia.uni.wroc.pl

Dr hab. Marcin Popiołek, prof. UWr

Wrocław, 25.10.2019 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Żanety Kopacz pt. „Ocena częstości występowania oraz charakterystyka molekularna *Cryptosporidium* spp. u pacjentów immunokompetentnych oraz z immunosupresją indukowaną farmakologicznie z wybranych grup ryzyka”

Zwalczanie globalnych pasożytów człowieka, mimo systematycznie zwiększającego się potencjału badawczego, nadal napotyka na szeroką gamę problemów, zarówno tych o charakterze klinicznym, środowiskowym oraz ekonomicznym. Do grupy tej należy bez wątpienia *Cryptosporidium*, kwalifikowany obecnie jako szósty, najważniejszy na świecie, pasożyt powodujący inwazje układu pokarmowego. Kryptosporydiozy, kojarzone dotychczas głównie z inwazjami u osób z zaburzeniami układu odpornościowego, stają się obecnie zagrożeniem także dla pacjentów z immunosupresją indukowaną farmakologicznie, jak również immunokompetentnych. Skutkuje to wyodrębnianiem nowych, nie analizowanych wcześniej, grup ryzyka np. biorców przeszczepów lub pacjentów leczonych onkologicznie. Nie dziwi więc fakt, że pierwotniak ten jest obecnie jednym z najintensywniej badanych mikropasożytów na świecie. W tym kontekście, temat rozprawy doktorskiej mgr Żanety Kopacz dobrze wpisuje się w aktualnie obowiązujące trendy współczesnej parazytologii lekarskiej.

Przedstawiona do recenzji praca jest klasycznym opracowaniem monograficznym, liczy 165 stron i jest podzielona na osiem głównych rozdziałów: wstęp, materiał i metody, wyniki, zestawienie wyników, dyskusja, wnioski oraz literatura. Do pracy dołączono także publikację zatytułowaną "The first evidence of *Cryptosporidium meleagridis* infection in a colon adenocarcinoma from an immunocompetent patient" opublikowaną w 2019 roku przez Doktorantkę i współpracowników w czasopiśmie *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, prezentującą część otrzymanych podczas badań Doktorantki wyników.

W podzielonym na osiem głównych podrozdziałów i mocno rozbudowanym "wstępie", Autorka zapoznaje czytelnika z najważniejszymi aspektami bionomii *Cryptosporidium*: taksonomią, budową, cyklem rozwojowym, a także czynnikami wirulencji. W oparciu o najnowsze i trafnie dobrane

piśmiennictwo szeroko omawia chorobotwórczość, koncentrując się głównie na epidemiologii zarażeń, drogach transmisji oraz czynnikach ryzyka. Opisuje patogenezę kryptosporydiozy, jej obraz kliniczny oraz odpowiedź immunologiczną żywiciela. Przybliży także aktualne trendy w diagnostyce i leczeniu. Przedstawiony przegląd jest opracowany w sposób przejrzysty i logiczny, nie epatuje nadmierną szczegółowością, jest wyważony i umiejętnie wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane i wykorzystywane w dalszej części rozprawy. Zasób informacji przedstawiony we Wstępie jest imponujący. Z powodzeniem zasługiwałby na wydzielenie go jako osobnego opracowania monograficznego lub obszernego artykułu przeglądowego. Jako całość pokazuje, że wiedza Autorki o biologii *Cryptosporidium* i jego szeroko rozumianej epidemiologii jest niekwestionowana.

"Wstęp" płynnie przechodzi w rozdział przedstawiający cel pracy oraz zaplanowane zadania, zmierzające do jego realizacji.

W dość obszernym, bo liczącym 26 stron rozdziale "materiał i metody" Autorka charakteryzuje analizowane grupy pacjentów jak również pobrany od nich materiał biologiczny. Na uwagę zasługuje trafny pomysł rozszerzenia puli badanego materiału o próby pochodzące od zwierząt, z którymi zarażeni pacjenci mieli styczność. Pozwoliło to na weryfikację zoonotycznego charakteru niektórych przypadków inwazji. W dalszej części rozdziału, Doktorantka w przejrzysty i zrozumiały sposób przedstawia metody przygotowywania materiału do badań oraz zastosowane techniki badawcze, zarówno te molekularne jak i mikroskopowe. Wykorzystanie obu metod, nadal niebędące niestety standardem w tego typu badaniach, jeszcze bardziej uwiarygadnia uzyskane wyniki. Rozdział kończy nieco lakoniczna, w porównaniu z pozostałą treścią tej części rozprawy, informacja o zastosowanej analizie statystycznej. Generalnie, zarówno dobór materiału badawczego jak i liczebność prób uważam za wystarczające, a wykorzystane metody diagnostyczne za prawidłowe i adekwatne do postawionych celów badawczych. Ta część rozprawy nie wymaga dłuższego komentarza świadcząc o obszernej wiedzy, opanowaniu warsztatu i przygotowaniu Doktorantki do realizacji podjętego tematu.

Konstrukcja rozdziału Wyniki, choć nie jest standardowa, dobrze ilustruje uzyskane rezultaty. Sam sposób ich przedstawienia uważam za czytelny, przejrzysty i układający się w logiczną całość,



WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD PARAZYTOLOGII
ul. Przybyszewskiego 63/77
51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 62 68 | +48 71 375 62 14
fax +48 71 325 21 51

zpar@uwr.edu.pl | www.mikrobiologia.uni.wroc.pl

a suplementacja tabelami, rycinami jak i załączonymi dendrogramami dodatkowo uwypukla i uwiarygadnia uzyskane rezultaty. Lektura wyników, na pierwszy rzut oka, może wydawać się nieco rozczarowująca. Obecność *Cryptosporidium* stwierdzono bowiem tylko w bardzo niewielkiej liczbie prób. Jednak bardziej złożona analiza inwazji, w zestawieniu z dobrze wyeksponowaną w rozdziale dyskusja "specyfiką" częstości występowania tego pasożyta, pozwala spojrzeć na uzyskane rezultaty w zupełnie innym świetle. W tym kontekście, uzyskane przez Doktorantkę wyniki, nie tylko nie odstają, ale wydają się całkowicie zgodne z notowanym w Polsce, ale i innych krajach, poziomem zarażenia tym patogenem. Poziomem, który jest bardzo zmienny i zależy od wielu czynników, np. zróżnicowanych szans na ekspozycję względem pasożyta, podatności na inwazję, czy dostępnością i poziomem szeroko rozumianej opieki zdrowotnej.

Podsumowując uzyskane wyniki, należy podkreślić że w sytuacji kiedy większość współcześnie prowadzonych badań dotyczących *Cryptosporidium* jest wykonywana w oparciu o materiał zwierzęcy lub próby środowiskowe, już sam fakt przeprowadzenia badań na materiale ludzkim czyni recenzowaną pracę bardziej interesującą i wyróżnia ją spośród zbliżonych tematycznie opracowań. W tym kontekście do najbardziej istotnych osiągnięć recenzowanej rozprawy zaliczam: (1) pokazanie rosnącej różnorodności gatunków/genotypów *Cryptosporidium* w Polsce, poprzez stwierdzenie obecności *C. parvum* podtypu IIaA16G1R1, *C. melagridis* z rodziny podtypu IIIg, *C. baileyi*, oraz *Cryptosporidium* "horse genotype", a także potwierdzenia bezpośredniej, zoonotycznej transmisji tego ostatniego od koni na człowieka, (2) wykazanie, że status immunologiczny pacjenta nie jest jedynym kryterium ryzyka zarażenia *Cryptosporidium*, (3) pokazanie, że oprócz leczenia immunosupresyjnego, także procesy nowotworowe o różnej etiologii mogą być czynnikami sprzyjającymi zarażeniom *Cryptosporidium*, (4) wykazanie roli pacjentów z utajonym zarażeniem jako rezerwuaru *Cryptosporidium* w populacji, (5) wskazanie pacjentów z przewlekłymi procesami zapalnymi lub nowotworowymi jako możliwe grupy ryzyka zarażenia *Cryptosporidium*.

Dyskusja wyników została, w mojej opinii, przeprowadzona w sposób poprawny, logiczny i dojrzały. Autorka syntetycznie odnosi uzyskane przez siebie rezultaty do wyników i informacji pochodzących ze starannie dobranych i licznie cytowanych źródeł literaturowych. Na podkreślenie zasługuje szeroki kontekst dyskutowanych problemów, dotyczący zarówno wykrywalności zarażeń,

występowania lub braku objawów, problematyki inwazji zoonotycznych, inwazji u pacjentów immunokompetentnych oraz pacjentów ze schorzeniami nowotworowymi.

Zarówno dobór jak i wykorzystanie źródeł literaturowych uważam za prawidłowe, a listę piśmiennictwa za bardzo obszerną, obejmującą najnowsze, w większości anglojęzyczne, wydawnictwa. Praca napisana jest przejrzystym i bardzo poprawnym językiem, spełniającym wymagania stawiane publikacjom naukowym.

Z obowiązku recenzenta, chciałbym podzielić się kilkoma uwagami lub sugestiami, które nasunęły mi się podczas czytania rozprawy.

- Poziom fragmentacji tekstu na rozdziały, podrozdziały itd., jest dość mocno rozbudowany. Mimo że zamierzeniem Autorki było zapewne ułatwienie czytelnikowi poruszania się po tekście (co generalnie się udało), w moim odczuciu wyodrębnianie osobnych podrozdziałów dla informacji zawartych w dwóch, a nawet w jednym zdaniu należy uznać już chyba za nieco przesadne,
- Określając cel pracy, wypunktowano listę zadań, które miały doprowadzić do jego osiągnięcia. Osobiście uważam, że lepiej byłoby zastąpić je kilkoma, zwięźle sformułowanymi hipotezami, które sprecyzowałyby oczekiwania Autorki w odniesieniu do realizowanych wyników,
- Nieco zabrakło mi w wynikach (lub w podsumowaniu) tabeli, która w prosty i klarowny sposób zestawiałaby wszystkie uzyskane rezultaty, np. z podziałem na grupy pacjentów czy rodzaje badanego materiału. Wspomniane informacje zawarte są, co prawda, w tekście podrozdziałów "Wyniki" jak i w "Zestawienie wyników", ale ich odszukanie, a zwłaszcza porównanie wymaga już nieco więcej czasu i wertowania kilkudziesięciu stron tekstu,
- Chciałbym także zapytać, na jakim metodologicznym etapie badań zaczął się udział Doktorantki. Czy Autorka uczestniczyła w pobieraniu próbek, czy otrzymywała je gotowe?
- Przed przygotowaniem wyników do publikacji, mocno sugerowałbym również rewizję podejścia do użytej w pracy analizy statystycznej, a w zasadzie do ogólnego sensu jej zastosowania. Jak już wcześniej wspomniałem, z dość lakonicznego opisu sposobu wykorzystania narzędzi statystycznych, zarówno w "materiałach i metodach", jak i w "wynikach", nie jestem w stanie wywnioskować co było celem wykonanych analiz i co otrzymane wyniki tak naprawdę pokazały. Uważam, że natura uzyskanych wyników, w szczególności w kontekście liczby uzyskanych prób

pozytywnych lub zarażonych pacjentów sprawia, że jakkolwiek miarodajna interpretacja wyników przeprowadzonych analiz jest praktycznie niemożliwa, lub może być obciążona trudnym do zmierzenia błędem. Ponadto, próba wykorzystania parametrycznego testu T-Studenta do analizy danych, w których z uwagi na bardzo dużą liczbę "prób negatywnych", uzyskanie rozkładu normalnego lub spełnienie warunku jednorodności wariancji jest mało realne, wydaje się co najmniej dyskusyjna.

Wspomniane wyżej uwagi dotyczą głównie zagadnień natury formalnej lub redakcyjnej, a tylko w marginalnym stopniu *stricte* merytorycznej. Ich intencją, oprócz wyjaśniania nielicznych niedomówień, jest doprecyzowanie niektórych informacji podczas przygotowywania uzyskanych wyników do druku.

Podsumowując, uważam, że Doktorantka zrealizowała założone cele. Recenzowana rozprawa dostarcza nowych i ciekawych danych dotyczących zarówno rosnącej bioróżnorodności jak i epidemiologii zarażeń *Cryptosporidium*. Będąc swego rodzaju kompendium wiedzy o *Cryptosporidium* i kryptosporydiozie, pokazuje również jak trudnym i zarazem "niewdzięcznym" modelem badawczym jest wybrany przez Autorkę patogen. Trzeba także podkreślić że przeprowadzenie badań na materiale pobranym od pacjentów na taką skalę w obecnym czasie i w świetle obowiązujących przepisów nie jest zadaniem łatwym i nawet tylko ze *stricte* formalnego punktu widzenia wymaga determinacji i dużego wysiłku.

W świetle powyższych danych, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Żanety Kopacz 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 powyższym przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Marcin Popiołek, prof. UWr

