

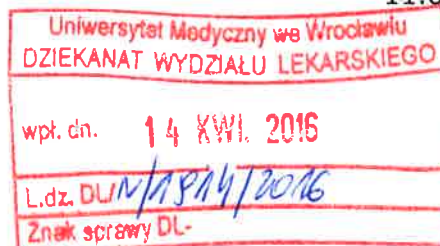


Dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska, prof. nadzw. UWr

11.04.2016

Zakład Mikrobiologii

Instytut Genetyki i Mikrobiologii
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski
Zakład Mikrobiologii
ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław
Tel. 071-3756-227



Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Aldony Bińkowskiej z Katedry i Zakładu Mikrobiologii

Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

pt. „Profil oporności szczepów *Helicobacter pylori*”

Promotor: prof. dr hab. Grażyna Gościński

Wśród pałeczek należących do rodzaju *Helicobacter* gatunek *Helicobacter pylori* ma największe znaczenie kliniczne. Gatunek ten jest czynnikiem etiologicznym przewlekłych nieżytów żołądka, choroby wrzodowej żołądka i dwunastnicy, a przewlekłe zakażenie tą bakterią może być przyczyną raka żołądka czy chłoniaka typu MALT. Czynniki wirulencji *H. pylori* nie są nadal do końca poznane i scharakteryzowane, a notowane w Polsce i na świecie zjawisko oporności tych drobnoustrojów na różne grupy antybiotyków potwierdza, iż podjęta przez Doktorantkę tematyka rozprawy doktorskiej jest trafna i bardzo aktualna. Aktualnymi, w tym kontekście zagadnieniami, są podjęte w rozprawie doktorskiej badania nad opornością szczepów na lewofloksacynę oraz metronidazol. Pomimo dużej wiedzy jaką obecnie posiadamy w zakresie oporności bakterii na antybiotyki, wiele aspektów molekularnych nadal pozostaje nierozwiązanych, a wiedza w tym zakresie ma ogromny wpływ na możliwości leczenia zakażeń.

Rozprawa doktorska mgr Aldony Bińkowskiej liczy 122 strony. Praca ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. W pracy wyróżniono takie rozdziały jak: wstęp pracy, cel pracy, materiały, metody badań; wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie, streszczenie w języku angielskim oraz piśmiennictwo i aneks.

Wstęp wprowadza w eksperymentalną część pracy. Autorka omawia charakterystykę bakterii z gatunku *H. pylori* szczególną wagę przykładając do przedstawienia czynników wirulencji tej bakterii, oraz częstości jej występowania na świecie. W kolejnych częściach wstępu omówione zostały opcje terapeutyczne zakażeń wywołanych przez *H. pylori*, a także mechanizmy oporności pałeczek *H. pylori* na metronidazol, makrolidy, fluorochinolony, amoksycylinę, tetracykliny, rifabutynę. Autorka przedstawia także diagnostykę zakażeń wywołanych przez *H. pylori*. Ta część pracy została bardzo

dobrze opracowana, mogłaby zostać jedynie wzbogacona o przedstawienie zjawiska mimikry molekularnej antygenów *H. pylori* w kontekście omawianej wirulencji tej bakterii. Bardzo proszę o omówienie tego zagadnienia podczas publicznej obrony pracy.

Poprawność formułowania hipotez i problemów badawczych stawianych przez mgr Aldonę Bińkowską oceniam bardzo dobrze. Trzy cele pracy przedstawiono bardzo zwięźle. Głównym celem pracy była próba wyjaśnienia mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie oporności szczepów *H. pylori* na klarytromycynę, lewofloksacynę, metronidazol, tetracyklinę i amoksyliny. Ważnymi celami pracy była także identyfikacja genetycznych podstaw warunkujących oporność na badane antybiotyki i określenie zależności pomiędzy częstością występowania genów *cagA* i *vacA* warunkujących wirulencję szczepów *H. pylori*, a profilem lekowrażliwości. Należy stwierdzić, iż cele pracy jakie postawiła sobie Doktorantka zostały zrealizowane.

W rozprawie doktorskiej Doktorantka wykorzystała podstawowe metody mikrobiologiczne, dotyczące hodowli szczepów i oznaczania lekowrażliwości na antybiotyki metodą E-test® oraz metody z obszaru biologii molekularnej tj. izolacji DNA bakterii, metodę PCR do wykrywania fragmentów genomowego DNA bakterii, elektroforezę produktów PCR, oraz metodę sekwencjonowania klasycznego fragmentów DNA. Autorka rozprawy dla pełnej analizy wyników zastosowała także oznaczenia statystyczne. Metody do badań zostały wybrane trafnie i umiejętnie zastosowane. Materiały i metody zostały precyzyjnie i dobrze przygotowane. Pytania do tej części pracy: jakie było kryterium wyboru 106 szczepów *H. pylori* do badań nad dystrybucją genów wirulencji oraz analiz mutacji w genie 23s rRNA spośród 170 szczepów badanych w rozprawie doktorskiej?

W rozdziale omawiającym wyniki Autorka bardzo dokładnie przedstawia uzyskane dane i szczegółowo wizualizuje je na wykresach i w tabelach. W zdecydowanej większości wykresy i tabele są bardzo czytelne. W opinii Recenzenta wykresy od 1 do 9 powinny zostać wzbogacone w legendę, co ułatwiłoby ich analizę. Analizując wyniki należy podkreślić, iż wyniki w których Autorka porównuje lekowrażliwość szczepów pomiędzy grupą dzieci a grupą dorosłych są niezwykle cenne i pozwalają na wyciąganie wniosków dotyczących wirulencji *H. pylori* w korelacji do wieku pacjentów. Wyniki pozwalają także na uzyskanie ciekawych wniosków takich jak te, iż od chorych z przewlekłym zapaleniem żołądka lub/i dwunastnicy najczęściej izoluje się szczepy wielooporne. Analiza dystrybucji genów wirulencji w badanych komórkach szczepów pokazały m.in. kombinacje alleli *s* oraz *m* genu cytotoksyny wakuolizującej *vacA* w obrębie grupy dzieci i dorosłych, gdzie szczepy *H. pylori s1/m1* częściej izolowano od osób dorosłych niż od dzieci, natomiast szczepy *H. pylori s1/m2* odwrotnie, częściej izolowane były od chorych dzieci.

Należy podkreślić wagę zastosowanych obliczeń statystycznych, dzięki którym udało się wskazać na cenne dane, że szczepy z wyższą opornością na klarytromycynę częściej mają mutację A2143G. Interesującym jest także wniosek wskazujący, iż obecność izoleucyny w pozycji 191 genu *gyrA*

zmniejsza ryzyko oporności na fluorochinolony aż o 87%. Uwagi do tej części pracy dotyczą tego, iż na rycinie 3 dokumentującej rozkład elektroforetyczny produktu PCR genu *vacA* omyłkowo opisano dwie kontrole ujemne. Wątpliwość budzi także opis wykresów 17, 18, 19 i 20, które Autorka podpisuje jako: „Występowanie mutacji (...) w genie (...) u szczepów (...)”. W opinii Recenzenta wykresy przedstawiają wartości dotyczące odsetka szczepów, u których stwierdzono brak mutacji lub obecność mutacji.

Całościowa analiza wyników pozwala stwierdzić, iż wykorzystując standardowe metody mikrobiologiczne dotyczące badania lekowrażliwości szczepów oraz zaawansowane metody molekularne Doktorantce udało się zrealizować założone cele pracy doktorskiej oraz wnieść nowe dane i obserwacje do badań nad lekowrażliwością pałeczek *H. pylori*.

W dyskusji Doktorantka precyzyjnie omawia uzyskane wyniki na tle badań innych autorów. Niezwykle cenne, iż Autorka cytuje prace przedstawiające wyniki epidemiologiczne odnoszące się do naszego kraju, Europy, ale także przedstawia dane dotyczące innych części świata, co świadczy o dużej znajomości tematu przez Doktorantkę. Wnioski są trafne i syntetycznie ujęte.

Proszę o szersze skomentowanie jednego z wniosków pracy mówiącego o tym iż, nie stwierdzono związku między opornością szczepów *H. pylori*, a obecnością genów *cagA* oraz *vacA* w korelacji do danych umieszczonych w tabeli numer 15.

Autorka rozprawy cytuje 110 prac naukowych, w zdecydowanej większości są to prace anglojęzyczne. Zacytowane piśmiennictwo jest bardzo aktualne. Praca napisana jest poprawnie pod względem formalno-językowym.

Powracając do tego, co jest w mojej opinii najważniejszym aspektem ocenianej rozprawy, należy stwierdzić, iż mgr Aldona Bińkowska w swojej pracy doktorskiej pt. „Profil oporności szczepów *Helicobacter pylori*” dokonała ciekawych obserwacji oraz uzyskała ważne naukowo wyniki. Do najważniejszych wyników zaliczyć należy:

1. ryzyko wystąpienia oporności na klarytromycynę jest istotnie większe wśród szczepów *H. pylori* z mutacją A2143G niż wśród szczepów dzikich;
2. oporność szczepów na lewofloksacynę wiąże się z mutacjami w genach *gyrA* i *gyrB*, ale nie można wykluczyć innych mechanizmów oporności;
3. mutacje punktowe w genie *rdxA* występowały wśród szczepów opornych i wrażliwych na metrodnidazol, co sugeruje istnienie innych mechanizmów odpowiedzialnych za fenotypową oporność szczepów.

We wnioskach końcowych warto nadmienić, iż praca wykonana została w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu po opieką naukową prof. dr hab. Grażyny Gościńskiak, będącej autorytetem naukowym w badaniach dotyczących bakterii z gatunku *Helicobacter pylori*. Przedstawiona mi do recenzji praca pt. „Profil oporności szczepów *Helicobacter pylori*” została

prawidłowo zaplanowana, wykonana i wpasowuje się w aktualnie prowadzone na świecie badania dotyczące *Helicobacter pylori*.

Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi krytyczne i pytania w żadnym stopniu nie umniejszają wartości naukowej przedstawionej pracy i są elementem dyskusji z Doktorantką. Warto podkreślić, iż wyniki badań były prezentowane na 5 konferencjach naukowych.

Podsumowując pragnę stwierdzić, iż: "Rozprawa doktorska 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.)".

Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z uprzejmą prośbą o dopuszczenie mgr Aldony Bińkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie i nagrodzenie rozprawy doktorskiej.

Dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska, prof. nadzw. UW

KIEROWNIK
Dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska, prof. nadzw. UW