



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirsfelda

POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości: IMMUNE

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 fax: (+48-71) 337 21 71

<http://www.iitd.pan.wroc.pl>

dr. hab Anna Pawlik

Zakład Mikrobiologii

Tel. 071-3709949

e-mail: zawilak@iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 31. 03.2016

Recenzja rozprawy doktorskiej ppor. mgr Aldony Bińkowskiej pt.:

" Profil oporności szczepów *Helicobacter pylori*"

Rozprawa doktorska ppor. mgr Aldony Bińkowskiej dotyczy problemu oporności bakterii *Helicobacter pylori* na antybiotyki. *H. pylori* jest bakterią chorobotwórczą, zasiedlającą przewód pokarmowy znaczącej części populacji ludzi na świecie. Jest istotnym czynnikiem ryzyka w rozwoju takich chorób jak przewlekłe zapalenie błony śluzowej żołądka, wrzody żołądka lub dwunastnicy czy rak żołądka. Wiele izolowanych szczepów *H. pylori* jest opornych na stosowane powszechnie antybiotyki, a profil lekooporności jest często zróżnicowany geograficznie. Lekooporność bakterii, szczególnie w ujęciu molekularnym i fizjologicznym, jest bardzo ciekawym tematem badawczym, ale przede wszystkim stanowi poważny problem medyczny utrudniający skuteczne leczenie ludzi i zwierząt. W związku z powszechnym używaniem antybiotyków, lekooporność bakterii staje się coraz powszechniejszym zjawiskiem. Co więcej, zmianie ulega zarówno profil lekooporności poszczególnych gatunków jak i poznawane są nowe podstawy molekularne oporności bądź wrażliwości bakterii na antybiotyki. W tym świetle badania Pani ppor. mgr Bińkowskiej nad lekoopornością bakterii *H. pylori* wpisują się w nurt aktualnie prowadzonych prac naukowych.

Rozprawa ppor. Mgr Aldony Bińkowskiej ma formę klasyczną. Jest napisana poprawnym językiem naukowym, rzeczowo przedstawione są zagadnienia teoretyczne jak i wyniki badań. We „Wstępie” Doktorantka wyczerpująco wprowadza w tematykę związaną z chorobotwórczością, lekoopornością szczepów oraz molekularnymi podstawami oporności *H. pylori* na antybiotyki stosowane w leczeniu zakażeń tą bakterią. W rozdziale „Cel Pracy” jasno przedstawia założenia badawcze. Rozdziały „Materiały” i „Metody” precyzyjnie opisują wykorzystywany materiał badawczy i stosowane techniki. Rozdział „Wyniki” a następnie „Dyskusja” stanowią główną część pracy, omówioną poniżej. W rozdziale „Wnioski” doktorantka w punktach wymienia najważniejsze osiągnięcia badań. Całość dopełniają streszczenia rozprawy w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów, tabel, rycin i wykresów

oraz spis literatury. W tym miejscu podkreślić należy staranność przygotowania rozprawy, a także czytelność i dopracowaną szatę graficzną.

Celem pracy podjętej przez Doktorantkę było określenie profilu lekooporności szczepów *H. pylori*, zarówno w aspekcie fenotypu jak i genotypu, oraz zbadanie zależności między lekoopornością/wrażliwością na antybiotyki a wirulencją szczepów *H. pylori* charakteryzowaną przez geny *cagA* i *vacA*. Wszystkie badania prowadzone były z uwzględnieniem obrazu klinicznego choroby pacjentów, od których izolowano poszczególne szczepy; niektóre uwzględniały też wiek pacjentów (dorośli, dzieci). W sumie analizie poddano 170 szczepów wyizolowanych od pacjentów leczonych w klinikach Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Badania fenotypowe wykonano przez określenie wzrostu bakterii w obecności antybiotyków: metronidazolu, klarytromycyny, lewofloksacyny, amoksycyliny i tetracykliny; dla wszystkich szczepów wyznaczono wartość MIC. Następnie szczepy poddano analizie genotypowej z uwzględnieniem specyfiki molekularnej określonej lekooporności. Badano mutacje w genie 23S rRNA w szczepach opornych na klarytromycynę, mutacje w genach *gyrA* i *gyrB* w szczepach opornych na lewofloksacynę, mutacje w genie *rdxA* w szczepach opornych na metronidazol. We wszystkich szczepach, wykorzystując reakcje PCR, przeprowadzono genotypowanie genu *vacA* oraz weryfikowano obecność genu *cagA*. Doktorantka wszystkie wyniki przedstawiła w formie opisów, tabel, wykresów; opisała zależności między opornością na antybiotyki a obrazem klinicznym choroby i wirulencją szczepów *H. pylori*. Przywołanie wszystkich wyników w recenzji nie jest możliwe, gdyż są one bardzo obszerne i wielowymiarowe. Wymieniłem tylko najistotniejsze osiągnięcia:

- Określenie profilu wrażliwości i oporności badanych szczepów *H. pylori*. Wykazano wysoki odsetek szczepów opornych na metronidazol (24%) i klarytromycynę (17%). Stwierdzono równocześnie, że 32% szczepów było wielolekoopornych. Wykazano brak oporności szczepów na amoksycylinę i tetracyklinę w badanych szczepach. Jak przedstawiono we „Wstępie” i w „Dyskusji” oporność bakterii nie jest jednakowa (ani ilościowo, ani jakościowo) i zależy zarówno od regionu geograficznego jak i zmienia się w czasie (zwykle narasta), stąd konieczność prowadzenia badań uwzględniających te dwa czynniki. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę potwierdzają wcześniejsze doniesienia, aktualizują dane dotyczące profilu lekooporności *H. pylori* i są istotne ze względów praktycznych, ponieważ mogą pomóc w doborze antybiotyków stosowanych w leczeniu zakażeń *H. pylori*.
- Określenie genotypów badanych szczepów związanych z opornością na określony antybiotyk, przy czym badano typowe loci związane z opornością na dany antybiotyk. W niektórych przypadkach nie udało się określić molekularnych podstaw obserwowanej oporności, co świadczy o innym mechanizmie niż typowy, zakładany przez Doktorantkę na podstawie danych literaturowych. Świadczy to o złożoności problemu lekooporności bakterii (w tym wypadku *H. pylori*) na antybiotyki oraz konieczności poszukiwania nietypowych, nieznanych dotąd mechanizmów oporności na antybiotyki.

- Wykazano powiązanie niektórych czynników np. występowania określonej mutacji z obrazem klinicznym choroby czy wartością MIC
- Wykazano brak związku między obecnością genu *cagA* i obecnością oraz typem genu *vacA* a lekoopornością szczepów *H. pylori*.

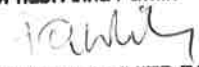
Wyniki zaprezentowane w pracy są przekonujące, wyczerpująco opisane i świadczą o rzetelnym i dokładnym przeprowadzeniu zaplanowanych badań, które umożliwiły osiągnięcie postawionego w pracy celu. Nasunęły mi się jednak następujące spostrzeżenia i pytania:

1. Doktorantka w swoich badaniach określała molekularne podstawy oporności bakterii w typowych loci podawanych w literaturze. Jak sama podkreśla, z powodu ograniczeń, głównie finansowych, niemożliwe było zbadanie wszystkich możliwych wariantów mutacji tak, aby wykryć nowe, niezależne od typowych genów, mutacje. Jest to zadanie trudne z racji zmienności genetycznej *H. pylori*, co Doktorantka wykazała w analizach sekwencji genu *rdxA*, jednak takie podejście - sekwencjonowanie całego genomu - umożliwiłoby odkrycie nowych mechanizmów oporności. Co więcej, pozwoliłoby też wyjaśnić sytuację odwrotną – wrażliwość *H. pylori* na antybiotyki pomimo posiadania mutacji warunkującej oporność jak np. w przypadku mutacji A2143G zapewniającej oporność na klarytromycynę (10% badanych szczepów wrażliwych na klarytromycynę posiadało ta mutację). Czy Doktorantka spotkała się w literaturze czy doniesieniach zjazdowych z takim podejściem?
2. Mutacje zidentyfikowane z genie *rdxA* można porównać z opublikowanymi danymi, np. Mirzaei i wsp., Adv Biomed Res 2014, 3:90. Wtedy uzyskuje się większą bazę danych umożliwiającą wytypowanie mutacji istotnych dla oporności na metronidazol.
3. Dlaczego Doktorantka, podejmując badania, zakładała, że istnieje związek między wirulencją szczepów *H. pylori*, ocenianej na podstawie obecności i typów genów *cagA* i *vacA*, a lekoopornością?
4. Z czego może wynikać wykazana w badaniach (rozdział 5.2.3 i 5.2.4) wysoka oporność na klarytromycynę szczepów izolowanych od dzieci (24%) i brak oporności szczepów izolowanych od dorosłych?
5. Czym można wytłumaczyć pojawienie się oporności na antybiotyki w przypadku wystąpienia mutacji niemej w genie (np. GCG w pozycji 122 *gyrA*) lub ogólnie większej liczby mutacji w genie *gyrA* (Rozdział 6, str. 100)?
6. Czym można tłumaczyć różnice w występowaniu mutacji warunkujących oporność na antybiotyki zależną od rozpoznania klinicznego choroby (np. mutacje w 23s rRNA, Wykres 16, str. 82)?
7. Na stronie 23 Doktorantka pisze, że mutacje punktowe są przekazywane bez pośrednictwa plazmidów, wertykalnie. Mutacje punktowe mogą być przekazywane również horyzontalnie bez pośrednictwa plazmidów.

8. Dyskutując wyniki dotyczące czynników wirulencji *cagA* i *vacA* w badanych szczepach, Doktorantka używa skrótowego opisu np. „szczepy *H. pylori cagA(+)* s1/m2” (str. 93 i 4). To jest nieprawidłowy opis genotypu, sugerujący, że s1/m2 odnosi się do genu *cagA*, podczas gdy w rzeczywistości charakteryzuje gen *vacA*.
9. Praca zawiera bardzo wiele danych. Czy istnieją bazy danych umożliwiające zdeponowanie tego typu informacji, które z jednej strony służą nauce, z drugiej mogą stanowić podstawy racjonalnego planowania terapii przeciwbakteryjnych?

Podsumowując recenzję merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani ppor. mgr Aldony Bińkowskiej mogę stwierdzić, że zawiera ważne wyniki naukowe. Podkreślić też należy ogrom pracy włożony w wykonanie badań, staranność ich wykonania i opisanie. Wyniki dotychczas były prezentowane zjazdach i konferencjach. Powinny zostać opublikowane, ponieważ tylko wtedy mogą być wykorzystane zarówno do dalszych badań naukowych jak też do racjonalnego planowania terapii skierowanej przeciwko *H. pylori*.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ppor. Mgr Aldony Bińkowskiej spełnia wszystkie wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pani ppor. Mgr Aldony Bińkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Anna Pawlik

Zakład Mikrobiologii IITD PAN