

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Kalinowskiej
„Porównanie metody opartej na reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) oraz
metody konwencjonalnej w diagnostyce zakażeń grzybiczych skóry
i jej przydatków”

napisanej pod kierunkiem dr hab. med. Anity Hryncewicz-Gwóźdź

Grzyby, ze względu na nabyte w toku ewolucji cechy biotyczne, w tym specyficzne szlaki metabolizmu, przystosowały się do życia w różnych środowiskach. Organizmy te są czynnikiem etiologicznym wielu chorób roślin i zwierząt, a także człowieka. Są kosmopolityczne i ubikwistyczne. Większość gatunków grzybów jest w ekosystemach pożądana, również korzystnie oddziałując na ludzki organizm, będący dla nich swoistą niszą ekologiczną. Niektóre gatunki w toku ewolucji stały się pasożytami o słabszych lub mocniejszych powiazaniach z żywicielem.

Ze względu na mikroskopijne struktury, grzyby najczęściej nie są widoczne w obrazie klinicznym objawów przez nie spowodowanych. Dlatego podczas wstępnej diagnozy, choroby grzybicze są określane na podstawie mniej lub bardziej charakterystycznych zmian chorobowych, będących zazwyczaj przesłanką do kolejnych etapów coraz bardziej precyzyjnej analityki. Jest to konieczne, ponieważ liczne choroby skóry nie dają swoistych i jednoznacznych co do przyczyn objawów.

Lekarze specjalizujący się w diagnozowaniu chorób powodowanych przez grzyby potrzebują jednoznacznej informacji na temat rodzaju czynnika sprawczego. Dlatego dobrze się stało, że pani mgr Katarzyna Kalinowska podjęła próbę porównania dwóch, najczęściej stosowanych w diagnostyce infekcyjnych chorób skóry metod: konwencjonalnej - hodowlanej oraz opartej na analizie specyficznych fragmentów DNA - testów molekularnych umożliwiających identyfikację grzybów. Doktorantka, co istotne, opierała się przy tym na licznych, wcześniej przeprowadzonych diagnozach, postawionych na podstawie obserwacji objawów chorobowych. Takie holistyczne podejście jest cenne. Liczne zmiany skóry mogą być spowodowane czynnikami

abiotycznymi, autoimmunologicznymi, niekiedy o mieszanej skomplikowanej etiologii, a więc nie tylko zewnętrznymi czynnikami biotycznym. W tym kontekście podjęte badania, zarówno co do zakresu, jak i przyjętej metodyki są nie tylko pożądane, ale również nowatorskie.

Praca ma układ typowy dla dysertacji naukowych, została podzielona na 7 głównych podrozdziałów i 3 pomocnicze. W rozdziale *Wstęp* doktorantka stopniowo wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z zaplanowanymi etapami pracy badawczej, budując tezy pracy i wskazując na konieczność przeprowadzania szeroko zakrojonej diagnostyki chorób skóry. W kolejnym rozdziale *Założenia i cel pracy* tezy badawcze są już precyzyjnie i poprawnie określone, trafnie korespondują z tematem pracy. W moim mniemaniu rozdział ten, obejmujący aż 1/3 objętości pracy, jest zbyt obszerny. Mógł, bez szkody na zawarte w nim treści, zostać podzielony na dwa niezależne rozdziały. *Wstęp* – z treściami wprowadzającymi krótko do tematyki i np. *Przegląd literatury*. W rzeczywistości *Wstęp* jest bardzo obszerną, podzieloną na trafnie utworzone podrozdziały analizą stanu wiedzy obejmującej zarówno: przyczyny infekcyjnych chorób skóry o etiologii grzybiczej, zagadnienia epidemiologiczne, jak również informacje o dotychczas stosowanych metodach diagnostycznych. Autorka pracy cytuje w tym miejscu ponad 100 pozycji trafnie dobranej literatury specjalistycznej. Są to głównie oryginalne prace naukowe, opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Tylko nieliczne pozycje to podręczniki akademickie. Zarówno łączna liczba 158 zacytowanych z całej rozprawie prac, jak i ich dobór świadczą o szerokiej wiedzy doktorantki, oraz o biegłości w wyszukiwaniu i posługiwaniu się naukowymi danymi bibliograficznymi.

Przedstawione w rozdziale *Materiał i metody* techniki zostały wystarczająco precyzyjnie opisane. Oznacza to, że ten istotny fragment pracy pozwala na odtworzenie badań w dowolnym czasie i miejscu. Dostatecznie szczegółowo opisano zarówno sposoby pobierania próbek jak i zasady którymi się kierowano podczas wykonywanego badania bezpośredniego - diagnozy zmian skóry. Do badań hodowlanych wykorzystano aż 11 podłoży (zestawienie pożywek na str. 107-111), co umożliwiło rzetelne przeprowadzenie izolacji mikroorganizmów z pobranych próbek. Ponadto zastosowano liczne testy biochemiczne, a dla grzybów keratynolitycznych - test perforacji włosa.

Do identyfikacji gatunków metodami analityki molekularnej wybrano między innymi multipleksową reakcję PCR. Jest to technika służąca do amplifikowania wielu matryc podczas jednej reakcji. Dzięki jednoczesnemu wykorzystaniu różnych zestawów primerów, metoda ta zapewnia oszczędność czasu i pozwala obniżyć koszty badań, przy zachowaniu wysokiej jakości uzyskiwanych wyników, co w konsekwencji ma duży walor praktyczny. Metoda

ma jednak wady, głównie ze względu na możliwość występowania konkurencji pomiędzy starterami w jednej mieszance reakcyjnej, dlatego kluczową cechą primerów jest ich specyficzność w stosunku do amplifikowanej sekwencji docelowej. Niespecyficzna amplifikacja może zachodzić w innych, komplementarnych regionach. Złe dopasowanie primerów prowadzi do obniżenia jakości reakcji amplifikacji. Dodatek każdej nowej pary primerów zwiększa ryzyko wystąpienia niespecyficznych połączeń. Dlatego warunki reakcji należy określić osobno dla każdego zestawu starterów, a następnie dodawać je kolejno do siebie i jeśli to konieczne zmieniać i dostosowywać wszystkie parametry. Wymaga to, wbrew zamieszczonej w pracy tezie o prostocie wykonania tego typu testów, sporego doświadczenia.

Autorka pracy wykazała się w tym zakresie biegłością. Wiedząc o trudnościach metodycznych, minimalizowała ryzyko wystąpienia błędów. Stosowała wieloetapowe działanie. Wykonując początkowo badanie 225 próbek, ze starterami specyficznymi tylko wobec dermatofitów i grzybów rodzaju *Candida*. Następnie wykonywała badania z kolejnymi parami starterów, w tym parą specyficzną wobec dermatofitów oraz gatunkowo-specyficzną. Tak przyjęty schemat działania pozwolił na rzetelną identyfikację gatunków oraz wykrycie infekcji mieszanych. Doktorantka wykazała się nie tylko pracowitością, o czym świadczy bardzo obszerny zakres badań, ale również dużym doświadczeniem w posługiwaniu się zaawansowanymi technikami analityki molekularnej.

Uzyskane wyniki badań zostały szczegółowo opisane w rozdziale *Wyniki* oraz udokumentowane w czterech syntetycznych tabelach (nr: 2-4) zamieszczonych w odrębnym rozdziale na końcu pracy. W mojej opinii, ze względu na niewielką liczbę tabel, zrzęcniej byłoby zamieścić te dwie spójne części pracy w jednej przestrzeni. Tabelę 1., gdzie ujęto sekwencje starterów wykorzystywanych do badań, można było zamieścić w rozdziale *Material i metody*. Tego typu zabiegi redakcyjne sprzyjałyby logicznej spójności opracowania. Mimo tej dyskusyjnej zresztą uwagi, doktorantce udało się opracować wyniki badań z należytą starannością. Cennym elementem pracy było zastosowanie wzorów określających „czułość” poszczególnych metod identyfikacji przyczyn chorób skóry. Tak przyjęte rozwiązanie pozwoliło w miarę obiektywnie ocenić różnice w skuteczności stosowania różnorodnych metod diagnozy. Warto podkreślić, co do praktycznej, ale i również z naukowego punktu widzenia, istotnej informacji, w kontekście epidemiologicznym, jest zestawienie częstości występowania poszczególnych gatunków grzybów na różnych części ciała i w zależności od wieku pacjenta.

Uzyskane wyniki badań zostały umiejętnie skonfrontowane z danymi opublikowanymi w literaturze naukowej. W rozdziale *Omówienie wyników i*

dyskusja autorka pracy wykazała się dużą dojrzałością i umiejętnością w operowaniu złożonym, wieloaspektowym materiałem faktograficznym. Mgr Kalinowska wykazała się zdolnością syntetycznego przekazu danych naukowych, uniknęła często spotykanego błędu wielokrotnego powielania informacji, używając argumentów wskazała na wady i zalety zastosowanych w pracy naukowej metod. Zazwyczaj tego typu rozdział kończy się podsumowaniem prowadzącym do wniosków. Doktorantka wnioski zamieściła wcześniej, przed dyskusją wyników, co wg mojej opinii nie było zbyt dobrym rozwiązaniem. Nie zmienia to jednak w znaczący sposób przekazu zawartych w pracy informacji poznawczych, tym bardziej, że wnioski zostały sformułowane prawidłowo. Zawarte w nich treści nie są ponowną eksplikacją wyników, co jest powszechnym spotykanym błędem u początkujących badaczy. Wnioski przedstawiono jako uogólnienia, dające odpowiedź na zwarte w rozprawie tezy badawcze.

Pomimo specjalistycznego zaawansowania naukowego, stylu typowego dla rozpraw naukowych, dysertację czyta się z przyjemnością, między innymi dlatego, że została zredagowana poprawnym językiem. Tym mniej nie uniknięto kilku drobnych błędów edytorskich. Powszechnie przyjętą w biologii zasadą jest pisanie kolejno powielanych nazw rodzajowych, w nazwach gatunków, poprzez redukcję pierwszego członu nazwy do pierwszej dużej litery (np. str. 82 *Trichophyton interdigitale*, kolejny gatunek powinien być zapisany jako *T. mentagrophytes*). Dobrym zwyczajem, ale i zasadą jest zamieszczanie po nazwie gatunkowej, czy rodzajowej, nazwisk autorów opisujących takson (np. str. 11 powinno być: *Trichophyton mentagrophytes* (C.P. Robin) Sabour). Przy często zmieniających się nazwach taksonomicznych, szczególnie w przypadku mikroorganizmów, ułatwia to precyzyjną i jednoznaczną weryfikację poprawności nazwy, a ta nie zawsze jest jednoznaczna. Niektóre nazwy wykresów i tabel są wg mnie niedostatecznie precyzyjne. Np. wykres 1. Zatytułowano: *Wyniki badań mikologicznych otrzymanych metodą klasyczną i metodą opartą na reakcji łańcuchowej polimerazy....* Lepiej byłoby *Porównanie skuteczności metod zastosowanych do identyfikacji dermatofitów z użyciem pojedynczych par starterów*. Tabela 2. została zatytułowana: *Wyniki badań mikologicznych otrzymanych metodą klasyczną oraz molekularną*, precyzyjniej byłoby - *Gatunki grzybów uzyskane z próbek klinicznych zidentyfikowane metodami klasycznymi i molekularnymi*.

W części metodycznej brakuje cytowań literatury, na podstawie której identyfikowano gatunki. Pozycje te są wprawdzie zamieszczone w spisie literatury oraz były cytowane w rozdziale *Wstęp*. Wydaje się jednak, że powinny być zamieszczone jako jeden z elementów metody. Chyba że autorka

uznała identyfikację kilku podstawowych dermatofitów jako działanie obecnie już rutynowe.

Przedstawiona do oceny praca doktorska, mimo uwag dotyczących głównie struktury tekstu, w znacznej mierze redakcyjnych, niekiedy dyskusyjnych, posiada wysoki poziom naukowy. Szereg wyników badań wnosi nowe elementy poznawcze z zakresu mikologii lekarskiej oraz szeroko pojętej analityki medycznej. Wyniki pracy wskazują, jak dużą rolę w procesie leczenia zmian chorobowych skóry mogą mieć coraz powszechniej stosowane metody analityczne. Zaletą pracy jest nie tylko wskazanie zalet i wad związanych ze stosowaniem różnorodnych metod analitycznych ale zachęta do ich łącznego stosowania.

Duża liczba przebadanych pacjentów, jak również pobranych w warunkach klinicznych prób, pozwoliła autorce pracy na wyciągnięcie wniosków o różnorodnej czułości metod, ale również o zbieżności w identyfikowaniu gatunków. Z punktu widzenia profilaktyki medycznej, monitoring występowania organizmów pasożytniczych, zmiany w kompensacji poszczególnych gatunków, zmiany we frekwencji dermatofitów, są cenną informacją zarówno dla lekarzy, jak i firm farmaceutycznych.

W związku z powyższym po szczegółowej analizie rozprawy stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr inż. Katarzyny Kalinowskiej spełnia warunki stawiane dysertacjom naukowym i wnoszę o dopuszczenie Autorki do publicznej obrony pracy.

Ponadto, ze względu na zakres pracy, jak również poziom zaawansowania naukowego, w tym opanowanie warsztatu badawczego, woskuję o uhonorowanie pani mgr inż. Katarzyny Kalinowskiej nagrodą.

Krzysztof Matkowski

