Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD EKOLOGII DROBNOUSTROJÓW I AKAROENTOMOLOGII
ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 62 20
zeda@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

dr hab. Dorota Kiewra, prof. UWr Wrocław, 25.08.2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Kulas

pt. „Cechy determinujące patogeniczność mikrogrzybów zasiedlających przewód pokarmowy osób zdrowych oraz pacjentów z rakiem jelita grubego”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Kulas (zwanej dalej Autorką) została wykonana pod kierunkiem Pani Promotor prof. dr hab. Marii Dynowskiej w Katedrze Mikrobiologii i Mykologii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Podjęta przez Doktorantkę tematyka jest szczególnie ważna w aspekcie wyjątkowego znaczenia grzybów w przyrodzie, w tym ich istotnego wpływu na zdrowie człowieka. Duża różnorodność a także szerokie rozprzestrzenienia tej grupy drobnoustrojów w środowisku, w tym ich zdolność do zasiedlania ludzkiego organizmu i znaczący potencjał chorobotwórczy sprawiają, że badania nad tą grupą mikroorganizmów prowadzą naukowcy z różnych dziedzin i dyscyplin naukowych, w tym biolodzy, mikrobiolodzy, genetycy, lekarze czy epidemiolodzy. Warto jednocześnie zwrócić uwagę, że dotychczasowa wiedza na temat znaczenia grzybów obecnych w mikrobiomie człowieka jest nadal niewystarczająca. Należy podkreślić, że podjęta w pracy tematyka wpisuje się w kierunek badań i zainteresowanie naukowe zespołu badawczego Katedry Mikrobiologii i Mykologii UWM w Olsztynie, w którym Doktorantka wykonała swoją pracę doktorską.

Autorka w przedstawionej do oceny rozprawie koncentruje się na badaniu grzybów kolonizujących przewód pokarmowy ludzi zdrowych oraz pacjentów z rakiem jelita grubego. Przeprowadzone badania poszerzają aktualny stan wiedzy nie tylko w zakresie znajomości mikrobiomu zdrowego człowieka, ale też potencjalnych zmian w mikrobiomie związanych z procesem chorobowym. Wartym podkreślenia jest zebranie unikatowego materiału badawczego obejmującego izolaty grzybowe pochodzące zarówno od osób zdrowych, jak i pacjentów ze zdiagnozowanym histopatologicznie rakiem jelita grubego.

Oceniana praca doktorska jest dziełem oryginalnym, została przedstawiona w postaci oprawionego, estetycznie przygotowanego maszynopisu. Została napisana starannie,

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD EKOLOGII DROBNOUSTROJÓW I AKAROENTOMOLOGII
ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 62 20
zeda@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

poprawnym językiem, cechuje się logicznym i przejrzystym układem. Obejmuje 97 stron, w tym 14 tabeli i 2 ryciny. Układ pracy spełnia wymogi stawiane pracom eksperymentalnym. Całość została podzielona na rozdziały, zawiera w kolejności wstęp (z podrozdziałami), uzasadnienie wyboru tematu, cel badań, materiał i metody, wyniki (z podrozdziałami), dyskusję, wnioski, a także piśmiennictwo, spis tabel i rycin oraz zamieszczone na początku pracy streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis nazw gatunków ze skrótami.

W pierwszym rozdziale zatytułowanym „**Wstęp**" Autorka w sposób syntetyczny i wyczerpujący opisała dotychczasowy stan wiedzy na temat grzybów jako drobnoustrojów o potencjale chorobotwórczym dla człowieka. Zwróciła uwagę zarówno na patogeniczność grzybów, jak i na czynniki wpływające i determinujące rozwój zakażeń grzybiczych. Zwróciła uwagę na zróżnicowanie i szerokie rozprzestrzenienie grzybów w środowisku człowieka, a także podkreśliła ich często oportunistyczny, a więc warunkowo chorobotwórczy charakter. Omówiła różnice w etiopatogenezie chorób związanych z grzybami uwzględniając nie tylko grzybice (mykozy), a także możliwość oddziaływania metabolitów o charakterze toksyn (mykotoksykozy) i potencjał do wywoływania reakcji alergicznych (mykoalergozy). Cenne jest zwrócenie uwagi na rolę biofilmu w rozwoju zakażenia grzybiczego, a także na produkcję szerokiego spektrum enzymów, których występowanie może sprzyjać rozwojowi, penetracji i namnażaniu grzybów. Autorka podkreśliła także rolę swoistych i nieswoistych mechanizmów obronnych gospodarza w rozwoju zakażenia grzybiczego oraz przeanalizowała wpływ różnych czynników, które mogą predysponować do zakażenia.

W rozdziale zatytułowanym „**Uzasadnienie wyboru tematu**" Autorka w sposób zwięzły przedstawiła przesłanki skłaniające do podjęcia realizowanego tematu, podkreślając jednocześnie możliwy wpływ chorób, w tym chorób nowotworowych oraz ich leczenia na zmiany w mikrobiocie i podatność na rozwój zakażeń grzybiczych. Uzasadniła zarówno wybór grupy badawczej, jak i konieczność podjęcia prowadzonych badań.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „**Cel badań**" Autorka jasno przedstawiła główny cel pracy obejmujący nie tylko identyfikację, ale też charakterystykę grzybów kolonizujących

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD EKOLOGII DROBNOUSTROJÓW I AKAROENTOMOLOGII
ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 62 20
zeda@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

różne ontocenozy osób zdrowych i pacjentów z rakiem jelita grubego oraz przedstawiła kolejno zaplanowane i wykonane zadania badawcze umożliwiające realizację założonego celu badań.

W rozdziale czwartym zatytułowanym „**Materiał i metody**" Autorka opisała pochodzenie materiału badawczego i metody wykorzystywane w identyfikacji i charakterystyce badanych izolatów grzybowych. Szkoda, że przy opisie pochodzenia materiału badawczego nie została zawarta informacja kiedy, tj. w jakim okresie, czy w jakich latach materiał był pobierany. Uzupełnieniem byłaby też informacja o wieku pacjentów zarówno z grupy kontrolnej, jak i pacjentów ze zdiagnozowanym rakiem jelita.

W dalszej części rozdziału Autorka szczegółowo przedstawiła metody prowadzenia hodowli grzybów uwzględniając rodzaj stosowanych podłoży i warunki hodowli. W sposób nie budzący wątpliwości opisała metody identyfikacji otrzymanych izolatów, uwzględniając zarówno cechy grzybów, które były brane pod uwagę przy oznaczaniu, jak i klucze wykorzystane do określania przynależności systematycznej. Wartym podkreślenia jest użycie do identyfikacji izolatów grzybowych spektometrii mas MALDI-TOF - metody, która coraz powszechniej jest stosowana do szybkiej i precyzyjnej identyfikacji drobnoustrojów. W rozdziale „Materiał i metody" Autorka opisała także metody oceny lekooporności grzybów z uwzględnieniem zarówno spektrum testowanych leków przeciwgrzybiczych, jak i wielkości stref zahamowania wzrostu, które pozwalają na oszacowanie stopnie wrażliwości na dany lek. Wydaje się jednak, że odwrotnie zamieszczono znak nierówności w podanych w tab. 1. zakresach wielkości stref zahamowania wzrostu dla szczepów opornych, bowiem przy szczepach opornych strefa zahamowania wzrostu jest mała lub nawet jest jej brak. Przy opisie oceny aktywności enzymatycznej zostały wymienione testowane enzymy i hydrolizowany substrat, a także została uwzględniona skala pozwalająca na określenie aktywności enzymów. Autorka dokładnie opisała także metodę bazującą na *Candida albicans,* którą wykorzystała do oceny tempa wzrostu grzybów izolowanych z różnych lokalizacji obydwóch grup pacjentów. Nie do końca jednak jest dla mnie czytelny opis schematu wykonywania odczytu (str. 25): "…w pierwszej godzinie inkubacji, pomiary wykonywano co 15 minut, a w 2, 4, 8, 12, 24, 48 i 72 godzinie co 30 minut". Z opisu wynika, że w pierwszej godzinie wykonywano odczyty co 15 minut, a wiec były to 4 odczyty w ciągu godziny, a kolejne odczyty były w kolejnych godzinach. Natomiast nie jest dla mnie do końca jasna informacja o odczytach co 30 minut

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD EKOLOGII DROBNOUSTROJÓW I AKAROENTOMOLOGII
ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 62 20
zeda@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

podana przy kolejnych godzinach. Równocześnie, biorąc pod uwagę wyniki zamieszczone w tabeli 8. i 14., wydaje się, że w pierwszych trzech godzinach odczyty były wykonywane co 30 minut, a następnie w godzinie 4, 6, 12, 24, 48 i 72.

Wyniki przeprowadzonych badań zostały opisane na 43 stronach i stanowią znaczną część pracy doktorskiej. Autorka w sposób staranny opisała zróżnicowanie jakościowe i ilościowe występowania grzybów wyizolowanych z jamy ustnej, odbytu i jelita grubego od pacjentów z grupy kontrolnej (osób zdrowych) i osób z rakiem jelita grubego, a także aktywność enzymatyczną izolatów, ich lekooporność i tempo wzrostu szczepów *C. albicans* wyizolowanych z różnych lokalizacji obydwóch grup badanych pacjentów. Wyniki uzyskane dla grupy kontrolnej zamieszczono w rozdziale V.1, natomiast dla grupy pacjentów z rakiem w kolejnym rozdziale (oznaczonym jako V.2). Taki układ nieco utrudnia śledzenie potencjalnych różnic między badanymi grupami, bowiem porównanie wyników uzyskanych dla obydwóch grup wymaga prześledzenia danych zamieszczonych na różnych stronach maszynopisu.

Na niektóre otrzymane wyniki warto zwrócić szczególną uwagę. W grupie kontrolnej Autorka stwierdziła obecność grzybów u 54,5%, natomiast u chorych w 78,5%. Szkoda, że nie zostało potwierdzone czy zaobserwowane różnice są istotne statystycznie. Interesujące jest, że od pacjentów grzyby izolowano albo z jednej, albo z dwóch, albo nawet trzech analizowanych lokalizacji, przy czym jednoczesna izolacja zarówno z jamy ustnej, jak i odbytu i jelita grubego była częściej notowana u osób z rakiem jelita grubego. Warto podkreślić, że wśród zidentyfikowanych grzybów były nie tylko gatunki, które są często izolowane od ludzi, ale też gatunki rzadko notowane w mykologii medycznej. Cenne są szczegółowe tabelaryczne zestawienia zidentyfikowanych gatunków, które przedstawiają ile izolatów i z jakich lokalizacji zostało uzyskanych (tab. 3. i 9.). Nieco mylące może być podanie wartości „Razem" w tab. 9., które odnosi się do danych zamieszczonych na kolejnych stronach tej samej tabeli, tj. „Razem" obejmujące wiersze 1-24, a następnie osobno wiersze 25-51, przy braku podania łącznej wartości dla liczby izolatów, a więc obejmujących wiersze 1-51 (całkowita liczba uzyskanych izolatów podana jest w tekście). Wartościowe jest również zbiorcze zestawienie zamieszczone w tabelach 4. i 10., które w sposób czytelny ukazuje jakie gatunki były izolowane z poszczególnych lokalizacji. Wyniki dotyczące wyizolowanych gatunków warto byłoby,

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD EKOLOGII DROBNOUSTROJÓW I AKAROENTOMOLOGII
ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 62 20
zeda@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

moim zdaniem, uzupełnić o porównanie przydatności wykorzystanych przy identyfikacji metod klasycznych (identyfikacja w oparciu o cechy makroskopowe, mikroskopowe i biochemiczne) z zastosowaną spektrometrią mas MALDI-TOF.

Wartościową częścią pracy jest ocena aktywności enzymatycznej wyizolowanych grzybów, przy czym zwraca uwagę fakt, iż grzyby izolowane od pacjentów z rakiem jelita grubego z reguły cechowały się wyższą aktywnością enzymatyczną niż grzyby pozyskane od pacjentów zdrowych. Równocześnie, biorąc pod uwagę zróżnicowaną liczbę testowanych izolatów poszczególnych gatunków grzybów z różnych lokalizacji, zastanawia mnie, czy podana wartość aktywności enzymów (od 1 do 5) dotyczyła izolatu cechującego się najwyższą aktywnością enzymatyczną, czy średnią, czy wybranego izolatu, czy też może wszystkie izolaty z danej lokalizacji cechowały się jednakową aktywnością.

Interesujące są dane dotyczące zróżnicowanej wrażliwości izolatów na leki przeciwgrzybicze. Cenne jest wykazanie, że wśród testowanego szerokiego spektrum leków przeciwgrzybiczych amfoteracyna B jest antymykotykiem, na którego działanie nie odnotowano oporności zarówno wśród szczepów izolowanych od pacjentów zdrowych, jak i izolatów otrzymanych od pacjentów z rozpoznanym rakiem jelita grubego. Ważne jest też wykazanie, że wysoki odsetek izolatow jest opornych na nystatynę. Nie bardzo jednak rozumiem jak została określona „średnia wrażliwość" na flucytozynę 5 mg oszacowana na 40-50% (str. 34). Nie jest też dla mnie do końca jasne jak, biorąc pod uwagę liczbę otrzymanych izolatów poszczególnych gatunków grzybów z określonych lokalizacji, obliczono odsetek szczepów opornych, słabo wrażliwych, wrażliwych, czy wtórnie opornych (np. tab. 7. dane dotyczące zróżnicowanej wrażliwości *Rhodotorula minuta* izolowanego z jamy ustnej przy uwzględnieniu wcześniejszych danych zamieszczonych w tab. 4., informujących o uzyskaniu tylko jednego izolatu z tej lokalizacji). Mam również pewne wątpliwości porównując niektóre wartości podane w tekście z danymi z tabeli, np. w tekście (str. 34) przy opisaniu najniższej wrażliwości *C. glabrata* na flucytozynę 5 mg podano w nawiasie zakres od 15 do 18%, natomiast w tabeli 7 nie widzę wartości 15% dla wrażliwych szczepów *C. glabrata*. Doszło też chyba do omyłkowego, kilkukrotnego podania wartości 33% w tab. 13. (dla odsetka szczepów

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD EKOLOGII DROBNOUSTROJÓW I AKAROENTOMOLOGII
ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 62 20
zeda@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

słabo wrażliwych na flucytozynę). W tabeli 7. nie widzę natomiast danych dotyczących wyników uzyskanych dla ketokonazolu, amfoterycyny B i nystatyny.

Interesującą częścią wyników jest analiza tempa wzrostu przeprowadzona w oparciu o izolaty *C. albicans* pochodzące z jamy ustnej, odbytu i jelita grubego pacjentów obydwóch badanych grup pacjentów. Wyniki tych analiz nie tylko opisano w tekście, ale też szczegółowo przedstawiono na rycinach (ryc. 1. i 2.) oraz w tabelach (tab. 8. i 14.; domyślam się, że legenda zamieszczona pod tabelą 8. dotycząca wyjaśnień znaczenia podawanych cyfr odnosi się też do tabeli 14.). Wykazano zróżnicowanie między poszczególnymi szczepami nawet izolowanymi z tej samej lokalizacji, a także wskazano na różnice między izolatami pochodzącymi od osób zdrowych i chorych.

Generalnie uważam, że uzyskane przez Autorkę wyniki są bardzo ciekawe, istotne zarówno z poznawczego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia, pewien mój niedosyt budzi brak szczegółowej analizy statystycznej.

Wartościową częścią pracy jest **dyskusja**, w której Autorka w sposób dojrzały omówiła uzyskane wyniki. Doktorantka dobrze orientuje się w literaturze zarówno polsko- jak i anglojęzycznej dotyczącej tematyki prowadzonych badań. Wskazała na grzyby nie tylko jako komponent fizjologicznej mikrobioty człowieka, ale też na rolę, jaką może odegrać ta grupa mikroorganizmów w przebiegu chorób nowotworowych. W tej części rozprawy szczególną uwagę zwróciła na podkreślenie i wyjaśnienie zaobserwowanych podobieństw i różnic w mykobiocie między pacjentami zdrowymi a pacjentami z chorobami nowotworowymi. W oparciu o dostępną literaturę przedstawiła znaczenie i potencjalną rolę chorobotwórczą wykrytych gatunków grzybów, zarówno tych, które z przewodu pokarmowego izolowane są dość często, jak i tych rzadko izolowanych, a wykrytych w recenzowanej rozprawie. Dobrze napisana jest też część dyskusji odnosząca się do znaczenia aktywności enzymów w patogeniczności, lekooporności i szacowania tempa wzrostu badanych izolatów *C. albicans* szczególnie w kontekście porównania szczepów pochodzących od osób zdrowych i pacjentów z rozpoznanym rekiem jelita grubego. Cenne jest zwrócenie uwagi na fakt, że obecność i cechy grzybów u pacjentów z nowotworami mogą być następstwem rozwoju choroby, ale też nie należy wykluczyć, że grzyby rozwijające się wcześniej mogą być czynnikiem karcinogennym.

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD EKOLOGII DROBNOUSTROJÓW I AKAROENTOMOLOGII
ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 62 20
zeda@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

Interesującym jest też zwrócenie uwagi na możliwe interakcje zachodzące miedzy mikroorganizmami z różnych grup systematycznych.

W rozdziale „**Wnioski**" Autorka w sposób zwięzły w 9 punktach przedstawiła najważniejsze osiągniecia wynikające z pracy. Do istotniejszych, moim zdaniem, osiągnięć należy:

- wykazanie w badanym materiale obecności różnych taksonów grzybów, w tym gatunków stosunkowo rzadko notowanych w przewodzie pokarmowym,
- zwrócenie uwagi na podobieństwa i różnice w mykobiocie izolowanej od osób zdrowych i pacjentów z rozpoznanym nowotworem jelita grubego,
- wykazanie zróżnicowanej aktywności enzymatycznej, obfitości i szybkości wzrostu między izolatami grzybów uzyskanymi od osób zdrowych, a izolatami pozyskanymi od osób z rozpoznanym nowotworem jelita grubego,
- stwierdzenie wysokiej i bardzo wysokiej lekooporności oporności wśród grzybów izolowanych z przewodu pokarmowego.

Zacytowane piśmiennictwo zostało trafnie dobrane, obejmuje 129 pozycji (w spisie praca autorstwa Troska i wsp. 2017 została podana dwukrotnie). Warto podkreślić wysoki udział cytowanych prac anglojęzycznych z ostatnich lat opublikowanych w renomowanych czasopismach.

W mojej ocenie praca nie zawiera istotnych błędów rzeczowych. Poza pewnymi uwagami, o których pisałam wcześniej, zauważyłam drobne nieścisłości i błędy edytorskie, które podaję poniżej.

Należy pisać kursywą wszystkie nazwy gatunkowe i rodzajowe (zarówno w tekście, jak i w tabelach oraz w tytułach cytowanych publikacji). Warto jednocześnie zwrócić uwagę, że nazwy rodzajowe powinno się pisać kursywą także wtedy, gdy występują samodzielnie, tj. bez nazwy gatunkowej.

Do drobnych błędów interpunkcyjnych nalżą m.in. zbędne/nadmierne przecinki, spacje, kropki (te jednak uchybienia są nieliczne). Warto ujednolicić wykorzystanie znaków interpunkcyjnych, np. w spisie literatury (przy cytowaniu rozdziałów książek konsekwentne używanie „W:" lub „(W:)", „[W]", czy [W:]").. Przy cytowaniu literatury warto zachować jednolity styl, np. konsekwentnie podawać jedynie skróty tytułów czasopism (pełne tytuły są

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD EKOLOGII DROBNOUSTROJÓW I AKAROENTOMOLOGII
ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 62 20
zeda@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

np. przy pracy Douglas 2003, Dynowska i in. 2005), czy podawać nazwiska wszystkich autorów (nazwisko tylko trzech pierwszych autorów podane jest przy pracy Bizerra i in. 2008). Warto tez uzupełnić nazwę wydawnictwa przy pracy Larone 2002. Do innych nieznacznych błędów należy zwrócenie uwagi na konsekwentne wykorzystanie spójnika „i" przy podawaniu trzech nazwisk autorów cytowanych publikacji (str. 71, 13 linia od dołu, str. 72 14 linia od dołu), konsekwentne pisanie kapitalikami nazwisk autorów cytowanych prac (str. 78, 8 linia od góry). W spisie nazw gatunków ze skrótami należy konsekwentnie przy każdym gatunku podać rok (brak przy *Candida glabrata*). Warto też zwrócić uwagę na unikanie skotów myślowych i języka potocznego (np. str. 73 „Jest również podawany ze skóry owłosionej człowieka…", str. 80 „Patrząc na wyniki..", str. 81 „Analiza …. nie przyniosła zbyt obiecujących wyników"). Należałoby również ujednolicić skróty czy nazwy dotyczące antybiotyków. Można się domyślać, że wszystkie określenia, tj. 5FV (str. 22 i dalsze), 5-flucytozyna (str. 34), 5-fluorocytozyna (str. 81), 5 FC (str. 81) dotyczą flucytozyny 5 mg, a Fl10 (str. 22 i dalsze), FL 10 mg (str. 55), Fl 10 (str. 37, 59) dotyczą flukonazolu 10 mg. Należy też zwrócić uwagę przy podawaniu jednostek dotyczących dawek badanych antybiotyków (np. str. 81- flukonazol 10 mg, czy 10 µg; flukonazol 25 mg, czy 25 µg).

Podsumowując chciałabym podkreślić, że wymienione powyżej uwagi mają charakter drugoplanowy i nie wpływają na zasadniczą część pracy. Rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Kulas wpisuje się w kierunek badań prowadzonych w Katedrze Mikrobiologii i Mykologii Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie i dostarcza nowych danych o różnorodności mikrogrzybów zasiedlających przewód pokarmowy osób zdrowych oraz pacjentów z rakiem jelita grubego.

Wniosek końcowy. Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Kulas pt. „**Cechy determinujące patogeniczność mikrogrzybów zasiedlających przewód pokarmowy osób zdrowych oraz pacjentów z rakiem jelita grubego**" spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w związku z tym wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr Patrycji Kulas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.