

Prof. dr hab. med. Waleria Hryniewicz

## **Recenzja rozprawy doktorskiej mgr farmacji Marcina Ciszewskiego**

### **pt „ Czynniki chorobotwórczości *Streptococcus dysgalactiae* – paciorkowców ropotwórczych izolowanych od ludzi i zwierząt”**

Przez dziesiątki lat uważano, że istnieje bariera między „światem” patogenów zwierzęcych i odrębnym od niego „światem” patogenów ludzkich. Pojedyncze przypadki zakażeń u człowieka typowymi drobnoustrojami zwierzęcymi kwitowano zazwyczaj stwierdzeniem, że to pojedynczy przypadek ze względu na bliskość kontaktu ze zwierzętami. Faktycznie od tej bliskości zaczynało się ale coraz częściej nie kończyło się na pojedynczych przypadkach zachorowań u ludzi ale przekazywaniem zakażenia kolejnym podatnym osobnikom i szerzeniem się wśród nowej podatnej populacji „typowego” drobnoustroju zwierzęcego. Przykładów jest wiele zwłaszcza jeśli chodzi o wirusy a epidemie przez nie wywoływane nie należą do rzadkości (np. SARS, MERS, wirusy grypy ptasiej, świńskiej). Znakomitym przykładem przekroczenia barier gatunkowych jest ludzki wirus niedoboru odporności (HIV). Ostatnie lata wskazują, że coraz więcej takich przykładów znajdujemy także wśród bakterii i to dość często należących do ziarenkowców jak np. *Streptococcus suis* czy LA-MRSA. Lista patogenów zoonotycznych jest coraz dłuższa. Stanowią one poważne zagrożenie dla życia i zdrowia człowieka. Rozwój metod biologii molekularnej umożliwia poznanie strategii pozwalających drobnoustrojom przekraczać bariery gatunkowe. Związane jest to przede wszystkim z pozyskiwaniem nowego materiału genetycznego umożliwiającego nabywanie nowych cech m.in. pozwalających na zasiedlanie nowych niszy. Jest to jeden z najbardziej fascynujących tematów współczesnej mikrobiologii.

W związku z powyższym wybór tematu pracy wpisuje się w aktualną, ważną tematykę badawczą.

Rozprawa doktorska mgr Marcina Ciszewskiego zawiera się na 152 stronach i ma charakter typowy. Wstęp zajmuje 20 s. i podzielony jest na dwa podrozdziały, co sprzyja przejrzystości przedstawionych informacji i ułatwia czytanie. Rozpoczyna go niezwykle ciekawie opisany

podrozdział na temat mechanizmów przełamania bariery międzygatunkowej zwierzę-człowiek. Przedstawiony schemat na podstawie publikacji Wolfe'go z 2007 r i jego omówienie, pokazuje pięć etapów przemian ewolucyjnych, które muszą być spełnione aby drobnoustrój przeszedł drogę ewolucyjną od patogenu zwierzęcego do ludzkiego. Doktorant ilustruje ten proces wieloma przykładami i to zarówno dotyczącymi wirusów jak i bakterii. Daje także przykłady zoonoz odnotowywane w krajach UE. Odnosi się także do przedstawicieli rodzaju *Staphylococcus* obejmującego gatunki będące czynnikami etiologicznymi zakażeń u zwierząt, które coraz częściej izolujemy od ludzi będących właścicielami zwierząt. Doktorant skupia się na cechach drobnoustrojów natomiast nie odnosi się do cech ze strony człowieka, ich nowego gospodarza. Czy one są bez znaczenia w pokonywaniu barier gatunkowych? Szereg wspomnianych patogenów, przynajmniej na chwilę obecną, wywołuje zakażenia jedynie u osób z obniżoną odpornością. Z pewnością na tej ścieżce ewolucyjnej odgrywa rolę gospodarz.

Drugi podrozdział skupia się na opisie rodzaju *Streptococcus* poprzez opis ich podziału, przedstawienie ich filogenetycznej drabiny, do opisu cech umożliwiających im wywoływanie zakażeń. Na przykładzie gatunków zawartych w tym rodzaju Doktorant ciekawie opisuje „wspinanie” się ich po drabinie przemian ewolucyjnych. W ostatniej części Wstępu znajduje się opis czynników wirulencji *S. pyogenes*, patogenu wyłącznie „ludzkiego”. Mam w tym miejscu parę uwag. Nie są mi znane zakażenia pochwy wywoływane przez ten drobnoustrój. Nie rozumiem też stwierdzenia, że ...”patogen rozprzestrzenił się z pierwotnego miejsca zakażenia, najczęściej poprzez płyny ustrojowe” ..s.23). To wymaga doprecyzowania. Trudno się też zgodzić ze stwierdzeniem, że wymienione przez doktoranta zakażenia inwazyjne, kwalifikuje jako ...o lekkim i średnio-ciężkim przebiegu. Wszystkie one mogą być piorunujące w przebiegu.

Nie mogę zgodzić się ze stwierdzeniem Doktoranta, że streptolizyna O jest jednym z głównych czynników chorobotwórczości *S. pyogenes* a dzięki jej antygenowemu podobieństwu do tkanek ludzkiego organizmu odgrywa rolę w nieropnych powikłaniach zakażenia *S. pyogenes*. Nie wskazuje także na to przytoczona przez niego literatura. Jest ona ważna w diagnostyce zakażeń. Sądzę, że Doktorant miał na myśli białko M.

Ogólnie mogę stwierdzić, że Wstęp jest ciekawy i dobrze napisany. Najwięcej uwagi poświęca jednak *Streptococcus pyogenes*. Uważam, że za mało w nim informacji o *Streptococcus dysgalactiae*, głównym temacie Rozprawy.

W Założeniach i Celu Pracy, po krótkim wprowadzeniu, określono główne zadania Rozprawy. Postanowiono ocenić poprawność identyfikacji analizowanych szczepów zgodnie z zaleceniami Vandamma czy Vieiry'ego oraz porównać wyposażenie szczepów ludzkich ze zwierzęcymi pod kątem obecności genów warunkujących chorobotwórczość i ich ekspresję. Zaplanowano także odniesienie otrzymanych wyników do *S. pyogenes*.

Część Materiały i Metody jest bardzo bogata (ponad 25 stron), począwszy od opisu szczepów i źródeł ich izolacji z informacją o wieku, płci i stanie klinicznym poprzez szczegółowe informacje dotyczące podłoża, aparatury i metod. Istnieje duża dysproporcja w liczbie szczepów pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego ale podzielam opinię Doktoranta, że te ostatnie jest trudno pozyskać. Na uwagę zasługuje badanie bardzo szerokiego wachlarza cech biochemicznych, określanie lekowrażliwości, zdolności tworzenia biofilmu. Bardzo dokładnie opisano stosowane metody genetyczne dla celów badania ekspresji genów i typowania szczepów na podstawie różnic genetycznych białka M.

Następnie w tej części Rozprawy przedstawiono zastosowany program użyty przez Doktoranta do statystycznej analizy otrzymanych wyników.

Ostatni podrozdział tej części skupia się na badaniach *in silico* głównie obejmujących lokalizację genów w genomowym DNA *S. pyogenes* i *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* oraz porównaniem ich map genomowych.

Wyniki zawarte są na prawie 30 stronach. Są bogato ilustrowane rycinami, tabelami i zdjęciami.

Zawierają opis szeregu cech biochemicznych, serologicznych i biologicznych badanych szczepów. Pokazuje interakcje między badanymi szczepami a florą zasiedlającą skórę człowieka. Wyniki lekowrażliwości przedstawione dla 10 antybiotyków uzyskane metodą dyfuzji z krążka są kontrowersyjne. Wykazanie oporności *S. pyogenes* na penicylinę, cefotaksym, wankomycynę i linezolid byłoby takim pierwszym znaleziskiem na świecie. Na podstawie zastosowanej metody Doktorant nie był uprawniony do przedstawienia takiego

wyniku. Należało takie szczepy poddać wnikliwej analizie metodą rozcieńczeniową w bulionie a w przypadku potwierdzenia takiej oporności przesłać do Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów celem znalezienia mechanizmu za to odpowiedzialnego.

Imponujący jest zakres badania właściwości biologicznych pod kątem oceny cech wirulencji szczepów. Wykazano zdolność SDSE izolowanych zarówno od zwierząt jak i ludzi do tworzenia biofilmu. Wykazano różnice ekspresji poszczególnych cech wirulencji między szczepami pochodzenia ludzkiego i zwierzęcego. Trudno jednak, co podkreśla Doktorant, na uogólnianie wniosków dotyczących różnic biochemicznych istniejących między dwiema populacjami szczepów ze względu na małą liczebność izolatów od zwierząt. Ciekawy wynik uzyskano dla streptokinazy. Jej wytwarzanie jest charakterystyczne dla szczepów ludzkich i stanowi jedną z cech stosowanych w ustalaniu ich pochodzenia, co zostało potwierdzone w niniejszej Rozprawie. To znalezisko znalazło wytłumaczenie w badaniach genetycznych, w których stwierdzono brak ekspresji genu kodującego streptokinazę, obecnego w genomach szczepów wyizolowanych od zwierząt. Wyniki określające zdolności wytwarzania hemolizy przeprowadzono na krwinkach baranich. Wydaje mi się, że byłoby ciekawe porównanie zdolności hemolizy krwinek końskich, które często stosuje się w badaniach nad *S. pyogenes*.

Dużą wartość rozprawy stanowią badania genetyczne, zakrojone na szeroką skalę. Wykazały one nie tylko bogactwo genów wirulencji u dobrze już przebadanego gatunku *S. pyogenes* ale także SDSE. Zastosowanie techniki PCR a także Real-time PCR pozwoliły nie tylko na stwierdzenie obecności najważniejszych genów wirulencji Rodzaju *Streptococcus* ale także ich ekspresję u badanych w Rozprawie szczepów. Ważnym wynikiem jest znalezienie szerokiej puli genów wirulencji u szczepów SDSE izolowanych od ludzi. Pracę wzbogaciły wyniki molekularnego typowania szczepów SDSE od ludzi w oparciu o białko M. Populacja ta była dość heterogenna i składała się aż z 13 typów białka M, które jest najważniejszym czynnikiem wirulencji *S. pyogenes*. Ciekawym byłoby porównanie z M typami u szczepów *S. pyogenes*.

Bardzo wartościowymi wynikami są kladogram przedstawiający przybliżone podobieństwo między szczepami SDSE w oparciu o sekwencje genu białka M i opracowane drzewo

filogenetyczne pokazujące podobieństwo między szczepami SDSE w oparciu o sekwencje genu *emm*.

Dyskusja zawarta jest na ponad 20 stronach. Doktorant omawia własne wyniki na tle literatury światowej, odnosząc się do istniejących klasyfikacji i definicji gatunku jako takiego włączając się w międzynarodową dyskusję na ten temat. Proponuje on wprowadzenie patotypów uwzględniających cechy fenotypowe i genotypowe i połączone ze źródłem izolacji i typem zakażenia. Omawia także znaczenie poszczególnych cech *S. dysgalactiae* w odniesieniu do potencjału chorobotwórczego porównując je z *S. pyogenes*.

Przedstawione z Rozprawy wnioski są zawarte w 10 punktach. Według mojej oceny są zbyt opisowe i zawierają także wyniki. Wniosek 8, jak już wspomniałam powyżej, nie jest uprawniony bowiem zastosowane metody nie upoważniają do jego sformułowania.

Rozprawę kończą streszczenia w języku polskim i angielskim i bardzo bogate piśmiennictwo (271) pozycji. Uważam, że należało cytować bardziej aktualne Rekomendacje Krajowego Ośrodka Referencyjnego ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów.

Na zakończenie przedstawiono spis tabel i rycin, po których następuje Aneks z licznymi tabelami. Szkoda, że brak w części z nich legendy co ułatwiałoby ich czytanie.

W podsumowaniu pragnę stwierdzić, że Rozprawa porusza szereg istotnych, oryginalnych zagadnień dotyczących biologii ważnych gatunków Rodzaju *Streptococcus*, reprezentujących typowy patogen człowieka i patogen (y) zwierzęcy na ścieżce ewolucyjnej w kierunku przełamania bariery gatunkowych. Bogactwo zastosowanych metod laboratoryjnych klasycznych i molekularnych a także ich analiza pozwoliło na szeroką ocenę badanych przedstawicieli 2-ch gatunków *S. dysgalactiae* i *S. pyogenes* i wskazuje na znaczącą biegłość Doktoranta w posługiwaniu się nimi celem realizacji postawionych w Rozprawie zadań. A więc cele zostały zrealizowane bardzo szeroko. Pomimo pewnych wyrażonych powyżej uwag, Rozprawę oceniam pozytywnie.

Rozprawa doktorska mgr farm. Marcina Ciszewskiego pt. „Czynniki chorobotwórczości *Streptococcus dysgalactiae* – paciorkowców ropotwórczych izolowanych od ludzi i zwierząt” spełnia ustawowe wymagania stawiane tego typu rozprawom.

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego  
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie mgr farm. Marcina Ciszewskiego do  
dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 13.03.17

Colby waw