

## **Ocena rozprawy doktorskiej**

**mgr Patrycji Kulas**

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

*Features determining of the pathogenicity of gastrointestinal microfungi in healthy persons  
and patients with colorectal cancer*

Grzyby to organizmy cudzożywne, które bytują w różnych środowiskach: wodzie, glebie, czy też powietrzu i są zdolne do istnienia w powiązaniu z innymi organizmami eukariotycznymi, roślinami, zwierzętami, a szczególnie człowiekiem. Mogą one oddziaływać na nie w sposób bezpośredni poprzez: drapieżnictwo, pasożytnictwo i symbiozę lub pośredni: neutralizm, komensalizm, protokooperację, konkurencję i amensalizm. W medycynie, w układach człowiek-grzyb lub człowiek-środowisko-grzyb, w odniesieniu do poszczególnych interakcji pomiędzy gospodarzem, a grzybem, spotykać można dodatnie zależności: symbiozę i komensalizm, ale również negatywne układy, jakimi są konkurencja i pasożytnictwo. W przypadku symbiozy organizm człowieka potrzebuje grzybów do prawidłowego funkcjonowania poszczególnych układów np. pokarmowego czy skóry. Grzyby drożdżopodobne, przede wszystkim grzyby z rodzaju *Candida*, są integralną częścią światła jelita oraz są trwale związane z jego śluzówką tworząc specyficzne nisze ekologiczne. W odniesieniu do komensalizmu bytując na skórze człowieka grzyby drożdżopodobne chronią przed nadmiernym namnażaniem się bakterii, ale także poprzez umiejętność wykorzystywania kwasu mlekowego, jako źródła węgla, grzyby z gatunku *Geotrichum candidum* czy rodzaju *Candida* odkwaszają środowisko tworząc dogodne warunki do rozwoju bakterii gnilnych potrzebnych do rozkładu składników mleka w przewodzie pokarmowym. W sytuacji pasożytnictwa wszystkie grzyby (zarówno drożdżopodobne, jak i pleśniowe) stają się

„szkodliwe” dla organizmu człowieka, a rozwój choroby o etiologii grzybiczej sprzyja tworzeniu warunków korzystnych dla ich bytowania i namnażania się. W innym układzie negatywnym, jakim jest konkurencja, drobnoustroje (bakterie i grzyby) walczą o zasoby potrzebne do swojego rozwoju, a organizm człowieka poprzez zaburzenie homeostazy staje się ontocenozą do rozwoju infekcji o etiologii bakteryjnej lub grzybiczej, lub obydwu równocześnie. Ta sytuacja staje się niezwykle niebezpieczna dla pacjentów z grup ryzyka, którymi są np. chorzy onkologicznie. Szansa wygrania walki konkurencyjnej wśród drobnoustrojów będzie uzależniona od: szybkości ich wzrostu i namnażania się, wytrzymałości na czynniki środowiskowe, wydajności energetycznej podczas metabolizowania składników pokarmowych, wymagań w stosunku do substancji wzrostowych, zdolności do gromadzenia substancji zapasowych i wykorzystywania ich gdy środowisko ubożeje, zdolności ruchu lub rozrastania się w postaci strzępek, czy zdolności do ekspansji w środowisku. Dlatego też przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, której celem była ocena zróżnicowania ekofizjologicznego grzybów kolonizujących różne ontocenozy osób zdrowych oraz pacjentów z rakiem jelita grubego, z uwypukleniem gatunków często notowanych w mykologii medycznej oraz gatunków rzadko opisywanych, ale wyraźnie tendencyjnych do ekologicznej ekspansywności w stosunku do ontosfery człowieka wpisuje się w obszar badań naukowych związanych z naukami o zdrowiu oraz naukami biologicznymi.

Rozprawa doktorska mgr Patrycji Kulas stanowi wnikliwe opracowanie naukowe przygotowane w oparciu o metodę eksperymentalną i zawiera typowe części dysertacji tj: wstęp stanowiący rozważania teoretyczne, uzasadnienie wyboru tematu, cel badań, materiał i metody, wyniki (podzielone na dwa obszernie podrozdziały), dyskusję, wnioski, piśmiennictwo oraz spis tabel i rycin. Pracę poprzedza streszczenie przygotowane zarówno w języku polskim jak i angielskim oraz spis nazw gatunków grzybów wraz ze skrótami.

Rozprawa liczy 97 stron maszynopisu, wraz z piśmiennictwem obejmującym 128 pozycji (niestety nie ponumerowanych) oraz 14 tabel i 2 ryciny. Poprzedzający rozprawę wstęp zwięźle wprowadza w tematykę pracy. Rozważania teoretyczne, obejmują 9 stron tekstu i stanowią dobre opracowanie tematyki grzybów jako czynnika etiologicznego, definicji i mechanizmów patogenności, stanu makroorganizmu a właściwości grzybów oraz czynników predysponujących do zakażeń grzybiczych wskazując na merytoryczne przygotowanie Doktorantki do przeprowadzenia doświadczenia badawczego i interpretacji wyników uzyskanych na jego podstawie. W rozdziale uzasadnienie wyboru tematu Doktorantka wskazuje przyczyny podjęcia niniejszych badań oraz wymienia ich uwarunkowania.

W rozdziale Cel badań Doktorantka wskazuje cel głównym, którym była ocena zróżnicowania grzybów kolonizujących różne ontocenozy osób zdrowych oraz pacjentów z rakiem jelita grubego. Autorka w celu badania zwraca uwagę, że ocena ta będzie dotyczyć gatunków często wykrywanych ale także tych rzadko opisywanych ale o wyraźnych tendencjach do ekologicznej ekspansywności w stosunku do ontosfery człowieka. W dalszej części pracy Doktorantka wskazuje zadania badawcze (etapy prowadzenia badania) tj. prowadzenie oceny mykologicznej uzyskanych biomateriałów w tym identyfikacja wykonana za pomocą metody spektrometrii masowej MALDI TOF, określenie aktywność enzymatycznej wyhodowanych grzybów za pomocą testów API ZYM, określenie lekowrażliwości wyizolowanych grzybów metodą dyfuzyjno-krażkową, określenie tempa wzrostu grzybów z gatunku *Candida albicans*.

W dalszej części pracy Doktorantka opisuje szczegółową metodykę prowadzenia badania z wykazaniem wszystkich zasad pracy z materiałem uzyskanym od pacjentów z rakiem jelita grubego (51 chorych) oraz z grupy kontrolnej (30 osób). Materiał kliniczny pobierano z jamy ustnej, jelita grubego oraz odbytu. Do badań wykorzystano wymazy, wycinki śródoperacyjne oraz jak to określa Doktorantka endoskopię, co może w domyśle stanowić wycinek śluzówki przeznaczony do analizy histopatologicznej prowadzonej w trakcie endoskopii (co wymaga doprecyzowania przez Doktorantkę).

Wszystkie wskazane zadania badawcze zostały w części materiał i metody starannie opisane z przedstawieniem dokładnej metodyki ich prowadzenia z podaniem dokładnego przebieg każdego z etapów badania oraz omawiając szczegółowe warunki ich wykonania. Wszystkie szczeble badań zostały bardzo dobrze opracowane tak merytorycznie jak i technicznie, co stanowi o jego oryginalności. Niemniej jednak w tej części pracy brakuje jednego wprowadzającego podrozdziału, w którym schematycznie Doktorantka przedstawiła by plan swojego badania z przejrzystym podaniem liczby osób zakwalifikowanych do badania, którzy wzięli udział w badaniu, liczby szczepów grzybów poddanych analizie ect., co bezwzględnie przyczyniło by się do większej transparentności podanej przez nią metodyki badań. Brakuje w ocenie recenzenta także informacji w jakim czasie badania prowadzono, zarówno z jakiego okresu pochodziły uzyskane próbki do badania a także kiedy prowadzono właściwą analizę laboratoryjną. Ponadto brak informacji jakie Autorka miała założenia badawcze tj. problemy/pytania badawcze (np. *Jakie gatunki grzybów najczęściej izolowano z ontocenozy osób ze zdiagnozowanym rakiem jelita grubego oraz w grupie kontrolnej?*, czy *W jakim stopniu choroba nowotworowa determinuje skład mykrobioty jelita grubego w porównaniu z osobami bez diagnozy nowotworu?*), jakie zmienne (zależne, niezależne) były przedmiotem badania czy

przynajmniej wskazanie hipotez badawczych, które zostały założone przez Doktorantkę przed rozpoczęciem badania.

Wyniki badań zostały przedstawione opisowo na 42 stronach maszynopisu, uzupełnione 12 tabelami oraz 2 rycinami. Opis wyników został podzielony na 2 podrozdziały tj: charakterystykę taksonomiczną i fizjologiczną grzybów wyizolowanych od osób zdrowych – grupa kontrolna oraz charakterystykę taksonomiczną i fizjologiczną grzybów wyizolowanych od osób z rakiem jelita grubego. Każdy z tych podrozdziałów został podzielony według podobnego układu (zgodnie z zadaniami badawczymi przedstawionymi w rozdziale cel pracy) i dotyczył informacji na temat zróżnicowania jakościowego i ilościowego, oceny aktywności enzymatycznej grzybów wyizolowanych z przewodu pokarmowego osób badanych (odpowiednio zdrowych i z rakiem jelita grubego), oceny lekowrażliwości grzybów wyizolowanych z przewodu pokarmowego osób (odpowiednio z grupy kontrolnej i z rakiem jelita grubego) oraz tempa wzrostu. Wyniki zostały przedstawione zgodnie z zaplanowanymi etapami, przy zachowaniu rutynowych metod diagnostyki mikrobiologicznej. Autorka w tej części pracy zwięźle i w sposób rzetelny przedstawiła zmiany i powiązania w zakresie badanych czynników i parametrów. Na podkreślenie zasługuje bardzo dokładny opis wyników uzyskanych zwłaszcza w obszarze hodowli grzybów ich obfitości wzrostu, lekowrażliwości, czasie inkubacji czy struktury morfologicznej wyhodowanych gatunków grzybów z rodzajów: *Candida*, *Saccharomyces*, *Rhodotorula* i *Trichosporon*. Nie budzi także wątpliwość interpretacja uzyskanych wyników chociaż czuje się niedosyt braku analizy statystycznej przynajmniej części uzyskanych wyników. Brakuje także przynajmniej, kilku zestawień, gdzie w jednej tabeli zawarto by porównanie wyników pomiędzy badanymi grupami, np. w liczbie izolatów wyodrębnionych gatunkach grzybów w poszczególnych ontocenozach pacjentów z grupy kontrolnej i grupy badanej. Dało by to jednoznaczny obraz uzyskanych wyników. Co prawda wszystkie te dane można odnaleźć w pracy ale umieszczenie ich w tabeli zbiorczej było by dobrą częścią tej dysertacji i dało by lepszy obraz umiejętności Doktorantki porównywania wyników pomiędzy grupami badaną i kontrolną.

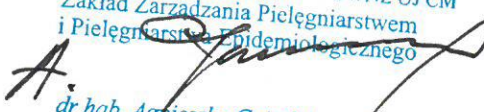
Dyskusja jako kolejny rozdział pracy stanowi ciekawe opracowanie w którym Autorka z dużą znajomością zagadnienia porównuje wyniki badań własnych z danymi z piśmiennictwa, co prawda część z piśmiennictwa to publikacje mające więcej niż 10 lat. W dyskusji Doktorantka krytycznie odnosi się do wyników badań własnych, podkreślając że wyniki niniejszej pracy ściśle korespondują z wynikami innych autorów w kwestii właściwości biologicznych grzybów, natomiast nie potwierdzają sugestii, że warunki panujące w różnych odcinkach przewodu pokarmowego wpływają na zróżnicowanie taksonomiczne grzybów.

Wnioski końcowe to 9 jasno określonych stwierdzeń, które dotyczą faktu jakościowego i ilościowego zróżnicowania taksonomicznego grzybów zasiedlających przewód pokarmowy osób zdrowych i pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem i są porównywalne, co może świadczyć o powszechności występowania grzybów. Dominującymi grzybami wyizolowanymi od badanych osób były grzyby z rodzaju *Candida*, a wyizolowanie od pacjentów z rakiem jelita grubego grzybów należących do gatunków *C. catenulata*, *C. lipolytica* oraz *C. rugosa* wskazuje, że są to gatunki, które można uznać za niebezpieczne klinicznie, gdyż cechy którymi dysponują są typowe dla potencjalnej chorobotwórczości. Grzyby, które hodowano od pacjentów z rakiem jelita grubego charakteryzowały się znacznie obfitszym wzrostem (*in vitro*) niż u osób zdrowych, co także wiązało się z ich wyższą aktywnością enzymatyczną. Zróżnicowanie to zależało od pochodzenia szczepu i warunków panujących w ontocenozie. Wyższa aktywność enzymatyczna była związana ze wzrostem lekooporności szczególnie na leki z grupy azoli. Obserwowano także szybszy wzrost izolatów grzybów z gatunku *C. albicans* pochodzących od osób z chorobą nowotworową, co można rozpatrywać w kontekście tempa kolonizacji oraz tworzenia się biofilmy jako czasu rozwoju zakażenia. Ten ostatni wniosek w ocenie recenzenta ma dużą wartość praktyczną.

Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę jeszcze na stronę językową dysertacji, niejednokrotnie bowiem Autorka wplata w tekst wyrazy potoczne, skróty myślowe stosowane w naukach medycznych oraz używa wyrażen w pierwszej osobie liczby mnogiej np. zaliczamy, wyróżniamy *ect.*, co należy wyeliminować przygotowując to opracowanie do druku w czasopiśmie naukowym (co szczególnie polecam).

Dlatego też na podstawie przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Kulas po jej wnikliwym przeczytaniu, pomimo wskazania uwag i niedoskonałości stwierdzam, że spełnia ona wymagania stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biologia.

Wobec powyższych stwierdzeń zgłaszam wniosek do Rady Naukowej Dyscypliny nauki biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr Patrycji Kulas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Instytut Pielęgniarstwa i Położnictwa WNŻ UJ CM  
Zakład Zarządzania Pielęgniarstwem  
i Pielęgniarstwa Epidemiologicznego  
  
dr hab. Agnieszka Gniadek, prof. UJ  
kierownik