



**ZAKŁAD DIAGNOSTYKI MIKROBIOLOGICZNEJ
i IMMUNOLOGII INFEKCYJNEJ**

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. J. Waszyngtona 15A
15-269 BIAŁYSTOK
tel/fax +48857468571 POLSKA
zdmik@umb.edu.pl

Białystok, dn. 23.06.2017 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Urszuli Czyżewskiej pt.: „Biochemiczne i molekularne cechy grzybów *Malassezia pachydermatis* izolowanych od psów” wykonanej w Zakładzie Cytobiochemii Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku pod kierunkiem Pana dr hab. Adama Michała Tylickiego, przy współudziale promotora pomocniczego Pana dr Marka Bartoszewicza.

Grzyby stanowią bardzo liczną grupę mikroorganizmów szeroko rozpowszechnionych w różnorodnych niszach ekologicznych, wykazującą ogromną bioróżnorodność. Szacuje się, że na świecie występuje ok. 1,5 mln gatunków, z czego tylko nieznaczna z nich część została opisana. Wiedza na ich temat wymaga stałego uzupełniania. Występują jako saprofity w środowisku naturalnym, występują w najbliższym otoczeniu ludzi i zwierząt, jak również bezpośrednio na lub w naszych organizmach. Izolowane są z powierzchni skóry, błon śluzowych różnych układów, jako drobnoustroje komensalne. Mogą być odpowiedzialne za powstawanie zakażeń o różnej lokalizacji – powierzchniowe grzybice skóry, błon śluzowych oraz najpoważniejsze inwazyjne zakażenia układowe.

Z morfologicznego i klinicznego punktu widzenia grzyby dzielone są na strzępkowe (pleśniowe) i drożdżopodobne. Zakażenia przez nie wywoływane mają najczęściej charakter zakażeń oportunistycznych, są związane z zaburzeniami funkcji układu immunologicznego, a tylko nieliczne gatunki uznane są za bezwzględnie patogenne. Grzybice powierzchniowe mogą występować u osób z niedoborami odporności, jak i u osób immunokompetentnych, zaś narządowe o ciężkim przebiegu zagrażającym życiu pacjentów mogą występować u osób z niedoborami odporności. W ostatnich latach obserwuje się wzrost liczby tego typu zakażeń powodowanych przez grzyby u pacjentów

hospitalizowanych. Notowany wzrost rozpoznawanych grzybic związany jest z postępowaniem terapii chorób nowotworowych, ale również z postępowaniem w chirurgii, zwłaszcza w dziedzinie transplantacji narządów oraz szpiku.

Grzyby z rodzaju *Malassezia* już od dawna są uznawane za składnik mikroflory skóry u ludzi i zwierząt. Są to grzyby drożdżopodobne, a ich charakterystyczną cechą jest lipofilność. Występowanie objawów chorobowych korelowane jest z zaburzeniami metabolicznymi, hormonalnymi lub immunologicznymi gospodarza. Gatunek *M. pachydermatis* to przykład grzyba zoofilnego, a zwierzęta zwłaszcza psy i koty stanowią rezerwuuar dla człowieka. U ludzi może powodować łupież pstry, zapalenie mieszków włosowych.

Za cel pracy doktorskiej Pani mgr Urszula Czyżewska stawia sobie zweryfikowanie sformułowanej hipotezy, że występują cechy różniące szczepy *M. pachydermatis* pochodzące od zdrowych i chorych zwierząt, co wskazuje na istnienie komensalnych, jak i potencjalnie patogennych szczepów w obrębie gatunku, poprzez udzielenie odpowiedzi na pytanie czy istnieją różnice na poziomie biochemicznym i molekularnym pomiędzy izolatami pochodzącymi od zdrowych i chorych psów. Planuje zadania badawcze i w pierwszym etapie zamierza utworzyć kolekcję szczepów *M. pachydermatis* w dwóch porównywanych między sobą grupach. Następnie wykonanie badań w celu określenia podobieństwa oraz pokrewieństwa genetycznego szczepów, aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych i fosfolipaz zewnątrzkomórkowych, profili lipidowych oraz zawartości kwasów tłuszczowych, a także określenia profili białkowych. Co ważne, Doktorantka zwraca uwagę na możliwy aspekt praktycznego wykorzystania ewentualnie wykazanych cech różniących szczepy jako potencjalnych markerów patogenności pod kątem diagnostycznym.

Recenzowana rozprawa doktorska zawiera rozdziały typowe dla dysertacji poznawczych: „Wstęp”, „Cel pracy”, „Materiały i Metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Wnioski”, „Literatura”, „Spis tabel i rycin”, „Wykaz skrótów”, „Streszczenie” oraz „Summary”. Obejmuje łącznie 150 stron maszynopisu, zawiera 30 tabel, 30 rycin oraz 168 pozycji piśmiennictwa, w znacznej części pochodzącego z ostatnich kilku lat.

W obszernym „Wstępie” Autorka przedstawia klasyfikację grzybów z rodzaju *Malassezia*, szczegółową charakterystykę wybranych gatunków, z uwzględnieniem *M. pachydermatis* będącego przedmiotem zainteresowania i badań Doktorantki. Za szczególną cechę tych grzybów drożdżopodobnych należy uznać ich lipofilny charakter. Na tym tle *M. pachydermatis* wyróżnia się, ponieważ do wzrostu na sztucznych podłożach mikrobiologicznych nie wymaga zawartości lipidów. Należy zwrócić uwagę na swoistą strukturę wielowarstwowej ściany komórkowej, grubszej i zawierającej znacznie większy odsetek lipidów niż u innych grzybów drożdżopodobnych, co podwyższa odporność *Malassezia* na czynniki chemiczne i fizyczne. Struktura ściany komórkowej tych drobnoustrojów stanowi istotny czynnik wirulencji, ułatwiający im adhezję do komórek gospodarza, a zarazem utrudniający fagocytozę patogenu. Wiele miejsca Autorka poświęca znaczeniu klinicznemu *Malassezia*. Niektóre z gatunków w znacznym odsetku mogą być izolowane od zdrowych ludzi jak i od zwierząt. Wśród stanów chorobowych u ludzi z potwierdzoną etiologią lub domniemanym udziałem wyróżnia się, jako pierwsze, zakażenia skórne (łupież pstry, zapalenie mieszków włosowych), oraz jako drugie, zmiany skórne, które ulegają jedynie nasileniu w wyniku obecności tych grzybów (łojotokowe i atopowe zapalenie skóry, łuszczycy). Szczególnie niebezpieczne i coraz częściej stwierdzane są zakażenia inwazyjne, np. zakażenia krwi związane ze stosowaniem cewników naczyniowych i żywienia pozajelitowego. Z kolei wśród zwierząt, głównie u psów, na pierwszy plan wysuwa się *M. pachydermatis*, która jest najczęściej izolowana ze skóry zdrowych osobników, a także ma udział w podobnych schorzeniach jak inne gatunki u ludzi – zapalenie ucha zewnętrznego, łojotokowe i atopowe zapalenie skóry. Gatunek ten jest coraz częściej wiązany z przypadkami zakażeń także u ludzi. Doktorantka zwraca uwagę na różnicowanie genetyczne, wielkość genomu i liczbę genów u poszczególnych gatunków *Malassezia*, co do niedawna było poznane w małym zakresie, w zależności od źródła izolacji (osobniki zdrowe lub chore) oraz różnicowanie biochemiczne, które łącznie sugerują istnienie pewnych przystosowań na poziomie molekularnym i metabolicznym, ułatwiających proces infekcji jako potencjalnych czynników wirulencji po stronie drobnoustroju, a nie tylko sprzyjających uwarunkowań ze strony gospodarza. Dodatkowo różnorodność przekłada się na aktywność leków wobec szczepów *Malassezia*. Wartości MIC u *M. pachydermatis* pochodzących od psów chorych były wyższe niż u szczepów wyizolowanych od psów zdrowych w przypadku większości stosowanych leków. Powyższe

może być ważne z klinicznego punktu widzenia. W tej części rozprawy należy podkreślić dydaktyczny aspekt opracowania, dodatkowo wzbogaconego licznymi fotografiami uzupełniającymi prezentowane treści oraz tabelami przejrzysto porządkującymi przedstawiane dane.

Cele pracy zostały określone w sposób czytelny, uzasadniają ważność podjętych badań.

W rozdziale „Materiał i metody” Autorka szczegółowo opisuje sposób przygotowania kolekcji szczepów *M. pachydermatis*, ich identyfikację do gatunku, techniki biologii molekularnej stosowane w genotypowaniu, analizie podobieństwa (RAPD-PCR) i pokrewieństwa (ITS-RFLP) genetycznego szczepów, opisuje metody biochemiczne wykorzystywane do określenia aktywności enzymów wewnątrzkomórkowych (dehydrogenazy jabłczanowej, kinazy pirogronianowej, liazy izocytrynianowej), aktywności enzymów zewnątrzkomórkowych (fosfolipazy), analizy komórkowych profili lipidowych metodą chromatografii cienkowarstwowej oraz zawartości kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. W badaniach dotyczących porównywania i analizy profili białkowych prezentuje metodykę jednokierunkowej elektroforezy denaturującej oraz elektroforezy dwukierunkowej z wykorzystaniem identyfikacji poszczególnych białek metodą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią masową (LC-MS/MS). W tym miejscu należy zwrócić szczególną uwagę na interdyscyplinarny asortyment metod, którymi posługuje się Badaczka, co wskazuje na duży już rozwój umiejętności naukowego pracownika.

Materiał do badań stanowiły 64 izolaty *M. pachydermatis* podzielone na dwie zbliżone pod względem liczności grupy, tj. 34 pozyskane od psów bez objawów *otitis externa* i 30 pozyskane od psów chorych na *otitis externa*. Użyte do badań szczepy pochodziły z kolekcji Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie oraz zostały pozyskane od psów w ramach własnych działań ze Schroniska dla Zwierząt w Białymstoku. Gatunkową przynależność szczepów Doktorantka przeprowadziła wykorzystując metody fenotypowe, a co istotne dokonała tego metodami biologii molekularnej. Bardzo dokładnie opisuje identyfikację genetyczną skolekcjonowanych szczepów. Jako kontrolę w

we własnych analizach genetycznych wykorzystwała referencyjny szczep *M. pachydermatis* CBS 7925.

W rozdziale „Wyniki” Autorka przedstawiła bardzo dokładną, wielokierunkową analizę uzyskanych wyników badań. Są one zgodne z wytyczonymi wcześniej celami pracy. Obejmują one ocenę poprawności identyfikacji gatunkowej badanych grzybów jako *M. pachydermatis*. Odnosi się do epidemiologicznych danych częstości występowania tego gatunku na poziomie 30% u zdrowych zwierząt, co pokrywa się z danymi literaturowymi. Zarówno analizy podobieństwa w oparciu o polimorfizm fragmentów losowo amplifikowanego polimorficznego DNA, jak i ocena pokrewieństwa w oparciu o sekwencje nukleotydowe fragmentu ITS-1 wskazują na istnienie korelacji pomiędzy tym czy szczep pochodził od psa zdrowego czy chorego, a jego profilem genetycznym. W dalszej kolejności Doktorantka dokonała analiz na poziomie fenotypowym. Stwierdziła 3-krotnie wyższą, istotną statystycznie, aktywność fosfolipazy C oraz o ok. 30% wyższą łączną aktywność fosfolipazy A i B w grupie psów chorych wobec psów bez objawów chorobowych. Analizy średnich aktywności trzech enzymów wewnątrzkomórkowych nie wskazywały na różnice istotne statystycznie pomiędzy porównywanymi grupami szczepów. Jednak różnice takie zaobserwowała w zależności od warunków prowadzonej hodowli – dodatku lipidów do pożywki. Na takiej pożywce aktywność dehydrogenazy jabłczanowej jest 3-krotnie niższa, a kinazy pirogronianowej 16-krotnie niższa niż na pożywce bez dodatku lipidów w obu badanych grupach szczepów. Na pożywce bez dodatku lipidów średnia aktywność wszystkich enzymów była wyższa w komórkach grzybów pochodzących od psów bez objawów otitis externa, natomiast na pożywce z dodatkiem lipidów zgodność z powyższą tendencją zaobserwowała jedynie w przypadku kinazy pirogronianowej. Wykazała różnice profili lipidowych i kwasów tłuszczowych. Szczepy pochodzące od psów bez objawów *otitis externa* charakteryzują się znacznie wyższą zawartością estrów ergosterolu w porównaniu do szczepów izolowanych od psów chorych i różnica ta utrzymuje się bez względu na warunki prowadzenia hodowli. Na pożywce bez dodatku lipidów szczepy izolowane od psów zdrowych zawierają więcej kwasów tłuszczowych, triacylogliceroli, ergosterolu, także kwasu behenowego i lignocerynowego, wykazują wyższą wartość stosunku nasyconych do jednonienasyconych kwasów tłuszczowych. Na pożywce z lipidami najistotniejszą różnicą była wyższa

zawartość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych u szczepów pochodzących od zdrowych zwierząt. Na szczególną uwagę zasługuje obecność kwasu nerwonowego tylko w grupie szczepów izolowanych od chorych psów. Analiza profili białkowych pozwoliła określić występowanie białek charakterystycznych dla poszczególnych grup badanych izolatów. Dla szczepów izolowanych od psów z *otitis externa* charakterystyczne były: dehydrogenaza mannitolowa NADP-zależna, reduktaza cytochromu b5, podjednostka e kompleksu ATPazy, reduktoizomeraza ketolo-kwasowa oraz kinaza fosfoglicerynianowa. Dla szczepów izolowanych od psów bez *otitis externa* charakterystyczne były: podjednostka β -białka G, podjednostka γ syntazy ATP, białko wiążące poliadenylan oraz syntetaza glicylo-tRNA. Sposób przeprowadzonych analiz i wnioski w tej części rozprawy wskazują na dużą dojrzałość naukową Doktorantki.

Uzyskane wyniki badań zostały zobrazowane w postaci 18 rycin oraz 7 tabel.

W „Dyskusji” Autorka szeroko omawia problem zróżnicowania szczepów *M. pachydermatis* na poziomie molekularnym i fenotypowym w aspekcie posiadania potencjalnych cech wirulentnych przyczyniających się do rozwoju zakażenia, a więc czynników po stronie drobnoustroju uznawanego za komensala i oportunistę, a nie tylko czynników predysponujących po stronie gospodarza. Typuje aktywność fosfolipaz, profile lipidowe oraz obecność charakterystycznych białek jako wieloczynnikowy marker odróżniający szczepy typowo komensalne od potencjalnie patogennych i możliwość wykorzystania tego w aspekcie diagnostycznym, profilaktycznym i terapeutycznym. Szczególnie ważne jest wyjaśnienie wieloczynnikowej genezy różnic pomiędzy szczepami izolowanymi od psów chorych na *otitis externa* i bez objawów chorobowych, z naciskiem na podstawy genetyczne i filogenetyczne. W różnych momentach prowadzonej dyskusji zwraca uwagę na szybkość proliferacji grzybów, poziom metabolizmu w zależności od dostępności i preferencji substratowych i wyjaśnia wyływające z nich możliwe dla komórki konsekwencje, wykazane i wyjaśnione na podstawie własnych badań, np. wpływ na profile lipidowe, aktywność enzymów wewnątrzkomórkowych. We wnikliwej i sprawnie opisanym analizie dokonuje porównań wyników własnych w kontekście światowej literatury naukowej. Piśmiennictwo w tej części niemal w całości stanowi aktualną, współcześnie obowiązującą wiedzę w tym zakresie.

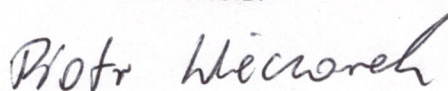
We „Wnioskach” kończącej rozprawę Doktorantka zwraca uwagę na najważniejsze aspekty pracy, formułując 5 wniosków. Wnioski czwarty i piąty świadczą o dojrzałości naukowej Doktorantki, bowiem widzi możliwość stworzenia kompleksowego markera patogenności dla szczepów *M. pachydermatis* wykorzystywanego w celach diagnostycznych, profilaktycznych oraz typowania grup ryzyka wystąpienia objawów chorobowych. Tym samym „otwiera” drogę dalszym badaniom z możliwością praktycznego zastosowania swoich wyników badań. Pierwsze trzy wnioski są zwięzłymi i trafnymi wskazaniem istoty otrzymanych wyników w ramach zaplanowanych i przeprowadzonych badań.

Podsumowując, recenzowana dysertacja doktorska stanowi oryginalne i bardzo wartościowe opracowanie, zarówno pod względem poznawczym jak i praktycznym. Posiada wysoką wartość merytoryczną. Zastosowanie współczesnych technik biologii molekularnej, z zakresu proteomiki oraz technik wizualizacji otrzymanych wyników badań zasługują na szczególne podkreślenie.

Recenzowaną rozprawę oceniam bardzo wysoko, spełnia ona wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym mam zaszczyt zwrócić się do Wysokiej Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Urszuli Czyżewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W tym miejscu, także korzystając z przysługującego mi prawa jako Recenzenta, wnioskuję do Pani Dziekan i Wysokiej Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o przyznanie wyróżnienia Pani mgr Urszuli Czyżewskiej za wybitną rozprawę doktorską.

dr hab. n. med. Piotr Wieczorek
lekarz
specjalista mikrobiolog
6760121



Dr hab. n. med. Piotr Wieczorek