

Prof. dr hab. Bogdan Kałużewski

Katedra Genetyki Klinicznej i Laboratoryjnej UM w Łodzi,

92-213 Łódź, ul. Pomorska 251

Profesor emerytowany

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Gołąbek

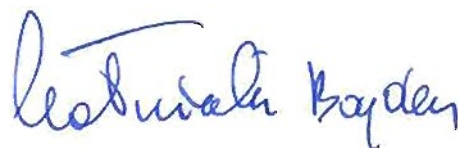
Wybrane molekularne mechanizmy oporności szczepów *Candida albicans* na leki azolowe

Odpowiadając na prośbę Pana Prof. dr hab. n. med. Macieja Misiółka, Dziekana Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko Dentystycznym w Zabrze, Śląskiego Uniwersytetu Medycznego oraz zgodnie z Uchwałą Rady Wydziału w/w Uniwersytetu nr. 180/VII/2012/2013 zapoznałem się z manuskrytem rozprawy doktorskiej autorstwa Karoliny Gołąbek: „Wybrane molekularne mechanizmy oporności szczepów *Candida albicans* na leki azolowe”. Praca doktorska została wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii Medycznej i Molekularnej Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym w Zabrze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach 41-808 Zabrze Rokitnica, ul. Jordana 19. Rozprawa liczy 83 strony, posiadając typowy dla tego typu opracowań układ treści. Manuskrypt zaopatrzone w Wykaz Skrótów anglojęzycznych, Wykaz Tabel, których zamieszczono w tekście rozprawy jedenaście oraz Wykaz Rycin, których umieszczono w tekście rozprawy 22. We Wstępie, który liczy 25 stron tekstu, autorka w sposób syntetyczny, ale przejrzysty podaje charakterystykę przedstawiciela królestwa grzybów wchodzącego w skład flory saprofitycznej, który w określonych warunkach zmienionej odporności organizmu może być przyczyną zakażenia nazywanego kandydozą. Najczęstszym czynnikiem etiologicznym tego typu zakażeń jest drobnoustrój *Candida albicans*. W kolejnych podrozdziałach Wstępu znajdujemy informacje o zmienności morfologicznej tego drobnoustroju, adhezji, aktywności enzymatycznej oraz zdolności do

tworzenia biofilmu struktury heterogennej, wielowarstwowej, która może zawierać różne morfologiczne formy drobnoustroju jak blastosporę, pseudostrzępkę i strzępkę. Autorka podała również fazy tworzenia biofilmu. W kolejnym fragmencie Wstępu autorka dokonała przeglądu leków przeciwgrzybiczych. Ten fragment Wstępu pozostawia uczucie niedosytu, bo w sposób jednoznaczny z lektury nie wynika, dlaczego autorka podjęła decyzję o skoncentrowaniu swych wysiłków badawczych na związkach azolowych. W kolejnych fragmentach Wstępu pozyskujemy informacje o mechanizmach oporności na stosowane leki przeciwgrzybiczne. W podrozdziale „Molekularne mechanizmy oporności na leki znajdujemy dokładny opis mechanizmów oporności, który może zależeć od nadekspresji pewnych genów oraz mutacji punktowych. Kolejnym mechanizmem oporności na leki opisanym w rozprawie jest mechanizm komórkowy głównie realizowany w różnych fazach rozwoju biofilmu. Ten mechanizm oporności nie będzie jednak przedmiotem rozprawy, ale jest istotnym dla zrozumienia kompleksowości mechanizmów oporności na leki przeciwgrzybiczne w tym leki azolowe. W kolejnym fragmencie Wstępu Autorka zapoznaje nas z metodami diagnostyki zakażeń *Candida albicans* od metod tradycyjnych opartych na ocenie cech fenotypowych, poprzez metody „rapid” oraz systemy zautomatyzowane po techniki typowania molekularnego. Ten podrozdział jest prezentowany szczegółowo, a szczególne miejsce w nim zajmuje podrozdział poświęcony roli metylacji DNA na funkcjonowanie w genomu drobnoustroju. Na stronie 37 rozprawy znajdujemy Założenia i Cele Pracy, które dotyczą spadku wrażliwości tej grupy patogenów na leki azolowe. W sumie autorka ma zamiar zajmować się ekspresją genu ERG11, oraz mutacjami tego genu, zmianami w ekspresji genów CDR1, CDR2 i MDR1. Przedmiotem badań Autorki będą również zmiany w metylacji DNA, jako czynnika epigenetycznego. Na stronie 38 rozprawy znajdujemy opis Materiału badawczego i Metod. Pewien niedosyt pozostawia brak informacji epidemiologicznej, dotyczącej sposobu i przedziału czasowego, w jakim pozyskano materiał do badań od chorych hospitalizowanych w Podhalańskim Szpitalu Specjalistycznym im. Jana Pawła II w Nowym Targu. Wydaje mi się, że również cennym byłoby opisanie warunków technicznych towarzyszących sposobowi pozyskania materiału, przechowywania? W okresie poprzedzającym izolację szczepów oraz badania wrażliwości na leki azolowe. Kolejne opisy homogenizacji i izolacji RNA oraz DNA charakteryzują się dokładnością i profesjonalizmem. Opis analizy statystycznej uzyskanych wyników zamyka ten fragment rozprawy. Wyniki badań przedstawiono bardzo starannie ilustrując je czytelnymi rycinami i tabelami.

W pierwszym etapie pracy, który polegał na ocenie względnej ekspresji genów CDR1, CDR2, MDR1 i ERG11 wykryto istotne statystycznie różnice w ekspresji szczepów wrażliwych i opornych na leki azolowe. Godnym odnotowania jest fakt, że autorce udało się zidentyfikować trzy nowe mutacje genu ERG11. Wartościowym jest również opis zmiennej ekspresji tego genu, który będąc zależnym od rodzaju mutacji podwyższa lub obniża ekspresję genu. Autorce udało się sformułować cztery wnioski, z których wynika, że główny mechanizm oporności na azole w przebadanych szczepach *Candida albicans* polega na podwyższonej ekspresji genów CDR2 i ERG11 w tym ostatnim genie za nad92-213 Łódź, ul. Pomorska 251 ekspresję odpowiedzialna była mutacja G1309A. Wniosek trzeci można by pominąć, bowiem wynika on również w sposób przekonujący z prezentowanego Wstępu i Dyskusji. Autorce nie udało się przedstawić nowych faktów opisujących metylację DNA, jako potencjalnego mechanizmu powstawania oporności, ale być może rola tego mechanizmu jest tylko pośrednia. Z resztą byłoby trudno podjąć tutaj równorzędną dyskusję z autorami publikacji Mishra PK i inni, których wyniki badań autorka przytacza we Wstępie i Dyskusji pozycja piśmiennictwa 72. W prezentowanym manuskrypcie wykorzystano 92 współczesne publikacje. Manuskrypt kończy Streszczenie opracowane w języku polskim i angielskim. Podsumowując stwierdzam, że przedstawiony do oceny manuskrypt rozprawy doktorskiej spełnia w mojej opinii wszystkie kryteria rozprawy naukowej, jasno sformułowany cel pracy został osiągnięty, wprowadzie rola mechanizmów oporności ciągle pozostaje w kręgu badań naukowych, ale świadczy to o złożoności procesów towarzyszących procesowi oporności na leki. Moja opinia o pracy i osiągniętych wynikach jest pozytywna, w związku z tym stawiam wniosek do Wysockiej Rady o realizację dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Łódź 01-02-2015



Prof. dr hab. n. med.
Bogdan Kałużewski
ginekolog - położnik
specjalista genetyki klinicznej
Łódź, ul. Inowrocławska 9 m. 132
7768314