



Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie

Dr hab. n. med. Danuta Kosik-Bogacka, prof. PUM
Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Al. Powstańców Wielkopolskich 72
70-111 Szczecin

Szczecin, 29.11.2016 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej magistra Marcina Cholewińskiego pt.: „Pełzaki wolno żyjące z rodzaju *Acanthamoeba* występujące w piaskownicach na placach zabaw dla dzieci w Poznaniu oraz oznaczenie genotypów wyizolowanych patogenicznych izolatów”

Pracę doktorską stanowi cykl trzech oryginalnych i spójnych tematycznie prac pod wspólnym tytułem „Pełzaki wolno żyjące z rodzaju *Acanthamoeba* występujące w piaskownicach na placach zabaw dla dzieci w Poznaniu oraz oznaczenie genotypów wyizolowanych patogenicznych izolatów”. Publikacje ukazały się w latach 2013-2015, były to następujące prace:

1. Cholewiński M, Hadaś E, Derda M, Wojt WJ, Skrzypczak Ł. Występowanie patogenicznych pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba* w piaskownicach miejskich. Now Lek 2013; 82: 138-141,
2. Derda M, Solarczyk P, **Cholewiński M**, Hadaś E. Genotypic characterization of amoeba isolated from *Acanthamoeba* keratitis in Poland. Parasitol Res 2015; 114: 1233-1237,
3. **Cholewiński M**, Solarczyk P, Derda M, Wojtkowiak-Giera A, Hadas E. Presence of potential pathogenic genotypes of free-living amoebae isolated from sandboxes in children's playgrounds. Folia Parasitol (Praha) 2015; 62. pii: 2015.064.

Wszystkie powyższe prace są opracowaniami zbiorowymi, w dwóch z nich Doktorant jest pierwszym autorem, a w jednej trzecim. Dwie prace zostały opublikowane w języku angielskim w czasopiśmie z tzw. listy filadelfijskiej, a jedna w języku polskim. Sumaryczny współczynnik oddziaływania tych prac (impact factor, IF) wynosi 3.298, a punktacja MNiSW 55 punktów. Wszystkie publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej mają dużą wartość merytoryczną.

W rozprawie doktorskiej zawarto zwięzłe omówienie przeprowadzonych badań, a ponadto dołączono kopie prac oraz oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej. Na podstawie tych oświadczeń można stwierdzić, że wkład Pana magistra Marcina Cholewińskiego w powstanie omawianego cyklu prac był wiodący i dotyczył organizacji badań, zebrania próbek środowiskowych, hodowli pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*, oznaczenia patogeniczności pełzaków, izolacji DNA z pełzaków patogenicznych i przeprowadzenia reakcji PCR, analizy i interpretacji wyników badań oraz przygotowania publikacji do druku.

Pełzaki z grupy „limax”, szczególnie gatunki z rodzajów *Acanthamoeba*, *Naegleria* i *Balamuthia* mogą być fakultatywnymi pasożytami człowieka. Występują one powszechnie w glebie, powietrzu, wodach słodkich i słonych. Powszechność ich występowania sprawia, że stanowią one potencjalne zagrożenie dla zdrowia ludzi, zwłaszcza osób o obniżonym poziomie odporności. Inwazje pełzaków wolno żyjących to stosunkowo nowy problem w parazytologii lekarskiej. Istnieje duża potrzeba prowadzenia dalszych i kompleksowych badań dotyczących szczególnie monitorowania występowania pełzaków wolno żyjących w środowisku, a także opracowania metod diagnostycznych i leczenia schorzeń przez nie wywoływanych.

Pierwsza z trzech prac zamieszczona w *Nowinach Lekarskich* dotyczyła obecności potencjalnie patogenicznych pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* w piasku pochodzącym z piaskownic znajdujących się na poznańskich placach zbaw. Próbkę piasku z 13 piaskownic zebrano w okresie od maja do sierpnia 2012 roku. Wyizolowane z nich pełzaki hodowano, a następnie zarażano nimi myszy szczepu BALB/c. Po dwóch tygodniach od zarażenia zwierzęta uśmiercano i pobierano od nich mózg i płuca w celu izolacji pełzaków. Pełzaki identyfikowano mikroskopowo na podstawie cech morfologicznych oraz z wykorzystaniem testu flagelacji. Pierwotniaki z rodzaju *Acanthamoeba* stwierdzono we wszystkich badanych próbkach piasku, a pełzaki patogeniczne dla myszy wykryto u połowy badanych zwierząt. Wyniki tej pracy są bardzo istotne ponieważ obecność patogenicznych pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* w piaskownicach stwarza potencjalne zagrożenie dla zdrowia bawiących się w nich dzieci, szczególnie, że piasek może powodować mechaniczne uszkodzenie rogówki oka, co sprzyja inwazji tych pełzaków.

W drugiej pracy zamieszczonej w *Parasitology Research* oznaczano genotypy pełzaków izolowanych od osób, u których zdiagnozowano pełzakowe zapalenia rogówki oka (AK). Zbadano osiem izolatów *Acanthamoeba* spp., które okazały się patogeniczne dla myszy. Do identyfikacji trofozoitów i cyst pierwotniaków wykorzystano badania

mikroskopowe oraz molekularne. W pracy tej przy użyciu łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) i elektroforezy produktów reakcji PCR stwierdzono, że wszystkie uzyskane sekwencje nukleotydów pełzaków należą do genotypu T4. Ponadto wykazywały one duże podobieństwo w stosunku do sekwencji referencyjnych szczepów *Acanthamoeba* spp. izolowanych między innymi z próbek środowiskowych i zeszkobin rogówki oka z różnych regionów świata zdeponowanych w Banku Genów. Stwierdzono również polimorfizm w obrębie tego genotypu. Wyniki tych badań sugerują, że szczepy pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* uzyskane od pacjentów z pełzakowym zapaleniem rogówki oka pochodzących z Polski nie różnią się od opisywanych w innych krajach i wszystkie należały do genotypu T4.

Trzecia praca opublikowana w *Folia Parasitologica* stanowi kontynuację poprzednich badań opisanych w publikacjach. Dotyczy ona genotypów patogenicznych pełzaków izolowanych z próbek piasku pobranych z piaskownic znajdujących się na placach zabaw w Poznaniu. Próbkę te gromadzono w latach 2012-2014. W badaniach wykorzystano metody mikroskopowe, hodowlane i molekularne oraz testy biologiczne. W badanych próbkach piasku zidentyfikowano 15 patogenicznych dla myszy szczepów *Acanthamoeba* spp. Analiza sekwencji tych szczepów wykazała, że były one homologiczne z sekwencjami szczepów *Acanthamoeba* spp. pozyskanych z próbek środowiskowych i zeszkobin z rogówki oka zdeponowanych w Banku Genów. Wyniki badań opisane w tej pracy potwierdzają występowanie potencjalnie patogenicznych szczepów pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* o genotypie T4 w piasku z miejskich piaskownic. W związku z tym należałoby systematycznie badać piaskownice, w tym próbki piasku, w celu kontroli obecności w nich patogenicznych pełzaków.

Zawarte w cyklu publikacje były szczegółowo recenzowane, jednak w pracach powinno być napisane, że badano próbki piasku, a nie piaskownice. Ponadto należało podać ile próbek piasku pobierano z jednej piaskownicy i opisać dokładnie w jaki sposób określano patogeniczność danego szczepu dla zwierząt laboratoryjnych. W publikacjach i przygotowanym przez Doktoranta opisie prac brak jest numeru zgody lokalnej komisji etycznej na badania z użyciem zwierząt doświadczalnych. Kopia takiej zgody została mi dostarczona w odrębnej korespondencji. Na swoje badania Doktorant uzyskał zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Badań na Zwierzętach w Poznaniu (uchwała nr 56/2012 z 7.11.2012 r.). W opisie cyklu publikacji znalazło się też kilka błędów stylistycznych, ponadto jeden raz został niewłaściwie użyty termin zakażenie zamiast zarażenie.

Powyższe uwagi nie obniżają wartości naukowej ocenianych prac. Wybór metod badawczych we wszystkich publikowanych pracach, sposób przeprowadzenia badań i analiza uzyskanych wyników świadczą o dużym doświadczeniu Doktoranta.

Cykl prac jest oryginalnym opracowaniem bardzo istotnego i aktualnego problemu dotyczącego występowania pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* w środowisku oraz określania genotypów szczepów *Acanthamoeba* pochodzących z próbek środowiskowych oraz od pacjentów. Problem badawczy podjęty przez Doktoranta jest bardzo istotny, opracowanie zawiera elementy nowatorskie oraz prezentuje wysoki poziom wnosząc nowe dane w dziedzinie biologii medycznej. Świadczy także o bardzo dobrej znajomości przedstawionego tematu i umiejętnością posługiwania różnymi metodami badawczymi. Wysoki poziom naukowy publikowanych prac i znaczący w nich udział Doktoranta dokumentuje bardzo dobrze opanowany przez niego warsztat badawczy.

Uzasadnienie:

Przedstawiona do oceny praca doktorska pt. "Pełzaki wolno żyjące z rodzaju *Acanthamoeba* występujące w piaskownicach na placach zabaw dla dzieci w Poznaniu oraz oznaczenie genotypów wyizolowanych patogenicznych izolatów" w pełni spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami), dlatego wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego I, Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie Pana magistra Marcina Cholewińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie z uwagi na wysoką wartość poznawczą i naukową prowadzonych badań wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie niniejszej pracy doktorskiej.

PROFESOR NADZWYCZAJNY
Katedry i Zakładu Biologii
i Parazytologii Medycznej

dr hab. n. med. Danuta Kosik-Bogacka

Dr hab. n. med. Danuta Kosik-Bogacka, prof. PUM