



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Klinika Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych

ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

tel. (61) 8691363
fax (61) 8691699
e-mail: tropisk2@ump.edu.pl

Kierownik Katedry i Kliniki: *Prof. dr hab. med. Jerzy Stefaniak*

Poznań, dnia 10 stycznia 2017 r.

Ocena

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

mgr biol. Marcina Cholewińskiego

z Katedry i Zakładu Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu

Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

na podstawie cyklu publikacji

pt. „Pełzaki wolno żyjące z rodzaju *Acanthamoeba* występujące w piaskownicach na placach zabaw dla dzieci w Poznaniu oraz oznaczenie genotypów wyizolowanych patogenicznych izolatów”.

Znaczenie pełzaków amfizoicznych, prowadzących zazwyczaj wolno żyjący tryb życia w naturalnym środowisku przyrodniczym, jako potencjalnych mikroorganizmów o zdecydowanych właściwościach chorobotwórczych i niezwykle groźnych dla człowieka, wzbudza w ostatnich latach szczególne zainteresowanie przedstawicieli świata naukowego oraz lekarzy wielu specjalności klinicznych. Zasięg występowania tego niepokojącego problemu zdrowotnego nie został jeszcze do końca wyjaśniony i nadal stanowi źródło inspiracji dla prowadzenia bardziej szczegółowych obserwacji naukowych w kręgu parazytologów doświadczalnych i epidemiologów klinicznych. Szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, w naturalnym otoczeniu człowieka, jako typowe organizmy saprofityczne, te wyjątkowe pierwotniaki mogą w sprzyjających okolicznościach stanowić istotne niebezpieczeństwo dla zdrowia i życia pacjentów, a szczególnie dla osób z fizjologiczną niedojrzałością lub zmniejszoną aktywnością układu immunologicznego. Badania nad pełzakami wolno żyjącymi, izolowanymi ze środowiska w Poznaniu i Wielkopolsce były prowadzone przez Katedrę i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu już od wielu

lat (Kasprzak i Mazur, 1972; Kasprzak i wsp., 1974; 1982, 1985; Mazur, 1984; Kasprzak, 1985; Hadaś i Mazur, 1991; Hadaś, 1993; Hadaś i wsp., 2004; Derda i wsp., 2006, 2014), stąd kontynuacja tego niezwykle złożonego i nie w pełni jeszcze poznanego problemu badawczego, podtrzymującego tradycję Poznańskiego Ośrodka Parazytologicznego, zasługuje ze wszech miar na uznanie. W ostatnich latach notuje się gwałtownie zwiększającą się liczbę pacjentów immunoniekompetentnych z osłabioną funkcją układu odpornościowego, niezwykle podatnych na zakażenia i zarażenia oportunistyczne, w tym inwazje wywoływane przez wszechobecne pierwotniaki z rodzaju *Acanthamoeba*, *Naegleria* i *Balamuthia*. Nasilające się zjawisko migracji wielonarodowościowej oraz prężny rozwój międzynarodowego ruchu turystycznego na obszarach odmiennej strefy klimatyczno-środowiskowej i sanitarno-epidemiologicznej, spowodowały niebezpieczeństwo nabywania zarażeń wywołanych przez potencjalnie chorobotwórcze, egzotyczne pierwotniaki podczas podróży do krajów klimatu gorącego i ryzyko ich importowania również na terytorium naszego kraju.

Populacja wieku rozwojowego z wrodzonymi niedoborami immunologicznymi oraz małe dzieci z fizjologiczną niedojrzałością układu odpornościowego, a także pacjenci dorośli z nabytym zespołem upośledzenia odporności i chorzy poddawani długotrwałemu leczeniu immunosupresyjnemu lub immunomodulacyjnemu z powodu chorób rozrostowych, zaburzeń autoimmunologicznych, transplantacji tkankowych i narządowych, przewlekłych zapaleń wątroby, chorób układowych tkanki łącznej, stanowią grupę szczególnego ryzyka dla zarażeń wywołanych przez potencjalnie chorobotwórcze pierwotniaki. Preferowanie zdrowego stylu życia poprzez wdrażanie różnych form aktywności sportowej i rekreacyjnej w środowisku przyrodniczym, wobec konieczności zastępowania tradycyjnych szkieł okularowych soczewkami kontaktowymi u osób z wadami refrakcji narządu wzroku, w tym zwłaszcza osób młodych, niesie za sobą zwiększone ryzyko coraz szerszego i gwałtownego rozprzestrzeniania się inwazji pierwotniaczych w tej szczególnej grupie pacjentów. Przedłużająca się długość życia człowieka oraz coraz częstsze występowanie przewlekłych, cywilizacyjnych chorób układu oddechowego i układu krążenia oraz zaburzeń metabolicznych, jest niewątpliwie dodatkowym czynnikiem predysponującym do występowania infekcji o charakterze oportunistycznym wywołanych przez pierwotniaki, stanowiącym poważne zagrożenie dla zdrowia

publicznego. Rozprawa doktorska posiada więc szczególnie istotne i niezwykle aktualne znaczenie dla rozwoju parazytologii klinicznej i medycyny doświadczalnej, wskazując nowe drogi możliwości zarażenia człowieka przez potencjalnie chorobotwórcze, wolno żyjące pełzaki, dotychczas rzadko uwzględniane przez lekarzy podczas prowadzenia tradycyjnej diagnostyki różnicowej istotnych dolegliwości chorobowych, z powodu uznania ich za łagodne i niegroźne saprofity. Dlatego też problem niedocenianych dotąd i zapomnianych inwazji pasożytniczych wywoływanych przez szeroko rozpowszechnione pełzaki wolno żyjące staje się w chwili obecnej niezwykle cenny i wartościowy oraz przydatny w codziennej praktyce klinicznej wielu klinicznych specjalności medycznych.

Rozprawa doktorska została przygotowana na podstawie monotematycznego zbioru 3 oryginalnych prac twórczych, zatytułowanego „Pełzaki wolno żyjące z rodzaju *Acanthamoeba* występujące w piaskownicach na placach zabaw dla dzieci w Poznaniu oraz oznaczenie genotypów wyizolowanych patogenicznych izolatów”. Prace naukowe wchodzące w skład cyklu zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach medycznych w latach 2013 – 2015, w tym dwa artykuły w wiodących anglojęzycznych czasopismach parazytologicznych o zasięgu światowym oraz jedna praca w kluczowym, internistycznym czasopiśmie ogólnopolskim. Tytuł cyklu 3 publikacji naukowych Doktoranta bardzo dobrze oddaje istotę i treść rozprawy, podkreślając zagrożenie epidemiologiczne powodowane przez wolno żyjące pełzaki z rodzaju *Acanthamoeba* i ich identyfikację genotypową w przypadku potwierdzonej patogenności oraz stwierdzenia objawów chorobowych u zarażonych pacjentów. **Łączna wartość wskaźnika wpływu IF dla prezentowanego cyklu prac wynosi 3,245, a klasyfikacja MNiSW posiada 60 punktów.**

Spośród amfizoicznych pełzaków wolno żyjących stanowiących potencjalne zagrożenie dla człowieka, głównie kosmopolityczne gatunki z rodzaju *Acanthamoeba* posiadają zdolność do rozwoju w Polsce, w mniej sprzyjających warunkach klimatu umiarkowanego. Cykl publikacji składających się na rozprawę doktorską dotyczy aktualnych badań epidemiologicznych, parazytologicznych oraz molekularnych w zakresie identyfikacji izolatów pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* oraz oceny ich właściwości chorobotwórczych, wyodrębnionych z naturalnych prób środowiska na terenie aglomeracji miejskiej Poznania oraz materiału uzyskiwanego od chorych na

pełzakowe zapalenie rogówki, w latach 2012-2014. Tematyka opracowanych zagadnień jest ściśle ukierunkowana, bardzo spójna i wzajemnie się uzupełnia, stanowiąc istotny wkład naukowy w aktualny rozwój parazytologii klinicznej i eksperymentalnej. Głównym celem przeprowadzonych badań była ocena częstości występowania i identyfikacja pełzaków wolno żyjących z rodzaju *Acanthamoeba* w wybranych piaskownicach miejskich, zlokalizowanych na dużych osiedlach mieszkaniowych, w parkach i placach zabaw dla dzieci. Na uwagę zasługuje celowany dobór prób do analizy parazytologicznej, pochodzących z najbardziej atrakcyjnych terenów rekreacyjnych, które są bardzo często, wielokrotnie i masowo odwiedzane przez dzieci i młodzież oraz ich najbliższych opiekunów. Poszukiwanie potencjalnie chorobotwórczych pełzaków w środowisku przebywania najmłodszej populacji, cechującej się fizjologiczną niedojrzałością układu immunologicznego i jego obciążeniem spowodowanym towarzyszącymi chorobami infekcyjnymi w powiązaniu z istotnym ryzykiem przypadkowego zanieczyszczenia i mechanicznego uszkodzenia rogówki gałkowej piaskiem podczas zabawy w piaskownicy tworzy logicznie przemyślany łańcuch epidemiologiczno-metodologiczny mający istotny wpływ na końcowy sukces prowadzonych analiz parazytologicznych. Podobnie, osoby starsze opiekujące się dziećmi w ogródkach jordanowskich i skwerach miejskich są również zdecydowanie predysponowane do zakażenia tymi samymi pierwotniakami ze względu na współistniejące zazwyczaj przewlekłe choroby cywilizacyjne i osłabioną wraz z wiekiem sprawność układu odpornościowego. Każdy element prowadzonej analizy parazytologicznej został dobrze przemyślany i celowo dobrany. Również okres zbierania prób materiału biologicznego do badań eksperymentalnych nie był przypadkowy, gdyż w okresie ciepłych miesięcy wiosenno-letnich, od maja do sierpnia, w związku z nasiloną aktywnością rekreacyjno-wypoczynkową populacji dziecięcej, istnieje największe zagrożenie epidemiologiczne kontaktu człowieka z potencjalnie chorobotwórczymi pierwotniakami i ich największe nagromadzenie w naturalnym środowisku. Na szczególne podkreślenie zasługuje też dobrze zorganizowany i precyzyjnie ukierunkowany warsztat badawczy Doktoranta, który nie wahał się w podejmowaniu niezwykle pracochłonnych i technicznie trudnych wyzwań laboratoryjnych, polegających na prowadzeniu wymagającej dużego doświadczenia praktycznego hodowli pierwotniaków, ich profesjonalnej identyfikacji morfologicznej oraz

umiejętności poprawnego zaplanowania i wykonywania nieczęsto już dzisiaj przeprowadzanych badań eksperymentalnych z użyciem zwierząt doświadczalnych. Zastosowanie próby biologicznej na myszach szczepu BALB/c w celu namnażania mikroorganizmów w tkankach zwierząt dla rzeczywistej, a nie tylko potencjalnej oceny ich wirulencji i właściwości patogennych, jest w chwili obecnej niezwykle cenną metodą badawczą możliwą do wykonania jedynie przez nieliczne ośrodki referencyjne na świecie. Niezwykle wartościową obserwacją Doktoranta jest udokumentowanie występowania pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* we wszystkich badanych piaskownicach miejskich (100%) i potwierdzenie ekspresji ich nie zawsze docenianych właściwości chorobotwórczych - w ponad połowie analizowanych przypadków.

Dotychczas brak jest w piśmiennictwie tak pełnego i wyczerpującego opisu stopnia zarażenia piaskownic dla dzieci przez wolno żyjące pełzaki, pełnej identyfikacji taksonomicznej izolowanych pierwotniaków przy użyciu skomplikowanych metod mikroskopowych i molekularnych oraz oceny stopnia ich inwazyjności i wirulencji z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż badane próby biologiczne pochodziły z dużej 600-tysięcznej aglomeracji miejskiej, a nie z terenów wiejskich, czy podmiejskich ogródków działkowych. Zaskakującą obserwacją kliniczną okazało się stwierdzenie najbardziej patogennych pełzaków na jednym z najsłynniejszych i najczęściej uczęszczanych poznańskich terenów rekreacyjnych nad Jeziorem Maltańskim w pobliżu pola piknikowego.

Kontynuacja badań Doktoranta, w zakresie oceny molekularnej i genotypowania izolatów patogennych pełzaków pochodzących z Polski pozwoliła na potwierdzenie obecności sekwencji nukleotydowych w 99-100% identycznych z sekwencjami szczepów referencyjnych uprzednio wyizolowanych z różnych środowisk przyrodniczych oraz rejonów geograficzno-klimatycznych świata i zarejestrowanych w Banku Genów Narodowego Centrum Informacji Biotechnologicznej z siedzibą w Stanach Zjednoczonych. Ponadto, wszystkie chorobotwórcze izolaty pełzaków *Acanthamoeba* z Wielkopolski należały do najczęściej rozpowszechnionego na świecie genotypu T4, odpowiedzialnego za większość przypadków klinicznych objawowych zarażeń u ludzi. Spośród ośmiu polskich pacjentów kierowanych przez okulistów z podejrzeniem amebowego

zapalenia rogówki, Autor udokumentował obecność wysoce patogennych szczepów *Acanthamoeba* w zeszkobinach rogówkowych u wszystkich badanych, które charakteryzowały się bardzo wirulentnym genotypem T4 oraz były w 100% identyczne genotypowo z sekwencjami izolowanymi uprzednio z różnorodnych środowisk przyrodniczych i od osób chorych. Osiągnięcie naukowe Doktoranta posiada niezwykle ważną wartość nie tylko epidemiologiczną i analityczną, ale przede wszystkim kliniczną, gdyż identyczne izolaty potwierdzono w próbach środowiskowych kolekcjonowanych z poznańskich piaskownic na placach zabaw dla dzieci. Uzyskane dyskretne różnice w pojedynczych sekwencjach niektórych rodzimych izolatów mogą wskazywać na istnienie polskich podtypów w obrębie rozpowszechnionego na świecie patogenicznego genotypu T4, związanych być może z chłodniejszą strefą klimatu umiarkowanego i mogą być dodatkowym atutem przedstawionego do oceny opracowania naukowego, podnosząc jego, i tak już niezależnie wysoką, wartość diagnostyczną.

Doktorant podjął się opracowania bardzo trudnego i interdyscyplinarnego tematu badawczego z zakresu pokrewnych dziedzin biologii medycznej: parazytologii lekarskiej i doświadczalnej, epidemiologii, ochrony środowiska, infekcjologii i chorób zakaźnych oraz biologii molekularnej. Na źródło swoich dociekań naukowych wybrał niezwykle aktualny temat, dotyczący do niedawna zapomnianych i wyjątkowo intrygujących mikroorganizmów o zmiennych właściwościach patogennych, które stosunkowo rzadko uwzględniano dotąd w diagnostyce różnicowej objawów klinicznych i zespołów chorobowych u człowieka. Przedmiotem przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej jest więc niezwykle ważny problem zdrowotny i kliniczny, a przedstawione przez Autora próby analizy prewalencji pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba*, potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka w kontekście ich wpływu na ryzyko rozwoju groźnego dla życia i zdrowia oraz niezwykle trudnego w terapii zapalenia rogówki, przede wszystkim u pacjentów z zaburzeniami odpornościowymi oraz u osób noszących soczewki kontaktowe, zasługuje na szczególne wyróżnienie. Stale powiększająca się populacja pacjentów okulistycznych, używających na co dzień soczewek bezpośrednio przylegających do rogówki, produkowanych z materiałów optycznych zwiększających ryzyko adhezji i namnażania się pierwotniaków na ich powierzchni, a jednocześnie bardziej predysponowanych do mechanicznego, wielokrotnego uszkodzenia rogówki podczas

aplikacji soczewek, stanowi istotny problem kliniczny i terapeutyczny XXI wieku. Fakt, iż są to przeważnie osoby młode, aktywnie uprawiające sport rekreacyjnie lub wyczynowo na terenach miejskich parków, zieleńców i skwerów oraz mające bezpośredni kontakt z ziemią potencjalnie skażoną nie zawsze „łagodnymi” pierwotniakami, czyni problematykę poruszaną w rozprawie niezwykle istotną dla zdrowia publicznego i epidemiologii klinicznej. Proponowane przez Doktoranta regularne monitorowanie publicznych piaskownic w kierunku obecności patogenicznych pełzaków oraz propagowanie na szerszą skalę edukacji prozdrowotnej w zakresie informowania społeczeństwa o stopniu zagrożenia i możliwościach skutecznego zapobiegania zarażeniu, wydaje się być bardzo obiecujące, ale także celowe i praktycznie uzasadnione.

W prezentowanych publikacjach, Autor przedstawił w sposób szczegółowy i wyczerpujący lokalizację miejsc poboru prób środowiskowych, które poddawał analizie parazytologicznej i molekularnej, sposób pobierania materiału do badań, procedurę zastosowanych metod hodowli i identyfikacji pełzaków, szczegółowe parametry reakcji łańcuchowej polimerazy wraz z zasadami identyfikacji produktów amplifikacji genowej i sekwencjonowania kwasów nukleinowych, a także metodykę przeprowadzonej próby biologicznej przy użyciu zwierząt doświadczalnych dla oceny inwazyjności, wirulencji i zmian patologicznych wywoływanych w tkankach przez izolowane patogeniczne szczepy pełzaków. Szczególnego podkreślenia wymaga podjęcie się wykonania przez Autora bardzo trudnego i pracochłonnego zagadnienia izolacji i identyfikacji pełzaków ze środowiska naturalnego aglomeracji poznańskiej oraz od osób chorych, za pomocą nowatorskich i referencyjnych technik molekularnych. Bardzo starannie i profesjonalnie przeprowadzona analiza laboratoryjna, wymagająca znacznego doświadczenia analitycznego Doktoranta oraz doskonałej, praktycznej znajomości zastosowanych technik parazytologicznych dowodzi niezwykle zaangażowania Kandydata w Jego pracę naukowo-badawczą. Praktyczna część doświadczalna rozprawy doktorskiej i wkład Doktoranta w samodzielne wykonywanie badań laboratoryjnych jest więc szczególnym atutem ocenianego osiągnięcia naukowego.

W opisywanej klinicznej terminologii medycznej, ze względu na niepowtarzalną budowę gałki ocznej człowieka, sugerowałabym raczej unikanie używania określenia rogówka „oka” gdyż jest to tkanka, która nie występuje w organizmie w żadnym

innym narzędzie, ani układzie. Podobnie, bardziej profesjonalne jest aktualnie zastosowanie wyrażenia soczewki kontaktowe, zamiast „szkieł” kontaktowych, gdyż stosowane jeszcze przed laty twarde soczewki kontaktowe są już obecnie wyeliminowane z użycia. Poczynione przeze mnie drobne sugestie redakcyjne nie mają charakteru merytorycznego, a dotyczą jedynie dodatkowych uzupełnień natury edytorskiej, które mogą być pomocne podczas kontynuacji dalszych prac naukowo-badawczych w tym kierunku.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska wnosi istotne elementy nowatorskie w zakresie udokumentowania bezpośredniego wpływu pełzaków wolno żyjących, uznawanych dotąd za saprofityczne na powstawanie istotnych zmian patologicznych w organizmie człowieka, prowadzących niejednokrotnie do groźnych i nieodwracalnych powikłań narządowych, w tym zwiększonego ryzyka wśród wrażliwych pacjentów z osłabioną funkcją układu immunologicznego. Walory naukowe, jak i praktyczne rozprawy oceniam bardzo wysoko.

W podsumowaniu stwierdzam, iż recenzowana praca mgr biol. Marcina Cholewińskiego w pełni odpowiada kryteriom stawianym promocyjnym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych z zakresu biologii medycznej, zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 r. nr 65, poz. 595 z późn. zm). Przedkładam zatem wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie mgr biol. Marcina Cholewińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ze względu na wysoką ocenę merytoryczną osiągnięcia naukowego Doktoranta oraz wyjątkową oryginalność i nowatorstwo podjętych problemów badawczych, proponuję wytypowanie niniejszej rozprawy do jej wyróżnienia.

Z wyrazami szacunku i poważania

0053906 | Dr hab. med. Małgorzata Paul
Małgorzata Paul
medycyny męskiej i tropikalnej
parazytolog kliniczny