



dr hab. Anna Turska-Szewczuk  
Zakład Genetyki i Mikrobiologii  
Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie  
20-033 Lublin, ul. Akademicka 19

Lublin, 25.05.2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Pana Krzysztofa Puka pt.: Występowanie prątków u ryb akwariowych oraz ich wrażliwość na antybiotyki, chemioterapeutyki i ekstrakty roślinne,** wykonanej w Zakładzie Chorób Ryb i Biologii, na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie,

pod kierunkiem promotora dr. hab. Leszka Guza i promotora pomocniczego dr hab. Anety Nowakiewicz

Rodzaj *Mycobacterium* obejmuje prawie 130 gatunków prątków zarówno chorobotwórczych jak i środowiskowych. Dla odróżnienia od bezwzględnie patogennych przedstawicieli tego rodzaju - prątków gruźlicy i trądu, tworzących grupy systematyczne odpowiednio, *Mycobacterium tuberculosis* complex i *Mycobacterium leprae*, prątki środowiskowe, oportunistyczne i saprofityczne są określane jako MOTT (*ang. mycobacteria other than tuberculosis*), mykobakterie inne niż gruźlicze lub NTM (*ang. nontuberculous mycobacteria*) prątki niegruźlicze. Prątki NTM są grupą niejednorodną, wg klasyfikacji uwzględniającej tempo wzrostu oraz produkcję pigmentu, podzielono je na cztery grupy, wśród których dwie pierwsze wytwarzają barwnik a czwarta grupa skupia niechromogenne gatunki szybko rosnące. Większość gatunków prątków atypowych jest mało patogenna dla człowieka. Jednakże w ostatnim czasie, na całym świecie wzrasta liczba doniesień dotyczących zakażeń prątkami niegruźliczymi. Mycobakteriozy, których czynnikiem etiologicznym są kwasooporne prątki atypowe mogą przyjmować różne postaci kliniczne. Najczęściej zakażenie dotyczy układu oddechowego, nieco rzadziej występują infekcje obejmujące inne tkanki, m.in. węzły chłonne, tkanki miękkie i kości. Niemal wszystkie gatunki prątków niegruźliczych są zdolne do wywoływania zmian chorobowych skóry. Według doniesień światowych najczęściej od chorych izoluje się *M. avium* complex (ok. 47%), a w dalszej kolejności *M. gordonae*, *M. xenopi* i *M. fortuitum* complex (od 11-7%). Z kolei, w Polsce, około 35% wszystkich zakażeń stanowi *M. kansasii*. Do grupy podwyższonego ryzyka zachorowań na mycobakteriozy należą osoby z uogólnionymi zaburzeniami odporności, w przebiegu różnych chorób, jak i z ciężkimi niedoborami immunologicznymi, np. w przypadku nabytego zespołu niedoboru



odporności (AIDS). Zwiększone ryzyko zachorowań dotyczy także osób ze współistniejącymi chorobami układu oddechowego. Obecnie wiadomo, że prątki atypowe wywołują także choroby u osób immunologicznie kompetentnych.

Szczególną grupę ryzyka infekcji mykobakteriami NTM, ze względu na występowanie prątków w wodzie (także chlorowanej) oraz ich zdolność do zakażenia ryb morskich i słodkowodnych, stanowią osoby pracujące przy połowie ryb, hodowcy i akwaryści, osoby uprawiające sporty wodne, jak również korzystający z kąpielisk i basenów.

Temat podjęty przez Doktoranta Pana Krzysztofa Puka dotyka zatem ważnego problemu, infekcji prątkami niegruźliczymi ryb akwariowych, które to zakażenia przyczyniają się do poważnych strat u hodowców. Prątki atypowe, jak wskazują badania prowadzone w wielu krajach, stanowią także zagrożenie dla dzieci i osób dorosłych zajmujących się akwarystyką, zwłaszcza dla tych z dysfunkcjami układu odpornościowego. Leczenie mykobakterioz jest trudne i długotrwałe zarówno u ryb jak i u ludzi, u których rozpoznanie przyczyny choroby wydaje się dużo trudniejsze. Zatem w związku z rosnącą popularnością akwarystyki można spodziewać się wzrostu infekcji u ludzi prątkami niegruźliczymi, których źródłem są ryby ozdobne.

W obliczu tego problemu, temat badań podjęty przez Doktoranta, który dotyczy częstości występowania prątków niegruźliczych u ryb akwariowych oraz ich wrażliwości na terapeutyki i aktywne substancje ekstrahowane z roślin, jest ważny i aktualny.

Przedstawiona do oceny praca została napisana w języku polskim i ma układ typowy dla większości prac eksperymentalnych, liczy łącznie 129 stron, zawiera 11 rycin oraz 42 tabele. Doktorant zastosował ogólnie przyjęty sposób podziału rozdziałów, tj. „Wstęp”, „Założenia i Cele pracy”, „Materiał i Metody”, „Wyniki”, „Dyskusja”, „Wnioski”, „Streszczenie” (w języku polskim i angielskim) oraz „Piśmiennictwo”.

Tytuł pracy: Występowanie prątków u ryb akwariowych oraz ich wrażliwość na antybiotyki, chemioterapeutyki i ekstrakty roślinne, brzmi poprawnie. Zwracam jednak uwagę, że praca dotyczy prątków niegruźliczych i w tytule należało to wskazać.

Rozprawę rozpoczyna 23 stronicowy Wstęp, który składa się z 6 rozdziałów. W pierwszym z nich Doktorant przedstawił krótką charakterystykę rodzaju *Mycobacterium* z uwzględnieniem obowiązującego podziału na grupy. W drugim rozdziale wymienił podstawowe testy diagnostyczne mające zastosowanie w identyfikacji prątków do gatunku. Następnie omówił czynniki etiologiczne mykobakteriozy ryb oraz scharakteryzował objawy infekcji. Zmiany anatomopatologiczne u ryb przedstawił na 6 ilustracjach (Ryc. 1 a-f). W tym miejscu chcę zaznaczyć, że nie znalazłam informacji dotyczącej źródła pochodzenia zdjęć czy stanowiły one część kolekcji własnej Autora czy zostały zaczerpnięte z literatury. W czwartym i piątym, najbardziej obszernych rozdziałach Wstępu, Doktorant omówił odpowiednio, zjawisko oporności niegruźliczych prątków na antybiotyki



i chemioterapeutyki oraz scharakteryzował substancje aktywne roślin o właściwościach przeciwpłatkowych. W ostatnim rozdziale przedstawił chorobotwórczość niegruźliczych prątków NTM dla człowieka.

Informacje zawarte we Wstępie, którego myślą przewodnią są mykobakterie, zostały ułożone logicznie i prowadzą czytelnika do podjętego celu naukowego.

Uważam, że w pierwszym rozdziale Wstępu Doktorant powinien był umieścić rysunek przedstawiający schemat budowy ściany komórkowej prątków, która jest strukturą powierzchniową bakterii odgrywająca istotną rolę w jej interakcjach z komórką eukariotyczną, decydująca o chorobotwórczości oraz oporności na leki. Stanowi także ważne miejsce docelowe dla leków prątkobójczych i prątkostatycznych. Podczas gdy Doktorant wyraźnie zaakcentował problematykę dotyczącą oporności prątków na terapeutyki zbyt ogólnie potraktował zagadnienie dotyczące molekularnych metod diagnostycznych wykorzystywanych do identyfikacji mykobakterii do gatunku. Ponadto, w zdaniu na str. 7 zastosował żargon laboratoryjny: „...zamplifikowane fragmenty genów są następnie poddawane enzymatycznemu cięciu...”, który powinien być zastąpiony sformułowaniem „...poddawane trawieniu przy udziale enzymów restrykcyjnych (endonukleaz)”.

Proszę Doktoranta o uzupełnienie: na czym polega identyfikacja prątków metodą spektrometrii mas MALDI-TOF. Jakie struktury komórkowe są porównywane oraz czy metoda ta pozwala na klasyfikację prątków tylko do rodzaju czy także do gatunku?

„Cel pracy” został sformułowany jako „Założenia i cele pracy”. Na początku tego rozdziału Doktorant wyjaśnia przyczyny, dla których zostały podjęte badania oraz formułuje trzy, w mojej ocenie, cele szczegółowe. Zabrakło tutaj ogólnego celu badań, który mógłby brzmieć np. Badanie częstości występowania niegruźliczych prątków NTM u ryb ozdobnych oraz określenie ich wrażliwości na terapeutyki i związku pochodzenia roślinnego.

W kolejnym rozdziale pracy opisano wykorzystany materiał oraz zastosowane metody badawcze. W tym miejscu należy podkreślić, że Doktorant pobrał do badań łącznie 408 próbek, od 136 ryb akwariowych, dla których wykonał bakterioskopię oraz posiewy na podłoże diagnostyczne. Zważywszy na rozmiar niektórych obiektów nie było to z pewnością łatwe. Na badania Doktorant uzyskał zgodę Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (pozwolenie nr 1/2015). W niniejszym rozdziale najdokładniej została przedstawiona metodyka dotycząca oznaczania wartości minimalnych stężeń hamujących dla terapeutyków i ekstraktów roślinnych.

Mam dwie uwagi, pierwszą dotyczącą sposobu zapisu nazwy genu (tytuł podrozdziału 3.2.4, str. 32 oraz w tekście Rozprawy). Według powszechnie przyjętych reguł nazwy genów powinny być zapisane w postaci kodu trzyliterowego, małą literą i kursywą bez spacji, z kolei nazwy białek prostą czcionką i pierwszą z nich wielką literą np. *hsp65* vs Hsp65.

Moja druga uwaga dotyczy sformułowania, które znalazło się w ostatnim paragrafie rozdziału 3.3, na str. 34, dotyczącym opisu metody użytej do analizy ekstraktów roślinnych „...Analizę składu



badanych ekstraktów przeprowadzono w chromatografii gazowej...”, tak naprawdę zastosowano tutaj technikę GC-MS, w której chromatograf gazowy jest sprzężony z detektorem mas. Doktorant powinien być umieścić informację o typie detektora, w który wyposażony jest chromatograf gazowy (prawdopodobnie detektor FID czyli płomieniowo-jonizacyjny lub inny) oraz podać sekwencję zapisu programu temperaturowego, który zastosowano aby rozdzielić na kolumnie GC składniki mieszanin ekstraktów roślinnych. Należało także podać wersję biblioteki NIST, której baza widm masowych pozwoliła na zidentyfikowanie składników w badanych ekstraktach roślinnych.

Wyniki Doktorant przedstawił w sposób szczegółowy i staranny, dokumentując je 32 tabelami i 8 rycinami.

Na pierwszym etapie badań przeprowadzono izolację prątków NTM od ryb akwariowych. Za najważniejsze obserwacje poczynione w tej części pracy należy uznać, to że (i) metoda posiewów na podłoże mikrobiologiczne okazała się metodą badawczą znacznie dokładniejszą w porównaniu do bakterioskopii (podobne wyniki uzyskuje się przy izolacji prątków *M. tuberculosis* complex); (ii) prątki izolowano najczęściej od ryb akwariowych należących do rodzin guramiowate, zbrojnikowate, karpowate i pielęgnicowate; (iii) ryby ozdobne stanowią istotny rezerwuwar prątków niegruźliczych, które mogą być chorobotwórcze dla człowieka.

Drugi etap pracy dotyczył identyfikacji prątków NTM na podstawie porównania sekwencji nukleotydowej fragmentu genu dla białka szoku cieplnego o masie 65 kDa (Hsp65) z tymi dostępnymi w bazie danych GenBanku. Należy podkreślić, że zastosowana technika (ze względu na większą zmienność sekwencji genu *hsp65* niż genu kodującego 16S rRNA u prątków) umożliwiła zidentyfikowanie wszystkich izolatów *Mycobacterium* do gatunku a uzyskane sekwencje zostały zdeponowane w banku genów.

Czy Doktorant mógłby odnieść się i porównać zdolność rozdzielczą metod molekularnych sekwencjonowania genów *hsp65* i *rpoB* (podjednostki  $\beta$  polimerazy RNA) w porównaniu do analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR-RFLP) wspomnianych genów, w weryfikowaniu przynależności prątków NTM do gatunku?

Uzyskane w pracy wyniki wskazują, że prątki niegruźlicze najbardziej rozpowszechnione u ryb ozdobnych, na badanych obszarze, reprezentują gatunki: *M. marinum* (33,33%), *M. chelonae* (16,16%), *M. gordonae* (15,15%), *M. peregrinum* (12,12%) i *M. fortuitum* (10,1%). Spośród nich identyfikuje się szczepy patogenne zarówno dla ryb jak i dla człowieka.

W tym miejscu chciałam zapytać Doktoranta czy wyizolowane prątki NTM charakteryzują się podobnym potencjałem epidemiologicznym, które z nich, ze względu na profil wirulencji i lekooporności, mogą być najgroźniejsze dla człowieka.

Wyniki trzeciego etapu badań, który miał na celu zbadanie wrażliwości wyizolowanych prątków na antybiotyki i chemioterapeutyki oraz określenie aktywności przeciwaprątkowej ekstraktów



roślinnych, zostały przedstawione w postaci dobrze opracowanych graficznie tabel. Ułatwiło to prześledzenie uzyskanych dla terapeutyków i ekstraktów wartości minimalnych stężeń hamujących oraz porównanie ich pomiędzy szczepami prątków NTM. Wykonane badania wykazały, że większość szczepów prątków niegruźliczych była wrażliwa na amikacynę, kanamycynę, klarytromycynę, cyprofloksacynę i sulfametoksazol. Podczas gdy ryfampicyna i izoniazyd były nieaktywne a doksycyklina hamowała wzrost prątków wolno rosnących.

Badane w pracy ekstrakty roślinne z brodziuszki wiechowatej (*A. paniculata*), krwawnika pospolitego (*A. millefolium*), berberysu zwyczajnego (*B. vulgaris*), dziewięcisiła bezłodygowego (*C. acaulis*), tojeści pospolitej (*L. vulgaris*), cząbrzu ogrodowego (*S. hortensis*) i tymianku pospolitego (*T. vulgaris*) okazały się źródłem związków takich jak sterole, alkaloidy, fenole, terpeny i chinony, o właściwościach bakteriobójczych włączając aktywności przeciwpłatkowe. Najaktywniejsze w tym względzie okazały się ekstrakty chloroformowe dziewięcisiła bezłodygowego, heksanowe i etanolowe brodziuszki wiechowatej, wodne jak i organiczne berberysu zwyczajnego oraz heksanowe cząbrzu ogrodowego i tymianku.

Mam pytanie czy związki zawarte w ekstraktach identyfikowano tylko w oparciu o widma rozpadu masowego zgromadzone w bibliotece NIST czy może wykorzystano także widma fragmentacyjne dla substancji wzorcowych?

W Tabelach 35-39, w których przedstawiono skład substancji wykrytych w ekstraktach roślinnych, należało podać wartości współczynnika dopasowania Match Factor, który określa stopień podobieństwa widm mas badanych substancji do tych umieszczonych w bibliotece NIST. Ewentualnie należało zaznaczyć jaki procent związków identyfikowano w oparciu o wysokie wartości współczynnika dopasowania, MF.

Proszę Doktoranta o opinię, który z przebadanych ekstraktów roślinnych budzi największe nadzieje na zastosowanie w terapii mykobakterioz u ryb akwariowych oraz w jakiej postaci mógłby zostać podany aby było możliwe osiągnięcie najlepszego efektu terapeutycznego?

Uzyskane wyniki podsumowano i omówiono rzeczowo w rozdziale Dyskusja, odnosząc je do dostępnych danych literaturowych. Bibliografia rozprawy jest bardzo obszerna i liczy łącznie 292 pozycje. Stanowi dobry przegląd aktualnej literatury światowej. Rozprawę zamyka streszczenie w języku polskim i angielskim, podsumowujące przedstawione w pracy dokonania.

Rozprawa została napisana poprawnym i zrozumiałym językiem naukowym. Nieliczne błędy edytorskie nie mają wpływu na jakość pracy.

Rozprawa jest oryginalnym dorobkiem Autora. Lek. wet., Pan Krzysztof Puk wykazał się umiejętnością formułowania i rozwiązywania postawionego problemu badawczego. W mojej opinii osiągnął zamierzone cele, co wskazuje, że jest przygotowany do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.



### Podsumowanie

Wartość naukowa przedstawionej pracy doktorskiej wiąże się ze znaczącym wzbogaceniem wiedzy na temat częstości występowania niegruźliczych prątków u ryb ozdobnych, ich wrażliwości na terapię i aktywne metabolity wtórne roślin. Jest to pierwsze takie opracowanie. Co warto podkreślić, Doktorant dostrzega możliwość kontynuowania podjętej pracy naukowej i wyraźnie kreśli plany na przyszłość. Jego zamierzeniem jest zbadanie mechanizmów działania substancji zawartych w ekstraktach roślinnych w powiązaniu z ich aktywnością przeciwprątkową.

Uważam, że rozprawa doktorska lek. wet., Pana Krzysztofa Puka całkowicie spełnia warunki stawiane pracom doktorskim, zawarte w Ustawie z dnia 18.03.2011 r. o stopniach naukowych i tytułach naukowych. Wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pana Krzysztofa Puka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość naukową przeprowadzonych badań oraz opublikowanie części z nich w uznanym periodyku naukowym (*Journal of Fish Diseases*), wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.



dr hab. Anna Turska-Szewczuk

