

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Dariusza Stanisława Jarycha pt. „Molekularne analizy genomowe patogennych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli*”

Praca doktorska mgr inż. Dariusza Stanisława Jarycha, wykonana w Pracowni Genetyki Molekularnej, Instytut Biologii Medycznej PAN w Łodzi pod kierunkiem prof. dr hab. Pawła Parniewskiego i dr inż. Marty Majchrzak, ma postać obszernej monografii (170 stron), opracowanej bardzo starannie i zgodnie z wymogami przyjętymi dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk medycznych. Przed przystąpieniem do właściwej recenzji pracy doktorskiej sprawdziłem, czego można dowiedzieć się na temat Kandydata w bazie PubMed. Znalazłem dwie publikacje, pod nazwiskiem Jarych z inicjałem D., które można przypisać Autorowi pracy doktorskiej, z których dwie mają tytuły odpowiadający zakresowi badań opisanych w pracy doktorskiej. Pierwsza z nich dotyczy interpretacji numerycznej wyników profilowania szczepów *Escherichia coli* z wykorzystaniem metody TRS. Praca ta została opublikowana w 2019 roku w czasopiśmie *Molecular Biology Reports*. Mgr inż. Dariusz Jarych jest również współautorem drugiej pracy opublikowanej w 2021 roku w czasopiśmie *Scientific Reports*, w którym zamieszczono również wyniki eksperymentalne recenzowanej pracy doktorskiej. Tematyka pozostałych 10 prac nie jest bezpośrednio związana z recenzowaną pracą doktorską. Jest to bardzo dobry start jak na początek kariery naukowej i po lekturze pracy doktorskiej jestem pewny, że p. mgr inż. nie będzie miał problemów z utrzymaniem dotychczasowego tempa rozwoju naukowego. Dane uzyskane za pośrednictwem bazy PubMed znaczą, że badania zostały już pozytywnie zweryfikowane przez co najmniej czterech zewnętrznych recenzentów. Nie zwalnia mnie to z obowiązku rzetelnej pracy recenzenta.

Tematyka i cele recenzowanej pracy doktorskiej mieszczą się w głównym kierunku badań podstawowych prof. dr hab. Pawła Parniewskiego i Jego współpracowników z Pracowni Genetyki Molekularnej PAN w Łodzi dotyczącym szeroko rozumianej epidemiologii molekularnej w obszarze epidemiologii chorób zakaźnych. Pan mgr inż. Dariusz Jarych podjął badania zmierzające do ulepszenia techniki TRS-PCR wykorzystywanej do różnicowania patogennych dla człowieka

szczepów *Pseudomonas aeruginosa* i *E. coli*. W pracy brakuje uzasadnienia podjęcia tematu, tym niemniej na podstawie lektury Wstępu i Założeń i celu pracy wydedukowałem, że patogenne bakterie *P. aeruginosa* i *E. coli* wykazują duży potencjał epidemiologiczny i są źródłem zakażeń zagrażających życiu. Aby móc opracować i wdrożyć skuteczne strategie prewencyjne, konieczne jest głębsze zrozumienie obecnej epidemiologii inwazyjnych zakażeń wywoływanych przez te gatunki bakterii. Do niedawna podstawą działań epidemiologicznych były metody różnicowania patogennych dla człowieka szczepów *P. aeruginosa* i *E. coli* oparte na analizie cech fenotypowych. Niestety techniki typowania fenotypowego mają ograniczoną zdolność różnicowania szczepów oraz są czasochłonne, pracochłonne i kosztowne. Zastąpienie metod fenotypowych metodami molekularnymi opartymi na reakcji PCR pozwoliło przede wszystkim na skrócenie czasu wykonywania analiz i drastyczne zmniejszenie ich kosztów i pracochłonności. Należy w tym miejscu dodać, że metody molekularne różnicowania szczepów różnią się między sobą siłą dyskryminacji i istotną rzeczą jest ich odpowiedni, dopasowany do celu badań wybór. Stąd, podzielam pogląd Doktoranta przedstawiony w recenzowanej pracy, że spośród kilkunastu dostępnych metod molekularnych wyróżnia się technika TRS-PCR i jej ulepszenie pozwoli na stworzenie narzędzia do szybkiego i wydajnego genotypowania szczepów klinicznych, które będzie się charakteryzować lepszymi parametrami takimi jak powtarzalność i siła różnicowania od pozostałych. Myślę, że obrona pracy doktorskiej mgr Dariusza Stanisława Jarycha będzie dobrym forum na porównanie mojej i Jego wizji Uzasadnienia podjęcia tematu. Dwa jednoznacznie sformułowane cele pracy uznaję za ważne i w pełni uzasadnione w świetle danych literatury światowej przedstawionych w części teoretycznej (Wstęp). Postanowiono bowiem, po pierwsze, ulepszyć metodę TRS-PCR w celu jak rozumiałem dopasowania jej do różnicowania patogennych szczepów *P. aeruginosa* i *E. coli*. Po drugie, przeprowadzono analizę porównawczą nowej techniki z technikami wykorzystywanymi rutynowo do różnicowania tych gatunków bakterii.

Z dużym zainteresowaniem przeczytałem dobrze skonstruowany i napisany Wstęp pracy doktorskiej mgr Dariusza Stanisława Jarycha. Wstęp ten można podzielić na dwie części – poświęcone kolejno dwóm gatunkom analizowanym badanym w pracy: *P. aeruginosa* i *E. coli* oraz

przeglądzie metod różnicowania bakterii. W pierwszej części Autor opisuje w kolejnych podrozdziałach charakterystykę *P. aeruginosa* i *E. coli* i zakażenia z udziałem tych dwóch gatunków bakterii. W świetle cytowanych w tych podrozdziałach wyników osiągniętych przez innych autorów jednoznacznie wynika, że bakterie te stanowią poważny problem epidemiologiczny i określenie powiązań epidemiologicznych jest niezbędne w celu ograniczenia zakażeń w myśl zasady głoszącej, że lepiej jest zapobiegać niż leczyć.

W drugiej części Wstępu mgr Dariusz Stanisław Jarych przedstawił aktualną wiedzę na temat metod różnicowania *P. aeruginosa* i *E. coli*. W poszczególnych podrozdziałach Doktorant opisał wykorzystywane w diagnostyce epidemiologicznej metody typowania fenotypowego i molekularnego. Jak się okazuje istnieje szereg technik typowania wykorzystujących rozmaite markery bakteryjne. Stąd wybór najlepszej techniki do postawionych celów nie jest sprawą prostą. Z nieznanymi mi przyczyn Doktorant podzielił metody typowania molekularnego na metody analizy białek i metody molekularne, prawdopodobnie dlatego, że do drugiej grupy zaliczone zostały tylko metody oparte na analizie markerów genetycznych. Po przestudiowaniu tego podrozdziału lepiej zrozumiałem, że poszukiwanie idealnej techniki różnicowania jest w pełni uzasadnione. Najlepszą techniką różnicowania jest, jak przyznaje Autor recenzowanej pracy doktorskiej sekwencjonowanie całych genomów. Zgadzam się z tą opinią, zgadzam się również, że jest to niestety technika czasochłonna i kosztochłonna. Stąd, projekt badań realizowany w pracy oceniam bardzo pozytywnie zarówno w perspektywie skali podjętych badań, jak też nowych wyzwań odważnie podjętych przez Promotora i Doktoranta, stanowiących kontynuację badań nad różnicowaniem bakterii prowadzonych od lat w Pracowni Genetyki Molekularnej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi. Mój niedosyt budzi brak KRYTYCZNEGO porównania opisywanych metod oraz pominięcie niektórych nowych metod różnicowania (np. metody CRISPR).

Materiał do badań stanowiły kolekcje patogennych szczepów klinicznych *E. coli* i *P. aeruginosa* opisane przez Doktoranta w podrozdziałach 6.1.1 i 6.1.2. Mam tylko dwa pytania dotyczące zastosowanych metod technik badawczych, opisanych skrupulatnie na 15 stronach pracy,

obejmujących różnorodne metody mikrobiologiczne, biologii molekularnej i bioinformatyki. Profesjonalne przedstawienie stosowanych metod jest najlepszym potwierdzeniem, że Autor opanował bogaty warsztat metodyczny. Co oznacza symbol (N)₆ w sekwencji starterów do techniki TRS-PCR? Czy są to dowolne nukleotydy i losowo Autor wybrał i zastosował jeden z możliwych 4096 kombinacji, czy też w tej technice stosuje się mieszaninę wszystkich możliwych kombinacji sekwencji sześci nukleotydowej? Nie jest również jasne na czym polega unikalność schematu klasyfikacji klas TRS-PCR, w jaki sposób ta klasyfikacja została dokonana i jakie było kryterium doboru szczepów do oceny powtarzalności metody TRS-PCR.

Po przestudiowaniu części teoretycznej i celów pracy mgr inż. Dariusza Stanisława Jarycha, w szczególności zaś po zapoznaniu się z warsztatem badawczym i metodami praktycznej realizacji założonych celów - przystąpiłem do studiowania rezultatów całej pracy w oczekiwaniu na interesujące wnioski końcowe. W pierwszej części rozdziału Wyniki Doktorant przedstawił uzyskane wyniki dotyczące analiz różnicowania szczepów *E. coli* a w drugiej *P. aeruginosa*. Badania te przeprowadził z użyciem kilku narzędzi bioinformatycznych oraz metod zaliczanych do kanonu genetyki takich jak PCR i rozdział fragmentów DNA za pomocą technik elektroforetycznych w żelu agarozowym. Wyniki przeprowadzonych badań zaprezentowane zostały w formie 11 złożonych rycin (nie rysunków!) oraz sześciu zestawień tabelarycznych. Na ich podstawie Autor wskazuje na większą siłę różnicowania ulepszonej techniki TRS-PCR w porównaniu do rutynowo stosowanych metod MLST i VNTR-MLVA tym samym potwierdzając słuszność swoich wcześniejszych założeń. Doceniając ogrom pracy włożony w opracowanie i analizę wyników różnicowania szczepów *E. coli* i *P. aeruginosa* za pomocą trzech różnych metod uważam, że uzyskane wyniki wnoszą nowe informacje do dyskusji na temat molekularnych metod typowania patogenów bakteryjnych. Do wyników, które dla mnie biologa są najważniejsze, oryginalne i okazały się warte publikacji w „rankingowym” czasopiśmie naukowym zaliczam wykazanie, że nowa metoda analiz profili TRS-PCR jest wysoce użyteczna w różnicowaniu szczepów klinicznych *E. coli* oraz *P. aeruginosa*, oraz wykazuje większą zdolność różnicowania izolatów niż rutynowo stosowane schematy oparte na analizie markerów MLST i MLVA. Opis wyników poszczególnych eksperymentów został

przedstawiony rzeczowo, a ich staranna dokumentacja nie budzi moich zastrzeżeń. Cztery wnioski sformułowane są jasno i są rzeczywiście wnioskami, które Autor wyciąga na podstawie uzyskanych danych a nie wypunktowanym skrótem wyników. Zgodnie z definicją zamieszczoną w Słowniku Języka Polskiego wniosek to twierdzenie wyprowadzone ze zdań uznanych za prawdziwe. Tym samym użycie trybu przypuszczającego w piątym wniosku (który zgodnie z numeracją Autora jest wnioskiem nr 2) dyskwalifikuje to zdanie jako wniosek. Zwięzła dyskusja wyników w odniesieniu do dobrze dobranej literatury naukowej, przeprowadzona jest we właściwy sposób z wyłączeniem Tabel 21 i 22 oraz ich opisów. W mojej ocenie porównanie wartości współczynników różnicowania należy zaliczyć do wyników i jako takie tabele wraz z opisami powinny być zamieszczone w stosownym rozdziale. W zakończeniu oceny dodam, że Autor w części teoretycznej oraz w dyskusji cytuje ponad 148 pozycji literatury światowej, w dużej części prac opublikowanych w latach 2010 - 2020.

Ponieważ z założenia recenzent tropi niedociągnięcia, błędy etc. dlatego poniższy fragment recenzji skupia się na tych właśnie sprawach.

- Podsumowanie według słownika synonimów i wyrazów bliskoznacznych to synonim Streszczenia – nie rozumiem idei stojącej za umieszczeniem dwóch podobnych rozdziałów będących ujętą krótko i zwięźle treścią Doktoratu.
- Ryciną (ryc.) (a nie Rysunkiem – rys.!) można nazwać w pracy drukowanej wszystko poza tekstem i tabelami, a więc rysunek, wykres, schemat ale także fotografię czy fragment zapisu (np. elektrokardiograficznego) przygotowany do publikacji. Również podstawową zasadą obowiązującą dla tabel i rycin jest ich niezależność od tekstu, czyli możliwość zrozumienia istoty tabeli czy ryciny bez konieczności wczytywania się w tekst pracy.
- Odsyłanie czytelnika do treści zawartych na stronach o większym numerze niż bieżąca nie ułatwia czytelnikowi zrozumienia „co Autor miał do przekazania”.

- W jaki sposób wyliczono określenie wartości powtarzalności dla metody CAC-PCR dla *E. coli*? Wyliczając średnia na podstawie danych zamieszczonych na stronie 74 otrzymałem inną wartość niż Autor (96 vs 95). Jest to o tyle istotne, że na podstawie tej wartości przeprowadzono dalej różnicowanie szczepów UPEC.
- Dlaczego Autor niekonsekwentnie określa wartość powtarzalności dla metody TRS-PCR dla *E. coli* i *P. aeruginosa*? W pierwszym przypadku do oceny były wykorzystywane 3 powtórzenia, w drugim cztery. Biorąc pod uwagę silny wątek metodyczny obecny w recenzowanej pracy doktorskiej oczekiwałbym co najmniej 3 powtórzeń z trzech różnych eksperymentów oraz dodatkowe analizy obejmujące wpływa takich parametrów na wyliczone wartości jak stężenie żelu, rodzaj użytej agarozы, wielkości aparatury do elektroforezy, czasu i warunków rozdziału etc.
- Co oznacza zwrot „najbardziej różnicujące” na str. 89. Oceniając metodą wzrokową dla mnie najbardziej różnicujący jest wynik dla N6(GAC)4. Czy Autor jest w stanie poprzeć swój pogląd dotyczący najbardziej różnicującej metody TRS-PCR dla szczepów *P. aeruginosa* wnioskowaniem statystycznym?
- Czy wybierając inne izolaty *P. aeruginosa* do opracowania testów TRS-PCR do różnicowania kolekcji *P. aeruginosa* nie otrzymano by innych wyników?
- Czemu Autor nie używa skorygowanego współczynnika Wallace'a? Jest on zalecany, ponieważ pozwala wyeliminować przeszacowanie jednokierunkowej zgodności między metodami typowania.
- Jaki test statystyczny został wykorzystany do porównania indeksu różnicowania? Wyliczone indeksy różnicowania w większości przypadków różnią się między sobą marginalnie i trudno jest jednoznacznie określić czy np. różnica 0,0353 jest istotna i upoważnia Autora do twierdzenia o wyższości numerycznego testu TRS-PCR nad metodą VNTR-MLVA (Tabela 22).

Powyższe uwagi/komentarze sprowokowane oryginalnymi i ciekawymi rezultatami i równie ciekawą ich interpretacją mają charakter dyskusyjny/polemiczny i niczym nie umniejszają mojej

wysokiej oceny rozprawy doktorskiej mgr inż. Dariusza Stanisława Jarycha. W moim przekonaniu publiczna obrona pracy będzie dobrym miejscem na wymianę poglądów/dyskusję dotyczącą moich komentarzy. Wszystkie części rozprawy świadczą o wiedzy Autora i Jego dojrzałości naukowej. Uważam, że rozprawa, jest oryginalnym osiągnięciem naukowym, wnoszącym nowe dane do wiedzy o technikach różnicowania patogennych szczepów *E. coli* i *P. aeruginosa* i odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Dlatego też chciałbym złożyć wyrazy uznania nie tylko dla Doktoranta, ale i dla Promotora pracy. Wnoszę zatem do Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej PAN w Łodzi zgodnie z Ustawą o Szkolnictwie Wyższym i Nauce o dopuszczenie mgr inż. Dariusza Stanisława Jarycha do dalszych etapów postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora.

Tomasz Popiela

