



UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU
Wydział Lekarski
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Akceptuję
Klinika Okulistyki i Optometrii
Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr. Jana Bizuela
ul. Ujejskiego 75, 85-168 Bydgoszcz
tel. +48 52 3655849
koio@cm.umk.pl

prof. dr hab. n. med. Bartłomiej J. Kałużny
Klinika Okulistyki i Optometrii, Katedra Chorób Oczu
Szpital Uniwersytecki nr 2 im. dr. Jana Bizuela
ul. Ujejskiego 75, 85-168 Bydgoszcz

Bydgoszcz, dnia 25.11.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Agnieszki Piwowarczyk

pod tytułem:

„Analiza przydatności technik sekwencjonowania następnej generacji do oceny występowania czynników zakaźnych w zapaleniu wnętrza gałki ocznej”

Zapalenie wnętrza gałki ocznej (ZWGO) stanowi jedno z najpoważniejszych wyzwań terapeutycznych współczesnej okulistyki. W 92-98 % mamy do czynienia z przypadkami egzogennymi, najczęściej po operacjach zaćmy i iniekcjach doszklistkowych leków anti-VEGF. W ostatnich latach częstość występowania ZWGO po operacji zaćmy w Polsce wyniosła 0,1 % i jest wielokrotnie wyższa niż w Europie Zachodniej. ZWGO stanowi to najbardziej niebezpieczne powikłanie chirurgii okulistycznej, a rokowanie jest zdecydowanie niekorzystne. Mimo agresywnego leczenia większość oczu nie uzyskuje użytecznej ostrości wzroku, nierzadko pojawiają się wskazania do usunięcia gałki ocznej. Ponadto tradycyjne metody identyfikacji drobnoustrojów które wywołały ZWGO za pomocą hodowli okazały się mało skuteczne, głównie za względu na małą objętość próbek pobieranych z komory przedniej lub z ciała szklistego. Nowoczesne techniki sekwencjonowania następnej generacji stanowią potencjalnie znacznie lepsze narzędzie diagnostyczne w przypadkach ZWGO. W związku z powyższym, uważam że podjęta tematyka badawcza została wybrana trafnie, i stwarza możliwość poszerzenia obecnego stanu wiedzy, szczególnie zakresie etiologii ZWGO w polskiej populacji.

Przedłożona do oceny rozprawa liczy 176 stron, zawiera 7 zasadniczych rozdziałów tematycznych, opinię komisji bioetycznej oraz aneks. Rozdziały posiadają typowy układ dla rozprawy doktorskiej o charakterze badawczym. Praca jest dobrze ilustrowana za pomocą 30 rycin, zawiera 40 tabel oraz wykaz stosowanych skrótów.

KIEROWNIK
Kliniki Okulistyki i Optometrii
prof. dr hab. Bartłomiej Kałużny



Obszerny wstęp obejmuje 35 stron i stanowi dobre wprowadzenie do tematu badań. Zapoznaje czytelnika z aktualnym stanem wiedzy na temat klasyfikacji, etiologii, epidemiologii, diagnostyki, leczenia i profilaktyki ZWGO. Szczegółowo zostały przedstawione możliwości diagnostyki mikrobiologicznej, w tym nowoczesne techniki sekwencjonowania.

Głównym celem przeprowadzonych przez Doktorantkę badań jest weryfikacja kliniczna przydatności technik sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) do oceny występowania czynników zakaźnych w zapaleniu wnętrza gałki ocznej w zestawieniu z danymi uzyskanymi metodami hodowlanymi. Cztery cele szczegółowe zostały sformułowane jasno i precyzyjnie. Pozostają aktualne w świetle dotychczasowego stanu nauki i potrzeb praktyki klinicznej.

Badania zostały prawidłowo zaprojektowane i przeprowadzone. Uzyskano odpowiednią zgodę Komisji Bioetycznej. Część badań, obejmująca 33 oczy pacjentów leczonych z powodu ZWGO w latach 2013 – 2018 miała charakter retrospektywny (grupa A). W tych przypadkach wykorzystano tylko tradycyjne metody diagnostyki mikrobiologicznej. Oczy pacjentów, w liczbie 26, leczone w latach 2018 – 2022 zostały włączone do części prospektywnej, która obejmowała również techniki mikrobiologii molekularnej (grupa B). Biorąc pod uwagę relatywnie niską zachorowalność, zebrany materiał należy ocenić jako duży, wystarczający dla większości przeprowadzonych analiz. Wykorzystywane metody badawcze, zarówno hodowlane jak i wykorzystujące sekwencjonowanie II i III generacji, zostały prawidłowo dobrane i opisane. Analiza statystyczna nie budzi zastrzeżeń.

Wyniki Doktorantka przedstawiła wykorzystując 26 rycin zawierających wykresy oraz 19 tabel. Znaczna część danych statystycznych zawarta jest również w tekście. Wyniki przedstawione są w sposób przemyślany, uporządkowany i staranny. Z tabeli 29 wynika, że w przypadku 4 oczu z grupy A nie wykonano hodowli materiału ani z komory przedniej ani z ciała szklistego. Uważam że te oczy nie powinny być wyłączone do analizy. Zaprezentowane rezultaty pozwalają na realizację założonych celów badawczych, mimo że uzyskano zaskakująco wysoką częstość występowania bakterii z rodzaju *Escherichia*, co autorka wiąże z zanieczyszczeniem próbek. Wydaje się że problem ten został rozwiązany poprzez przeprowadzenie analizy statystycznej mikrobiomu bez rodzaju *Escherichia*. Pewne wątpliwości może budzić ocena statystyczna mikrobiomu w 9 postaciach klinicznych ZWGO. Zaproponowana analiza jest bardzo istotna z praktycznego punktu widzenia, jednak biorąc pod uwagę fakt że niektóre postacie kliniczne są reprezentowane przez pojedyncze przypadki, należy bardzo ostrożnie podchodzić do wnioskowania na jej podstawie.



W rozdziale Dyskusja, liczącym 30 stron, uzyskane rezultaty zostały zestawione z danymi z piśmiennictwa. Tok prowadzenia dyskusji wskazuje na dobre przygotowanie merytoryczne Doktorantki i zdolność autorki do krytycznego spojrzenia na osiągnięte rezultaty. Pozytywnie należy ocenić fakt, że autorka potrafiła wskazać najważniejsze ograniczenia badań. Obszerna część dyskusji dotyczy obecności w zdecydowanej większości próbek znacznej ilości materiału genetycznego *Escherichia fergusonii*, która najprawdopodobniej spowodowana jest kontaminacją. Autorka prawidłowo wskazuje możliwości wykorzystania wyników w praktyce klinicznej, jednak podkreśla że wyniki są trudne do jednoznacznej interpretacji, a metody wymagają dopracowania, ujednoczenia i standaryzacji.

Rozprawę charakteryzuje aktualne, dobrze dobrane i prawidłowo cytowane piśmiennictwo. Wykaz zawiera 277 pozycji, głównie anglojęzycznych.

Zwieńczeniem pracy jest 8 wniosków, które wypływają logicznie z całości rozprawy i odpowiadają celowi i założeniom pracy. Część wniosków poszerza dotychczasowy stan wiedzy, i może wypłynąć na modyfikację postępowania leczniczego, chociaż przy ich interpretacji należy pamiętać że próbki najprawdopodobniej uległy kontaminacji. Wniosek numer sześć, dotyczący różnych postaci klinicznych, powinien zostać zmodyfikowany ze względów o których pisałem powyżej.

Cała praca napisana jest poprawnym językiem naukowym, tworzy logiczną całość. Dostrzeżono tylko nieliczne błędy i niedociągnięcia edytorskie. Nie mają one jednak istotnego wpływu na merytoryczną ocenę pracy.

Podsumowując, Doktorantka dowiodła że potrafi prawidłowo zaplanować, wykonać i opracować zamierzony problem badawczy. Autorka wykazała się należytyym przygotowaniem merytorycznym, starannością i dociekliwością badawczą. Praca wzbogaca dotychczasową wiedzę na temat etiologii ZWGO oraz przydatności technik sekwencjonowania następnej generacji. W moim przekonaniu oceniana rozprawa w pełni spełnia wymogi określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018r. poz. 1669 z późn.zm.). W oparciu te przesłanki mam zaszczyt prosić o przyjęcie pracy i dopuszczenie lek. Agnieszki Piwowarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


KIEROWNIK
Kliniki Okulistyki i Optometrii
prof. dr hab. Barbara Kozłowska

