

Ocena

rozprawy Pani mgr Beaty Rozwadowskiej na stopień doktora nauk medycznych pt. „Ekspresja genów związanych z TNF i jego receptorami w zakażeniach in vitro *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* oraz *Borrelia afzelii*”

Od wielu lat obserwuje się w Europie wzrost częstości występowania, zarówno wśród ludzi jak i zwierząt, chorób przenoszonych przez kleszcze przede wszystkim: kleszczowego zapalenia mózgu, boreliozy z Lyme, ludzkiej babeszjozy i ludzkie anaplazmozy. Choroby przenoszone przez kleszcze nadal należą do grupy *emerging infectious diseases*. Mimo postępów w medycynie zapadalność na te choroby rośnie, nie tylko w Polsce, ale w całej Europie. Wpływ ma na to ma wiele różnych czynników między innymi: zmiany w środowisku otaczającym człowieka, zmiany ekonomiczne i społeczne zachodzące wśród mieszkańców określonych obszarów, zmiany w sposobie spędzania czasu wolnego w tym również podróże ze zwierzętami domowymi sprzyjające pokłuciom tych zwierząt przez kleszcze. Także obserwowane w ostatnich latach zmiany klimatyczne mają wpływ na zapadalność i geograficzne rozprzestrzenienie zachorowań na boreliozę z Lyme. Według danych Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego Państwowego Zakładu Higieny w Polsce w roku 2015 zarejestrowano 13 625 zachorowań na boreliozę, i aż 21 200 w roku 2016.

Rozpoznanie boreliozy z Lyme musi opierać się na kryteriach klinicznych, z których najważniejsze są historia pokłucia przez kleszcze i objawy kliniczne. Diagnostyka laboratoryjna opiera się na „dwuetapowym protokole diagnostycznym” polegającym na wykrywaniu swoistych przeciwciał metodą immunoenzymatyczną oraz techniką Western blot. Metody serologiczne nie pozwalają na jednoznaczne odróżnienie czynnej infekcji od stanu po przebytej boreliozie. Swoiste przeciwciała przeciwko krętkom *B. burgdorferi* s.l. są wykrywane także u osób zdrowych. Obecność więc samych przeciwciał, u osób nie prezentujących objawów chorobowych, nie jest wskazaniem do podjęcia leczenia antybiotykami.

Dlatego nadal prowadzone są badania nad możliwościami wykorzystania innych technik diagnostycznych.

Przedstawiona do oceny praca podejmuje więc bardzo ważny oraz aktualny problem współczesnej medycyny i ma istotne znaczenie praktyczne.

Rozprawa posiada układ typowy dla tego rodzaju prac naukowych. Na 108 stronach – Pani mgr Beata Rozwadowska przedstawiła, w bardzo przejrzystej formie, wszystkie części pracy, łącznie z 19 tabelami i 40 rycinami.

We wstępie Doktorantka dokonała przeglądu najnowszych danych z piśmiennictwa dotyczących charakterystyki kleszczy będących wektorem chorób infekcyjnych. Bardzo zwięźle, ale szczegółowo, w oparciu o najnowsze dane z piśmiennictwa naukowego opisała morfologię i budowę antygenową krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Bardzo wiele uwagi poświęciła szczegółowemu omówieniu obrazu klinicznego boreliozy z Lyme. Jeden z podrozdziałów wstępu jest poświęcony omówieniu zasad diagnostyki boreliozy z Lyme oraz różnych innych metod, które są lub mogłyby być pomocne w ustaleniu właściwego rozpoznania zakażenia. W sposób zwięzły i rzeczowy Doktorantka w podrozdziale poświęconym czynnikowi martwicy nowotworu TNF przedstawiła jego syntezę, budowę, funkcję jaką pełni w organizmie oraz receptory i szlaki sygnałowe tej cytokiny.

Powyższe dane z literatury zdopingowały Doktorantkę do podjęcia własnych badań nad efektami, na poziomie molekularnym, kontaktu ludzkich fibroblastów z krętkami *B. burgdorferi* s.l., oceną i znalezieniem ewentualnych zmian ekspresji genów związanych z TNF i jego receptorami w komórkach fibroblastów po zakażeniu trzema genogatunkami *B. burgdorferi* s.s., *B. garini* i *B. afzelii*.

Cel pracy jaki postawiła Doktorantka jest niezwykle ambitny i bardzo ciekawy, a konsekwencja i skrupulatność z jaką realizowała ten projekt naukowy budzi szczególny podziw i sprawia, że uzyskane wyniki są wyjątkowo cenne.

Projekt badawczy był realizowany w czterech etapach. W pierwszym Doktorantka prowadziła hodowlę prawidłowych ludzkich fibroblastów (NHDF, linia komórkowa CC – 2511) w monokulturze oraz w obecności (kokulturze) krętków *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* i *B. afzelii*. W drugim etapie pracy dokonała analizy profilu ekspresji genów w komórkach kontrolnych linii NHDF oraz komórkach zakażonych trzema genogatunkami krętków z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydowych HG-U133A. Następnie dokonała detekcji aktywności kaspazy 3 i lokalizacji DNA komórek apoptotycznych - metoda TUNEL. Ostatni etap badań obejmował analizę chromatograficzną z wykorzystaniem chromatografii ciekowej – UHPLC, chromatografii żelowej – GPC oraz analizę spektralną przy użyciu techniki MALDI-ToF.

Zastosowana analiza statystyczna uzyskanych wyników badań nie budzi zastrzeżeń.

Przeprowadzone badania wykazały istnienie różnic w ekspresji genów związanych z TNF i jego receptorami w ludzkich fibroblastach zakażonych krętkami *B. burgdorferi*. Doktorantka wykazała obecność cytokiny TNF w hodowlach NHDF zakażonych *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* i *B. garini*. Ilość tej cytokiny zależała od genogatunku krętków.

Największy wzrost produkcji cytokiny TNF stwierdzała po 24 godzinach od zakażenia linii komórkowej NHDF krętkami *B. afzelii*.

Istotnym spostrzeżeniem Doktorantki jest wykazanie, że wydłużenie czasu prowadzenia hodowli fibroblastów zakażonych *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* i *B. afzelii* z 24 godzin do 48 godzin prowadziło do zwiększeniem produkcji TNF jedynie hodowlach zakażonych *B. garinii*.

Doktorantka wykazała że w hodowlach fibroblastów NHDF zakażonych krętkami *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* i *B. afzelii* procesy programowanej śmierci komórki zachodzą bez udziału kaspazy 3.

Wykazane różnice ekspresji genów związanych z TNF i jego receptorami potwierdzają istnienie mechanizmów patogenetycznych zależnych od genogatunku krętków, co w konsekwencji może prowadzić do zróżnicowanej odpowiedzi organizmu na zakażenie poszczególnymi gatunkami krętków *B. burgdorferi*.

Bardzo istotnym spostrzeżeniem Doktorantki, możliwym do praktycznego wykorzystania w diagnostyce boreliozy z Lyme, jest stwierdzenie, że oznaczanie cytokiny TNF może być wykorzystane jako biomarker boreliozy z Lyme we wczesnym stadium. Doktorantka potwierdziła także przydatność metody ultrasprawnej chromatografii cieczowej (metod UHPLC), chromatografii żelowej (GPC) oraz analizy spektralnej MALDI ToF w diagnostyce zakażeń krętkami *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* i *B. afzelii*.

W oparciu o wykonane badania i ich wyniki Doktorantka wyciągnęła istotne wnioski naukowe, które mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w ocenie zagrożenia chorobami boreliozą z Lyme.

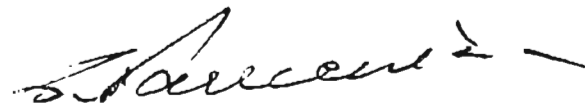
Uzyskane efekty badawcze oraz ustalone przez Doktorantkę wnioski odpowiadają postawionym celom pracy.

Bardzo trafny jest również dobór cytowanego piśmiennictwa, szczególnie tego z ostatnich lat.

Z obowiązku recenzenta pragnę zwrócić uwagę na szczególnie staranną szatę graficzną rozprawy, przejrzyste zestawienia tabelaryczne i graficzne uzyskanych wyników badań. Nieliczne niezręczności w tekście i błąd znajdujący na stronie 20 (powinno być *Treponema pallidum* a nie *Trypanosoma pallidum*) nie umniejszają wartości dysertacji i mam nadzieję, że zostaną usunięte przy przygotowaniu pracy do druku.

Wnoszę przeto do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Beaty Rozwadowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Białystok 25 października 2017 roku.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'S. Arcus', with a horizontal line extending to the right.