

Prof. zw.dr hab.n.med. Andrzej Wiczowski

Piekary Śląskie 27.10.2017

Akademia Techniczno-Humanistyczna

Wydział Nauk o Zdrowiu

Katedra Zdrowia Publicznego

Bielsko-Biała

Ul. Willowa 2

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Beaty Rozwadowskiej pt. Ekspresja genów związanych z TNF i jego receptorami w zakażeniach *in vitro Borrelia burgdorferi sensu stricto, Borrelia garinii oraz Borrelia afzelii* wykonanej pod kierunkiem dr hab. Krzysztofa Jasika.

Wzrost liczby zachorowań na boreliozę w ostatnich latach jest zaskakujący, wg. danych przytoczonych przez Doktorantkę w latach 2015-16 wykryto o 60 % więcej przypadków boreliozy. Wynika to najprawdopodobniej z lepszej znajomości objawów i patologii tej krętkowicy oraz łatwiejszego dostępu do badań laboratoryjnych. W procesie zakażenia udział biorą głównie trzy genogatunki *Borrelii*, które wykazują różne powinowactwo narządowe i nieco odmienny przebieg choroby. Stąd bardzo interesujące podejście Doktorantki do patogenezy choroby polegające na analizie roli czynnika martwicy nowotworów TNF w zakażeniu poszczególnymi genogatunkami *Borrelii*. Na rycinie 4 bardzo czytelnie przedstawiony został udział TNF w aktywowaniu szlaku reakcji zapalnej i proliferacji oraz szlaku apoptoz, co pozwoliło później na przyjęcie założenia o możliwości zróżnicowanej reakcji na zakażenie poszczególnymi genogatunkami.

Wstęp pracy liczy 17 stron informacji na temat klasyfikacji *Borrelii*, ich struktury antygenowej oraz boreliozy i jej przebiegu. Przedstawiona została też zalecana diagnostyka laboratoryjna choroby i najnowsze metody diagnostyczne. Na zakończenie Wstępu Doktorantka omawia znaczenie czynnika TNF i jego receptorów w patogenezie chorób infekcyjnych. Uważam, że w rozdziale Dyskusja poruszane tematy zmienności morfologicznej, antygenowej i tzw. kamuflażu przestrzennego *Borrelii* powinny znaleźć się we

Wstępie. Omawiane w Dyskusji są również trudności diagnostyczne i poszukiwanie nowych metod laboratoryjnych oceny przebiegu boreliozy, należą także do zagadnień które można byłoby umieścić we Wstępie w rozdziale dotyczącym innych metod diagnostycznych. Po włączeniu w/w części Dyskusji do Wstępu spełni on moim zdaniem wymagania wprowadzenia w zakres zagadnień, które są przedmiotem badań Doktorantki.

Założenia i cele pracy są ważnym etapem rozprawy doktorskiej, Autorka skupiła się na przedstawieniu braku dostatecznie zadawalających metod diagnostycznych i stwierdziła, że celem pracy jest podjęcie niestandardowych badań nad efektami kontaktu ludzkich fibroblastów z krętkami z rodzaju *Borrelia*. Jednocześnie na zakończenie tego rozdziału stwierdza, że problemem badawczym jest obserwacja zmiany profilu ekspresji genów związanych z TNF i jego receptorami w komórkach fibroblastów pod wpływem zakażenia oraz ocena efektów zmian na poziomie transkryptomu i białek.

Cele pracy są bardzo ambitne i szeroko zaplanowane, jak wynika z ryciny 5 schematu postępowania z materiałem badanym zadaniami jakie postawiła sobie Doktorantka są: analiza ekspresji genów związanych z TNF i jego receptorami na szlaku apoptotycznym i prozapalnym, potwierdzenie obecności i syntezy TNF oraz ocena jego zawartości w hodowlach fibroblastów aktywowanych poszczególnymi genogatunkami i wykazanie aktywności apoptotycznej poprzez oznaczenie aktywności kaspazy 3 i obecności DNA w płynie hodowlanym.

Aby zrealizować tak postawione zadania Doktorantka posłużyła się czterema bardzo nowoczesnymi metodami badawczymi tj. metodą mikromacierzy oligonukleotydowej HGU-133A dla wykazania ekspresji poszczególnych genów. Za pomocą chromatografii żelowej i cieczowej oraz analizy spektralnej MALDI wykazała obecność i stężenie TNF, a metodą TUNEL i mikroskopii fluorescencyjnej wykazała aktywność kaspazy 3 i zlokalizowała w hodowlach fibroblastów obecność komórek apoptotycznych. Przeprowadzenie badań wymagało założenia hodowli fibroblastów i *Borrelia* z gatunków *Borrelia burgdorferii s.s.*, *Borrelia afzeli* i *Borrelia garini* oraz prowadzenia kokultur bakterii i fibroblastów. Wymienione badania są wysoce specjalistyczne i wymagają zastosowania specjalnego aparatu statystycznego w opracowywaniu wyników. Doktorantka korzystała z pomocy pracowników Katedry Biologii

Molekularnej Wydziału Farmaceutycznego ŚUM, Katedry Histologii i Embriologii Zwierząt Wydziału Biologii oraz Zakładu Biometrii UŚ w Katowicach. Poszczególne techniki są dokładnie opisane w pracy co wskazuje na to, że Doktorantka szczegółowo zapoznała się z nimi i wykazuje ich pełną znajomość. Metody badań omówione w pracy ilustrowane są dobrymi schematami i zdjęciami dokumentującymi sposób przeprowadzenia badań.

Rozdział Wyniki to 33 strony tekstu, tabel, zdjęć i wykresów dokumentujących otrzymane wyniki. Niezmiernie interesująca jest analiza molekularna wskazująca, które geny uległy aktywacji a które wyciszeniu, wykazano także istnienie różnic w ekspresji grup genów między hodowlami fibroblastów bez bakterii i z dodatkiem bakterii oraz pomiędzy kokulturami fibroblastów z poszczególnymi genogatunkami bakterii. Doktorantka wykazała małą aktywność kaspazy 3 w preparatach badanych metodą mikroskopii fluorescencyjnej natomiast obserwowano dużą aktywność apoptotyczną metodą TUNEL w preparatach z kokulturami w porównaniu do hodowli kontrolnej. Analiza chromatograficzna medium hodowlanego z hodowli mieszanych w porównaniu do hodowli kontrolnych wykazała wzrost stężenia TNF w hodowlach mieszanych. Badania przeprowadzono w próbkach 24 i 48 godzinnych hodowli. Najwyższe stężenie TNF w pierwszej dobie wystąpiło w hodowlach z *B.afzeli*. W hodowlach z dodatkiem *B.afzeli* i *B.burgdorferi* s.s. Doktorantka obserwowano spadek stężenia TNF w drugiej dobie a z dodatkiem *B.garinii* wzrost stężenia TNF. Przeprowadzone badania dostarczyły bardzo interesujących obserwacji, brakuje mi jedynie podsumowania tych bardzo licznych wyników, co pozwoliłoby na ich łatwiejszą percepcję i omówienie później w dyskusji.

W analizie Dyskusji pominię tą część, którą uważam, że powinna zostać umieszczona we Wstępie. Omawiając wyniki Doktorantka przeprowadziła analizę aktywności poszczególnych grup genów wskazując na zespół 17 genów aktywowanych zakażeniem wszystkich genogatunków oraz poszczególne grupy genów charakterystyczne dla infekcji poszczególnymi gatunkami. Sugeruje to odmiennosć patomechanizmów infekcji zależną od gatunku krętka. Bardzo ważne jest stwierdzenie nadekspresji genu TP53, białka regulującego przebieg podziałów komórkowych oraz apoptozy. W badaniach metodą TUNEL i wykrywania produktów degradacji DNA w hodowlach fibroblastów

potwierdzony został proces apoptozy indukowany zakażeniem ale bez udziału kaspazy 3, sugeruje to inną drogę aktywacji apoptozy. Część dyskusji Autorka poświęca roli metod chromatografii i spektrometrii masowej w proteomice i metabolomice. Są to nowoczesne metody badań, które coraz szerzej wchodzi do diagnostyki laboratoryjnej chorób ale jak to zaznaczyłem wcześniej omówienie tych metod we Wstępie lepiej uzasadniałoby podjęcie późniejszych badań. W tej pracy posłużyły wykazaniu obecności i zmian ilościowych TNF w kontrolnych i zakażonych hodowlach fibroblastów poszczególnymi genogatunkami *Borellii*. Doktorantka sugeruje, że wzrost stężenia TNF w hodowli komórkowej zakażonej *B.afzelii* może mieć związek z tropizmem narządowym tego gatunku i postacią skórną boreliozy. Podsumowując dyskusję Autorka stwierdza, że przeprowadzone przez Nią badania były próbą znalezienia markera diagnostycznego na poziomie molekularnym i białkowym. Niewątpliwie przeprowadzone badania wybranych genów, TNF, kaspazy 3 i apoptozy pozwalają na wniknięcie w przebieg procesu patologicznego boreliozy i zrozumienie związku niektórych objawów klinicznych z gatunkiem *Borellii* który był przyczyną zakażenia. Dyskusję kończy siedem wniosków opartych o wyniki przeprowadzonych badań.

Piśmiennictwo to 128 aktualnych pozycji, w znaczącej mierze anglojęzycznych obejmujący bardzo szeroki zakres tematów przedstawionych w pracy.

Rozprawę kończą streszczenia w języku polskim i angielskim.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Beaty Rozwadowskiej^{jest} oryginalną pracą poruszającą istotne z poznawczego i klinicznego punktu widzenia zagadnienia dotyczące boreliozy i jej zróżnicowanych objawów klinicznych. Doktorantka przygotowała i przeprowadziła dobrze zaplanowany i przemyślany eksperyment, który pozwolił na uzyskanie wiarygodnych i spójnych wyników. Zastosowała umiejętnie współczesną metodykę badań, przedstawiła logicznie i czytelnie otrzymane wyniki i przeprowadziła adekwatną do nich dyskusję. W pracy wykorzystała współczesne i dobrze dobrane piśmiennictwo. Moje uwagi dotyczą rozmieszczenia fragmentów tekstu między Dyskusją a Wstępem, nie wpływają natomiast na bardzo wysoką ocenę przedstawionej rozprawy.

W związku z powyższym mogę stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Beaty Rozwadowskiej pt. „Ekspresja fenów związanych

z TNF i jego receptorami w zakażeniach in vitro *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* oraz *Borrelia afzelii*” spełnia warunki określone w art. 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach w zakresie sztuki(Dz. U.Nr65, poz. 595, z póź. zm.) . Na tej podstawie zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach z wnioskiem o dopuszczenie mgr Beaty Rozwadowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Andrzej Wiczkowski
Andrzej Wiczkowski