



Prof. dr hab. Katarzyna Sikorska

Gdynia, dnia 18 grudnia 2023r.

Kierownik Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych

Katedra Medycyny Tropikalnej i Parazytologii

Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej

Wydział Nauk o Zdrowiu z IMMiT

Gdański Uniwersytet Medyczny



RPIW/11345/2023  
Data: 2023-12-21  
UMB

### **Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Marty Dobrzyńskiej**

#### **„Zmiany parametrów metabolicznych w osoczu krwi pacjentów z kleszczowym zapaleniem mózgu oraz z koinfekcjami bateryjnymi”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. n. farm. Elżbiety Skrzydlewskiej i prof. dr hab. n. med. Anny Moniuszko-Malinowskiej (drugi promotor), w Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Lekarz Marta Dobrzyńska przygotowała rozprawę doktorską w formie monografii naukowej, zawierającej treści, które częściowo zostały opublikowane w 3 powiązanych tematycznie artykułach naukowych (w tym 1 oryginalny, 2 przeglądowe) w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, o wysokim współczynniku oddziaływania. W dwóch publikacjach, w tym jednej oryginalnej, doktorantka jest pierwszym autorem, co jednoznacznie potwierdza jej kluczowy wkład w ich opracowanie.

Praca doktorska została przygotowana w oparciu o wyniki uzyskane w badaniach finansowanych z grantu Narodowego Centrum Nauki "Wykorzystanie badań multiomicznych do oceny konsekwencji metabolicznych chorób przenoszonych przez kleszcze" (NCN, SONATA BIS, 2017/26/E/NZ6/00277), którego kierownikiem była prof. dr hab. Anna Moniuszko-Malinowska.



Kleszczowe zapalenie mózgu (KZM) niewątpliwie można obecnie uznać za narastające zagrożenie dla zdrowia człowieka. Zmiany klimatyczne, środowiskowe, migracje ludności odpowiadają za rosnącą ekspansję wektorów zakażeń zoonotycznych, przyczyniając się do zwiększania zasięgu występowania u człowieka chorób rozwijających się w konsekwencji tych zakażeń. Kleszczowe zapalenie mózgu (ang.: tick-borne encephalitis; TBE) jest chorobą ośrodkowego układu nerwowego (OUN), o możliwych fatalnych, trwałych następstwach, w tym w postaci nieodwracalnej patologii układu nerwowego i ciężkiego inwalidztwa, a ryzyko zgonu w jej przebiegu szacowane jest na ok. 1%. Nie jest dostępne leczenie przyczynowe. Mimo rekomendacji szczepień p/KZM, stanowiących narzędzie ochrony przed skutkami zakażenia, w ostatniej dekadzie rośnie częstość występowania KZM począwszy od Europy, głównie północnej, środkowej i wschodniej, przez dalekowschodnią Rosję, po Japonię i północne Chiny. Światowa Organizacja Zdrowia podaje, że rocznie rejestruje się około 10 000–12 000 przypadków KZM, jednak liczba ta najpewniej jest znacznie niższa niż faktyczna całkowita liczba przypadków klinicznych. W Polsce KZM jest objęte obowiązkiem zgłaszania. Na dzień 30.11.2023r. liczba zgłoszonych przypadków w 2023r. w Polsce wyniosła 609 i jest większa w porównaniu z analogicznym okresem w poprzednich latach (n=392 w 2022r., n=198 w 2021r.). Zapadalność wzrosła z 0,47 w 2018r. do 1,61/100 000 w 2023r. Nie jest błędem przekonanie, że wśród zakażeń OUN, rejestrowanych przez Państwową Inspekcję Sanitarną mogą mieścić się przypadki niezdiagnozowanego KZM. W raporcie przygotowanym przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny, opublikowanym w 2021r. „Kleszczowe zapalenie mózgu w Polsce i na świecie. Ocena sytuacji epidemiologicznej KZM w Polsce w latach 2015-2019 w oparciu o dane pochodzące z nadzoru epidemiologicznego” autorzy podkreślają problem utrzymywania się wysokiego odsetka rozpoznań neuroinfekcji bez potwierdzenia etiologicznego, co warunkuje niedoszacowanie rzeczywistej liczby zachorowań.

Klinicznie zakażenie wirusem KZM przybierać może postać zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, rzadziej zapalenia mózgu, zapalenia opon i mózgu, bardzo rzadko zapalenia rdzenia. Zróznicowany co do ciężkości przebieg kliniczny w ostrej fazie zakażenia i w okresie występowania trwałych neurologicznych powikłań są powiązane m.in. z siłą odpowiedzi



immunologicznej osoby zakażonej. Do zidentyfikowanych niekorzystnych czynników rokowniczych należą starszy wiek, współistnienie zaburzeń odporności, inne ciężkie przewlekłe choroby.

Podjęcie badań odnoszących się do problemu złożonego, nie w pełni poznanego patomechanizmu zakażenia wirusem KZM, uważam więc za uzasadnione, niezwykle ciekawe i wartościowe.

Układ rozprawy jako monografii mieszczącej się na 91 stronach jest typowy, składają się na nią rozdziały: wstęp, założenia i cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz zastosowanych skrótów oraz piśmiennictwo. Doktorantka dołączyła także zgody Komisji Bioetycznej na realizację projektu oraz życiorys i opis swojego doświadczenia naukowego. We wstępie opisane zostały wirusy, przede wszystkim flawiwirusy o największym znaczeniu, ze względu na epidemiologię i potencjał chorobotwórczy, zdolne do zakażenia OUN i wywołania zapalenia w tkance nerwowej. W oparciu o rzetelny przegląd aktualnej literatury i szereg odkryć z ostatnich lat, odwołujących się do badań podstawowych, Doktorantka zaprezentowała w sposób bardzo skondensowany stan wiedzy o patogenezie neuroinfekcji wirusowych i mechanizmach związanych z neuroprotekcją, zwracając uwagę na potrzebę rozwoju badań nad wzajemnym oddziaływaniem czynników związanych z funkcją odpowiedzi gospodarza na zakażenie a wirulencją patogenu. Szczególny nacisk kładzie na zmiany metaboliczne w OUN w powiązaniu ze stanem równowagi oksydacyjnej czy zaburzeniem homeostazy redoks. W tym miejscu chcę zwrócić uwagę na potrzebę uzupełnienia wypowiedzi o potencjalne znaczenie mechanizmów powiązanych z ferroptozą w patogenezie oksydacyjnych szkód struktur ośrodkowego układu nerwowego. Coraz pełniejsze rozumienie tych zjawisk jest podstawą do tworzenia skutecznych metod diagnostyki i terapii.

Cel i założenia pracy zostały przedstawione jasno. Doktorantka podjęła się zadania oceny zmian metabolicznych w osoczu krwi oraz granulocytach i limfocytach, w kontekście zaburzenia równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej, u pacjentów zakażonych wirusem KZM oraz pacjentów z koinfekcjami bakteryjnymi *Borrelia burgdorferi* i *Anaplasma*



*phagocytophilum*, jednocześnie rozpoznawanymi z KZM. Taka konstrukcja grup badanych jest bardzo ciekawa, po pierwsze dlatego, że zwraca uwagę na zjawisko koinfekcji przenoszonych przez kleszcze, potencjalnie stanowiące wyzwanie diagnostyczno-terapeutyczne. Po drugie odnosi się do problemu zakażeń różnymi patogenami przenoszonymi przez kleszcze, które to koinfekcje, gdy dochodzi do nich jednocześnie, mogą wzajemnie modulować nieswoiste mechanizmy odpornościowe związane z indukcją reakcji zapalnej, finalnie powiązanej ze zwalczaniem zakażenia. Parametry metaboliczne w osoczu krwi oraz granulocytach i limfocytach były oceniane we wczesnej fazie choroby i po zakończeniu leczenia. Przy tak ambitnych założeniach w samej monografii osobiście brakuje mi w dość hermetycznie napisanym wstępie (w części dotyczącej zaburzeń metabolicznych) przejrzystego, schematycznego przedstawienia/podsumowania miejsca i roli wszystkich analizowanych w projekcie parametrów stresu oksydacyjnego, odpowiedzi antyoksydacyjnej, produktów metabolizmu fosfolipidów i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, ekspresji białek i oksydacyjnych modyfikacji białek. Być może wynika to z mojego przyzwyczajenia do określonego schematu prac. Spostrzegam bowiem, że w dyskusji Doktorantka biele opisuje w sposób spójny i przejrzysty zjawiska związane ze stresem oksydacyjnym i mechanizmami obrony antyoksydacyjnej, krytycznie odnosząc się do uzyskanych przez siebie wyników. Niewątpliwie jest dobrze przygotowana merytorycznie do realizacji projektu zgodnie z założeniami, skupionego wokół zmienności parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej powiązanych z nimi oksydacyjnych uszkodzeń komórkowych i modulacji reakcji zapalnej w przebiegu KZM.

Analizą objęto zmiany poziomu reaktywnych form tlenu (RFT), aktywności oksydazy ksantynowej, pomiar całkowitego statusu antyoksydacyjnego, aktywności enzymów antyoksydacyjnych, śledzenie produktów peroksydacji lipidów, skutków zmian aktywności enzymów lipolitycznych, ekspresji czynników antyoksydacyjnych i natężenia modyfikacji oksydacyjnych białek.

Warsztat badawczy jest bardzo rozbudowany, nowoczesny i umożliwia w założeniach wielopłaszczyznowe i kompleksowe „rozpracowanie” zmian w homeostazie redoks,



modyfikacji oksydacyjnych lipidów, białek oraz powiązanych z tymi zjawiskami znaczników odpowiedzi zapalnej (NF-kappaB, TNF-alfa) w przebiegu zakażenia wirusem KZM, a także stawiać hipotezy w oparciu o obserwację w czasie i charakterystykę zmian zejściowych. Ciekawi mnie jednak możliwość użycia zastosowanych metod badawczych do analizy prób płynu mózgowo-rdzeniowego i o komentarz na ten temat poproszę Doktorantkę w czasie obrony. Domyślam się, że istotną barierę w rekrutacji do grupy kontrolnej stanowiłaby potrzeba pobierania płynu mózgowo-rdzeniowego od osób zdrowych, a takimi byli uczestnicy badania w tejże własnie grupie. Niemniej interesujące byłoby porównanie mierzonych parametrów, jeśli warsztatowo możliwe, u osób chorujących na KZM w grupach w zależności od postaci klinicznej i natężenia zmian zapalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym, w chorobie zapalnej, obciążonej ryzykiem przetrwałego uszkodzenia narządu, toczącej się w centralnym układzie nerwowym.

W analizie zmienności wielu mierzonych parametrów, na którą składa się ich charakterystyka opisowa brakuje mi badania wzajemnych korelacji elementów składowych stresu oksydacyjnego i odpowiedzi antyoksydacyjnej, które mogłoby stanowić uzupełnienie do dyskusji. Interesujące, w kontekście powiązań obrony antyoksydacyjnej i reakcji zapalnej, wydaje się m.in. określenie zależności między mierzoną w granulocytach ekspresją HO-1, Nrf2, pNrf2 oraz podjednostek NF-kappaB.

Założone cele badawcze zostały zrealizowane. Przeprowadzone przez panią Martę Dobrzyńską badania pozwoliły na ustalenie, że zakażenie wirusem KZM, (także koinfekcje KZM/*Anaplasma phagocytophilum*/*Borrelia burgdorferi* – w znacznie mniejszym stopniu z uwagi na niską liczebność grup chorych z koinfekcjami), wpływają na homeostazę redoks prowadząc do jej przesunięcia w kierunku prooksydacyjnym. Rosły aktywność oksydazy ksantynowej, poziomy RFT, aktywność enzymów lipolitycznych z nasileniem metabolizmu lipidów z przewagą prozapalnych metabolitów. Nasilało to odpowiedź prozapalną, ocenianą na podstawie zmian poziomu czynnika transkrypcyjnego NF-kappaB i cytokiny TNF-alfa, który znacząco rósł w początkowej fazie choroby i taki utrzymywał się w momencie zakończenia leczenia. Natomiast zakończenie klasycznej farmakoterapii nie wiązało się z powrotem do



fizjologicznej homeostazy redoks (której wzorcem były wyniki mierzonych parametrów w grupie kontrolnej). Ten ciekawy wniosek otwiera pole do badań nad znaczeniem preparatów o aktywności antyoksydacyjnej, także lipofilowej w leczeniu KZM z włączeniem koinfekcji innymi patogenami przenoszonymi przez kleszcze. Ciekawi mnie jakie preparaty z tej grupy zdaniem Doktorantki mogłyby potencjalnie stać się przedmiotem pogłębionych badań nad zastosowaniem we wskazanym celu.

Przedmiotem pracy badawczej Doktorantki nie było analizowanie zmian w mierzonych parametrach stresu oksydacyjnego, odpowiedzi antyoksydacyjnej, metabolizmu lipidów czy odpowiedzi zapalnej w zależności od rodzaju zastosowanego leczenia przeciwzapalnego czy przeciwozrętkowego. Czy jednak zdaniem Doktorantki zastosowanie glikokortykosteroidów (GKS) w terapii KZM może mieć wpływ na uzyskane wyniki, szczególnie, że w oparciu o przedstawioną w tabeli 1 charakterystykę postaci klinicznych KZM, sądzę, że nie wszyscy chorzy z grupy badanej otrzymywali GKS.

W tekście znalazłam błędy literowe, językowe, interpunkcyjne. Legenda do ryciny 9 zawiera błąd w liczebności pacjentów w grupie z koinfekcjami (omyłkowe powtórzenie liczby pacjentów z KZM). Legenda dla ryciny 10 zawiera błędną informację o różnicy statystycznej  $x$  w porównaniu pacjentów z KZM przed i po leczeniu. Tymczasem symbol  $x$  umieszczony jest nad kolumną koinfekcje 1. Ostatecznie powyższe uwagi nie umniejszają w żadnym stopniu wartości uzyskanych wyników.

Podsumowując, oceniam pozytywnie przedstawioną do recenzji pracę doktorską pani Marty Dobrzyńskiej. Doktorantka wykazała się umiejętnością poprawnego sformułowania problemów badawczych, zastosowania adekwatnych do założonych celów metod badawczych, uzyskane wyniki omówiła krytycznie prawidłowo posługując się literaturą przedmiotu. Rezultaty badań stanowią istotny wkład w rozwój wiedzy w zakresie omawianych zagadnień i co ważne inspirują do dalszej pracy badawczej.



Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lek. Marty Dobrzyńskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2023 poz. 742) i z przyjemnością przedkładam wniosek do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Katarzyna Sobolewska*

