NARODOWY INSTYTUT LEKÓW
NARODOWE LABORATORIUM KONTROLI PRODUKTÓW LECZNICZYCH,
WYROBÓW MEDYCZNYCH I PRODUKTÓW BIOBÓJCZYCH
ul. Chełmska 30/34, 00-725 Warszawa

Warszawa, 13 listopada 2016

dr hab. Izabela Sitkiewicz, prof. NIL
Zakład Mikrobiologii Molekularnej
Narodowy Instytut Leków

Recenzja rozprawy doktorskiej pani magister Kariny Adamowicz „Analiza lokalnego i systemowego stanu zapalnego wywołanego infekcją *Porphyromonas gingivalis*"

Niniejsza recenzja rozprawy doktorskiej została przygotowana w odpowiedzi na pismo dziekana Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z dnia 2 listopada 2016, z prośbą o wykonanie niniejszej recenzji.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Jana Potempy w Zakładzie Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Rozprawa została zaprezentowana w klasycznej formie i zawiera standardowe części publikacji naukowej, czyli Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki i Dyskusję wraz ze spisem literatury cytowanej w tekście, streszczeniem w języku polskim i angielskim, wyodrębnionymi celami pracy, perspektywami i załącznikiem przedstawiającym wyniki analizy mikrobiomu. Praca zawiera również spis treści, wykaz rysunków, tabel i listę użytych skrótów.

Wstęp jest bardzo obszerny. Na ponad 40 stronach doktorantka opisuje epidemiologiczne aspekty chorób przyzębia ze szczególnym nastawieniem na czynniki mikrobiologiczne, środowiskowe, oraz immunologiczne i genetyczne cechy gospodarza, odpowiedzialne za rozwój chorób przyzębia. Dość dokładnie omówiony jest główny obiekt badań – *Porphyromonas gingivalis* i jego czynniki wirulencji biorące udział w patogenezie. Drugim szeroko omówionym zagadnieniem jest rola kinaz gospodarza, takich jak kinaza syntazy glikogenu 3 (GSK3), w przekazywaniu sygnału odbieranego przez receptory TLR i ich rola w odpowiedzi zapalnej. W kolejnej części wstępu omówiono związek między chorobami przyzębia a ogólnosystemowymi chorobami takimi jak choroby reumatyczne, ze szczególną uwagą poświęconą patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. W tej części wstępu omówiono również szczegółowo czynniki genetyczne, środowiskowe, immunologiczne i inne czynniki ryzyka związane z zapaleniem stawów.

Pod względem merytorycznym nie mam uwag do tej części rozprawy, jednak chciałabym zwrócić uwagę na kilka kwestii bardziej porządkowych i redakcyjnych związanych z przygotowywaniem tekstu naukowego. Zarówno we wstępie jak i w całym tekście rozprawy autorka nie ustrzegła się pewnych niekonsekwencji dotyczących głównie cytowanych w tekście artykułów, jak i nazewnictwa genów eukariotycznych. Referencje w tekście umieszczone są w dwóch konwencjach, raz jak np. w zdaniu „Wykazano, że pacjenci z zaawansowanym zapaleniem przyzębia cechują

się występowaniem genotypu: HLA-A9, HLA-B15, HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DQα, lub HLA-DRB1 **(Shapira et al., 1994), (Takashiba et al., 1994), (Ohyama et al., 1996)**.", z oddzielnymi referencjami, każda w nawiasie i rozdzielone przecinkami; w innych miejscach kilka referencji rozdzielonych jest średnikiem w obrębie jednego nawiasu, jak na przykład w zdaniu „akumulacja hemu prowadzi do pigmentacji kolonii *P. gingivalis* na kolor czarny **(Kusaba et al., 2002; Smalley et al., 2002)**." Dodatkowo, jeżeli cała rozprawa jest w języku polskim, to cytacje publikacji dwuautorskich powinny brzmieć np. (Kinane **i** Marshall, 2001), a nie (Kinane **and** Marshall, 2001). Zdarzają się również przypadki, że ta sama referencja jest powtórzona (strona 36, Rylatt et al., 1980). Z pewnością jest to efekt nie do końca dobrze ustawionych parametrów automatycznego formatowania referencji, jednak powinno to zostać ujednolicone w ostatecznej korekcie tekstu przed drukiem rozprawy.

Jeżeli chodzi o nazewnictwo genów ludzkich to w znakomitej większości przypadków jest jak najbardziej poprawnie zapisane wielkimi literami i kursywą (tekst i np. Tabela 1), jednak allel genu kodującego GSK3 jest zapisany jako *gsk3-β* w konwencji nazewnictwa genów bakteryjnych, lub *Gsk3-β*, w konwencji zapisu nazw genów zwierząt.

W tekście zdarzają się też drobne błędy polegające na zamianie części nazw, np. lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 to nie jest lizofosfatydylocholina acylotransferazy, lecz acylotransferaza lizofosfatydylocholiny.

Są to oczywiście drobne uwagi redakcyjne, które nie zmieniają merytorycznej zawartości rozprawy, jednak przy czytaniu dają poczucie, że tekst nie był poddany uważnej redakcji i sprawdzeniu.

Kolejnym rozdziałem rozprawy są Materiały i Metody. O ile metody są opisane w sposób przejrzysty i pozwalający na późniejsze prześledzenie doświadczenia opisanego w wynikach, to mam również cały szereg uwag techniczno - redaktorskich dotyczących tej części.

1. Jeżeli odczynniki i inne materiały są przedstawione w formie tabeli, powinna ona mieć numerację spójną z całą pracą
2. Wkłady GasPack, czy tez szkiełka mikroskopowe nie są odczynnikami, a są wymieniane w tabelach w kolumnie „odczynniki"
3. Nie podano stężeń erytromycyny i tetracykliny użytych do selekcji bakterii
4. Niekonsekwencje w szczegółowości wymienianych materiałów, np. doktorantka wymienia wśród materiałów płytkę 96 dołkową firmy NUNC. Czy był jakiś specjalny powód takiego wyróżnienia tylko tej konkretnej płytki, dlaczego nie zostały wymienione w takim razie inne „plastiki"?
5. Doktorantka podaje długą listę sprzętu laboratoryjnego, jednak później w tekście rozdziałów znowu podawane są nazwy urządzeń, jest to pewna niekonsekwencja i wielokrotne powtarzanie tych samych informacji.
6. Przy opisie szczepów bakteryjnych nie ma podanych referencji dotyczących poszczególnych szczepów. Przy opisie ATCC33277 i W83 można podać referencję Naito et al., Determination of the genome sequence of Porphyromonas gingivalis strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in P. gingivalis DNA Res. 15 (4), 215-225 (2008). Doktorantka powinna podać również referencje dotyczące konstrukcji szczepów ΔKRAB (niestety nie jestem w stanie stwierdzić o jaki konkretnie szczep chodzi, jest on opisany w Pyrc et al., Infection and Immunity. 2013;81(1):55-64, lecz również w tej pracy nie ma opisanego sposobu konstrukcji tego mutanta ani referencji; w literaturze opisane są także inne szczepy z takimi mutacjami) i ΔPPAD (zakładam, że jest to Wegner et al., 2010. Peptidylarginine deiminase from Porphyromonas gingivalis citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 62:2662–2672.). Informacja, że szczepy pochodzą z kolekcji zakładu nie jest referencją.

7. Rozdział zawiera partie tekstu i nagłówki, które nie powinny znaleźć się w tej części pracy. W niektórych miejscach podawany jest np. cel metody, str. 74 „**W celu sprawdzenia czy inhibitor SB216763 wpływa na przeżywalność bakterii** *P. gingivalis* wykonano test przeżywalności bakterii w obecności różnych stężeń inhibitora." Taki opis metody powinien raczej brzmieć po prostu „wykonano test przeżywalności bakterii w obecności różnych stężeń inhibitora". W innych miejscach doktorantka tłumaczy zasadę działania zestawu do oznaczania poziomu cytokin w surowicy. Rozdział Materiały i Metody powinien opisywać jak eksperyment był wykonany, a nie tłumaczyć jego zasadę. Podobna sytuacja ma miejsce w punkcie 3.2.11. Zdanie „**W celu określenia znaczenia** wrót zakażenia na rozwój choroby systemowej po infekcji *P. gingivalis* przeprowadzono doświadczenia z zastosowaniem innych modeli zwierzęcych, różniących się drogą inokulacji bakterii." nie jest opisem metody i raczej powinno się znaleźć w rozdziale Wyniki.
8. Ze schematu doświadczenia opisującego wywoływanie paradontozy w mysim modelu wynika, że zwierzętom podawana była tylko woda, nie wspomniano, że zwierzęta były karmione. Składam to na karb przeoczenia.
9. Opisana dawka bakterii podawana myszom przy infekcji jest myląca. Myszom podawano jak rozumiem 50µl zawiesiny bakterii o stężeniu $5x10^7$ CFU/ml, co przekłada się na jednorazową dawkę $2,5x0^6$ CFU. W opisach wykresów w rozdziale Wyniki w legendach podawana jest wartość stężenia a nie dawki $5x10^7$ CFU/ml.
10. Liczbę komórek izolowanych ze śledziony myszy przedstawiono jako $5x\ 10^6$ mln/ml. Nie jest jasne czy doktorantce chodziło o 5 milionów komórek na mililitr.
11. Doktorantka nie ustrzegła się też laboratoryjnego żargonu, wynikającego z bezpośredniego tłumaczenia angielskich terminów. Na przykład zamiast „bramkowania" (od ang. gating) można użyć po prostu określenia „różnicowanie pod względem" określonego parametru. Niezręczności przekładu pojawiają się również w innych miejscach, jak np. angielskie określenie „one way ANOVA" to nie jest jednostronna ANOVA, lecz jednoczynnikowa.
12. W dalszych partiach opisów metod są również pewne niekonsekwencje, np. w punkcie 3.2.10.1 (strona 87) doktorantka dokładnie opisuje posiew bakterii izolowanych z różnych organów, a zaraz pod tym akapitem opisuje oddzielnie izolację bakterii z płuc, mimo iż metodycznie nie różni się od opisanych powyżej. W opisie rozdrobnienia tych tkanek podane są bardzo dokładnie warunki, jednak przy kolejnym opisie izolacji DNA, warunki rozdrobnienia tkanki nie są już podane. Doktorantka powinna z takim samym poziomem dokładności i precyzji opisywać wszystkie metody.
13. W tabeli 2 wyróżniono kolumnę zawierającą stężenia składników mieszaniny reakcyjnej. Wartość podana w nanogramach dotycząca matrycy to nie jest stężenie, w tej tabeli jedynie stężenia starterów podane są w odpowiednich jednostkach. Nie do końca jestem też pewna czy 10µM to finalne stężenie startera, czy też stężenie roztworu startera użytego do reakcji PCR.

Tak jak wspomniałam powyżej, redakcyjne uchybienia nie zmieniają w znakomitej większości merytorycznego aspektu, lecz wywołują poczucie braku korekty tekstu.

Rozdział „Wyniki" zawiera opis wykonanych eksperymentów wraz z 25 rycinami je przedstawiającymi. W trakcie swojej pracy doktorantka wykonała eksperymenty pozwalające na ocenę lokalnego i systemowego wpływu infekcji *P. gingivalis* na odpowiedź immunologiczną w mysim modelu. Wyniki są ważne i poszerzają stan wiedzy na temat rozwoju infekcji oraz interakcji pomiędzy patogenem a gospodarzem. Badania nad patogenami biorące pod uwagę interakcje z układem immunologicznym gospodarza są niezwykle istotne, pokazują bowiem, jak ważna w rozwoju zakażenia jest reakcja gospodarza i jak istotne jest badanie patogenezy bakteryjnej uwzględniającej wielowymiarową interakcję pomiędzy patogenem a organizmem gospodarza.

1. Pierwszy z serii eksperymentów opisuje optymalizację mysiego modelu zapalenia przyzębia, w którym wykazano, że podawanie zawiesiny *P. gingivalis* w lepkim podłożu wpływa na rozwój zapalenia przyzębia i przyczynia się do powstawania ubytków kostnych.
2. W kolejnym doświadczeniu doktorantka badała wpływ inhibitora GSK3 na zapalenie przyzębia.
   W eksperymencie zademonstrowano, że podanie inhibitora GSK3 powoduje brak patologicznych zmian wywołanych działaniem *P. gingivalis*. Jest to z pewnością bardzo ciekawy wynik, jednak dość wstępny i raczej otwierający możliwości przyszłych eksperymentów. Szkoda by było, gdyby badania nad poznaniem molekularnego mechanizmu działania GSK3 na rozwój infekcji *P. gingivalis* nie były kontynuowane. Informacje o planach eksperymentalnych autorka uwzględnia w rozdziale Perspektywy.
   W tym miejscu mam metodyczną uwagę dotycząca podawanej dawki inhibitora. We wstępnych eksperymentach badających wpływ wysokich dawek inhibitora na przeżywalność *P. gingivalis* stosowano roztwór inhibitora, którego stężenie podano jako stężenie molowe (max. 125μM), w eksperymentach w mysim modelu podawano dawkę wyrażoną w mg/kg masy ciała zwierzęcia. Mam w związku z tym pytanie, jak jedna wartość ma się do drugiej. Nie wiem czy jest dostęp do jakichkolwiek informacji dotyczących farmakokinetyki/farmakodynamiki inhibitora w tkankach, jakie maksymalne stężenie może w nich osiągnąć i jaki jest czas działania w tkankach, jednak można teoretycznie oszacować na podstawie wymiarów i w wagi zwierzęcia, jakie jest maksymalne molarne stężenie inhibitora jakie może być osiągnięte w tkankach przy dawce 30 mg/kg.
   Podczas eksperymentu doktorantka obserwowała również stan zdrowia zwierząt. Wyniki tych obserwacji przedstawiono na rycinie i w tabeli. Akurat w tym przypadku tabela jest zupełnie zbędna, we wszystkich komórkach zawiera wartość „0", co równie dobrze można by było opisać jednym zdaniem tekstu.
3. Podczas obserwacji infekcji, ściśle monitorowano również rozwój reakcji pro-zapalnej wywołanej podaniem patogenu oraz wpływem inhibitora GSK3 na rozwój reakcji zapalnej. Doktorantka pokazuje przy użyciu klasycznej analizy histologicznej w mikroskopie świetlnym i na podstawie analizy w mikroskopie konfokalnym, że podczas infekcji następuje migracja komórek zapalnych do miejsca infekcji i akumulacja neutrofili w dziąsłach. Doktorantka pokazuje również produkcję prozapalnej IL-17 w miejscu infekcji, która jest zahamowana po podaniu inhibitora GSK3.
4. Jako następny, logiczny krok analizy odpowiedzi immunologicznej gospodarza na lokalną infekcję przyzębia, doktorantka wyznaczyła stężenia cytokin prozapalnych IL12p40, IL1-β, IL6 i TNF w surowicy. Doktorantka pokazała, że w wyniku infekcji poziom cytokin znacząco wzrasta, lecz podawanie inhibitora GSK3 powoduje znaczące obniżenie poziomu cytokin, do poziomu porównywalnego z nieinfekowanymi myszami kontrolnymi.

Drugi ciąg doświadczeń dotyczył badania wpływu infekcji *P. gingivalis* na rozwój choroby systemowej – stanu zapalnego stawów. Jako wprowadzenie do dalszych eksperymentów doktorantka opisuje dynamikę pojawiania się zmian w stawach po dotchawiczym podaniu jednorazowej dawki bakterii. Za jeden z ciekawszych aspektów tej pracy uważam pokazanie, że tylko dotchawicze podanie bakterii skutkuje rozwojem zapalenia stawów i sugeruje ważną rolę infekcji płuc w powstawaniu różnego rodzaju ogólnoustrojowych odczynów zapalnych. Do swoich badań doktorantka wybrała linię myszy DBA/1, które opisuje jako genetycznie przystosowane do rozwoju zapalenia stawów. Czy mogłabym prosić o przybliżenie tła genetycznego tej linii myszy i czym ta zwiększona podatność jest spowodowana? Jaki jest w tej linii myszy mechanizm powstawania zapalenia stawów indukowanego kolagenem i czy ma to związek z indukcją zapalenia stawów wywołanego przez infekcję bakteryjną? Doktorantka pisze na str. 123, że myszy te posiadają genotyp HLA, czy mogłabym prosić o wyjaśnienie co doktorantka miała na myśli. Jakie są różnice między liniami myszy DBA/1 i DR4-IF? Czy znane są doktorantce jakieś inne przykłady linii zwierząt laboratoryjnych, które albo w wyniku selekcji, albo modyfikacji genetycznych są wrażliwe na określone typy infekcji bakteryjnych?

Jako następny krok w poznaniu dynamiki rozwoju reakcji zapalnej stawów, doktorantka zbadała wpływ znanych czynników wirulencji *P. gingivalis* takich jak gingipainy oraz procesów związanych z patogenezą – czyli cytrulinacji białek. Doktorantka wykazała, że nie ma ilościowych różnic w rozwoju zmian w stawach pomiędzy infekcją szczepem dzikim *P. gingivalis*, a szczepami ΔKRAB i ΔPPAD.

Analiza histologiczna i immunodetekcja została zastosowana do wykrycia zmian w błonach maziowych po 14 dniach od infekcji. Zmiany wykryto u 30% zainfekowanych myszy. Informacja ta jest podana w tekście, a co za tym idzie rycina 19 panele C i D są zbędne i nie przedstawiają żadnych nowych informacji. Stan zapalny oceniono również na podstawie badania poziomu mieloperoksydazy, który wykazał znaczącą statystycznie różnicę pomiędzy stawami myszy kontrolnych i po infekcji.

Po podaniu dotchawiczym zawiesiny bakterii przeprowadzono ich detekcję w płucach myszy i badano dynamikę usuwania bakterii z płuc. Zaobserwowano szybką eliminację żywych bakterii (rycina 21), natomiast DNA P. gingivalis było wykrywane w płucach myszy po 2 tygodniach od infekcji. Do potwierdzenia toczącego się w płucach procesu zapalnego z udziałem neutrofili wykorzystano oznaczenie poziomu mieloperoksydazy. Zaobserwowano stopniowy spadek aktywności enzymu, po 2 tygodniach od zakażenia poziom enzymu był porównywalny z kontrolą. Otrzymane wyniki pokazują, że nie następuje kolonizacja płuc po podaniu bakterii, jednak obserwuje się rozwój ogólnosystemowej reakcji zapalnej opuchnięcie stawów bez kolonizacji stawów przez bakterie. Brak kolonizacji stawów podsumowany jest w tabeli 5, podobnie do tabeli 4 jest ona całkowicie zbędna i nie zawiera żadnych istotnych informacji, które nie byłyby przytoczone w tekście. DNA *P. gingivalis* nie został również wykryty w żadnym z badanych narządów myszy. Zdjęcia rozdziału produktów PCR zaprezentowane na rycinach 22 i 25 nie zawierają standardu wielkości. Wystąpienie ogólnej reakcji zapalnej zostało dodatkowo potwierdzone przez pomiary poziomu białka CRP i cytokin prozapalnych. Zaobserwowano zwiększony poziom CRP przez 2 tygodnie po infekcji, w przypadku cytokin, zwiększony poziom obserwowano najczęściej około 3 dnia po infekcji. Czy zdaniem doktorantki spadek poziomu cytokin może być efektem eliminacji bakterii z płuc po 3 dniach?

Doktorantka wykazała więc, że zapalenie stawów po infekcji nie jest bezpośrednio spowodowane przez migrację bakterii do stawów. Sprawdzono więc jak infekcja dotchawicza wpływa na różnicowanie limfocytów T i wykazano, że *P. gingivalis* promuje różnicowanie limfocytów T w kierunku Th17, a zmniejsza w kierunku Th1 i Treg.

Dodatkowo doktorantka wykazała wpływ czynników środowiskowych na rozwój zapalenia stawów po dotchawiczej infekcji. Udało się pokazać, że zapalenie stawów występuje jedynie w przypadku myszy przebywających w warunkach zwykłej zwierzętarni, natomiast nie jest obserwowane podczas przebywania w warunkach wolnych od patogenów (SPF). W związku z tym doktorantka postawiła tezę, że różnice w składzie mikroflory jelitowej u myszy żyjących w różnych warunkach może mieć wpływ na rozwój zapalenia stawów.

W dyskusji doktorantka podsumowuje uzyskane wyniki i w dojrzały sposób omawia je w odniesieniu do literatury. W dyskusji poruszane są tematy dotyczące np. potencjalnej funkcji GSK3 w rozwoju stanu zapalnego, perspektywy zastosowania inhibitorów GSK3 do leczenia paradontozy i związki paradontozy z występowaniem ciężkich chorób systemowych i odpowiedzi zapalnej. Dyskusja jest obszerna i prezentuje uzyskane wyniki w szerokim aspekcie. Bardzo podoba mi się wątek dyskusji omawiający wpływ mikroflory jelitowej na rozwój różnego rodzaju schorzeń o podłożu immunologicznym.

Podsumowując, zestaw wyników zaprezentowanych przez doktorantkę stanowi solidną bazę do dalszej eksploracji. Osobiście uważam, że badania porównawcze mikroflory bakteryjnej u ludzi cierpiących na ostre formy paradontozy byłyby niezwykle ciekawym kierunkiem badań.

Na zakończenie chciałabym prosić doktorantkę o wyrażenie opinii na temat mysich modeli chorób zakaźnych i tego czy są to zawsze odpowiednie modele do badań, jakie wady i zalety ma użycie modeli zwierzęcych.

Moje kolejne pytanie dotyczy patogenezy chorób wywoływanych przez *P. gingivalis*. Czy znane są inne cele w organizmie człowieka, czy znany jest rezerwuar tego patogenu i czy wywołuje on naturalnie infekcje u innych zwierząt niż człowiek?

I ostatnie pytanie, jak doktorantka tłumaczyłaby fakt, że tylko dotchawicze podanie bakterii wywołuje określoną kaskadę wydarzeń i prowadzi do rozwoju zapalenia stawów.

Podsumowanie

Na podstawie oceny indywidualnego wkładu pani magister Kariny Adamowicz w powstanie rozprawy doktorskiej, mogę stwierdzić, że przedstawiona rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w artykule 13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 o tytule naukowym i stopniach naukowych oraz tytule i stopniach naukowych w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz 595, wraz późniejszymi zmianami). Zgodnie z ustawą, przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Zwracam się do Rady Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego z prośbą o dopuszczenie pani magister Kariny Adamowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Izabela Sobieska