

dr hab. Wioletta Adamus-Białek, prof. UJK

Kielce, 20.01.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Lidii Fiedorowicz pt. „Znaczenie zmienności genetycznej i fenotypowej *Mycobacterium tuberculosis* w procesie transmisji gruźlicy”

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Lidii Fiedorowicz została wykonana w Instytucie Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi pod opieką promotora prof. dr hab. Jarosława Dziadka oraz promotora pomocniczego dr Aliny Minias w trakcie kształcenia w Szkole Doktorskiej Uniwersytetu Łódzkiego i Instytutów Polskiej Akademii Nauk w Łodzi. Prace badawcze były finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu otrzymanego w konkursie OPUS 18 (nr projektu 2019/35/B/NZ7/00942), kierowanego przez prof. dr hab. Ewę Augustynowicz-Kopeć i w związku z tym realizowane częściowo w Instytucie Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie.

Rozprawa doktorska została przygotowana w formie pracy pisemnej zgodnie z wymogami przyjętymi dla prac doświadczalnych. Praca rozpoczyna się stroną tytułową, po której Autorka umieściła podziękowania, a następnie spis treści, podanie źródeł finansowania badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej, wykaz użytych skrótów i 10 rozdziałów pracy. Pierwszy rozdział to wprowadzenie do tematyki badawczej co stanowi 20 % właściwej części pracy (t.j. wstęp, cel, materiały, metody, wyniki, dyskusja, wnioski), po którym przedstawiono cel pracy, część metodyczną (t.j. opis zastosowanych materiałów i metod stanowiący ok. 28 % pracy), szczegółowy opis uzyskanych wyników badań (ok. 29 % pracy) oraz dyskusję i wnioski (12 stron, 11 % pracy). Pracę kończy streszczenie w języku polskim i angielskim, spis literatury i wykaz zastosowanych szczepów bakteryjnych, co łącznie stanowi 146 stron. Uważam, że waga poszczególnych części pracy jest racjonalnie rozłożona. Przedłożona praca spełnia formalne wymogi przygotowania rozprawy doktorskiej.

Przechodząc do oceny merytorycznej już na wstępie należy zwrócić uwagę na istotny atrybut rozprawy jakim jest realizacja badań naukowych we współpracy z Instytutem Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki. Jest to dowód na mobilność Kandydatki i umiejętność współpracy w różnych zespołach badawczych co jest wartościowym elementem pracy naukowej. Poszczególne części pracy będą omawiane zgodnie z ich

kolejnością przedstawioną w rozprawie. W wykazie skrótów, które skrupulatnie zostały wylistowane znajduje się kilka nieścisłości i błędów, według mnie skróty powinny w pierwszej kolejności wyjaśniać ich oryginalne pochodzenie (w tym przypadku język angielski), a następnie wyjaśnienie w tłumaczeniu na język polski. Skrót CRISPR dotyczy tylko Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, dopiero w przypadku CRISPR-Cas uzasadnione byłoby zastosowanie wyjaśnienia Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and associated proteins. Skrót DOT dotyczy strategii bezpośredniej obserwacji leczenia różnych chorób, nie tylko gruźlicy. Powszechnie popełnianym błędem, którego Kandydatka także nie wystrzegła się jest wyjaśnienie skrótu NGS, co oznacza sekwencjonowanie następnej, a nie nowej generacji, a WGS oznacza sekwencjonowanie całego genomu (całogenomowe). Skrót RFLP oznacza jedynie polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych co może być związane z różnymi *loci* DNA, a nie tylko z IS6110, co zostało błędnie wyjaśnione w tekście, poprawne zdanie w podrozdziale 1.5. na stronie 18 powinno brzmieć np. „Pozwoliło to na opracowanie metody IS6110-RFLP (ang. IS6110-based restriction fragments length polymorphism), opartej o analizę liczby kopii oraz rozmieszczenia w genomie sekwencji insercyjnej IS6110.”, podobnie jak w przypadku stwierdzenia, że MIRU-VNTR jest metodą. Wspomniany skrót odnosi się do powtórzeń w genomie *M. tuberculosis*, które są wykorzystywane w metodach typowania szczepów, ale wówczas należałoby zapisać np. MIRU-VNTR typowanie, lub MIRU-VNTR PCR.

Tematem rozprawy jest gruźlica, a dokładnie analiza czynników wpływających na jej rozprzestrzenianie. Jest to choroba, którą naukowcy zajmują się już od XIX wieku, jednak nadal pozostaje chorobą nieposkromioną, o wysokim wskaźniku chorobowości, zachorowalności i śmiertelności, dlatego podjęcie tego tematu przez Kandydatkę jest w pełni uzasadnione. WHO zajmuje się monitoringiem gruźlicy i od 1997 r. corocznie publikuje globalny raport na temat gruźlicy. Jego głównym celem jest zapewnienie kompleksowej i aktualnej oceny stanu epidemii gruźlicy i postępów w reagowaniu na poziomie globalnym, regionalnym i krajowym, w kontekście globalnych zobowiązań, strategii i celów dotyczących gruźlicy. Gruźlica jest chorobą, której można zapobiegać i którą zazwyczaj można wyleczyć. Jednak w 2023 r. gruźlica prawdopodobnie powróciła do roli głównej przyczyny śmierci na świecie, wyprzedzając COVID-19 i powoduje prawie dwukrotnie więcej zgonów niż AIDS. Ponad 10 milionów ludzi na świecie choruje na gruźlicę, a liczba ta rośnie od 2021 r. W związku z tym organizacje WHO i ONZ uznały, że konieczne jest podjęcie pilnych działań, aby zakończyć globalną epidemię gruźlicy do 2030 r. W 2024 roku opublikowany obszerny raport wskazał 49 krajów należących do wysokiego obciążenia gruźlicą (HBC for TB), które powinny być objęte szczególną uwagą. Kandydatka słusznie zwraca uwagę na sytuację epidemiologiczną gruźlicy na świecie i w Polsce, powinna jednak w swojej pracy odnieść się do ostatniego raportu WHO, a nie sprzed dwóch lat, gdzie wskazywano jedynie na 30 krajów z grupy HBC, a problemy miały nieco inny obraz.

Czynnikiem etiologicznym tej choroby jest bakteria *Mycobacterium tuberculosis* posiadająca specyficzne mechanizmy patogenności, które ułatwiają jej przeżycie w niekorzystnych warunkach

środowiska, rozprzestrzenianie i infekcję. Autorka słusznie zwraca uwagę na skomplikowany patomechanizm choroby uzależniony od wielu czynników i obrazowo przedstawia etapy infekcji na pierwszej rycinie, brakuje jednak informacji dotyczącej pochodzenia ryciny, czy jest to opracowanie własne czy na podstawie innego źródła. Rozumiem, że jest to pewne niedopatrzenie, ale należy zastanowić się jak to naprawić, ponieważ brak odniesienia do źródła narusza prawa autorskie. Dotyczy to również Ryc. 1.2. jak i pozostałych. W rozdziale opisującym mechanizmy lekooporności prątków gruźlicy podrozdział 1.3.1., ze względu na bardzo krótki wątek (1 akapit zajmujący mniej niż pół strony) powinien być połączony z podrozdziałem 1.3.2. tym bardziej że są one ściśle ze sobą powiązane tematycznie. W podrozdziale „Nadzór transmisji gruźlicy na świecie” Kandydatka wystarczająco, bez nadmiernej nadgorliwości omawia metody różnicowania prątków gruźlicy, jednak byłoby lepiej, aby podrozdziały 1.5.1. i 1.5.2. stanowiły jeden, aby unikać tworzenia krótkich jednoakapitowych podrozdziałów, o czym już wspominałam. Kolejne podrozdziały wstępu są także odpowiednio opisane wprowadzając z zaciekawieniem czytelnika w tematykę badań. Czuję jedynie mały niedosyt w związku z brakiem omówienia roli *loci IS6110* w różnicowaniu prątków gruźlicy, szczególnie że znajduje się on we wspomnianym regionie CRISPR. Czy Kandydatka mogłaby krótko wyjaśnić to zagadnienie?

Część metodyczna pracy została zrozumiale i dokładnie opisana przy istotnym wsparciu rysunkami technicznymi najważniejszych metod. W większości przypadków brakuje informacji dotyczących źródła opracowanych metod (opracowanie własne, czy na podstawie: protokół producenta, czy inne prace oryginalne?). Nie wiadomo również czy podłoże stałe Lowenstein-Jensena było samodzielnie przygotowywane, czy zakupione gotowe? Podobnie jak w przypadku mieszanin reakcyjnych – brak informacji dotyczącej producenta poszczególnych odczynników. Kandydatka w podrozdziale 4.1. „Badania przesiewowe i analiza literatury wykorzystane do publikacji artykułu systematic review” opisuje, że ten etap pracy badawczej polegał na przeglądzie literatury, a uzyskane dane zostały przeanalizowane statystycznie, co jednak nie znalazło odniesienia w wynikach, a przynajmniej nie zostało to wyartykułowane. W podrozdziale 4.2. Kandydatka wspomina, że na podstawie wstępnego genotypowania metodą spoligotypowania wybrano szczepy potencjalnie wysoko- i niskotransmisyjne, później opisuje, że spoligotypowanie było przeprowadzone *in silico*, a w innej części pracy, że wyniki spoligotypowania w niektórych przypadkach różniły się w zależności od metody (laboratoryjna oraz WGS). Proszę o wyjaśnienie czy regiony CRISPR były analizowane zgodnie z przyjętą procedurą laboratoryjną spoligotypowania? Jeżeli tak – to brakuje opisu tej metody w rozprawie. Pojawił się również błąd w numeracji podrozdziałów, są bowiem dwa podrozdziały 4.2. Moim zdaniem nie było potrzeby tworzyć tak dużą liczbę podrozdziałów, ponieważ wiele z nich można było połączyć w jedną część ze względu na podobny i niewielki zakres tematyczny. Podsumowując, należy podkreślić, że ilość zastosowanych metod i przeprowadzonych analiz wymagała olbrzymiego nakładu pracy i nabycia wszechstronnych umiejętności laboratoryjnych.

W części wynikowej w pierwszym akapicie podrozdziału 5.1. Autorka przedstawiła proces selekcji szczepów do dalszych badań, opis jest jednak dość zawiły i trudno zorientować się dokładnie, ile i które szczepy zostały poddane jakim analizom. Dobrze byłoby zatem przedstawić tabelę z wypunktowanymi przeprowadzonymi analizami dla poszczególnych szczepów / grup szczepów i/lub schemat przedstawiający proces selekcji tychże szczepów oraz schemat przeprowadzonych badań. Dodatkowo opis selekcji szczepów potencjalnie wysoko- i niskotransmisyjnych przeprowadzono na podstawie danych epidemiologicznych i wstępnego genotypowania w obszarach CRISPR-*cas* oraz MIRU-VNTR. Jednak ani w metodach, ani później w opisie wyników Kandydatka nie wspomniała o analizie MIRU-VNTR. Nie znane są zatem wyniki analizy MIRU-VNTR, a jedynie oświadczenie, że posłużyły do wstępnego różnicowania szczepów. Uprzejmie proszę o wyjaśnienie tej kwestii – czy była przeprowadzona analiza MIRU-VNTR, a jeśli tak to co z tego wynika? Chciałam również zapytać, czy zastanawiała się Pani nad analizą IS6110-RFLP w celu wstępnej selekcji szczepów? Jest to jedna z najważniejszych metod różnicowania szczepów *M. tuberculosis*. Dlaczego nie została ona wybrana? A jeżeli do wstępnej selekcji wykorzystano (oprócz danych epidemiologicznych) jedynie dane pochodzące z WGS, a dokładnie obszary CRISPR– czy analizowała Pani wspomniane *loci*? Regiony CRISPR zostały wykorzystane tylko do spoligotypowania szczepów, czyli porównania podobieństwa tych regionów, ale może warto zastanowić się nad bardziej dokładną analizą tych regionów – liczba, rodzaj DR oraz obcego DNA (spacer) oraz polimorfizm genów *cas*. Co Kandydatka o tym sądzi?

Na Rycinie 5.1. podana jest grupa szczepów "pozostałe", z jakich dokładnie województw zostały one wyizolowane, ponieważ w sumie stanowią największą grupę? W rozdziale 5.2. Kandydatka napisała "zaobserwowaliśmy, w niektórych przypadkach niezgodność między spoligotypowaniem laboratoryjnym, a *in silico*". proszę o wyjaśnienie co Kandydatka miała na myśli, ponieważ oprócz analizy regionów CRISPR na podstawie uzyskanych danych z WGS nie znalazłam nigdzie innej metody i wyników. Autorka rozprawy wspomina także w podrozdziale 5.2., że były porównywane mutacje w genomach szczepów wysokotransmisyjnych i niskotransmisyjnych w trzecim etapie pracy. Stwierdzenie to pojawia się także w kontekście analizy lekooporności. Proszę o wyjaśnienie co ma Pani na myśli (np. jakie mutacje, gdzie, ile)? Wyniki przedstawione na Rycinach 5.3., 5.4., 5.5., 5.9. powinny być punktowe, ponieważ nawet jeżeli grupowo – to analizowane są wyniki dla różnych szczepów. Wartość *p* dla zastosowanej analizy statystycznej powinna być podana, nawet jeżeli nie wykazano istotnej statystycznie różnicy. W testach kompetencyjnych określa się stosunek liczby szczepów opornych do wrażliwych pomiędzy pierwszym i ostatnim dniem hodowli. W przypadku badań przedstawionych w rozprawie analiza dotyczy pojedynczych szczepów, więc wynik będzie 0 – 1, jeżeli dobrze rozumiem. Proszę wyjaśnić czego dotyczy zastosowany wzór do analizy kompetycji i co przedstawiają wartości na Rycinach 5.7. i 5.8.? Dodatkowo, w mojej ocenie opisy do rycin powinny być szczegółowo opisane tak aby mogły stanowić element graficzny w pełni zrozumiały niezależnie od tekstu pracy. Przede wszystkim powinna być informacja nt. zastosowanego testu statystycznego i wartości *p*. Kandydatka

badala także indukcję wytwarzania cytokin w grupach szczepów wysoko- i niskotransmisyjnych ale stwierdziła, że nie ma różnic istotnych statystycznie. Proszę wyjaśnić jaki test statystyczny był wykorzystany oraz dlaczego? Czy w ocenie istotności statystycznej analizowano pojedyncze cytokiny, czy ogólną indukcję wszystkich cytokin pomiędzy badanymi grupami szczepów? Podsumowując, Kandydatka nie zaobserwowała istotnych różnic fenotypowych i genetycznych z wyjątkiem zdolności do inwazji makrofagów (*vel* pochłaniania przez makrofagi). Jakie mogą być tego przyczyny, ponieważ szczepy zostały pierwotnie zróżnicowane jako potencjalnie bardziej i mniej zdolne do transmisji w środowisku? Nie zaobserwowano także różnic w ekspresji na poziomie transkrypcji badanych 3 par szczepów, ale ta kwestia została wyczerpująco i racjonalnie wyjaśniona w dyskusji.

W dyskusji Autorka rozprawy odniosła się do wielu badań, które w istotny sposób przyczyniły się do pogłębienia wiedzy na temat zmienności genetycznej szczepów w korelacji z ich wirulencją. Umiejętnie wkomponowała przeprowadzone badania w wątek epidemiologiczny i poprowadziła dyskusję chronologicznie do opisanych wyników badań. Na stronie 98 w ostatnim akapicie Kandydatka wspomina, że na podstawie analizy uzyskanych danych z WGS nie zaobserwowano istotnych różnic w mutacjach pomiędzy badanymi grupami szczepów. Biorąc pod uwagę brak jakichkolwiek informacji na ten temat w wynikach, zdanie to jest bardzo enigmatyczne, proszę wyjaśnić czego dotyczyły wspomniane mutacje i z czego może wynikać brak istotności statystycznej? Pomijając tę kwestię, dyskusja wyników to duży atrybut pracy, ponieważ Kandydatka rzetelnie odniosła się do badań innych autorów i uczciwie zinterpretowała uzyskane wyniki badań, zwracając uwagę na pewne ograniczenia pracy. Wszystkie uzyskane wyniki badań są bardzo istotne naukowo, mimo że nieistotne statystycznie, ponieważ dzięki tym badaniom doskonale widać, że patomechanizm gruźlicy jest jeszcze bardziej skomplikowany niż nam się wydaje. Dodatkowo, sformułowane wnioski dają wystarczające uzasadnienie do kontynuowania, poszerzenia przeprowadzonych badań. Za szczególnie wartościowe obserwacje uważam wykrycie braku różnic w przeżywalności w makrofagach mimo zwiększonej inwazyjności makrofagów w grupie szczepów potencjalnie wysokotransmisyjnych. Czy znajduje Pani jakąś hipotezę dla tych obserwacji? Kopalnią wiedzy może być także dogłębna analiza danych pochodzących z WGS, ponieważ mam wrażenie, że dane te zostały wykorzystane w bardzo ograniczonym zakresie, prawdopodobnie celowo, ze względu na ogromną ilość zaplanowanych innych badań. Biorąc pod uwagę złożoność badanych procesów i kluczową rolę czynników zewnętrznych (gospodarz, środowisko), czy zastanawiała się Pani nad rolą mechanizmów epigenetycznych w odmiennej zdolności do rozprzestrzeniania, czy wirulencji prątków gruźlicy? Brakuje także w pracy wyraźnych sformułowań dotyczących innowacyjności przeprowadzonych badań. Uprzejmie proszę o wyartykułowanie tych atrybutów pracy. Dodatkowo, ciekawa jestem, czy istnieją dalsze plany kontynuacji omówionych wątków badawczych. Czy Kandydatka ma dalsze plany rozwoju naukowego, jeśli tak – czy może się podzielić nimi z nami? Podsumowując, z pewnością prątki gruźlicy jak i choroba, którą powodują nie należą do tzw. łatwych obiektów do badań. Znajomość tych ograniczeń i trudności

to podstawowy warunek, aby prawidłowo zaplanować eksperymenty i właściwie zinterpretować uzyskane wyniki badań. Kandydatka udowodniła swoją dużą dojrzałość naukową i umiejętność zaplanowania, prowadzenia, analizy i dokumentacji pracy badawczej.

Kończąc moją analizę rozprawy doktorskiej – została ona napisana bardzo przystępnym i jednocześnie naukowym językiem. Bardzo bogate i aktualne piśmiennictwo (przez brak numeracji szacuję ok 250 pozycji) cytowane jest poprawnie. Zidentyfikowałam nieliczne błędy literowe, interpunkcyjne i gramatyczne np. na 137 str. powinno być „makrofagową”, nazwy własne piszemy wielką literą (np. Pracowni Biologii Molekularnej i Komórkowej), tak jak nazwy tabel i rycin, a nazwy genów (np. *cas*) kursywą i małą literą. W niektórych miejscach brak jednolitych reguł edytorskich – np. różne odstępy między wierszami, wypunktowanie lub brak w analogicznym miejscu. Powyższe uwagi jak i nieliczne błędy przy tak obszernej ilości przeprowadzonych badań nie umniejszają wartości przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej, którą oceniam pozytywnie (bardzo wysoko). Wyrazy uznania kieruję dla Kandydatki Lidii Fiedorowicz jak i Pan Promotora Profesora Jarosława Dziadka.

Niniejszym stwierdzam, że przedłożona rozprawa doktorska stanowi bardzo istotny wkład w dotychczasową wiedzę na temat *M. tuberculosis* i jednocześnie oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Rozprawa doktorska mgr Lidii Fiedorowicz pt. „Znaczenie zmienności genetycznej i fenotypowej *Mycobacterium tuberculosis* w procesie transmisji gruźlicy” spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Z pełnym przekonaniem wnoszę więc do Rady Naukowej Instytutu Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi o dopuszczenie mgr Lidii Fiedorowicz do dalszych etapów postępowania doktorskiego i rekomenduję podjęcie uchwały o wyróżnieniu rozprawy doktorskiej. Uzasadnieniem jest wyróżniający się zakres prac badawczych, ilość zastosowanych technik i uzyskanych wyników badań oraz potencjał aplikacyjny. Dodatkowo temat pracy obejmuje priorytetowe zadania WHO i innowacyjne podejście w rozwiązaniu problemu badawczego.



dr hab. Wioletta Adamus-Białek, prof. UJK