

Prof. dr hab. med. Urszula Demkow
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego
Warszawski Uniwersytet Medyczny

**Ocena osiągnięcia naukowego oraz działalności naukowej i dydaktycznej dr n. biol.
Anny Brzostek kandydatki do stopnia doktora habilitowanego nauk medycznych**

1. Uwagi formalne

Recenzję niniejszą wykonałam w związku powołaniem mnie w skład komisji habilitacyjnej przez Centralną Komisję do Spraw Stopni i Tytułów. Oceny dokonałam według obowiązujących uregulowań prawnych, biorąc pod uwagę przede wszystkim dorobek naukowy i wkład Kandydatki w rozwój uprawianej dyscypliny naukowej oraz możliwość samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Podstawą oceny był zbiór opublikowanych artykułów stanowiących rozprawę habilitacyjną, zestaw załączonych dokumentów, w tym omówienie najważniejszych osiągnięć naukowych i tematyki badawczej oraz zwięzłe przedstawienie badań opublikowanych w pracach wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej, a także zestawienie działalności dydaktycznej, wykaz nagród i innych wyróżnień oraz udział w krajowych i międzynarodowych projektach badawczych.

Przesłany mi materiał dokumentacyjny zawiera autoreferat Pani dr n. biol Anny Brzostek omawiający zakres badań i dorobek naukowy Habilitantki, spis publikacji z podanym sumarycznym współczynnikiem oddziaływania publikacji naukowych według listy JCR, liczbę cytowań publikacji według bazy Web of Science z podaniem indeksu Hirscha oraz dodatkowe informacje.

2. Ocena osiągnięcia naukowego pt. „Metabolizm steroidów w patogenezie prątków gruźlicy.”

Na rozprawę habilitacyjną składa się 6 publikacji. Wszystkie publikacje są pracami o autorstwie zespołowym. W 4 pracach habilitantka jest pierwszym autorem (wkład własny 65-70%) w 2 pozostałych jest kolejnym autorem a Jej wkład badawczy wynosi 20%. Prace publikowane są w renomowanych międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania. Łączny IF cyklu prac wynosi 19,946; KBN/MNiSzW – 180.

Istotne wątpliwości budzi tytuł rozprawy habilitacyjnej „Metabolizm steroidów w patogenezie prątków gruźlicy.” Tak sformułowany tytuł zawiera dużą nieścisłość. Zgodnie z definicją, potwierdzoną w dostępnych encyklopediach i słownikach języka polskiego/wyrazów obcych, patogeneza to mechanizm powstawania choroby (wyraz pochodzi z połączenia 2 słów pochodzenia greckiego – patologia i geneza). Zatem termin „patogeneza prątków gruźlicy” jest pozbawiony sensu i całkowicie błędny. Można się domyślać, że chodzi nie tyle o patogenezę prątka (bakterii) co o patogenezę gruźlicy (choroby).

W kontekście patogenyzy gruźlicy praca habilitacyjna dotyczy bardzo aktualnych i ważnych zjawisk. Unikalne mechanizmy przemian lipidowych u prątków gruźlicy pozwalają na przetrwanie w organizmie gospodarza pomimo ataków układu odpornościowego. Te właśnie cechy prątków decydują o jego możliwościach przeżycia w stanie latencji. Osobliwości metabolizmu prątków tłumaczą przewlekłość zakażenia oraz trudności w zwalczeniu gruźlicy. Zjawiska, które bada Habilitantka są unikalne i decydują o rozwoju choroby. Co więcej, kluczowe punkty przemian lipidowych mogą stać się punktem docelowym dla potencjalnie skutecznej metody leczenia gruźlicy. Zasadniczym celem rozprawy jest identyfikacja i charakterystyka wybranych enzymów biorących udział w metabolizmie steroidów oraz określenie ich roli w chorobotwórczości prątka. Prowadzone badania poszerzyły wiedzę o istotnych etapach przemian pochodnych cholesterolu w organizmie prątka gruźlicy i *M. smegmatis* oraz pozwoliły na zdobycie nieznanych, istotnych informacji o interakcjach pomiędzy organizmem prątków a rozwojem gruźlicy u człowieka.

Wiedza o kluczowych czynnikach warunkujących patogenność prątka może mieć duże znaczenie w praktyce klinicznej, a zatem bardzo cenne jest podjęcie przez Habilitantkę badań tego trudnego i ważnego zagadnienia.

W publikacjach wchodzący w skład rozprawy habilitacyjnej Autorka podejmuje ocenę struktury i funkcji genu *kstD* kodującego istotny enzym przemian cholesterolu Δ^1 -

dehydrogenazę 3-ketosteroidową *M. smegmatis*. W ramach prowadzonych eksperymentów skonstruowano szczep mutantu *M. smegmatis* charakteryzujący się zmodyfikowanymi zdolnościami biotransformacji steroli. Otrzymany mutant pozwolił na przeprowadzenie badań umożliwiających poznanie zależności pomiędzy poszczególnymi elementami szlaków przemian pochodnych cholesterolu u tych prątków. Przeprowadzona analiza bioinformatyczna potwierdziła istnienie różnic w badanym obszarze genomu pomiędzy *M. smegmatis* i *M. tuberculosis*. Przeprowadzono analizę porównawczą genów obydwóch prątków pozwalającą na odkrycie homologii oraz różnic pomiędzy tymi gatunkami w porównywalnych obszarach genomu.

Kolejno wybrano 2 geny *ksD-1* i *ksD-2* charakteryzujące się różnym stopniem homologii z odpowiednimi genami *M. tuberculosis*. Następnym etapem badań była konstrukcja szczepu mutantu *M. smegmatis* metodą wymiany alleli pozwalającą na bardzo wybiórcze wyciszenie wybranego genu, bez uszkodzenia otaczających fragmentów genomu. Skonstruowano defektywne szczepy *M. smegmatis* pozbawione jednego lub obu genów tj *kstD-1* i *kstD-2*. Wykazano, że mutanty genu *kstD-1* akumulowały pośrednie produkty przemian cholesterolu, natomiast nie obserwowano takich zmian u mutantu *kstD-2*, który metabolizował badane związki w podobnym tempie jak szczep dziki. Na podstawie opisanych eksperymentów badawczych Habilitantka stwierdziła, że KstD1 jest główną dehydrogenazą kortykosteroidową *M. smegmatis*. Skonstruowany mutant *M. smegmatis* w zakresie obu genów *kstD* posłużył jako model do dalszych badań odnoszących się do *M. tuberculosis*.

Szczep mutantu, do którego wprowadzono wektor plazmidowy niosący gen *kstD_{Mtb}*, odzyskał zdolność metabolizowania cholesterolu. Dla porównania, inny badany gen *M. tuberculosis*, wprowadzony za pomocą tej samej techniki, nie spowodował normalizacji zaburzeń metabolizmu w badanym zakresie. Na podstawie powyższych eksperymentów zidentyfikowano geny kodujące dehydrogenazy ketosteroidowe kluczowe w metabolizmie cholesterolu u obu gatunków prątka. Enzymy te są decydującą o wirulencji prątków gruźlicy, interferując z mechanizmami obronnymi gospodarza i zapewniając przeżycie prątkom w niekorzystnym środowisku wewnątrzkomórkowym. Kolejnym celem pracy habilitacyjnej była ocena zdolności prątków gruźlicy do gromadzenia oraz rozkładu związków cholesterolowych. Udowodniono, że związki cholesterolu są gromadzone we frakcji wolnych lipidów ściany komórkowej prątka, co utrudnia penetrację ryfampicy do wnętrza komórki prątka. Kolejno Kandydatka badała procesy degradacji związków cholesterolowych katalizowane przez Δ^1 -dehydrogenazę 3-ketosteroidową. Kolejnym celem eksperymentów badawczych była ocena zależności pomiędzy zjawiskiem wnikania i przeżycia prątków wewnątrz makrofagów przemianami cholesterolu. Badania przeprowadzono z zastosowaniem

ludzkiej linii monocytarno-makrofagowej THP-1, potwierdzając zależność pomiędzy zdolnością do degradacji cholesterolu a patogennością prątków. Wykazano również, że mutacja w genie *kstD* nie wywołuje zaburzeń w przekazywaniu sygnału przez receptor TRL-2 w zakażonych makrofagach.

Ostatnia część badań Habilitantki koncentrowała się wokół zagadnień powiązanych udziałem oksydazy cholesterolowej i innych enzymów w degradacji cholesterolu przez mikroorganizmy i wpływu tych przemian na patogenność mikroorganizmów. W tym celu skonstruowano szczep prątka, u którego wyciszono gen *choD* a następnie do takiego mutantu wprowadzono gen funkcjonalny. Badanymi szczepami zakażano myszy, które poddawano eutanazji a ich płuca i śledziony wysiewano na podłoża hodowlane. W przeprowadzonych eksperymentach potwierdzono, że szczep z wyciszonym genem nie był patogenny, przeciwnie do szczepu niosącego funkcjonalną kopię badanego genu. Dodatkowe badania na linii makrofagalnej, potwierdziły udział kodowanego enzymu w modulacji przeciwprątkowej aktywności makrofagów. Kolejno wykazano, że żaden z badanych enzymów nie jest niezbędny do degradacji cholesterolu zarówno przez *M. smegmatis* jak i *M. tuberculosis*.

W posumowaniu pragnę podkreślić, że praca dr n. biol. Anny Brzostek stanowi kolejny dowód na to, że przemiany związków lipidowych są kluczowe w patogenezie gruźlicy. Niewątpliwie praca stanowi oryginalny dorobek naukowy habilitantki. Jest dowodem jej pracowitości, umiejętności planowania i realizowania badań naukowych. Świadczy o zdolności do samodzielnego rozwiązywania postawionych sobie celów badawczych, o umiejętności krytycznej interpretacji wyników badań na tle właściwie wykorzystanego piśmiennictwa naukowego oraz logicznego wnioskowania. Zaprezentowany cykl prac nie jest przypadkowym zestawem publikacji lecz jest odpowiedzią na logiczny ciąg zadawanych pytań dotyczących badanego zagadnienia oraz pytań pojawiających się stopniowo podczas realizacji eksperymentów badawczych. Przedstawiona do oceny rozprawa habilitacyjna niewątpliwie zachęca do kontynuowania badań dotyczących opisywanych problemów.

Do najbardziej istotnych osiągnięć Habilitantki zaliczam:

- Właściwe powiązanie zagadnień doświadczalnych będących przedmiotem pracy ze złożonym obrazem procesów patologicznych charakterystycznych dla gruźlicy.
- Udowodnienie, że ksD-1 jest główną dehydrogenazą cholesterolową u *M. smegmatis*
- Pogłębienie podstawowej wiedzy o przemianach cholesterolu u patogennych i niepatogennych prątków

- Określenie powiązań pomiędzy badanymi zjawiskami a mechanizmami obronnymi gospodarza zarówno *in vivo* jak i *in vitro*.
- Określenie roli wybranych genów prątków w metabolizmie cholesterolu
- Powiązanie pomiędzy badanymi zagadnieniami a patogennością badanych szczepów prątków.
- Stworzenie nowej wiedzy, która może być podłożem do powstania innowacyjnych leków przeciwprątkowych.

Ocena dorobku naukowego i dydaktycznego Habilitantki

3a. Charakterystyka dorobku naukowego

Analiza osiągnięć naukowo-badawczych Habilitantki wykazała, że kandydatka posiada bardzo wartościowy dorobek naukowy. Łącznie jest autorem lub współautorem 30 prac oryginalnych i poglądowych opublikowanych w bazie JRC, nie wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej oraz 5 monografii/innych prac spoza bazy JCR. Sumaryczny IF opublikowanych prac wynosi 94,045; liczba cytowań (wszystkich prac, łącznie z włączonymi do rozprawy habilitacyjnej) wynosi 406, Indeks Hirscha 14.

Kandydatka uczestniczyła w badaniach zagadnień związanych z analizami epidemiologicznymi na podstawie typowania genetycznego prątków (7 publikacji). Kilka prac oryginalnych Habilitantki przedstawia wyniki badań dotyczących molekularnych mechanizmów nabywania odporności na leki przeciwprątkowe (5 publikacji). Kolejną część dorobku Habilitantki dotyczy zagadnień związanych z mechanizmami naprawy DNA u *M. tuberculosis* (7 prac). Pozostałe prace oryginalne Kandydatki tematycznie związane są z potencjalnymi miejscami docelowymi dla nowych leków przeciwprątkowych (3 prace), badaniem białek *Toxoplasma gondii* jako antygenów szczepionkowych (4 publikacje), podziałami komórkowymi mykobakterii (2 prace), przemianami kwasów tłuszczowych u prątków (2 publikacje), badaniami molekularnymi prątków szybko rosnących (4 prace przed doktoratem i 3 po doktoracie). Dorobek Habilitantki nie wchodzący w skład rozprawy habilitacyjnej jest bardzo znaczący. Wyniki prowadzonych prac zostały zaprezentowane na wielu konferencjach naukowych.

Habilitantka brała czynny udział w realizacji szeregu projektów naukowych finansowanych ze źródeł zewnętrznych. W przeszłości Kandydatka była kierownikiem 1 projektu MNiSW. Była również wykonawcą 3 międzynarodowych i 4 projektów krajowych. Kandydatka brała czynny udział w licznych konferencjach naukowych krajowych i

zagranicznych, była również zapraszana do wykonywania recenzji prac w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowych.

Za działalność naukową Habilitantka otrzymała liczne nagrody i wyróżnienia: nagrody Dyrektora Centrum Mikrobiologii i Wirusologii PAN, nagrody za publikacje i prace prezentowane na konferencjach naukowych. Kandydatka odbyła też 4 staże zagraniczne.

3b. Charakterystyka dorobku dydaktyczno-wychowawczego

Dr n. biol. Anna Brzostek prowadzi szkolenia dla studentów polskich oraz zagranicznych. Habilitantka pełniła funkcję opiekuna młodych pracowników naukowych, w tym 5 doktorantów oraz 6 magistrantów.

4. Wniosek końcowy

Na podstawie szczegółowej analizy rozprawy habilitacyjnej oraz dorobku naukowego, dydaktycznego i zawodowego stwierdzam, że dr n. biol. Anna Brzostek:

- przedłożyła do oceny osiągnięcie naukowe pt., „Metabolizm steroidów w patogenezie prątków gruźlicy”, które stanowi znaczny wkład Habilitantki w rozwój nauk medycznych w zakresie biologii medycznej;
- ma udokumentowany, oryginalny dorobek naukowy, w znacznej mierze w prestiżowych czasopismach naukowych krajowych i zagranicznych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, który spełnia wymagania stawiane Kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora habilitowanego;
- dorobek naukowy Kandydatki został uhonorowany licznymi nagrodami i wyróżnieniami;
- Habilitantka wykazuje szerokie spektrum zainteresowań naukowych, posiada umiejętność podejmowania ważnej tematyki badawczej;
- kierowała krajowym projektem badawczym;
- wygłaszała referaty na międzynarodowych oraz krajowych konferencjach;
- posiada odpowiedni dorobek dydaktyczny.

W oparciu o przedstawioną analizę stwierdzam, że przedstawione do recenzji spójne tematycznie osiągnięcie oraz dorobek naukowy i dydaktyczny dr n. biol. Anny Brzostek spełnia kryteria uprawniające do nadania stopnia doktora habilitowanego w obszarze biologii medycznej. Kandydatka jest aktywnym, młodym naukowcem otwartym na nowe obszary badań, pełnym pasji zarówno w prowadzeniu badań naukowych, jak i w pracy z młodzieżą.

Jej dorobek naukowy, ilość publikacji oraz projektów, w które była i jest zaangażowana, a także dorobek dydaktyczny w pełni świadczą o świetnym przygotowaniu Habilitantki do prowadzenia samodzielnej pracy naukowo-badawczej. Jest także, jako przyszły samodzielny pracownik naukowy, świetnie przygotowana do pracy dydaktycznej. Tym samym popieram wniosek dr n. biol. Anny Brzostek o nadanie stopnia naukowego doktora habilitowanego nauk medycznych w dyscyplinie biologia medyczna.

Prof. dr hab n. med. Urszula Demkow

