



# UNIwersytet Medyczny

## IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Nauk o Zdrowiu  
Zakład Nauk Podstawowych  
dr hab. n. med. Dorota Diakowska, prof. uczelni

Wrocław, dn. 19.09.2023 r.

### RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Piotra Naporowskiego pt.  
„Badania reaktywności przeciwciał surowicy ludzkiej z bakteryjnym białkiem OmpC jako  
markerem humoralnych niedoborów odporności”  
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Danuty Witkowskiej z Instytutu Immunologii  
i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu

#### Ocena wyboru tematu

Głównym celem badań recenzowanej pracy było ustalenie reaktywności i oznaczenie poziomu swoistych przeciwciał anti-OmpC w surowicy krwi dzieci z niedoborami odporności, z nawracającymi zapaleniami dróg oddechowych, u dzieci bez niedoborów odporności oraz u osób dorosłych – honorowych dawców krwi. Analiza porównawcza mian swoistych przeciwciał anti-OmpC w grupach chorych i zdrowych dzieci jest przyczynkiem do możliwości opracowania testu diagnostycznego pozwalającego ocenić humoralne niedobory odporności w grupach osób z pierwotnymi niedoborami immunologicznymi. Doktorant wykonał również izolację swoistych przeciwciał anti-OmpC z ludzkiej krwi obwodowej zdrowych dawców krwi przy użyciu natywnego białka OmpC, koniugatów białkowych BSA-peptyd cykliczny lub liniowy zawierających sekwencję wiążącą białka Omp oraz rekombinowanego białka OmpC. Mgr Piotr Naporowski przeprowadził charakterystykę immunochemiczną przeciwciał anti-OmpC oraz sprawdził ich właściwości ochronne na modelu mysim, co w przyszłości mogłoby umożliwić użycie izolowanych przeciwciał jako terapeutyku do suplementacji pacjentów z humoralnymi niedoborami odporności.

#### Charakterystyka formalna rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Piotra Naporowskiego liczy 156 stron, zawiera 30 tabel, 33 ryciny i 136 pozycji piśmiennictwa. Praca spełnia wymagania formalne, została podzielona według

klasycznego wzorca obowiązującego przy rozprawach doktorskich na następujące rozdziały: Wykaz skrótów, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Bibliografia oraz Osiągnięcia i działalność naukowa Doktoranta.

### **Ocena merytoryczna**

Tytuł rozprawy doktorskiej jest zgodny ze zrealizowanym przez mgr Piotra Naporowskiego badaniem, czego potwierdzeniem jest treść rozprawy doktorskiej.

We Wstępie Doktorant omówił zagadnienia związane z budową układu immunologicznego, zamieścił definicję i charakterystykę pierwotnych niedoborów odporności, opisał suplementację immunoglobulin u pacjentów z niedoborami odporności. Na zakończenie tej części pracy mgr P. Naporowski opisał budowę, funkcje i reaktywność białek błony zewnętrznej pałeczek *Shigella flexneri*, należących do bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. W ostatniej części Wstępu (str. 43-45) Doktorant zwrócił uwagę, że badania dotyczące białka OmpC były prowadzone wcześniej w macierzystym laboratorium, a wyniki dotyczące pozyskania homogennego preparatu białka OmpC przy pomocy zmodyfikowanej metody Arcidiakono, zsekwencjonowanie genu odpowiedzialnego za kodowanie białka OmpC, wyznaczenie epitopu wiążącego przeciwciała anti-OmpC surowicy ludzkiej oraz pilotażowe badania dotyczące opracowania testu serologicznego do oznaczania humoralnych niedoborów odporności zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych. Autor pracy w swoim badaniu powtórzył procedury związane z pozyskaniem odpowiednich antygenów i przeciwciał anti-OmpC do badań własnych, a następnie skupił się na takich aspektach tematycznych jak opracowanie wyników potrzebnych do skonstruowania szybkiego testu do oznaczania humoralnych niedoborów odporności, oraz opracowanie terapeutyku do suplementacji przeciwciał anti-OmpC u pacjentów z niedoborami humoralnymi.

Rozdział Materiał i metody został zredagowany bardzo szczegółowo, jednak Doktorant w tej części pracy nie ustrzegł się błędów. Podstawowym celem badania była analiza porównawcza mian przeciwciał anti-OmpC w 3 grupach badanych: u dzieci z niedoborami odporności (n=127), u dzieci z nawracającymi zapaleniami dróg oddechowych (n=83) oraz u dzieci bez obciążeń immunologicznych – grupa kontrolna (n=40), jednak grupy te nie zostały dokładnie scharakteryzowane. W pracy brak opisu grup badanych dotyczącego wieku i rozkładu płci. Niekompletne dane dotyczące tych dwóch zmiennych demograficznych znajdują się dopiero na stronach 93 (Wyniki, Tabela 15) i str. 98 (Wyniki, Tabela 16). Wiedza dotycząca

tych danych pozwoliłaby na przeprowadzenie prawidłowej analizy statystycznej w prezentowanym badaniu.

Dlaczego do analiz porównawczych dotyczących trzech grup badanych, w skład których wchodziły dzieci o średniej wieku od 5.7 lat do 10.6 lat dołączono dodatkową grupę osób dorosłych, honorowych dawców krwi, których średnia wieku wynosiła 30.2 lata?

Do fragmentu rozdziału Materiały i metody, w której mgr Piotr Naporowski dokładnie opisał procedury pozyskania homogennego białka OmpC ze szczepu *Shigella flexneri 3a*, metody syntezy koniugatów białkowych BSA-peptyd cyklicznego lub liniowego, zawierających sekwencję wiążącą białka Omp oraz pozyskanie rekombinowanego białka OmpC oraz opisał izolację swoistych przeciwciał anti-OmpC z ludzkiej krwi obwodowej zdrowych dawców krwi przy użyciu pozyskanych antygenów – nie mam uwag.

Natomiast opis analizy statystycznej danych wskazuje, że analizy porównawcze pomiędzy 3 grupami badanymi zostały przeprowadzone nieprawidłowo, przy pomocy źle dobranych testów statystycznych. Różnice w rozkładzie płci i wieku w grupach badanych (biorę pod uwagę wyłącznie grupy dzieci, grupa osób dorosłych powinna być wyłączona z analiz porównawczych) wskazują, że do testowania statystycznego powinna być włączona analiza ANOVA lub ANCOVA z uwzględnieniem zmiennych zakłócających jakimi są wiek i płeć badanych oraz powinny być zastosowane odpowiednie testy post-hoc. Tymczasem wszystkie analizy porównawcze przeprowadzono przy pomocy testów t-Studenta i Manna-Whitney'a, które są stosowane do porównań danych w dwóch niezależnych grupach badanych. Testy te mogły być użyte jedynie w analizach porównawczych dotyczących płci w każdej z grup badanych.

Zbędne było także zamieszczenie w podrozdziale „Metody statystyczne” ryciny 6, która przedstawia schemat wykresu box-plot, szczególnie, że schemat jest błędny. Odpowiednim miarom położenia powinny odpowiadać adekwatne miary zmienności właściwe albo dla rozkładu typu normalnego, albo dla rozkładu, który nie jest typu normalnego. Na schemacie zamieszczono położenie średniej arytmetycznej, a odpowiadającą jej miarą zmienności były kwartyle! Ponadto wszystkie opisy metod statystycznych powinny znaleźć się w podrozdziale „Metody statystyczne”, a nie – w licznych fragmentach rozdziału Wyniki.

Rozdział Wyniki powinien być skorygowany, ponieważ jest kompilacją wyników powielonych z wcześniej wykonanych badań, powtórzeniem opisów metod badawczych, opisów metod statystycznych oraz komentarzy, które powinny znaleźć się w rozdziale Dyskusja. Przypominam, że rozdział Wyniki powinien zawierać wyłącznie wyniki badań

własnych Autora pracy, nie powinno się w nim cytować danych pozyskanych przez innych badaczy (np. opis na str. 89).

Na rycinie 19 brak widocznych prążków po rozdziale elektroforetycznym.

Dane dotyczące badania reaktywności i miana przeciwciał anti-OmpC klasy IgA i IgG należy ponownie zanalizować przy pomocy właściwie dobranych testów statystycznych a uzyskane wyniki zaprezentować w tabelach, które zawierają łącznie dane opisowe oraz wyniki testów (wartości p) dla 3 grup badanych. Nie było potrzeby prezentowania tych samych wyników w postaci wykresów box-plot i histogramów, wystarczyłby wybór jednej formy prezentacji (Ryciny 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32). Tabele 12, 13, 14, 17, 19, 20, 21, 24 nie pokazują, jak to opisał Autor „Wartości p świadczące o istotności statystycznej średnich mian przeciwciał...”, a wskazują na występowanie istotnych różnic pomiędzy mianami przeciwciał w grupach badanych. Wymienione tabele oprócz wartości p powinny zawierać również dane opisowe dotyczące uśrednionych mian przeciwciał uzyskanych dla każdej z grup badanych. Ponieważ głównym celem badania było określenie możliwości opracowania testu diagnostycznego pozwalającego ocenić humoralne niedobory odporności w grupach osób z pierwotnymi niedoborami immunologicznymi sugeruję, aby uzyskane wyniki badań dotyczące oznaczenia mian przeciwciał anti-OmpC poddać dodatkowo statystycznej analizie ROC z ustaleniem czułości i specyficzności opracowanej metody badawczej.

Nie mam uwag do kolejnego rozdziału pracy Dyskusji, którego treść umocniła moją pozytywną ocenę dotyczącą przeprowadzonych przez Doktoranta badań.

W rozdziale Wnioski Autor zamieścił opis uzyskanych wyników badań i 5 wniosków, będących odzwierciedleniem szerokiego zakresu przeprowadzonych badań. Doktorant prawidłowo sformułował wnioski dotyczące badania, ale rozdział ten powinien zajmować maksymalnie 1 stronę tekstu.

W rozprawie doktorskiej mgr Piotr Naporowski zacytował 136 publikacji, doniesień naukowych i podręczników, stosując harvardzki system cytowania prac. Jedynie 33% artykułów zostało opublikowanych w ciągu ostatnich 10 lat, a tylko 13.2% prac to publikacje z ostatnich 5 lat, co świadczy o niezbyt dobrym przygotowaniu przez Doktoranta aktualnego piśmiennictwa naukowego.

Streszczenia w języku polskim i angielskim zostały napisane prawidłowo.

Jako Recenzent uważam, że ocenianą rozprawę doktorską charakteryzuje prawidłowe i nowatorskie ujęcie tematu badania przy wykorzystaniu nowoczesnych metod i technik badawczych z zakresu mikrobiologii, biochemii, spektroskopii i bioinformatyki oraz

akceptowalne opracowanie naukowe tematyki badawczej. Stwierdzam, że założony cel rozprawy doktorskiej został w pełni osiągnięty, a uzyskane wyniki badań stanowią istotny wkład w aktualny stan wiedzy obejmujący dyscyplinę nauki medyczne.

### **Podsumowanie**

Pan mgr Piotr Naporowski zrealizował zamierzony cel badania, wykorzystując prawidłowo dobrane metody i techniki badawcze. Wykazał się umiejętnością naukowego rozwiązywania problemu oraz wystarczającym stanem wiedzy na opracowany temat. Pomijając wykazane przeze mnie błędy i uchybienia, oceniam rozprawę doktorską pozytywnie, a przeprowadzone badania zawierają bezsprzecznie elementy nowości.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Piotra Naporowskiego spełnia warunki określone w art.187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (tj. Dz.U. z 2021r., poz.478 ze zm.). Przedkładam więc Radzie Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu **pozytywną ocenę** rozprawy doktorskiej oraz wnioskuję o dopuszczenie mgr Piotra Naporowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med. Dorota Diakowska, prof. uczelni

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
Wydział Nauk o Zdrowiu  
ZAKŁAD NAUK PODSTAWOWYCH  
*D. Diakowska*  
dr hab. Dorota Diakowska, profesor uczelni