



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Mikrobiologii
prof. dr hab. Grażyna Gościńskiak
e-mail:grazyna.goscińskiak@umed.wroc.pl

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 17-06-2021
L.dz. 1083

Wrocław 16.06.2021

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ewy Krzyżewskiej

Pt „Zależność pomiędzy długością części O-swoistej lipopolisacharydu a potencjałem patogenności bakterii z rodzaju *Salmonella*”

Rozprawa wykonana pod opieką Pana dr hab. Jacka Rybki, prof. IITD PAN, stanowi kontynuację wieloletnich badań prowadzonych przy współpracy z zespołem prof. Gabrieli Bugli Płoskońskiej z Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Dotychczasowe badania skupiały się na charakteryzowaniu mechanizmów oporności bakterii Gram-ujemnych wobec układu immunologicznego gospodarza, w tym układu dopełniacza oraz elementami błony zewnętrznej (OM) ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Praca doktorska mgr Ewy Krzyżewskiej mieści się w tym nurcie badawczym. Jej wyniki znacząco wzbogacają naszą wiedzę na temat roli długości części O-swoistej lipopolisacharydu w mechanizmach unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez bakterie z rodzaju *Salmonella*.

Rozprawa doktorska mgr Ewy Krzyżewskiej ma formę klasyczną. Opracowanie składające się z 11 rozdziałów: spis treści, streszczenie w j. polskim i w j. angielskim, wstęp, cel pracy, materiały i metody zastosowane w badaniach, wyniki, dyskusja wyników badań, wnioski i piśmiennictwo. Jest napisana poprawnym językiem naukowym, rzeczowo przedstawia zarówno zagadnienia teoretyczne jak i wyniki badań.

Streszczenie zawiera wprowadzenie do tematu, krótki opis wykonywanych badań i uzyskane wyniki.

We wstępie doktorantka wyczerpująco wprowadza w tematykę związaną z charakterystyką i chorobotwórczością bakterii z rodzaju *Salmonella*, a także dane epidemiologiczne dotyczące salmonelloz w Polsce i na świecie.

Ze swej strony pragnę uzupełnić o aktualne dane epidemiologiczne odnośnie liczby salmonelloz za rok 2020. W wyżej wymienionym roku nie stwierdzono w Polsce żadnego przypadku duru brzuszego a liczba zatruc pokarmowych wywołanych przez różne gatunki *Salmonella* wynosiła 5 270 co dało wyraźny spadek liczby zachorowań w porównaniu z rokiem 2019 gdzie zarejestrowano 9234 przypadki. W związku z częstym myciem i dezynfekcją rąk stosowanym w profilaktyce zakażenia przeciwko SARS-CoV-2 obserwuje się w Polsce znaczny spadek chorób zakaźnych. Ponadto we wstępie pracy Doktorantka szczegółowo przedstawiła budowę i techniki pomiaru długości cząsteczki lipopolisacharydu oraz interakcje lipopolisacharydu pałeczek *Salmonella* z układem immunologicznym gospodarza. Dane przedstawione we wstępie jak i ich analiza świadczą o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki do podjętych badań eksperymentalnych.

Cel pracy sformułowano klarownie, przedstawiając dwa cele ogólne i przewidywane etapy badań koniecznych do ich realizacji. Głównym celem rozprawy było określenie roli długości części O-swoistej lipopolisacharydu w mechanizmach unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza przez bakterie z rodzaju *Salmonella*. Cel ten zrealizowano poprzez określenie wpływu surowicy ludzkiej na kształtowanie długości lipopolisacharydu bakterii *Salmonella* 048 oraz uzyskanie mutantów *S. Enteritidis* o zróżnicowanej długości części O-swoistej Lipopolisacharydu i jego wpływie na patogenność bakterii poprzez oddziaływania ze składnikami dopełniacza. Ponadto przeprowadzono charakterystykę proteomu błony zewnętrznej *S. Enteritidis* badając jaki wpływ na skład białkowy mają wprowadzone mutacje długościowe lipopolisacharydu, oraz proteomu błony zewnętrznej *Salmonella* O48, w celu ustalenia zmian wywołanych przedłużoną ekspozycją bakterii na działanie surowicy ludzkiej.

Niezwykle rzetelnie i szczegółowo opisane zostały metody badań – na ich podstawie można odtworzyć przeprowadzone przez Doktorantkę eksperymenty, co zasługuje na uznanie. Metodologia badań jest właściwie dobrana i pozwala na zrealizowanie założonych celów pracy. Warto podkreślić, że Doktorantka, aby zrealizować cel pracy, wykorzystwała szereg technik badawczych, zarówno *in vitro* jak i *in vivo* między innymi poprzez określenie poziomu patogenności szczepów *S. Enteritidis* z wykorzystaniem larw *Galleria melonella*.

Wyniki badań zostały starannie opracowane i zaprezentowane. Podkreślam bogatą dokumentację pracy, w postaci 51 rycin i 32 tabel.

Przywołanie wszystkich wyników w recenzji nie jest możliwe, gdyż są one bardzo obszerne i wielowymiarowe. Wymienię tylko najistotniejsze osiągnięcia:

- Wykazano, że pasażowanie w 50% normalnej surowicy ludzkiej prowadzi do wzrostu przeżywalności bakterii *S. diarizonae* PCM 2511, ale nie pozwala na otrzymanie wariantu szczepu, który charakteryzowałby się odrębnym typem lipopolisacharydu. Nie stwierdzono także korelacji pomiędzy rosnącą opornością szczepu na przedłużone działanie surowicy a wzrostem średniej długości lipopolisacharydu, co jest ciekawą obserwacją w kontekście cytowanej przez Doktorantkę pracy *Pawlak i wsp. (2017)*
- Pomiar długości cząsteczek lipopolisacharydu ze względu na ich dużą zmienność strukturalną jest trudny. Dlatego bardzo istotnym dla dalszych badań było opracowanie metody pomiaru długości części O-swoistej LPS z wykorzystaniem chromatografii gazowo-cieczowej i konstrukcja mutantów chromosomalnych *S. Enteritidis* o różnej długości części O-swoistej lipopolisacharydu
- Potwierdzono główny udział drogi alternatywnej w litycznym działaniu układu dopełniacza względem testowanych mutantów o zróżnicowanym poziomie wrażliwości na bakteriobójcze działanie surowicy, a także, że kluczowe znaczenie dla ochrony bakterii w tym procesie ma lipopolisacharyd z tzw. długim łańcuchem O-swoistym (L-OAg)
- Wykazano, że skracanie części O-swoistej LPS zwiększa stopień pochłaniania bakterii *S. Enteritidis* PCM 2817 przez linię komórkową mysich makrofagów. W dobie oporności szczepów na antybiotyki istotne jest poszukiwanie nowych metod zwalczania drobnoustrojów. Być może skracanie części O-swoistej LPS będzie jedną z takich dróg.
- Jak wykazała Doktorantka skracanie części O-swoistej LPS moduluje skład białkowy białek będących aktywnymi składnikami osłon zewnętrznych jak i białek cytoplazmatycznych u badanych mutantów *S. Enteritidis*, które charakteryzują się zróżnicowaną patogennością, badaną in vivo na modelu larw *Galleria mellonella*.

Wyniki zaprezentowane w pracy są przekonujące, wyczerpująco opisane i świadczą o rzetelnym i dokładnym przeprowadzeniu badań, które umożliwiły osiągnięcie postawionego w pracy celu.

Nie znalazłam jednak informacji dotyczących kilku kwestii i proszę Doktorantkę o ich uzupełnienie:

- Str 12 „**poziom modelowej patogenności**” –proszę o wyjaśnienie tego terminu
- Str 17 Bakterie Salmonella charakteryzują się dużą **odpornością na wysychanie** -----
- **opornością**
- Do pięciu najczęściej izolowanych od ludzi szczepów należą: monofazowa *S. Typhimurium* Izolowanych gatunków. Proszę wyjaśnić co to za gatunek **monofazowa *S. Typhimurium***
- **Material i Metody** : Trudności w odczytaniu analizowanych serotypów (np. str 41)
- **Wyniki**: pod wykresami należałoby wskazać ilość powtórzeń biologicznych i technicznych
- **Str 137** Zjawisko oporności na czynniki bakteriobójcze występujące w surowicy wśród bakterii Salmonella jest uwarunkowane zmienną długością łańcucha O–swoistego LPS, **posiadaniem polisacharydowych otoczek****Pałeczki salmonella posiadają pojedyncze rzęski nie tworzą otoczek**
Technicznie rzecz biorąc, Salmonella typhi produkuje coś w rodzaju otoczki - jako polisacharyd Vi, albo otoczkę typu IV, chociaż rzeczywiście nie są one kwalifikowane jako typowy antygen K, których u Salmonella brak, i chyba o to chodziło doktorantce w tekście.
- Podczas prezentacji wyników warto zachować jednolitość tj. w niektórych przypadkach wyniki poddano analizie statystycznej, w innych już nie np. ryc. 10,11, 51
- Proszę wyjaśnić jaka jest dalsza aplikacyjność wyników. Czy istnieją możliwości zastosowania wyników w praktyce klinicznej. Czy wskazane byłoby po izolacji szczepu Salmonella spp. od pacjenta określać typ LPS na powierzchni komórek bakteryjnych. Czy białka odpowiadające za proces wydłużania cząsteczki LPS w trakcie biosyntezy mogłyby stać się celem dla nowych leków?
- W pracy pokazano ciekawą metodę pomiaru długości lipopolisacharydu, jest to jednak pomiar średniej długości cząsteczek w badanym preparacie. Czy można dokładniej określać ilościowy rozkład poszczególnych frakcji długościowych lipopolisacharydu u bakterii?
- Na jakiej podstawie wytypowano białko OmpD do tworzenia mutantu *S. Typhimurium* pozbawionego tego białka?

Podsumowując recenzję merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Evy Krzyżewskiej mogę stwierdzić, że cel pracy doktorskiej został osiągnięty, a moje uwagi nie umniejszają jej wartości. Praca zawiera nowatorskie i jednocześnie ważne wyniki naukowe na temat udziału struktur powierzchniowych w mechanizmach unikania odpowiedzi immunologicznej przez bakterie z rodzaju *Salmonella*. Wykazano wpływ długości części O-swoistej LPS na interakcje z układem dopełniacza oraz na pochłanianie bakterii przez komórki ssacze. Ponadto scharakteryzowano wpływ długości części O-swoistej LPS na kształtowanie proteomu błony zewnętrznej bakterii *Salmonella*. Podkreślić też należy ogrom pracy włożonej w wykonanie badań, staranność ich wykonania i opisanie. Wyniki pracy powinny zostać opublikowane, ponieważ tylko wtedy mogą być wykorzystane do dalszych badań naukowych.

Uważam, że przygotowana do recenzji rozprawa doktorska pt „Zależność pomiędzy długością części O-swoistej lipopolisacharydu, a potencjałem patogenności bakterii z rodzaju *Salmonella*” mgr Evy Krzyżewskiej spełnia wymogi osiągnięcia naukowego, o którym mowa w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.Nr 65, poz 595. z późn. zm). Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej we Wrocławiu o dopuszczenie Pani mgr Evy Krzyżewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie zważywszy na nowatorskie elementy poznawcze zawarte w recenzowanej dysertacji, zastosowanie złożonych technik badawczych, a także potencjalne znaczenie praktyczne uzyskanych wyników zgłaszam wnioszek o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Instytut Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
kierownik
Gościński
prof. dr hab. Grażyna Gościński