

AUTOREFERAT

dr Jacek Rybka

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

Wrocław, 03 marca 2014

1. Jacek Rybka**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

2001	Doktor nauk biologicznych Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN Tytuł: „Badania oddziaływania antygenów bakteryjnych zawierających kwas 3 deoksy-oktulozonowy i kwas sjałowy z serotoniną” Promotor: prof. dr hab. Andrzej Gamian
1994	MSc in Biotechnology Uniwersyt Wrocławski Wrocław, Wydział Nauk Biologicznych, Faculty of Biological Sciences, biotechnology Tytuł: „Elektrostatyczna destabilizacja kompleksu b6f z tylakoidów grochu. Topografia białka Rieske”. Promotor: prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych

Czas zatrudnienia	2011 – obecnie
Instytucja naukowa	IITD PAN
Stanowisko/Funkcja	Zastępca Dyrektora ds. naukowych IITD PAN
Czas zatrudnienia	2011 – obecnie
Instytucja naukowa	IITD PAN
Stanowisko/Funkcja	asystent
Czas zatrudnienia	2009 – obecnie
Instytucja naukowa	IITD PAN
Stanowisko/Funkcja	Kierownik Pracowni Analizy Instrumentalnej i Preparatyki IITD PAN
Czas zatrudnienia	2003 – 2012
Instytucja naukowa	IITD PAN
Stanowisko/Funkcja	adiunkt
Czas zatrudnienia	1994 – 2003
Instytucja naukowa	IITD PAN
Stanowisko/Funkcja	asystent

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikające go z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego /artystycznego:

Wykorzystanie Kdo jako markera chemicznego lipopolisacharydów i NeuAc w analizach immunochemicznych oraz analiza ilościowa endotoksyn przy użyciu markera Kdo i technik mikrosystemowych.

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Rybka J, Zielińska-Kuzniarz K., Korzeniowska-Kowal A., Sondej A., Gamian A. Substitution pattern of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid in bacterial lipopolysaccharides investigated by methylation analysis of whole LPS. *Carbohydr. Res.* (2003) 338, 2679-2686. IF¹: 1.631; MNiSW²: 20; liczba cytowań³: 2
2. Rybka J., Gamian A. Determination of endotoxin by the measurement of the acetylated methyl glycoside derivative of Kdo with gas-liquid chromatography – mass spectrometry. *J. Microbiol. Meth.* (2006) 64 (2), 171-184. Epub 2005 Jun 1. IF: 2,297; MNiSW: 20; liczba cytowań: 11
3. Rybka J., Grycko P., da Cruz Francisco J., Gamian A., Szwajcer Dey E. Application of supercritical carbon dioxide (scCO₂) for the extraction of lipopolysaccharides (LPS) from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* PCM 2266, *J. Supercritical Fluids* (2008), 45, 51-56. IF: 2,428; MNiSW: 24; liczba cytowań: 7
4. Bugła-Płoskońska G., Rybka J., Futoma-Kołołch B., Cisowska A., Gamian A, Doroszkiewicz W. Sialic acid-containing lipopolysaccharides of *Salmonella* O48 strains - potential role in camouflage and susceptibility to the bactericidal effect of normal human serum. *Microbial Ecology* (2010), 59, pp. 601-613. IF: 2,875; MNiSW: 32; liczba cytowań: 7
5. Chałupniak A., Waszczuk K., Hałubek-Głuchowska K., Piasecki T., Gotszalk T., Rybka J. Application of quartz tuning forks for detection of endotoxins and Gram-negative bacterial cells by monitoring of *Limulus* Amebocyte Lysate coagulation.

¹ Wartość współczynnika wpływu (IF) zgodnie z rokiem opublikowania.

² Liczba punktów według polskiego systemu punktacji czasopism, zgodnie z rokiem opublikowania.

³ Liczba cytowań(z uwzględnieniem autocytowań), według bazy Web of Science, stan z dn. 26.02. 2014 r.

Biosensors and Bioelectronics (2014), w druku, DOI: 10.1016/j.bios.2014.02.048.
IF: 5,437; MNiSW: 45

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Lipopolisacharydy bakterii Gram-ujemnych, region Kdo

Lipopolisacharyd (LPS) jest integralnym składnikiem błony zewnętrznej ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Lipopolisacharydy wykazują szeroki zakres właściwości endotoksycznych, odgrywają także znaczącą rolę w rozwoju infekcji, zwłaszcza infekcji systemowych prowadzących do posocznicy i wstrząsu septycznego.

W budowie cząsteczki LPS można ogólnie wyróżnić trzy regiony różniące się syntezą, strukturą oraz funkcją: polisacharyd O-swoisty, oligosacharydowy region rdzeniowy i lipid A. W części rdzeniowej wyróżnić można strukturalnie dwa regiony: zewnętrzny i wewnętrzny. Podstawowymi składnikami rdzenia wewnętrznego są głównie heptoza i kwas 2-keto-3-deoksy-D-manno-oktulozonowy (Kdo), przy czym Kdo łączy część polisacharydową cząsteczki z lipidem A. Zwykle w cząsteczce LPS występuje od jednej do czterech cząsteczek Kdo, sacharyd ten znajdujący się też w innych regionach cząsteczki niż rdzeń wewnętrzny. Jako główny element, odpowiedzialny za immunostymulujące i immunotoksyczne właściwości LPS uznawany jest lipid A, uznawany jest jednak także wpływ struktury regionu Kdo na te cechy lipopolisacharydu, na przykład na indukcję wydzielania interleukiny 1 czy leukotrienu C4. Stwierdzono, że rdzeń wewnętrzny, zawierający Kdo, może tworzyć także epitop dla przeciwciał ochronnych. Kdo jest niezbędnym składnikiem LPS, uczestnicząc w wiązaniu kationów dwuwartościowych Ca^{2+} i Mg^{2+} i stabilizując strukturę błony zewnętrznej na powierzchni komórek bakteryjnych. Jak dotąd znaleziono jedynie nieliczne przykłady lipopolisacharydów nieposiadających Kdo, monosacharyd ten odgrywa zatem istotną rolę w poprawnym funkcjonowaniu komórki bakteryjnej. Enzymy odpowiedzialne za syntezę Kdo są celem terapeutycznym, bada się możliwość wykorzystania syntetycznych pochodnych tego monosacharydu jako potencjalnych leków przeciwbakteryjnych. Opisano struktury regionu Kdo dla szeregu lipopolisacharydów bakterii Gram-ujemnych, jednak labilność samej cząsteczki Kdo, tworzonych przez nią wiązań ketozydowych i niektórych podstawników,

zwłaszcza podatność na kwaśną hydrolizę, komplikuje badania strukturalne. Dodatkowo, z resztami Kdo związane są liczne podstawniki, np. fosforanowe, reszty kwasów uronowych, heptozy, mannozy, ramnozy, glukozy, galaktozy czy aminokwasów. Sprawia to, że wpływ struktury regionu Kdo na aktywność biologiczną LPS wciąż nie jest wystarczająco zbadany.

Publikacja nr 1, stanowiąca część przedstawianego osiągnięcia naukowego, opisuje metodę szybkiej analizy wzoru podstawień reszt Kdo w całych cząsteczkach lipopolisacharydów. Metoda została wykorzystana do zbadania wzoru podstawień w lipopolisacharydach 15 szczepów bakteryjnych, zwłaszcza bakterii z gatunku *Hafnia alvei*, dla których niektóre doniesienia wskazywały na obecność nietypowych struktur regionu Kdo. Okazało się, że jest to dogodny model do dalszych badań. Metoda potwierdziła występowanie nietypowych podstawień Kdo w pozycjach 8; 7; 7,8; oraz 4,7. Uzyskane wyniki były też podstawą dwu doniesień konferencyjnych (pozycje IIIB:6 i IIIB:16 wykazu prac naukowych).

Izolacja endotoksyn

Współczesna analiza strukturalna lipopolisacharydów wymaga izolacji i oczyszczenia preparatów LPS z masy bakteryjnej. Cząsteczka lipopolisacharydu, posiadająca szereg labilnych, podatnych na chemiczną degradację elementów strukturalnych, może, zależnie od zastosowanych technik oczyszczania, ulegać zmianom w trakcie preparacji: utracie niektórych podstawników niecukrowych (np. deacylacji lub migracji reszt fosforanowych), odpadaniu labilnych reszt monosacharydowych (wrażliwych na kwaśną hydrolizę wiązań ketozydowych Kdo czy NeuAc) lub nawet degradacji całej cząsteczki. Również preparaty LPS do badań immunochemicznych, służących do uzyskiwania przeciwciał, lub otrzymywanych do wykorzystania jako czynniki immunostymulujące, muszą charakteryzować się nienaruszoną strukturą oraz wysokim stopniem czystości. Obecnie istnieje rosnące zapotrzebowanie na preparaty LPS, wolne od zanieczyszczeń, np. do badań immunologicznych lub, po pozbawieniu toksyczności, jako cenne źródło adiuwantów dla szczepionek. Prosta procedura, charakteryzująca się nieniszczącymi warunkami w trakcie oczyszczania jest kluczowa chociażby w przypadku izolacji LPS typu R z epitopami obejmującymi rdzeń wewnętrzny i labilne podstawniki w *Neisseria meningitidis*⁴.

⁴ M. Mieszala, G. Kogan, H.J. Jennings, Conjugation of meningococcal lipooligosaccharides through their lipid A terminus conserves their inner epitopes and results in conjugate vaccines having improved immunological properties, Carbohydrate Res. 338 (2003) 167–175.

Praca nr 3, stanowiąca część przedstawianego osiągnięcia naukowego, opisuje metodę izolacji lipopolisacharydów za pomocą ekstrakcji nadkrytycznym dwutlenkiem węgla (CO₂ SFE). Wykorzystanie jako rozpuszczalnika dodatkowego wyłącznie wody, bez użycia rozpuszczalników organicznych, pozwoliło na stworzenie techniki, w której uzyskiwane preparaty endotoksyn nie są zanieczyszczone resztkami odczynników chemicznych (fenol, SDS, rozpuszczalniki organiczne), co może wpływać na aktywność biologiczną takich preparatów. Przedstawiona metoda jest objęta ochroną patentową (pozycja IIB:3 wykazu prac naukowych), była też przedmiotem doniesień konferencyjnych (IIIB: 45, 46 i 47 wykazu prac naukowych).

Metoda wykrywania endotoksyn

Wykrywanie drobnoustrojów i ich toksyn za pomocą specyficznych markerów chemicznych jest obiecującym podejściem z szeroką paletą potencjalnych zastosowań. Mikroorganizmy wytwarzają szereg związków, które mogą być użyte do tego celu. Wykrywanie ergosterolu jako markera grzybowego⁵ czy kwasu muraminowego⁶ lub 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych⁷ charakterystycznych dla bakterii, są metodami, które od szeregu lat stosowane są w doświadczalnych badaniach biomedycznych i środowiskowych.

Kdo jest charakterystycznym składnikiem LPS i odgrywa istotną rolę w stabilności i procesach życiowych komórki bakteryjnej. Wszystkie opisane dotychczas struktury lipopolisacharydów mają co najmniej jedną resztę Kdo⁸, z kilkoma wyjątkami (np. 8-amino-Kdo znaleziono u kilku gatunków *Shewanella*, Ko w *Acinetobacter calcoaceticus*). Minimalna cząsteczka LPS wymagana dla poprawnego funkcjonowania komórki bakteryjnej zawiera co najmniej jedną resztę Kdo związaną z lipidem A⁹, a wśród bakterii żyjących w środowisku naturalnym najmniejszą znaną strukturę LPS znaleziono u *Chlamydiaeae* (lipid A i trójsacharyd Kdo). Mutanty bakterii, których LPS składa się jedynie z lipidu A bez Kdo, nie

⁵ Axelsson, B.O., Saraf, A., Larsson, L., 1995. Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr., B, Biomed. Appl. 666, 77– 84

⁶ Fox, A., Wright, L., Fox, K., 1995. Gas chromatography-tandem mass spectrometry for trace detection of muramic acid, a peptidoglycan chemical marker, in organic dust. J. Microbiol. Methods 22, 11 – 26.

⁷ Szponar, B., Larsson, L., 2000. Determination of microbial colonisation in water-damaged buildings using chemical marker analysis by gas chromatography-mass spectrometry. Indoor Air 10, 13– 18.

⁸ Holst, O., 1999. Chemical structure of the core region of lipopolysaccharides. In: Brade, H., et al., (Eds.), Endotoxins in Health and Disease. Marcel Dekker Inc., pp. 115–154

⁹ Helander, I.M., Lindner, B., Brade, H., Altmann, K., Lindberg, A.A., Rietschel, E.T., Zähringer, U., 1988. Chemical structure of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* strain I-69 Rd₁/b+. Description of a novel deep-rough chemotype. Eur. J. Biochem. 177, 483–492.

są w stanie się namnażać, co oznacza, że cukier ten odgrywa kluczową rolę w żywotności bakterii Gram-ujemnych.

W pracy nr 2, stanowiącej część przedstawianego osiągnięcia naukowego, opisane zostały wyniki, dotyczące opracowania metody wykrywania endotoksyn, wykorzystującej Kdo jako marker chemiczny oraz zastosowanie tej metody do analizy poziomu endotoksyn w próbkach biologicznych: bakteriach, bakteriofagach i w surowicy krwi zwierząt. Metodę wykorzystano także w pracach 3 (metoda oczyszczania lipopolisacharydów) i 4 (analiza wpływu długości lipopolisacharydu na patogenność serotypu bakterii *Salmonella* o serotypie O48), stanowiących część przedstawianego osiągnięcia naukowego, oraz w pracach IIa:7 (analiza poziomu endotoksyn w badaniach immunologicznych bakteriofagów), IID:4 (analiza poziomu endotoksyn w dymie tytoniowym) IID:7 (analiza poziomu endotoksyn w glikomakropeptydach), a także w doniesieniach konferencyjnych (IIIB: 17, 21, 23-28, 31, 35, 37, 39, 54, 66, 67, 78 i 79).

Wykorzystanie analizy markerów chemicznych w badaniach immunochemicznych

Kwas sjałowy (kwas N-acetyloweauraminowy, NeuAc) odgrywa ważną rolę w ochronie bakterii Gram-ujemnych, w stosunku do aktywności bakteriobójczej surowicy i może przyczyniać się do chorobotwórczości bakterii tworząc epitopy przypominające składniki tkanek gospodarza (mimikra cząsteczkowa).

O ile rola polisacharydów otoczkowych zawierających kwas sjałowy w unikaniu przez bakterie wrodzonej odporności gospodarza jest znana, o tyle informacje dotyczące podobnej roli lipopolisacharydów zawierających NeuAc są bardzo skąpe. Wiadomo, że lipooligosacharydy zawierające NeuAc powodują obniżanie aktywności aktywacji dopełniacza i mogą maskować powierzchnię komórki bakteryjnej przed reakcją immunologiczną. Niektóre badania wskazują, że zwiększonej podatności na bakteriobójcze działanie surowicy towarzyszyło zmniejszenie długości polisacharydu O-swoistego LPS¹⁰.

Serotyp O48 bakterii z rodzaju *Salmonella* posiada w strukturze antygeny O-swoistego NeuAc, serowarianty serotypu O48 różnią się natomiast składem białek błony zewnętrznej. W *S. enterica* O48, NeuAc jest składnikiem liniowej podjednostki polisacharydu O-swoistego

¹⁰ Taylor PW, Kroll HP, Tomlinson S (1982) Effect of subinhibitory concentrations of mecillinam on expression of *Escherichia coli* surface components associated with serum resistance. *Drugs Exp Clin Res* 8:625-631

LPS. Liczba jednostek w cząsteczki LPS może się zmieniać, co oznacza, że liczba reszt kwasu sjałowego w cząsteczce LPS nie jest stała. Jednocześnie LPS *Salmonella* O48 zawiera trzy cząsteczki Kdo.

W pracy nr 4, stanowiącej część prezentowanego osiągnięcia naukowego, przedstawiono zastosowanie analizy bakteryjnych markerów chemicznych: Kdo i NeuAc do badania wpływu długości części O-swoistej lipopolisacharydu szeregu serowariantów bakterii *Salmonella* O48 na ich oporność na bakteriobójcze działanie surowicy. Praca jest efektem współpracy z grupą dr hab. Gabrieli Bugli-Płoskowskiej z Instytutu Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego, specjalizującej się w badaniach dotyczących oporności bakterii zawierających kwas sjałowy wobec układu immunologicznego gospodarza. Analiza poziomu NeuAc i jego porównanie do ilości Kdo określała długość części O-swoistej poszczególnych lipopolisacharydów i umożliwiała sprawdzenie korelacji tych wartości z opornością szczepu na działanie dopełniacza. Przedstawiona metoda wykorzystana została także do uzyskania wyników prezentowanych na konferencjach (IIIB: 37, 53, 67, 78 i 79 wykazu publikacji).

Uzyskane wyniki wykazały, że ani obecność kwasu sjałowego w LPS ani długość jego polisacharydu O-swoistego nie odgrywa decydującej roli w zjawisku oporności bakterii na bakteriobójczą aktywność dopełniacza, oraz że obecność kwasu sjałowego w strukturze LPS nie jest wystarczająca do blokowania aktywacji alternatywnego szlaku dopełniacza.

Wykorzystanie technologii mikrosystemów do analizy endotoksyn

Rozwinięciem tematyki poszukiwania nowych sposobów wykrywania endotoksyn opisanej w pracy nr 2 prezentowanego osiągnięcia naukowego, było badanie możliwości wykorzystania technik mikrosystemowych do detekcji endotoksyn bakterii Gram-ujemnych.

Klasycznym testem służącym do wykrywania obecności endotoksyn i innych czynników pirogennych jest badanie testem pirogenności wykonywanym na królikach. W badaniu tym zwierzęciu wstrzykuje się małą ilość testowanej substancji, zmiana temperatury ciała zwierzęcia jest uważana za wskaźnik obecności pirogenów w badanej próbce. Test ten jest nadal stosowany w przemyśle farmaceutycznym, pomimo wątpliwości natury etycznej, ograniczonej czułości i swoistości. Oprócz testu pirogenności królików, jedyną analityczną metodą dopuszczoną do oznaczania zawartości pirogenów w produktach farmaceutycznych oraz medycznych jest test lizatu amebocytów skrzypłocza *Limulus polyphemus* (Limulus Amebocyte Lysate test, LAL).

W pracy nr 5, stanowiącej część przedstawianego osiągnięcia naukowego, przedstawiono zastosowanie systemu czujnikowego, wykorzystującego kwarcowe elementy rezonansowe (QTF) do pomiaru ilości endotoksyn z wykorzystaniem lizatu amebocytów *Limulus polyphemus* (LAL). W wyniku współpracy z Zakładem Metrologii Mikro- i Nanostruktur Politechniki Wrocławskiej, kierowanym przez prof. Teodora Gotszalka, opracowano technikę analizy stężenia endotoksyn w roztworach wodnych. Pomiar obniżenia amplitudy drgań QTF dostarcza informacji o zmianach lepkości występujących w badanej próbce po dodaniu LAL. Metoda ta została zastosowana do określania stężenia komórek bakteryjnych i endotoksyny *E. coli* O157: H19. Istotność uzyskanych wyników potwierdzono z pomocą komercyjnego kolorymetrycznego testu LAL. Skonstruowany system może wykryć endotoksyny bakteryjne w zakresie 0,001 – 5,0 EU/ml i komórki bakteryjne w zakresie 10^2 - 10^7 CFU/ml. Przedstawione rozwiązanie jest także przedmiotem wniosku patentowego (pkt. IIB:10 wykazu publikacji)

Przedstawiony cykl prac obejmuje 3 zagadnienia badawcze, stanowiące przedmiot moich zainteresowań naukowych:

Opracowanie metody analizy strukturalnej regionu Kdo lipopolisacharydów bakterii Gram-ujemnych wraz z metodą izolacji lipopolisacharydów umożliwiającą uzyskiwanie LPS w postaci natywnej

Opracowanie metody analizy markerów chemicznych – Kdo i NeuAc – służącej do wykrywania endotoksyn bakteryjnych oraz immunochemicznych analiz lipopolisacharydów

Opracowanie metody analizy zawartości endotoksyn bakteryjnych z wykorzystaniem technik mikrosystemowych

PODSUMOWANIE WYNIKÓW OPISANYCH W PUBLIKACJACH WYBRANYCH DO OCENY

Publikacja nr 1

Rybka J, Zielińska-Kuzniarz K., Korzeniowska-Kowal A., Sondej A., Gamian A. Substitution pattern of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid in bacterial lipopolysaccharides investigated by methylation analysis of whole LPS. *Carbohydr. Res.* (2003) 338, 2679-86

Kwas 3-deoksy-D-manno-2-oktulozonowy (Kdo) jest składnikiem wewnętrznej części rdzenia lipopolisacharydu bakteryjnego (LPS). Z uwagi na fakt, że ta część LPS ma istotne znaczenie dla aktywności biologicznej cząsteczki lipopolisacharydu, znajomość budowy regionu Kdo może mieć duże znaczenie w badaniach immunochemicznych. Struktury regionu Kdo badano stosując selektywne degradacje chemiczne całej cząsteczki lipopolisacharydu i analizując budowę powstających oligocukrów zawierających Kdo, lub przez analizy spektroskopowe¹¹. Dalsze zrozumienie wpływu regionu Kdo na właściwości immunochemiczne całej cząsteczki LPS oraz roli, jaką region Kdo LPS może pełnić w infekcjach bakteriami Gram-ujemnymi, mogło być ułatwione przez stworzenie uproszczonej procedury określania struktury podstawień Kdo w izolowanych LPS. Stąd pojawiła się koncepcja stworzenia metody analizy tych struktur w całych, niedegradowanych cząsteczkach

¹¹ Holst, O. In *Endotoxin in Health and Disease*. Brade H., Opal S. M., Vogel S. N., Morrison, D. C., Eds.; Marcel Dekker: New York, USA, 1999; pp 115-154

LPS. W pracy przedstawiono wyniki monitorowania podstawienia cząsteczek Kdo w LPS różnych szczepów bakteryjnych. Oceniono trzy różne sposoby metylacji (protokołów według Hakomori, Ciukanu i Kerek oraz Prehm).

Opracowana procedura składa się z trzech etapów. Pierwszy z nich to permetylacja całego z lipopolisacharydu w formie kwaśnej alternatywnie za pomocą jodometanu w zasadzie metylosulfinylowej (DMSO_{Na}) lub w DMSO z dodatkiem NaOH, lub trójfluorometanosulfonianie. Następnie produkt metylacji poddawano metanolizie (HCl w MeOH) i acetylacji (bezwodnik octowy w pirydynie). Uzyskane częściowo metylowane octany Kdo glikozydów metylowych analizowano metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas z jonizacją elektronową (GLC/EI-MS). Dla 12 pochodnych Kdo, wyznaczono właściwe czasy retencji GLC i wzory fragmentacji MS. Wyizolowano lipopolisacharydy z 15 szczepów bakterii Gram-ujemnych i analizowano przy użyciu trzech różnych sposobów metylacji. Szczególną uwagę zwrócono na lipopolisacharydy *Hafnia alvei*, z uwagi na fakt, że w kilku szczepach tego gatunku, znajdowano wcześniej nietypowe podstawienia Kdo^{12 13}.

Wykorzystanie rozpuszczalności LPS w postaci kwaśnej w rozpuszczalnikach organicznych pozwoliło na minimalizację ewentualnego wpływu niedometylowania na uzyskiwany wzór podstawień regionu Kdo. Protokół z wykorzystaniem zasady DMSO_{Na} był najbardziej skuteczny w permetylacji całych cząsteczek LPS spośród badanych procedur. Metylacja z użyciem trójfluorometanosulfonianu z kolei pozwoliła na wykrycie nietrwałych podstawników na resztach Kdo. Widma EI-MS pochodnych Kdo były interpretowane przy użyciu technik znakowania pochodnych deuterem. W uzyskanych widmach masowych pochodnych Kdo ustalono struktury głównych jonów.

Wyniki te wskazują na obecność nietypowych podstawników regionu Kdo w lipopolisacharydzie jak 8-podstawiony Kdo w *E. coli* O56, *Citrobacter youngae* O2 i *C. braakii* O37, *Hafnia alvei* PCM 1188, 1190 i 1196, 7-podstawiony Kdo w *H. alvei* PCM 1185, 7,8-dwupodstawiony Kdo w *H. alvei* PCM 1189, 1190 i 1216 or 4,7- dwupodstawiony Kdo w *H. alvei* PCM 1186. Uzyskane wyniki są potwierdzeniem wcześniejszych doniesień o obecności w niektórych z tych szczepów takich podstawień Kdo. Analizy lipopolisacharydów *Shigella sonnei* Fazy I – typu S, oraz Fazy II – mutantu typu R, wykazały podobny wzorzec

¹² Romanowska E. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000, 27, 219_/225

¹³ Ravenscroft N., Gamin A., Romanowska E. Eur. J. Biochem. 1995, 227, 889_/896

podstawień dla obu typów LPS: R i S, co potwierdziło skuteczność stosowanej metody. Opracowana procedura szybkiej i łatwej analizy podstawień Kdo lipopolisacharydach bakterii Gram-ujemnych może zostać wykorzystana w badaniach strukturalnych i immunochemicznych lipopolisacharydów bakteryjnych.

Publikacja nr 2

Rybka J., Gamian A. Determination of endotoxin by the measurement of the acetylated methyl glycoside derivative of Kdo with gas-liquid chromatography – mass spectrometry. *J. Microbiol. Meth.* (2006) 64 (2), 171-84

Oprócz klasycznych kolorymetrycznych metod wykrywania kwasu 2-keto-3-deoksyoktulozonowego, intensywnie badano możliwości innych sposobów analizy Kdo. Wykorzystywano techniki chromatografii jonowymiennej, chromatografii jonowymiennej w wysokim pH (HPAEC), spektroskopię NMR lub chromatografię gazową (GC) i chromatografię gazową połączoną ze spektrometrią mas (GC-MS). Opisane metody, z uwagi jednak na dość drastyczne warunki i wydłużony czas reakcji, mogące prowadzić do częściowego rozpadu Kdo, są mniej odpowiednie do bezpośredniego zastosowania w rutynowej analizie.

W przedstawionej pracy opisano badania dotyczące analizy Kdo metodą spektrometrii masowej, gdzie wykrywaną pochodną jest peracetylowany ester metylowy metyloglikozydu Kdo po metanolizie, defosforylacji enzymatycznej i acetylacji. Za pomocą opracowanej metody analizowano oczyszczone preparaty LPS, próbki preparatów bakteriofaga oraz surowicy zwierząt. Przeprowadzono analizę struktury podstawowych jonów powstających podczas rozpadu pochodnej Kdo z wykorzystaniem znakowania cząsteczki za pomocą deuteru. Wykorzystano technikę GLC EI-MS oraz GLC EI-MSMS, gdzie wykrywanym fragmentem pochodnej był jon pierwotny $m/z=375$ lub jon wtórny $m/z=195$.

W niektórych endotoksynach reszta Kdo podstawiona jest grupą fosforanową. Zbadano możliwość oznaczania endotoksyn zawierających fosforylowaną resztę Kdo przeprowadzając eksperyment z LPS *Vibrio cholerae*, gdzie jedyna reszta Kdo jest podstawiona fosforanem. Badania kinetyczne defosforylacji estrów metylowych metyloglikozydów Kdo za pomocą fosfatazy alkalicznej wykazały, że czas reakcji 15 min jest wystarczający. Stwierdzono

liniowość detekcji w zakresie 0.024–12.5 ng Kdo co odpowiada ilości 0.30–150.4 ng gładkiego LPS, posiadającego trzy reszty Kdo w cząsteczce.

Opracowaną metodę wykorzystano do analizy poziomu Kdo w próbkach biologicznych. Wykazano możliwość analizy bakterii w ilości do 1000CFU, z kolei w eksperymentach, w których badano ilość endotoksyny w próbkach surowic szczurzych zwierzęcego modelu endotoksemii, wykazano istotne różnice w poziomach Kdo pomiędzy grupami: „ostrą” - 153.79 ng/ml, „przewlekłą”: 13.87 ng/ml i „kontrolną”: 2.42 ng/ml.

Podczas analizy poziomu endotoksyny w próbkach faga T4, wykorzystywanego w badaniach immunologicznych, uzyskano zaskakujące wyniki: proporcje pomiędzy uzyskiwanymi pochodnymi Kdo istotnie się różniły w stosunku do proporcji obserwowanych w standardzie LPS. Może to wskazywać na obecność w preparatach fagowych LPS z Kdo na końcu redukującym cząsteczki, a tym samym na aktywność enzymu fagowego, odcinającego część polisacharydową LPS od lipidu A.

Publikacja nr 3

Rybka J., Grycko P., da Cruz Francisco J., Gamian A., Szwajcer Dey E. Application of supercritical carbon dioxide (scCO₂) for the extraction of lipopolysaccharides (LPS) from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* PCM 2266, J. Supercritical Fluids (2008), 45, 51-56

Metody izolacji lipopolisacharydów stosowane obecnie to wieloetapowe, pracochłonne procedury, wykorzystujące rozpuszczalniki organiczne i generujące toksyczne odpady. Klasyczna metoda izolacji polega na ekstrakcji LPS z masy bakteryjnej gorącą mieszaniną fenolu i wody (PW), lub zastosowanie mieszaniny złożonej z fenolu, chloroformu i eteru naftowego (PCP). Obie te metody oparte są na dezintegracji zewnętrznej błony bakteryjnej i wytrącenie białka za pomocą fenolu, różnią się jednak selektywnością. Metoda PW izoluje zarówno LPS typu (S) jak i (R), natomiast metodą PCP oczyszczać można raczej bardziej hydrofobowe LPS typu (R). Inne procedury, np. wg Darveau i Hancock, wykorzystują mechaniczne rozrywanie komórek bakteryjnych, a następnie trawienie enzymatyczne i ekstrakcję sodowym siarczanem dodecyłu i/lub kwasem etylenodwuaminotetraoctowym, i jest równie skuteczna w ekstrakcji obu typów LPS (R i S). Opisano także kilka innych metod, wykorzystujących różnorodne rozpuszczalniki, detergenty, sole, kwasy lub zasady, czynniki

chelatujące lub enzymy. Wszystkie one są jednak pracochłonne i generują toksyczne odpady, uzyskiwane preparaty mogą być skażone pozostałościami rozpuszczalników lub innych odczynników, dodatkowo procedury mogą doprowadzić do częściowej lub całkowitej degradacji natywnej struktury, jeśli LPS zawiera labilne podstawniki lub reszty sacharydowe wrażliwe na hydrolizę.

Artykuł opisuje nową metodę izolacji lipopolisacharydów poprzez ekstrakcję mieszaniną $scCO_2$ z dodatkiem wody. Ważnym etapem preparacji jest wstępne traktowanie masy bakteryjnej za pomocą STTP (trójpolifosforanu sodu). Ekstrakcja dwutlenkiem węgla w stanie nadkrytycznym ($scCO_2$) jest bezpieczną alternatywą dla trujących i łatwopalnych rozpuszczalników organicznych. Modyfikacja właściwości $scCO_2$: rozpuszczalności, gęstości lub hydrofobowości, jest stosunkowo prosta i realizowana może być poprzez zmianę ciśnienia i temperatury roztworu. Możliwa jest także modyfikacja polarności poprzez dodanie małej ilości wybranych współrozpuszczalników. Ekstrakcje można dzięki temu dostosowywać do specyficznych potrzeb użytkownika.

Typowym zanieczyszczeniem preparatów LPS uzyskanych metodami konwencjonalnymi są kwasy nukleinowe. Analiza ekstraktów $scCO_2$ wykazała, że zanieczyszczenia produktami DNA miały masę cząsteczkową z zakresu poniżej 1kDa, co pozwala na ich łatwe usunięcie. Z uwagi na możliwą zmianę pH roztworu podczas ekstrakcji, która może występować w mieszaninie wody i $scCO_2$ testowano również ekstrakcję za pomocą mieszaniny $scCO_2$ i roztworu buforowanego, jednak nie zmieniło to znacząco wydajności lub czystości LPS. Ponieważ proponowana procedura wykorzystuje tylko $scCO_2$ i wodę, może być sklasyfikowana jako bardzo przyjazna dla środowiska. Przedstawione wyniki mogą prowadzić bezpośrednio do zastosowań komercyjnych i terapeutycznych w przyszłości.

Publikacja nr 4

Bugla-Płoskońska G., Rybka J., Futoma-Kołoch B. , Cisowska A., Gamian A, Doroszkiewicz W. Sialic acid-containing lipopolysaccharides of *Salmonella* O48 strains - potential role in camouflage and susceptibility to the bactericidal effect of normal human serum. *Microbial Ecology* (2010) 59, 601-613.

Choroby typu salmonelloz są olbrzymim wyzwaniem dla zdrowia publicznego na skalę globalną. Na całym świecie każdego roku dochodzi do milionów zakażeń i tysięcy zgonów.

Salmonelloza jest jednym z najczęściej zgłaszanych schorzeń układu pokarmowego na świecie. Rosnącym problemem są także zakażenia ludzi szczepami *Salmonella* pochodzącymi od gadów. *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* i *Salmonella enterica* subsp. *enterica* wyizolowano od żółwi, iguan i węży, zwierzęta te zostały także zidentyfikowane jako źródło zakażenia ludzi. Gady stanowią istotny rezerwuuar *Salmonella arizonae*. *S. arizonae* wyizolowano z krwi, płynu opłucnowego i węzłów chłonnych.

W niniejszej pracy badano rolę poszczególnych mechanizmów aktywacji dopełniacza w surowicy ludzkiej w stosunku do szczepów należących do serotypu *Salmonella* O48. Szczepy serotypu O48 *Salmonella* mają taką samą strukturę antygeny O-swoistego, zawierającego w strukturze powtarzającej się podjednostce kwas sjałowy¹⁴, różnią się natomiast składem i zawartością białek błony zewnętrznej (OMP). Bakterie Gram-ujemne, takie jak *Salmonella* spp. są znane ze wzbudzania zarówno alternatywnej, lektynowej jak i klasycznej ścieżki aktywacji dopełniacza.

W celu zbadania roli NeuAc w generowaniu oporności bakterii na aktywność dopełniacza, jego zawartość w komórkach bakteryjnych była określana za pomocą GLC-MS, w porównaniu do kwasu 3-deoksy-D-manno-2-octulozonowego (Kdo). Wyniki wskazują na wysoką zmienność w średniej długości części O-specyficznej LPS wśród testowanych szczepów należących do tego samego serotypu O48.

Wyniki wskazały, że ani obecność kwasu sjałowego w LPS ani długość antygeny O-swoistego LPS zawierającego NeuAc nie odgrywa decydującej roli w oporności bakterii na działanie dopełniacza oraz że obecność kwasu sjałowego w strukturze LPS nie jest wystarczająca do blokowania aktywacji alternatywnego szlaku dopełniacza. Przykładowo szczepy z bardzo wysokim współczynnikiem NeuAc/Kdo (*Salmonella* Hammonia, *Salmonella* Balboa i *Salmonella* Ngozi), były podatne na działanie bakteriobójcze NHS, podczas gdy niektóre szczepy *Salmonella* (Djakarta, *S. arizonae*) przy bardzo niskim stosunku NeuAc/Kdo również wykazywały taką wrażliwość. Z kolei szczep *Salmonella* Isaszeg, w którym zawartość NeuAc była poniżej granicy wykrywalności, był bardzo wrażliwy na działanie bakteriobójcze ludzkiej surowicy.

¹⁴ Gamian A, Jones C, Lipinski T, Korzeniowska-Kowal A, Ravenscroft N (2000) Structure of the sialic acid-containing O- specific polysaccharide from *Salmonella enterica* serovar Toucra 048 lipopolysaccharide. Eur J Biochem 267:3160-3167

Publikacja nr 5

Chałupniak A., Waszczuk K., Hałubek-Głuchowska K., Piasecki T., Gotszalk T., Rybka J. Application of quartz tuning forks for detection of endotoxins and Gram-negative bacterial cells by monitoring of *Limulus* Amebocyte Lysate coagulation. *Biosensors and Bioelectronics* (2014), w druku, DOI: 10.1016/j.bios.2014.02.048.

W pracy przedstawiono zastosowanie systemu czujnikowego, wykorzystującego niskoczęstotliwościowe piezoelektryczne rezonatory kwarcowe (QTF) do detekcji endotoksyn bakterii Gram-ujemnych. Pomiar obniżenia amplitudy drgań QTF dostarcza informacji o zmianach lepkości występujących w badanej próbce po dodaniu składowej lizatu testu LAL.

Test LAL oparty jest na naturalnym przeciwbakteryjnym mechanizmie obronnym skorupiaka skrzypłocza (*Limulus polyphemus*), u którego infekcja wewnętrzna bakteriami Gram-ujemnymi prowadzi do koagulacji hemolimfy. Testy LAL w różnych wersjach (test typu żelującego, kolorymetryczny, turbidymetryczny, fluorescencyjny) są zalecane do kontroli zawartości endotoksyny w produktach farmaceutycznych, lub w trakcie procesów produkcyjnych, przez farmakopeę amerykańską, europejską czy japońską. Niemniej jednak, w chwili obecnej nie istnieją żadne obowiązujące przepisy opisujące metodę odpowiednią do dokładnej kontroli poziomu endotoksyny. Ponadto koszt pojedynczej analizy próbki z testu LAL, biorąc pod uwagę wymagane powtórzenia, rozcieńczenia i krzywe standardowe, jest bardzo wysoki. Testy LAL oraz testy na zwierzętach, stosowane obecnie w przemyśle i naukach przyrodniczych, nie dostarczają wyników, które są zadowalające pod względem kosztów, poziomu automatyzacji czy czasu wymaganego do zakończenia analizy.

Metoda ta była wykorzystana do określenia stężenia endotoksyny i ilości komórek bakteryjnych (*E. coli* O157:H19). Istotność uzyskanych wyników potwierdzono za pomocą komercyjnego kolorymetrycznego testu LAL. Skonstruowany system wykrywał endotoksyny bakteryjne w zakresie 0,001-5,00 EU/ml i komórki bakteryjne w zakresie 10^2 - 10^7 CFU/ml. Pojedynczy koszt badania jest niski w porównaniu do komercyjnych testów oznaczania endotoksyny i innych systemów detekcyjnych, opartych o czujniki mikromechaniczne. W przeciwieństwie do standardowego testu żelującego analiza opisaną metodą umożliwiała pomiar ilościowy. Opracowanie odpowiedniej metody obliczania stężenia endotoksyny, na podstawie kinetyki reakcji, pozwala na dokładne określenie stężenia endotoksyny w nieznanymi próbkach.

Opracowana metoda wykazuje się także efektywnością kosztową. Niska cena jednostkowa elementu czujnikowego oraz wykorzystanie rozcieńczonego lizatu LAL do analizy zapewnia niską cenę testu. Zakres roboczy metody (ponad 4 rzędy wielkości) przewyższa standardowe pół-ilościowe badanie żelującym testem LAL, natomiast, limit detekcji jest porównywalny do najbardziej czulej z metod LAL: metody kinetycznej chromogennej (0.005-50.00 UE/ml).

5 . Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych (artystycznych).

Podsumowanie.

Mój dorobek naukowy obejmuje współautorstwo w 38 pracach: 20 pracach oryginalnych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports, w tym w 18 pracach oryginalnych opublikowanych po uzyskaniu stopnia naukowego doktora, współautorstwo w 13 pracach spoza bazy Journal Citation Reports, 5 artykułach przeglądowych, 80 komunikatach zjazdowych. Dorobek obejmuje także 13 wygłoszonych referatów. Sumaryczny współczynnik wpływu (IF, impact factor) prac oryginalnych wynosi 34,515, a suma punktów MNiSW: 457, natomiast wartości te dla prac przeglądowych wynoszą odpowiednio IF: 0,511, MNiSW: 31. Do dnia 27 lutego 2014 r., według bazy Web Of Science (WOS), prace były cytowane 136 razy (wyłączono autocytowania). Łączny IF pięciu prac objętych rozprawą habilitacyjną wynosi 14,668, przy ilości cytowań 25.

A) przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora

Badanie topografii białka Rieskiego

W trakcie studiów na Uniwersytecie Wrocławskim realizowałem badania do pracy dyplomowej zatytułowanej: „Elektrostatyczna destabilizacja kompleksu b6f z tylakoidów grochu. Topografia białka Rieske” uzyskując tytuł magistra w 1994 roku. Uzyskane wyniki przedstawiono w publikacji II.A: 1 , tematykę badań opisano zaś w pracy II.D: 1

Analiza zjawiska oddziaływania kwas sjałowy-serotonina oraz Kdo-serotonina

Badania, będące przedmiotem mojej pracy doktorskiej, dotyczyły zjawiska powinowactwa, pomiędzy składnikiem glikoprotein kwasem sjałowym i jego strukturalnym analogiem – kwasem 2-keto-3-deoksyoktulozonowym – a serotoniną: hormonem tkankowym i neuroprzebieżnikiem. W 2001 roku obroniłem pracę doktorską zatytułowaną: „Badania oddziaływań kwasu sjałowego i bakteryjnych antygenów zawierających kwas 3-deoksyoktulozonowy z serotoniną” i uzyskałem tytuł doktora nauk przyrodniczych. Uzyskane wyniki przedstawiano w postaci doniesień konferencyjnych III.B: 2, 13 i 19.

Poziom wydalanych glikozaminoglikanów jako czynnik diagnostyczny w oftalmopatii Gravesa-Basedowa i akromegalii

W przebiegu choroby Gravesa-Basedowa glikozaminoglikany, wydzielanie przez immunologicznie pobudzone fibroblasty, powodują zjawisko oftalmopatii, mogące wywoływać uszkodzenie nerwu wzrokowego i ślepotę. Badania, realizowane we współpracy z Kliniką Endokrynologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz Laboratorium Glikobiologii Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, dotyczyły powiązania poziomu glikozaminoglikanów, wydalanych w moczu lub wydzielanych przez izolowane fibroblasty gałki ocznej, ze skutecznością terapii hormonalnej chorych na oftalmopatię Gravesa-Basedowa. W badaniach oznaczany był poziom glikozaminoglikanów w moczu chorych, badano korelację pomiędzy rodzajem wydzielanego glikozaminoglikanu a stopniem nasilenia choroby, analizowano także poziom kwasu hialuronowego, wydzielanego przez izolowane fibroblasty gałki ocznej w hodowli. Realizowane badania, kontynuowane także po doktoracie, były przedmiotem grantu II.I.2, ich opis i wyniki przedstawiano w publikacjach II.D: 2, 3 i 5 oraz w postaci doniesień konferencyjnych III.B: 3, 4, 5, 7, 8, 18, 20, 32, 33 i 34.

Zastosowanie inhibitorów proteaz w onkologii

We współpracy z Zakładem Biochemii oraz Zakładem Anatomii Patologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu realizowano badania dotyczące terapii guza sutka oraz raka żołądka za pomocą naturalnych inhibitorów proteaz cysteinowych. W IITD PAN realizowane były zadania dotyczące izolacji i oczyszczania naturalnych inhibitorów proteaz cysteinowych. Izolowane inhibitory wykorzystywane były w terapiach doświadczalnych na modelach zwierzęcych. Realizowane badania, kontynuowane także po doktoracie, były przedmiotem grantu II.I.2, ich opis i wyniki przedstawiano w publikacjach II.A: 2 i 5 oraz w postaci doniesień konferencyjnych III.B: 10, 11, 12 i 15.

B) przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora

Wykorzystanie zjawiska anizotropii fluorescencji koniugatów fluorofor-białko immobilizowanych na fazie stałej oraz w roztworze do detekcji endotoksyn bakterii Gram-ujemnych

We współpracy z Zakładem Spektroskopii Stanów Wzbudzonych Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu oraz przedsiębiorstwa ABB Polska prowadzono badania dotyczące możliwości wykorzystania zjawiska anizotropii fluorescencji do stworzenia metod wykrywania endotoksyn bakterii Gram-ujemnych. Badano systemy detekcyjne endotoksyn oparte o koniugaty białkowe immobilizowane na funkcjonalizowanych powierzchniach typu sol-gel, oraz o wolne koniugaty białkowe w roztworze. Wyniki realizowanych badań przedstawiano w publikacjach II.A: 6, 8 i 9 oraz w postaci doniesień konferencyjnych III.B: 22, 29, 30, 58. Wyniki badań zostały poddane ochronie patentowej: patent II.A:1 oraz wniosek patentowy II.A:8.

Wykrywanie endotoksyn poprzez markery chemiczne Kdo oraz kwasy 3-hydroksylowe metodą chromatografii wysokociśnieniowej

Projekt realizowany był we współpracy z przedsiębiorstwem POCh S.A. Zbadano możliwość jednoczesnej detekcji dwu markerów endotoksynowych: Kdo oraz 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych techniką HPLC z detekcją fluorymetryczną. Opracowano technikę łagodnej dekompozycji endotoksyny oraz znakowania produktów degradacji za pomocą znaczników fluorescencyjnych. Wykazano możliwość wykrywania obu markerów w jednej analizie z dużą czułością. Wyniki projektu zostały objęte ochroną patentową (wniosek patentowy II.B:6).

Zastosowanie technik mikrosystemowych w mikrobiologii

Zagadnieniem intensywnie badanym w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej jest zastosowanie technik mikrosystemowych do detekcji bakterii Gram-ujemnych i ich endotoksyn. W wyniku realizacji dwu projektów kluczowych przez zespoły Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej IITD PAN, Zakładu Metrologii Mikro- i Nanostruktur Politechniki Wrocławskiej, Katedry Biochemii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz Zakładu Technologii Mikrosystemów i Nanostruktur Krzemowych Instytutu Technologii Elektronowej w Warszawie uzyskano wiele wyników badawczych dotyczących zastosowania

do detekcji mikrobiologicznej czujników rezonansowych, mikrobelkowych, nanodrutowych oraz impedancyjnych. Uzyskane wyniki przedstawiono w pracach: praca nr 4 wykazana w niniejszym osiągnięciu habilitacyjnym, prace: II.A:13, II.B: 4, 5, 6 oraz na konferencjach: III.B: 36, 42, 49, 56, 64, 68, 76, 77, 80. Wyniki objęte są ochroną patentową: wnioski patentowe II.B: 4, 5, 10.

Integralną częścią badań dotyczących zastosowania mikrosystemów są prace związane z funkcjonalizacją różnorodnych powierzchni czujnikowych (Au, Si/SiO₂, sol-gel) za pomocą cząsteczek biologicznych, dla tworzenia powierzchni aktywnych stosowanych w czujnikach biologicznych. Wyniki tych prac przedstawiano na konferencjach: III.B: 40, 43, 44, 48, 51, 55, 57, 59, 60, 63, 65, 69, 72 i 73.

Badania strukturalne i immunochemiczne polisacharydów bakteryjnych

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej realizuje od lat badania związane z charakterystyką strukturalną i immunochemiczną polisacharydów, lipopolisacharydów i glikokoniugatów bakteryjnych. Mój udział w badaniach tego typu dotyczył współpracy w określaniu struktury i właściwości immunochemicznych polisacharydów O-swoistych *Citrobacter gillenii* O11 (publ. II.A:3), *Citrobacter werkmanii* O14 (publ. II.A:10), oraz egzopolisacharydów bakterii probiotycznych: *Lactobacillus rhamnosus* KL37C (publ. II.A:4), *Lactobacillus johnsonii* 142 (publ. II.A:12), oraz *Lactobacillus rhamnosus* KL37B (publ. II.A:15), wyniki badań prezentowane były także na licznych konferencjach (doniesienia konferencyjne IIIB: 1, 9, 14, 38, 41, 50 i 52).

Analiza sfingozyny w nadsączach komórkowych techniką GLC-MSMS

Laboratoria Immunobiologii Molekularnej Nowotworów IITD PAN oraz Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej realizowały projekt, dotyczący badania tzw. zjawiska pola proangiogenego, czyli zespołu czynników wpływających na angiogenezę w obrębie guza nowotworowego. Celem projektu było znalezienie niskocząsteczkowych inhibitorów ekspresji trombospondyny-1, wykazano, że taką rolę pełni sfingozyna. Mój udział w projekcie polegał na opracowaniu czulej metody analizy sfingolipidów za pomocą techniki chromatografii gazowo-cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas i pomiarach poziomu sfingozyny w próbkach nadsączy komórkowych. Wyniki pracy zostały ujęte w publikacji II.A: 16.

03 marca 2014

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J Rybka', is centered in the upper right portion of the page. The signature is fluid and cursive.

data

dr Jacek Rybka