



UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 2.6.2025
L.dz.

Dr hab. Krzysztof Grzymajło, prof. UPWr
Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Przyrodniczy We Wrocławiu

Wrocław, 25.02.2025 rok

Recenzja rozprawy doktorskiej pt:

„Charakterystyka pęcherzyków błony zewnętrznej *Yersinia enterocolitica* O:3 i ich oddziaływanie z ludzkim układem dopełniacza”

Praca doktorska wykonana w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. inż. Jolanty Łukasiewicz.

Przeprowadzone badania były częścią tematu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, realizowanego w ramach projektu OPUS 16 (2018/31/B/NZ6/03514) i zatytułowanego: ”Oddziaływanie gospodarz-patogen: bakteryjne pęcherzyki błony zewnętrznej jako tarcza dla układu dopełniacza”.

Zakażenia bakteryjne to rosnący problem współczesnych społeczeństw. Z uwagi na tempo podziałów, elastyczność cech i adaptacji genomu, mikroorganizmy te niesamowicie szybko przystosowują się do zmienności środowiska, a tym samym znacznie utrudniają kontrolę nad rozprzestrzeniającymi się zakażeniami. Do tego dochodzi rosnąca wśród wielu gatunków bakterii gram ujemnych antybiotykooporność, zawężająca spektrum możliwości przeciwstawiania się infekcjom.

Będąca przedmiotem badań w recenzowanej pracy doktorskiej *Yersinia enterocolitica* jest niezwykle ciekawym przykładem patogenu. Wspomniana wyżej elastyczność i zdolność do przystosowywania się do zmiennych warunków jest jej cechą charakterystyczną. Zdolność wzrostu w warunkach tlenowych jak i beztlenowych, a także w bardzo szerokim zakresie pH i temperatur, czyni ją z jednej strony trudnym do przeciwdziałania patogenem (może namnażać się w warunkach chłodniczych), a z punktu widzenia naukowca ciekawym i wdzięcznym modelem badawczym. Jako że kwintesencją działania patogenu jest jego interakcja z zakażonym gospodarzem, bardzo ciekawym



ELLENCE IN RESEARCH

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU
ul. C. K. Norwida 25
50-375 Wrocław
• www.upwr.edu.pl



aspektem jest analiza odpowiedzi odpornościowej zakażanego organizmu na atak patogenu, a w szczególności poznanie szczegółowych mechanizmów molekularnych tego procesu.

Biorąc to pod uwagę, przedstawiona mi do recenzji praca doskonale wpisuje się w szeroki aspekt poznawczy dotyczący z jednej strony czynników wirulencji *Yersinia enterocolitica*, z drugiej zaś interakcje z systemem odpornościowym gospodarza, tutaj z układem dopełniacza. W mojej opinii podjęta tematyka jest ciekawa, a zarazem uzasadniona nie tylko naukową ciekawością badaczy, ale też w dłuższej perspektywie potencjalnym pozytywnym wpływem na klinicznym.

Licząca 227 stron praca ma układ typowy dla tego typu opracowań. W treści pracy wyróżnione zostały: Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Bibliografia, spisy rycin i tabel. Doktorantka zamieściła również rozdział podsumowujący jej dotychczasowy dorobek naukowy. Mgr Paula Czysteń ma w swoim dorobku jedną pracę oryginalną oraz trzy doniesienia zjazdowe. Uczestniczyła też w licznych projektach i zadaniach badawczych, kierowanych głównie przez Panią promotor, prof. Jolantę Łukasiewicz. Doktorantka brała również udział w wydarzeniach popularyzujących naukę, prowadząc wykład w ramach Dolnośląskiego Festiwalu Nauki, oraz warsztaty dla uczniów szkół ponadgimnazjalnych. Wg. Recenzenta aktywność taka zasługuje na szczególne podkreślenie.

Merytoryczną część pracy poprzedzają bardzo szczegółowe streszczenia w języku polskim i angielskim. Z jednej strony zawarte w nich informacje dostarczają dużo informacji o całej pracy. Z drugiej, w mojej opinii streszczenie mogłoby być odrobinę bardziej zwarte i kompaktowe.

W rozbudowanym wstępie doktorantka po kolei prezentuje zagadnienia związane z realizowaną pracą, co wskazuje na biegłość i dogłębne rozeznanie w temacie. Wstęp zbudowany jest prawidłowo, rozpoczyna się od ogólnych informacji dotyczących *Yersinia enterocolitica*, przedstawia główne czynniki wirulencji, takie jak LPS, ECA, czy plazmid *pYV*, omawiając szczegółowo te najbardziej istotne tak z punktu widzenia procesu patogenezy, jak również z punktu widzenia realizacji pracy doktorskiej i poruszanych w niej zagadnień.

Nie jestem pewny, czy w tym miejscu, zaraz po omówieniu ogólnych zagadnień dotyczących *Yersinia*, nie powinien znaleźć się rozdział dotyczący patogenezy i epidemiologii zakażeń. Rozdział ten znajduje się znacznie później, w mojej opinii zmniejszając płynność narracji we wstępie. Czy doktorantka może wyjaśnić, dlaczego zdecydowała się na taki układ?



Po ogólnym przedstawieniu bakterii i czynników wirulencji, następuje bardzo szczegółowe opisy struktury cząsteczek będących czynnikami wirulencji oraz ich składowych uzupełnione są wyraźnymi i przejrzystymi rycinami, co pozwala dokładnie śledzić tok narracji w tym rozdziale.

W dalszej części wstępu doktorantka przechodzi do omawiania pęcherzyków bakteryjnych, które to stanowią najistotniejszą merytorycznie część pracy. Tutaj również narracja przeprowadzona jest we właściwy i rzetelny sposób, od ogólnego wprowadzenia w tematykę pęcherzyków, do bardziej szczegółowego omówienia pęcherzyków dla bakterii *Yersinia*. Z racji istnienia nielicznych doniesień dotyczących pęcherzyków *Yersinia enterocolitica*, powstanie niniejszej pracy jest tym bardziej godne pochwały.

Ostatnim z elementów wstępu jest spojrzenie na kwestię zakażenia od strony gospodarza i jego układu odpornościowego. Autorka w ciekawy i usystematyzowany sposób przedstawia aktywację układu odpornościowego, płynnie przechodząc do drugiego z kluczowych elementów pracy – czyli układu dopełniacza. Tutaj również tekst uzupełniony jest czytelnymi i pomocnymi schematami, za co ponownie wyrażam uznanie. W ostatnim podrozdziale autorka wyraźnie podkreśla potencjalnie istotną rolę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w przebiegu zakażenia i rozwoju sepsy, co we właściwy sposób pozwala czytelnikowi przejść do celów realizowanej pracy doktorskiej.

Podsumowując, doktorantka przedstawiła rozbudowany, wielowątkowy wstęp, który pozwala stwierdzić dogłębną znajomość tematu od strony teoretycznej. Momentami rozdział jest odrobinę chaotyczny, sprawie wrażenia że doktorantka tak bardzo chce się podzielić obszerną wiedzą z prezentowanego zakresu, że nie zawsze informacje te podane są w odpowiedniej kolejności. Zdarzają się przeskoki między szczegółowym omówieniem zagadnienia, a ogólną informacją o np. nowym elemencie wprowadzanym do pracy. Konsekwentne budowanie poszczególnych rozdziałów zgodnie z zasadą „od ogółu do szczegółu” znacznie ułatwiłoby czytanie pracy i przyswajanie przedstawionych w niej informacji. Ponadto, mnogość zmiennych stosowanych i analizowanych w pracy sprawia, że bardzo doceniłbym tabele podsumowujące niektóre aspekty. Np. tabela porównująca analizowane serotypy i uwypuklająca różnice pomiędzy nimi, czy tabela uwzględniająca zmiany zachodzące pod wpływem wzrostu bakterii w różnych temperaturach, skoro różnice temperaturowe stanowią istotny element niniejszego opracowania.

W rozdziale **Cel Pracy**, doktorantka wyjaśnia znaczenie i potrzebę realizacji tematu, w oparciu o informacje przedstawione we wstępie przedstawia trzy główne cele prezentowanego opracowania:



- 1) Charakterystykę pęcherzyków błony zewnętrznej *Y. enterocolitica* O:3 i ich oddziaływania z ludzkim układem dopełniacza
- 2) Ocena roli pęcherzyków w interakcjach z układem dopełniacza
- 3) Ocena wpływu chemotypu LPS/LOS na biodystrybucję znakowanych fluorescencyjnie pęcherzyków w badaniach *in vivo* z wykorzystaniem modelu mysiego.

Główne cele realizowane były poprzez cele pośrednie, skupiające się na izolacji i weryfikacji struktur LPS wybranych chemotypów YeO3, optymalizacji metody izolacji pęcherzyków, charakterystyki tychże oraz ustalenia struktury egzopolisacharydu jako potencjalnego liganda dla ludzkiej lektyny MBL.

W rozdziale brakuje mi celów szczegółowych odnoszących się do części związanej z eksperymentami na zwierzętach. Skoro doktorantka zdecydowała się na uszczegółowienie założeń i celów, warto być konsekwentnym i wyjaśnić szczegółowo każdy z planowanych aspektów.

Rozdział Materiały i Metody został przygotowany starannie i przejrzysto. Czytelnik może zapoznać się ze szczegółowymi opisami metod stosowanych w pracy, a sposób ich przedstawienia i wyjaśnienia pozwala sądzić, że eksperymenty mogłyby zostać powtórzone na bazie zaprezentowanych w pracy protokołów. A to w zasadzie główne zadanie tego rozdziału. Opisy uzupełnione zostały tabelami i schematami, co po raz kolejny upewnia mnie w przekonaniu o dużej samodzielności i świadomości dotyczącej wykonywanych eksperymentów u doktorantki. Zastosowana metodologia w mojej ocenie pozwala w pełni zrealizować założone w pracy cele.

Przechodząc do najistotniejszych z punktu widzenia pracy naukowej rozdziałów, czyli wyników oraz dyskusji, chciałbym jeszcze raz podkreślić szeroki zakres badań jakich podjęła się doktorantka. W pracy znalazły się bowiem zarówno procedury optymalizacji protokołów izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, dokładna analiza budowy chemicznej elementów zewnątrzkomórkowych w/w pęcherzyków jak i całych bakterii (LPS czy EPS), jak również eksperymenty bliższe zagadnieniem stricte mikrobiologicznym. Warto podkreślić również prezentowanie przez doktorantkę wyników w ciągłej korespondencji z informacjami podawanymi we wstępie, a także krótkie podsumowania po każdym z etapów pracy – oba elementy zdecydowanie ułatwiają nawigowanie po prezentowanych rezultatach pracy.



Ciekawym aspektem pracy jest przedstawienie procedur optymalizacji izolacji pęcherzyków. Zazwyczaj optymalizacje protokołów pozostają częścią niepublikowanych nigdzie opracowań, będąc jedynie informacją wewnętrzną w protokołach danego laboratorium. Z racji faktu że wybrany sposób publikacji pracy doktorskiej nie ograniczał autorki co do jej objętości, bardzo się cieszę że poszczególne protokoły zostały zaprezentowane i szczegółowo opisane, wraz z procedurą oceny skuteczności. Stanowi to integralną i ważną część pracy doktorskiej, zwłaszcza biorąc wspomniany we wstępie fakt mówiący o bardzo niewielkiej ilości doniesień dotyczących izolacji pęcherzyków z *Yersinia enterocolitica*. Ponadto, w moim odczuciu już ten element pracy pokazuje kwintesencję pracy naukowej i rozwoju naukowego – przeprowadzenie eksperymentów, wyciąganie wniosków na ich podstawie, ulepszenie, rozwój i kolejne eksperymenty. Na uwagę i docenienie zasługuje również krytycznie przeprowadzona analiza porównawcza zastosowanych metod, dodatkowo, jak wynika z treści pracy wsparta intensywną nauką przez doktorantkę zagadnień związanych z technikami analiz, jak np. DLS. Tutaj pozwolę sobie zwrócić się z drobną uwagą: przy podawaniu określonych wartości i wyciąganiu wniosków o jakości próbki na podstawie tychże, warto byłoby podawać wartości referencyjne mówiące o jakości i homogenności próbek. Doceniam przedstawione podsumowanie wyników zamykająca rozdział dotyczący procedur izolacji i analizy OMV oraz bardzo czytelne porównanie w formie tabeli.

Przechodząc do części wyników skupiających się na oddziaływaniu wyizolowanych pęcherzyków z układem dopełniacza, w oczy rzuca się informacja podana w rozdziale 6.6.1, gdzie wspomniano o analizie ekspresji mRNA dla cytokin IL-8, IL10, IL18 i TNF α ; Natomiast na rycinie 32, przedstawiającej wyniki tego eksperymentu, otrzymujemy IL-6, IL-8, IL-10 i TNF α ; Stąd dwa pytania: 1) jaki był klucz doboru akurat tych cytokin, zwłaszcza że w późniejszej dyskusji poruszane są również inne cytokiny; 2) które ostatecznie cytokiny były badane, te podane w treści rozdziału, czy też te przedstawione na rycinie? Trzymając się w dalszym ciągu eksperymentu skupionego na analizie ekspresji genów: rozumiem że w żadnym przypadku nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w ekspresji (opierając się na rycinie)? Jeśli tak, na jakiej podstawie pada stwierdzenie że stymulowały „silniej” (strona 141), jeśli izolowane były w niższych temperaturach? Dalsze zdanie „*uznano, że wzrost ...o wartość co najmniej 1,5 ...jest istotny*” Na jakiej podstawie uznano? Istnieją metody statystyczne, które pozwalają określać istotność wyników z określonym prawdopodobieństwem i takie testy powinny zostać wykonane.



Odnosząc eksperymenty skupiających się na badaniu ochrony przed bójącym działaniem surowicy: czy wyniki dotyczące inkubacji bakterii z surowicą były powtarzane? Dlaczego doktorantka nie zdecydowała się na policzenie CFU i ilościowe oznaczenie ilości przeżyjących bakterii? We wspomnianym rozdziale 5.25 pada informacja o % przeżyjących bakterii, natomiast w rozdziale wyniki pojawiają się jedynie zdjęcia kolonii i informacja przy którym rozcieńczeniu widać zmiany we wzroście. Wyniki liczbowe znacznie ułatwiły by analizę porównawczą. Warto podać wyniki w postaci wykresu, lub chociaż w tabeli, w sposób analogiczny do analizy aktywności bójącej z tabeli 20. Sama Tabela 20 zaś, w mojej opinii przemawiała by mocniej do odbiorcy, gdyby autorka zdecydowała się podać wyniki w formie wykresu. Oczywiście jestem otwarty na dyskusję w tym i innych aspektach.

Na kolejnych stronach pracy ukazuje się bardzo ciekawa seria eksperymentów analizująca potencjalne ligandy dla MBL. Doktorantka przedstawia potencjalnie cukrowego partnera dla MBL, tym samym płynnie wiążąc wcześniejsze eksperymenty z aktywacją układu dopełniacza. Tutaj pytanie, czy poziom białka w preparatach był zestawiany z białkiem całkowitym bakterii (np. przy tym samym OD bakterii hodowanych w różnych temperaturach)?

Rozdział Wyniki wieńczy eksperymenty z wykorzystaniem modelu zwierzęcego. Etap ten jest ciekawie zaplanowany i pozwolił uzyskać interesujące wyniki dotyczące wnikania i kumulacji pęcherzyków w narządach. Do samej części technicznej eksperymentu mam natomiast pytania:

- 1) Czy doktorantka nie rozważała, aby ustawić punkt graniczny odczytu fluorescencji powyżej sygnału grupy kontrolnej? Taki zabieg powinien pozwolić skuteczniej ocenić miejsce i intensywność właściwych sygnałów pochodzących z OMV.
- 2) Jak normalizowany był sygnał z OMV w fluorescencji. Czy rozważano kontrolne zdjęcia serii rozcieńczeń preparatu, tak by mieć przynajmniej zbliżone porównanie ilościowe?
- 3) Rozumiem oczywiście ograniczenia czasowe oraz te narzucone przez zasadę 3R oraz LKE, ale może w przyszłości warto mocniej oprzeć się i zaufać własnym eksperymentom *in vitro*, i na tych wynikach oprzeć część *in vivo*? Jestem bardzo ciekawy komentarza doktorantki.

Odrobinę zabrakło krótkiego podsumowania tego fragmentu wyników. Autorka przyzwyczaiła w poprzednich podrozdziałach to prezentowania mini-wniosków po każdej z części.



Podsumowując rozdział wyniki, chcę podkreślić że napisany jest on w ciekawy sposób, kolejne eksperymenty wynikają z poprzednich, w logiczny sposób budując historię prezentowaną w pracy. Podobają mi się podsumowanie najważniejszych informacji każdego z etapów pracy (mimo że to odrobinę zahacza o dyskusję,).

Na koniec tej części drobny komentarz edytorski: W rozdziale tym, prawdopodobnie również z powodu dużej ilości informacji w nim zawartych, pojawiają się pewne nieścisłości. Np. na stronie 145 autorka odwołuje się do materiałów i metod, rozdział 5.21 w kwestii posiewów i ochronnego działania pęcherzyków. Rozdział 5.21 w pracy opisuje symulację struktury EPS przy użyciu oprogramowania CASPER. Powinien być to rozdział 5.25. Tego typu drobne błędy utrudniają trochę nawigowanie po pracy i wynikach.

W rozdziale Dyskusja autorka zaczyna od wyjaśnienia zasadności podjęcia tematu opisanego tytułem pracy (czyli OMV w interakcji z układem dopełniacza) i roli OMV w procesie patogenezy bakterii. W tym kontekście, recenzując prace odniosłem wrażenie, że większy nacisk połączony jest jednak na oczyszczanie i analizę struktur, niż na finalny efekt interakcji z układem dopełniacza i na oddziaływanie gospodarz-patogen.

W całej dyskusji, autorka krytycznie podchodzi do otrzymanych wyników, zestawiając je z doniesieniami literaturowymi (najczęściej dotyczącymi pęcherzyków innych gatunków, gdy jak wielokrotnie wspomniano doniesień o izolacji OMV z *Yersinii* jest mało – co czyni prace doktorską ciekawą i nowatorską). Autorka przedstawia wcześniejsze pojedyncze doniesienie dotyczące problematyki izolowania i analizy pęcherzyków błony zewnętrznej z *Y. enterocolitica*, ciekawie punktuje ograniczenia poprzednich eksperymentów i przedstawiając argumentację przemawiającą za koniecznością rozwinięcia poprzednich badań. Dyskusja jest w ciekawy sposób usystematyzowana, przedstawiając kolejne wnioski i osiągnięcia przedstawiane w pracy, a następnie po kolei konfrontując je z aktualną wiedzą i doniesieniami literaturowymi. Warto docenić krytyczne podejście do własnych wyników i sukcesywne eliminowanie źródeł potencjalnych wyników fałszywie pozytywnych.

Na koniec drobne uwagi edytorskie, na które zwróciłem uwagę czytając i recenzując pracę.

1) Cytowania w tekście: w całej pracy informacje dotyczące źródła podawane są po kropce zdania, w którym następuje cytowanie. Zgodnie z moimi doświadczeniami, cytowanie powinno zamieszczać



się po ostatnim wyrazie zdania, ale przed kropką. Dodatkowo pozwoli to ominąć rozpoczynania kolejnego zdania z wielkiej litery po znajdującym się w nawiasie cytowaniu, a nie po kropce;

2) W zwłaszcza tak rozbudowanej pracy, nie jest niczym dziwnym pojawianie się literówek. W niniejszym opracowaniu jest ich zauważalna ilość, a zaczynają się już od samego streszczenia;

3) Skróty: sytuacje w których skrót pojawia się w rozdziale, a dopiero przy kolejnym jego użyciu jest rozwijany. Taka sytuacja ma miejsce już w streszczeniu, a potem co najmniej kilkakrotnie pojawia się w pracy. W tej sytuacji warto być konsekwentnym, albo kompletnie opuścić rozwijanie skrótów w pracy, zważywszy na fakt że autorka zawarła w pracy wykaz skrótów. (warto dodać że przygotowane bardzo starannie);

Uwagi te nie obniżają jednak ogólnej bardzo dobrej oceny recenzowanej pracy.

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji praca to ciekawe i rozbudowane opracowanie poruszające słabo do tej pory zbadany obszar tworzenia i roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych *Yersinia enterocolitica*. Praca doktorska w bardzo dobry sposób prezentuje szeroką wiedzę teoretyczną doktorantki, wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz stanowi interesujące i oryginalne rozwiązanie postawionego problemu naukowego, wnosząc do ogólnej wiedzy co najmniej kilka nowych elementów i odkryć.

Wniosek końcowy:

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Pauli Czyszczon pt „Charakterystyka pęcherzyków błony zewnętrznej *Yersinia enterocolitica* O:3 i ich oddziaływanie z ludzkim układem dopełniacza” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. Zm.). Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Pauli Czyszczon do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Biorąc pod uwagę całość pracy, uzyskane wyniki i rozbudowany warsztat doktorantki, zgłaszam również wniosek o wyróżnienie pracy.

Dr hab. Krzysztof Grzymajło