

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Pauli Czystoń

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

Praca doktorska została przygotowana pod opieką promotora prof. dr hab. inż. Jolanty Łukasiewicz w Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Yersinia enterocolitica jest gram-ujemną bakterią należącą do rodziny Enterobacteriaceae, wywołującą jersiniozę – chorobę układu pokarmowego. Bakteria ta występuje powszechnie w środowisku, a jej rezerwuarem są zwierzęta, zwłaszcza świnie, gryzonie i ptaki. Do zakażenia dochodzi najczęściej drogą pokarmową poprzez spożycie skażonej żywności lub wody albo kontakt z zakażonymi zwierzętami. Szczepy *Y. enterocolitica* różnią się patogennością, a jednymi z najbardziej wirulentnych są należące do serotypu O:3. Czynniki wirulencji obejmują m.in. system sekrecji typu III, białka antyfazogocytarne Yop, warunkujący inwazyjność bakterii plazmid pYV, a także cukrowe antygeny powierzchniowe - lipopolisacharyd (LPS) i enterobakteryjny wspólny antygen (ECA).

Ponadto do czynników wirulencji zalicza się, stosunkowo mało poznane, pęcherzyki błony zewnętrznej (OMV, ang. Outer Membrane Vesicles), uwalniane przez Gram-ujemne bakterie w procesie naturalnej dynamiki błony komórkowej. Są one zbudowane m.in. z fosfolipidów i białek błonowych, ale również ze wspomnianych powyżej LPS-ów. OMV-y odgrywają kluczową rolę w interakcjach między bakteriami a ich otoczeniem, uczestnicząc w transporcie cząsteczek sygnałowych, toksyn oraz enzymów degradujących. Pełnią istotną funkcję w patogenezie i modulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Zjawisko ich powstawania jest regulowane przez różne czynniki środowiskowe, takie jak stres oksydacyjny, antybiotyki czy zmiany temperatury. W biotechnologii i medycynie OMV-y są badane jako potencjalne nośniki szczepionek i systemy dostarczania leków. Dzięki zdolności do stymulacji układu odpornościowego wykorzystywane

są m.in. w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych przeciwko chorobom zakaźnym. Badania OMV-ów otwierają nowe perspektywy w mikrobiologii, immunologii i nanomedycynie.

W opisaną problematykę dobrze wpisuje się praca doktorska mgr Pauli Czyszczon poświęcona charakterystyce pęcherzyków błony zewnętrznej *Yersinia enterocolitica* O:3 i ich oddziaływaniu z ludzkim układem dopełniacza. Przeprowadzone badania były częścią projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki pt. "Oddziaływanie gospodarz-patogen: bakteryjne pęcherzyki błony zewnętrznej jako tarcza dla układu dopełniacza".

Recenzowana praca, licząca ponad 220 stron, została przygotowana w klasycznej formie i napisana w języku polskim. Rozpoczyna się od dosyć dobrze opisujących zawartość rozprawy streszczeń w języku polskim i angielskim.

Na kolejnych stronach Doktorantka zestawia i wyjaśnia stosowane skróty, zarówno w języku polskim jak i angielskim. Pomysł doskonały, natomiast wykonanie pozostawia wiele do życzenia. Wbrew pozorom przygotowanie takiego zestawienia wcale nie jest łatwe, ponieważ trzeba sobie odpowiedzieć na zasadnicze pytanie - dla kogo jest ono przeznaczone. Przykładowo, COSY to spektroskopia korelacyjna, HMBC to heterojądrowa korelacja przez kilka wiązań chemicznych, HSQC to heterojądrowe jednokwantowe widmo korelacyjne, a TOCSY to spektroskopia całkowitej korelacji. Nasuwają się pytania: na ile takie wyjaśnienia są pomocne dla osób, które nie znają zagadnienia? na ile takie wyjaśnienia są akceptowalne przez osoby znające zagadnienie?

Kolejnym rozdziałem pracy doktorskiej jest liczący 31 stron **Wstęp**. W pierwszej części Doktorantka charakteryzuje bakterie gatunku *Y. enterocolitica*, poświęcając sporo uwagi ich morfologii i cechom metabolicznym, a także chorobotwórczości, patogenezie i epidemiologii. Bardzo rozbudowanym elementem tej części rozprawy jest szczegółowy opis czynników wirulencji, zwłaszcza lipopolisacharydów (w tym ich struktur chemicznych), ale także enterobakteryjnego wspólnego antygeny, egzopolisacharydów, białkowych antygenów powierzchniowych i pęcherzyków błony zewnętrznej. W drugiej części **Wstępu** mgr Paula Czyszczon dużo miejsca poświęca ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej, roli ludzkiego układu dopełniacza, a także LPS-u i OMV-u w rozwoju sepsy. Tematyka poruszona w tym rozdziale jest ściśle związana z badaniami opisanymi w rozprawie doktorskiej i stanowi dobre do nich wprowadzenie. **Wstęp** napisany jest dobrze, przedstawione informacje poparte są licznymi odnośnikami literaturowymi (w całej pracy jest ich aż ~350).

W rozdziale **Cel pracy** zdefiniowane zostały trzy nadrzędne cele badawcze.

1. Charakterystyka OMV *Y. enterocolitica* O:3 i ich oddziaływania z ludzkim układem dopełniacza oraz ich zdolności do stymulacji wytwarzania cytokin przez komórki ludzkie posiadające na swojej powierzchni receptory TLR oraz hamowania bójczej aktywności surowicy ludzkiej względem bakterii YeO3.

2. Ocena, czy OMV YeO3 mogą służyć jako „tarcza” bakterii przed działaniem układu dopełniacza i aktywator reakcji zapalnej.

3. Ocena wpływu chemotypu LPS/LOS YeO3 na biodystrybucję znakowanych fluorescencyjnie OMV YeO3 in vivo na modelu mysim.

Zdefiniowano również cztery cele pośrednie.

1. Izolacja i weryfikacja struktur LPS (w tym lipidów A), ECA i EPS YeO3 w przypadku czterech szczepów o różnych chemotypach LPS/LOS [6471/76-c (S), YeO3-c-R1 (Ra), YeO3-R1-M205 (Re), YeO3-R1-M196 (Rd1)].

2. Optymalizacja metod izolacji OMV z zastosowaniem trzech znanych w literaturze metod oraz dobór optymalnej metody w celu przeprowadzenia badań strukturalnych i biologicznych OMV YeO3.

3. Charakterystyka OMV YeO3 hodowanych w trzech temperaturach wzrostu: 37, 22 i 4°C oraz charakterystyka OMV otrzymanych z mutantów o czterech różnych chemotypach LPS/LOS za pomocą metod: DLS, NTA, TEM, spektrometrii mas i spektroskopii NMR, w tym ilościowa ocena białka za pomocą testu BCA oraz LPS za pomocą metody z wykorzystaniem odczynnika Purpald na obecność Kdo i heptoz w oligocukrze rdzenia LPS/LOS.

4. Próba izolacji oraz ustalenia struktury egzopolisacharydu (EPS) pochodzącego z *Y. enterocolitica* O:3 będącego prawdopodobnie ligandem dla ludzkiej lektyny MBL dopełniacza. Trudno dyskutować z tak sformułowanymi celami pracy doktorskiej. Nasuwa się jednak spostrzeżenie, że są one (za) bardzo szczegółowe. Cele pośrednie sprawiają wrażenie jakby były zdefiniowane na podstawie uzyskanych wyników.

W rozdziale **Materiały i metody** Doktorantka przedstawiła część doświadczalną rozprawy doktorskiej. Wydaje się, że powtórzenie większości eksperymentów i odtworzenie uzyskanych wyników nie powinno stanowić problemu. Nie zabrakło jednak dosyć enigmatycznych stwierdzeń, jak np. w podrozdziale 5.2.2 - „LPS YeO3 szczepów 6971/76-c, YeO3-c-R1, YeO3-R1-M205, YeO3-R1-M196 oczyszczano przez trawienie enzymatyczne (DNAza, RNAza i proteinaza K) w celu usunięcia kwasów nukleinowych i białek.” Nie bardzo wiadomo, którego etapu badań ten opis dotyczy. Również tytuł rozdziału 5.2 jest zagadkowy - „Materiały wykorzystywane w doświadczeniach i oprogramowanie”. W opisie nie ma jednak żadnych informacji na temat oprogramowania. Na podkreślenie zasługuje ogromna liczba zastosowanych technik w przeprowadzonych badaniach. W ok. 25 podrozdziałach (spośród 28) rozdziału **Materiały i metody** opisano różne badania eksperymentalne. Z opisu wynika, że Doktorantka zdecydowaną większość badań przeprowadziła sama lub w nich uczestniczyła.

Wyniki badań przedstawiono w rozdziale 6 (**Wyniki**) na 84 stronach. Opis wzbogacony jest licznymi rysunkami, wykresami i tabelami, które ilustrują i zdecydowanie ułatwiają zrozumienie całego procesu analitycznego. Ta obszerna część rozprawy doktorskiej potwierdza wielki nakład pracy włożonej przez doktorantkę, który przełożył się na ogromną liczbę otrzymanych wyników.

Naturalną kontynuacją przedstawionych wyników badań jest rozdział **Dyskusja** (27 stron), w którym Doktorantka wyniki swoich badań porównuje z aktualnymi doniesieniami literaturowymi. Opis ten świadczy o dobrym rozeznaniu mgr Pauli Czystczoń w realizowanej tematyce naukowej.

Podsumowując rozdziały Wyniki i Dyskusja należy stwierdzić, że zdefiniowane cele badawcze zostały przez Doktorantkę zrealizowane.

Biorąc pod uwagę przeprowadzone badania, obszerną pracę z rozbudowaną częścią wynikową i dyskusją, brakuje rozdziału **Podsumowanie**, w którym na paru stronach Doktorantka podsumowałaby uzyskane wyniki oraz sformułowała najważniejsze osiągnięcia naukowe będące efektem przeprowadzonych badań. Bardzo proszę mgr Paulę Czystczoń o przedstawienie, podczas obrony rozprawy doktorskiej, trzech najważniejszych osiągnięć naukowych w odpowiedzi na uwagi zawarte w recenzji.

Kolejne części rozprawy doktorskiej zawierają zestawienie literatury (wykorzystanie ok. 350 pozycji literaturowych jest nie od przecenianie) oraz zamieszczonych w pracy rysunków (41) i tabel (20).

Rozprawa zakończona jest informacjami o osiągnięciach naukowych Doktorantki. Mgr Paula Czystczoń Artyszuk jest współautorką 1 artykułu: Janik M., Brzozowska E., Czystczoń P., Celebańska A., Koba M., Gamian A., Bock J. W., Śmietana A., 2021, „Optical fiber aptasensor for label-free bacteria detection in small volumes”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol.330 (129316) oraz 3 doniesień konferencyjnych zaprezentowanych na międzynarodowych sympozjach naukowych. Ponadto była stypendystką projektu OPUS finansowanego ze środków NCN oraz wykonawczynią w 5 innych projektach naukowych.

Miałem mieszane odczucia podczas czytania rozprawy doktorskiej. Imponująco wypada część eksperymentalna oraz wyniki badań. Natomiast język, styl i korekta edytorska pozostawiają miejscami sporo do życzenia, co sprawia, że niektóre fragmenty pracy są trudniejsze do zrozumienia. Problem ten dobrze ilustrują dwa pierwsze zdania rozprawy doktorskiej, zawarte w streszczeniu w języku polskim. „*Yersinia enterocolitica* O:3 (YeO3) jest Gram-ujemną pałeczką zdolną do wzrostu w szerokim zakresie temperatur (0 do 44°C) i jest czynnikiem etiologicznym zakażeń układu pokarmowego u ludzi oraz fakultatywnym patogenem wewnątrzkomórkowym oraz wywołuje chorobę zwaną jersiniozą. Zakażenia mogą również występować po transfuzji krwi, ze względu na szerokie spektrum wzrostu tej bakterii.” Znaczenie tego drugiego zdania jest wyraźnie inne w streszczeniu w języku angielskim, ponieważ odnosi się do zdolności bakterii do wzrostu w szerokim zakresie temperatur. I kolejne przykładowe zdanie: „*Y. enterocolitica* O:3 stanowiła ciekawy model do realizacji zaplanowanych badań, gdyż jej LPS, główny czynnik wirulencji, posiada unikatowe (w tym zależne od temperatury) cechy strukturalne związane z jego ogólnym schematem budowy oraz dysponowano biblioteką mutantów o różnych chemotypach LPS”.

Recenzowana praca to obszerne opracowanie naukowe (na szczęście wydrukowane dwustronnie w wersji dla recenzentów). W tak dużym dokumencie trudno całkowicie uniknąć błędów językowych, wyrażeń żargonowych czy literówek. Jednak staranna korekta mogłaby znacząco podnieść jakość tekstu. Podczas jego lektury odnosi się wrażenie, że takiej korekty wyraźnie zabrakło. Nie jest obowiązkiem recenzenta pełnienie funkcji korektora i wskazanie wszystkich uchybień, dlatego poniżej przedstawiam kilka subiektywnie wybranych uwag.

s.52 „Oligocukier”? zdecydowanie lepiej oligosacharyd.

s.53 „W pracy doktorskiej wykorzystywano trzy szczepy *Y. enterocolitica* O:3 6471/76-c, YeO3-c-R1, YeO3-R1-M205 i YeO3-R1-M196” – wymienione są 4.

s.57 Co to są „stronty”?

s.64 Co to jest „stężenie bezwzględne”?

s.66 Czy „rozdziały chromatograficzne” jest poprawnym określeniem?

s.67 Dlaczego MALDI-TOF jest spektrometrią masową, natomiast ESI-MS spektrometrią mas? Korzystając z okazji apeluję o używanie określeń „spektrometria mas” i „widma mas”. Natomiast zamienne używanie spektrometria mas i spektrometria masowa uważam za niedopuszczalne.

s.82 „Trójczukrowi”? zdecydowanie trisacharydowi.

s.86 Co to jest „atomu protonu”?

s.96 „Identyczny lub podobny repertuar jonów”- chemicznie to „brzmi” co najmniej dziwnie.

s.98 „Dodatkowo wyznaczono wartości stałych sprzężenia $J_{C1,H1}$ wynoszących odpowiednio dla reszt A, B i C ok. 172 Hz, 174 Hz i 170 Hz, co w przypadku heksoz należących do szeregu D wskazywałoby na obecność anomerów α ”. A jak byłoby w przypadku anomerów należących do szeregu L?

s.99 „Reszt węglowodanowych” – zdecydowanie monosacharydów.

s.102 O co chodzi w wyrażeniu „zasymulowanych przesunięć chemicznych”?

s.103 „Symbolami zaznaczono wartości o największych odchyleniach” – na rysunkach (chyba) nie ma żadnych symboli.

s.104 Zagadkowo brzmi „sygnały obserwowane podczas pomiarów NMR na widmie...”

s.130 Z czego wynika dominująca intensywność sygnału H4 na widmie „czerwonym” w porównaniu z pozostałymi sygnałami protonów?

s.138 „Chemotyp LPS nie wpływał na strukturę lipidu A w LPS i OMV...” Czy stwierdzenie, że chemotyp wpływa na strukturę jest poprawne?

s.143-144 Rozmieszczenie tabeli i tekstu powinno być dopracowane.

s.162 Jak należy rozumieć wyrażenie „posiada ciekawe cechy strukturalne związane z jego ogólnym schematem budowy”.

s.162 Na ile prawdziwe jest stwierdzenie (pomijając konstrukcję językową) „u bakterii występujących w naturze występują szczepy gładkie”.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że praca pod względem naukowym jest wartościowa, została dobrze zaplanowana i zrealizowana, wnosi oryginalny i istotny wkład do wiedzy na temat pęcherzyków błony zewnętrznej *Yersinia enterocolitica* O:3 i ich oddziaływaniach z ludzkim układem dopełniacza. Doktorantka wykazała się znajomością piśmiennictwa, które jest na ogół prawidłowo wykorzystane. Bardzo sprawnie posługuje się metodami biologicznymi i chemicznymi oraz technikami separacyjnymi i spektroskopowymi.

Reasumując, przedłożona do oceny praca doktorska spełnia ustawowe kryteria stawiane pracom doktorskim (Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r. z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnioskuję 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 w sprawie nadania stopnia naukowego doktora.



Signed by /
Podpisano przez:

Zbigniew Kaczyński
Uniwersytet
Gdański

Date / Data:
2025-03-02 12:03