



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 30 sierpnia 2025 r.

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Biochemii Komórki

Kierownik

Prof. dr hab. Joanna Bereta

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 04-09-2025
L.dz. AEG

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Katarzyny Leszczyńskiej-Nowak

pt. „Modulacja wrodzonej odpowiedzi immunologicznej przez antygeny powierzchniowe *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370”

Praca doktorska pani mgr Katarzyny Leszczyńskiej-Nowak została wykonana w Laboratorium Immunobiologii Mikrobiomu Zakładu Mikrobiologii w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk, a promotorką pracy jest dr hab. Sabina Górská, prof. Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej.

Jednym z tematów badawczych, które w ostatnich latach wzbudzają ogromne zainteresowanie naukowców z różnych dziedzin jest wpływ mikroflory jelitowej na funkcjonowanie organizmu. Z jednej strony pytamy, jak można modyfikować mikroflorę, aby jak najlepiej nam służyła, z drugiej strony analizujemy wpływ poszczególnych gatunków i szczepów bakteryjnych na cały metabolizm, na procesy nowotworzenia, na działanie układu pokarmowego, dokrewnego czy mózgu, a wreszcie na działanie układu odpornościowego. Era probiotyków trwa, ale dzięki badaniom nad molekularnymi mechanizmami działania poszczególnych związków produkowanych i wydzielanych przez bakterie jelitowe czy produkowanych przez te bakterie i wchodzących w skład ich struktur, wkraczamy w erę postbiotyków. Zidentyfikowanie związków, które odpowiadają za pożądane efekty wywierane przez konkretne mikroorganizmy pozwoli na skuteczniejsze i precyzyjniejsze terapie.

W ten właśnie nurt badań wpisuje się praca doktorska pani mgr Katarzyny Leszczyńskiej-Nowak.

Celem pracy było zbadanie czy szczep bakterii probiotycznych *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 oraz jego antygeny powierzchniowe mają potencjał terapeutyczny w leczeniu alergii oddechowych. Temat bardzo ważny, również ze względu na stale rosnącą liczbę pacjentów cierpiących na alergie dróg oddechowych, w tym astmę.

Doktorantka wyizolowała z bakterii trzy typy związków: 1/ polisacharydy, które rozdzieliła na dwie frakcje, 2/ peptydoglikan i 3/ białka powierzchniowe (określane dalej jako B.370). Wstępna charakterystyka własności immunomodulujących tych grup związków pozwoliła na stwierdzenie, że najciekawszą grupę stanowią białka powierzchniowe i na białkach właśnie Doktorantka skupiła swoją uwagę. W toku pracy pani mgr Leszczyńska-Nowak wykorzystwała model myszy z alergicznym zapaleniem dróg oddechowych wywołanym przez owoalbuminę. W doświadczeniach *in vitro* zbadała wpływ preparatu B.370 na komórki dendrytyczne i splenocyty izolowane z myszy uwrażliwionych owoalbuminą, a w

doświadczeniach *in vivo* badała potencjał terapeutyczny tego preparatu. Doktorantka przeprowadziła również badania nad wpływem B.370 na układ odpornościowy myszy wolnych od mikroorganizmów (*germ-free*) oraz podjęła próbę zbadania wpływu *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 oraz białek B.370 na inflammasom.

I tu już moja pierwsza wątpliwość dotycząca tytułu rozprawy (*Modulacja wrodzonej odpowiedzi immunologicznej przez antygeny powierzchniowe Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 – czy można badać wpływ jakichkolwiek czynników na alergię poruszając się jedynie w obszarze wrodzonej odpowiedzi immunologicznej? I druga wątpliwość – czy badania na modelu myszy wolnych od mikroorganizmów można określić jako badania nad wpływem białek B.370 na **rozwój** układu odpornościowego? Wg mnie te badania pozwalają odpowiedzieć na pytanie, czy i jak układ odpornościowy myszy wolnych od mikroorganizmów odpowiada na białka *Bifidobacterium*, ale nie – czy białka te wpływają na rozwój układu odpornościowego.

Za najistotniejsze osiągnięcia Doktorantki przedstawione w rozprawie uważam:

1. Wykazanie, że białka B.370 aktywują TLR2 i nie mają znaczącego wpływu na TLR4 i NOD;
2. Wykazanie, że aktywność białek B.370 znacząco redukuje aktywności układu odpornościowego nasilające alergię w mysim modelu alergii wziewnej indukowanej OVA w doświadczeniach *in vivo* i *ex vivo*;
3. Wykazanie, że obserwowana aktywność białek B.370 nie wynika z hamowania aktywności inflammasomu NLRP3.

Doświadczenia zostały dobrze zaplanowane, a Doktorantka wykorzystała w swojej pracy wiele różnorodnych metod badawczych: biochemiczne, analityczne, metody z obszaru biologii komórki i biologii molekularnej oraz – co zasługuje na szczególne podkreślenie – trudne i wymagające badania na zwierzętach.

Dysertacja zawiera typowe rozdziały, z których najważniejsze pokrótce omówię skupiając się na uwagach krytycznych.

Wstęp:

We wstępie Doktorantka omówiła mechanizm powstawania alergii, współczesne metody leczenia alergii, badania nad wpływem bakterii probiotycznych na alergię wziewną ze szczególnym uwzględnieniem bakterii z rodzaju *Bifidobacterium*. Omówiła także wyniki najnowszych badań nad wpływem rozmaitych postbiotyków na alergię z uwzględnieniem mechanizmów działania tych produktów bakteryjnych. Sporo uwagi poświęciła budowie i funkcjonowaniu inflammasomu NLRP3, jego roli w rozwoju chorób alergicznych układu oddechowego, a także możliwości wykorzystania inhibitorów inflammasomu w terapiach alergii. **Ta część pracy jest bardzo ciekawa i świadczy o dużej wiedzy Doktorantki.** Zamieszczone ryciny są znakomitą uzupełnieniem tekstu. Jedynie fragment dotyczący fizjologicznej i patologicznej odpowiedzi układu odpornościowego na potencjalne alergeny cechuje się, w mojej opinii, zbyt dużymi uproszczeniami.

Z drobnych uwag:

- (i) Wszystkie immunoglobuliny błonowe (w tym IgE) to białka transbłonowe (choć z krótkim fragmentem cytozolowym), a nie białka powierzchniowe zakotwiczone w błonie.
- (ii) Od wielu lat zalecana nazwa dla cytokiny określanej początkowo jako TNF-beta to limfotoksyna alfa.
- (iii) Razi wyjaśnienie skrótu NLRP3 w podpisie pod Ryciną 2, szczególnie, że jest to białko leżące w centrum zainteresowań Doktorantki. Nazwa NLRP3, którą należy tłumaczyć jako białko 3 rodziny NLR zawierające domenę pirynową, została przetłumaczona jako „domena pirynowa rodziny receptorów NOD-podobnych zawierająca 3”. Również tłumaczenie skrótu CARD jest nie do przyjęcia. CARD to domena aktywująca i rekrutująca kaspazę (*caspase activating and recruiting domain*). Autorka tłumaczy ten skrót jako: domena rekrutacyjna dla asparaginianu cysteiny (kaspazy). Kaspaza jest proteazą cysteinową hydrolizującą wiązanie po reszcie Asp, ale absolutnie nie jest asparaginianem cysteiny!
- (iv) Na początku wstępu Autorka pisze, że na katar alergiczny cierpi 40% populacji ludzi na świecie i cytuje pracę dotyczącą alergii pokarmowych, w której nie znalazłam takiej informacji. W dalszej części Wstępu Autorka wraca do tematu i podaje bardziej wiarygodną informację, że na alergiczny nieżyt nosa cierpi ok. 100 milionów Europejczyków (co stanowi 13% populacji Europy – uwaga moja).

Materiały i Metody:

Największe moje zastrzeżenia budzi **analiza statystyczna**. Autorka przy opisie dziewięciu doświadczeń pisze: „*Eksperyment wykonano w dwóch powtórzeniach biologicznych po dwa powtórzenia techniczne*”, a więc *de facto* Doktorantka miała w każdym z tych doświadczeń po dwa wyniki. We wszystkich tych doświadczeniach przeprowadziła analizę statystyczną albo testem t, albo testem jednoczynnikowa ANOVA z testem Dunnetta. Testy te można stosować tylko wówczas, gdy nie ma dużych różnic pomiędzy wariancjami wyników w badanych grupach i gdy wyniki w każdej grupie mają rozkład normalny. Jeśli mamy zaledwie dwa wyniki, to nie da się stwierdzić, czy rozkład jest normalny; natomiast przedstawione wykresy pudełkowe pokazują, że w wielu przypadkach wariancje są różne. Teoretycznie można, wykonując inne testy sprawdzić, czy różnice wariancji są dopuszczalne, ale druga przesłanka i tak nie byłaby spełniona. Przy tak nielicznych wynikach wyznaczanie parametru „p” nie ma sensu.

To nie znaczy, że uzyskane wyniki nie są ważne. To znaczy, że w ich interpretacji nie można opierać się na wyznaczonym parametrze „p” (w ogóle nie należy parametru „p” wyznaczać). Wydaje się, że analizując swoje wyniki Doktorantka właśnie do wartości „p” najczęściej się odwołuje, nie zaś do wielkości różnic badanego parametru. Autorka pisze np. „*Wynik pokazał znaczące podniesienie ekspresji genów rorc (** $p \leq 0.01$)*” albo „*poziom ekspresji kaspazy-1 został istotnie obniżony przez bakterie ($p \leq 0.05$)*”, ale nie pisze czy poziom transkryptu *Rorc* wzrósł o 20%, dwukrotnie, czy dziesięciokrotnie, czy poziom *CASP1* jest niższy o 10% czy o 90%. Parametr „p” nie świadczy o wielkości zmiany. Możemy mieć dużą różnicę między wynikami bez istotności statystycznej (co wcale nie znaczy, że tej różnicy nie ma) lub małą różnicę między wynikami z dużą istotnością statystyczną (a np. bez żadnej istotności biologicznej!). Oczywiście, im więcej niezależnych powtórzeń eksperymentu, tym wyniki są bardziej przekonujące, bardziej wiarygodne.

Przy opisach wielu Rycin pojawia się **rażąco błędne** sformułowanie dotyczące analizy statystycznej – cytuję reprezentatywny przykład: *Wykonano niezależny test t i obliczono istotne różnice między próbkami....* – tak Autorka opisuje parametr „p”.

W przypadku uzyskania nielicznych wyników najlepiej przedstawiać je w formie punktów, tak jak to Doktorantka uczyniła dla analizy poziomu transkryptów na Ryc. 10F i 12F. Dobrze jest w opisie **każdej ryciny** odnieść się do statystyki i podać informację, z ilu niezależnych doświadczeń obliczono średnią. Nie ma z kolei sensu pod każdą ryciną powtarzanie informacji, że 4 gwiazdki oznaczają $p < 0,0001$, a trzy gwiazdki oznaczają $p < 0,001$, jeśli na wykresie mamy tylko dwie gwiazdki – podpis pod ryciną ma wyjaśniać symbole istniejące na tej, konkretnej rycinie.

Dodatkowo, w rozdziale Materiały i Metody Doktorantka podaje informację, że wyniki są przedstawiane jako średnia arytmetyczna $\pm$ błąd standardowy średniej (SEM). W opisie pod rycinami widnieje jednak średnia $\pm$ odchylenie standardowe (SD). W rozdziale Materiały i Metody pani mgr Leszczyńska-Nowak pisze, że do analizy statystycznej używała testu – cytuję – „Two-way ANOVA” natomiast w opisach pod Rycinami stwierdza, że stosowała test jednoczynnikowa ANOVA (one-way Anova).

Z metod doświadczalnych największe zastrzeżenie budzi we mnie najprostsza metoda zatytułowana „*Badanie proliferacji komórek za pomocą testu SRB*”, czyli test wykorzystujący sulforodaminę B.

Test został użyty do oznaczania ilości komórek THP-1 po ich zróżnicowaniu do makrofagów przez PMA. Proliferacja tak zróżnicowanych komórek jest ograniczona (choć nie jestem pewna, do jakiego stopnia w warunkach różnicowania zastosowanych przez Autorkę). Test w tym wypadku raczej nie bada proliferacji lecz jest wykorzystany do badania cytotoksyczności albo bakterii, albo stosowanych preparatów. Autorka pisze, że test opiera się na kolorymetrycznym oznaczeniu białek w **żywych** komórkach eukariotycznych. Sulforodamina B **nie** wnika do żywych komórek; jej stosowanie wymaga utrwalenia komórek – po ich utrwaleniu kwasem TCA (lub TFA) barwi więc białka zarówno dotychczas żywych jak i martwych komórek. Nie widzę powodów, dla których sulforodamina B nie miałaby barwić również utrwalonych komórek bakteryjnych. Stąd wyniki oznaczenia żywotności komórek, w tym komórek inkubowanych z dużą liczbą bakterii, kluczowe dla wniosków dotyczących inflamasomu, mogą być obciążone dużym błędem.

Autorka pisze, że doświadczenie prowadziła na płytkach 96-dołkowych. W pewnym miejscu opisu procedury pisze: „do płytek zawierających po 200 μ l dołek pożywki dodano 200 μ l zimnego roztworu 20% kwasu trifluorooctowego (TFA)”. W dołkach klasycznej płytki 96-dołkowej mieści się bezpiecznie maksymalnie 200 μ l. Ponieważ w klasycznej metodzie SRB stosuje się 10% TCA, nie wiem, czy rzeczywiście Autorka dodawała TFA do pożywki, tyle że miała mniejsze objętości, czy też najpierw usuwała pożywkę a potem dodawała TFA. Jeśli nie usuwała pożywki i nie płukała komórek PBS-em, to wyniki mogą być dodatkowo obciążone błędem, gdyż również białka surowicy z pożywki, które oddziałują z powierzchnią komórek THP-1, mogą w mojej opinii, zaburzać wynik. W tego typu badaniach najbardziej miarodajne, choć pracochłonne, jest liczenie żywych komórek po ich uwolnieniu z podłoża.

W opisie metody Autorka stwierdza, że komórki THP-1 były inkubowane z bakteriami w ilościach 10^7 , 10^8 lub 10^9 pfu, w opisie Ryciny liczby są inne: 10^6 , 10^7 lub 10^8 pfu.

Opis metody RT-PCR jest niewystarczający, aby mieć pewność, że uzyskane wyniki są

miarodajne. Autorka nie podaje informacji o sekwencjach użytych starterów. Rozumiem, że używała komercyjnie dostępnych starterów. Tu też mam pewną wątpliwość. Autorka podaje, że startery pochodziły z Promegi; na stronie tej firmy nie znajduję ani oferty konkretnych starterów, ani oferty przygotowania starterów na życzenie klienta. Być może sekwencje starterów są tajemnicą firmy, z której zakupiono startery. Należało jednak sprawdzić, czy startery amplifikują jeden fragment DNA, czy w warunkach doświadczenia nie powstają dimery starterów, czy wydajność amplifikacji dla starterów specyficznych wobec badanych genów i wobec genu referencyjnego jest taka sama (tylko wtedy wyniki są wiarygodne). Czy zastosowany program termocyklera był wystarczający do wydajnej amplifikacji – (skoro nie znamy długości powielanego fragmentu nie możemy oszacować, czy czas 15 s przewidziany na wydłużanie nici jest wystarczający). Autorka nie podaje metody analizy poziomu transkryptów ($\Delta\Delta Ct$?). Pomijam to, że zgodnie ze sztuką powinno się analizować dwa różne geny referencyjne, przynajmniej początkowo.

Większość opisów metod jest bardzo szczegółowa, jeśli chodzi o wykonywane czynności, natomiast przy niektórych opisach brakuje ważnych informacji. **Na pochwałę** zasługuje to, że Doktorantka zawsze powołuje się na pracę, z której pochodzi oryginalna metoda. Według mojej osobistej opinii, opis metod w wielu przypadkach jest **zbyt** szczegółowy (oczywiście to nie może być zarzut). Natomiast niewłaściwe jest powtarzanie wielokrotnie tych samych informacji. Na przykład pewne fragmenty opisu hodowli, pasażu, liczenia komórek powtarzają się dla każdej stosowanej linii komórkowej. Te informacje, które dotyczą wszystkich linii można było napisać jeden raz. Również podstawowe informacje o hodowli myszy są niepotrzebnie skopiowane w czterech podrozdziałach dotyczących immunizacji myszy, izolacji splenocytów, izolacji komórek dendrytycznych i badania wpływu białek B.370 na rozwój alergii. Natomiast brakuje informacji, gdzie były zakupione myszy, w tym myszy wolne od mikroorganizmów. Autorka podkreśla jedynie różnice w hodowli, natomiast nie pisze nic o pochodzeniu zwierząt.

Uwagi do opisu metod:

Doświadczenia nad aktywacją receptorów rozpoznających wzorce – Komórki reporterowe powinny być znacznie dokładniej opisane. Te linie są w ofercie firmy Invivogen a nie, jak podaje Autorka, Invitrogen. Wszystkie pozwalają na łatwą ocenę wykorzystywania poszczególnych receptorów rozpoznających wzorce, ale mają różne systemy detekcji. Autorka powinna podać handlowe nazwy używanych linii. Doktorantka błędnie pisze, że genami reporterowymi w tych liniach są IL-8 i NF- κ B. Genami reporterowymi w niektórych liniach jest SEAP (wydzielnicza forma alkalicznej fosfatazy), w innych lucyferaza, w innych oba te geny pod promotorem genu IL-8 albo promotorem zawierającym miejsca wiązania NF- κ B/AP1. Poza tym, w opisie brak informacji o ilości wysiewanych komórek HEK293 i czasie inkubacji z próbkami.

Opis pasażowania komórek – brak informacji o ilości komórek wysiewanych po pasażu na butelkę hodowlaną. Doktorantka pisze, że wysiewała „odpowiednią ilość”; powinna być bardziej precyzyjna i podać albo liczbę komórek albo jaką część komórek zebranych z jednej butelki wysiewała na kolejną butelkę – 1/3, 1/5, 1/10?

Brakuje opisu doświadczenia wpływu bakterii żywych i inaktywowanych termicznie na splenocyty. Nie wiadomo, jak został przeprowadzony ten eksperyment, ile dodawano komórek bakteryjnych, ani też jak długo inkubowano splenocyty z bakteriami.

Opis izolacji i stymulacji splenocytów ogranicza się do splenocytów myszy BALB/c

uwrażliwianych owoalbuminą. Brakuje informacji, czy dokładnie tak samo postępowano w modelu myszy wolnych od mikroorganizmów. Przy opisie znajdujemy informację, że splenocyty stymulowano polisacharydami (PS) peptydoglikanem (PG) i tajemniczym SPL (nigdzie nie ma rozwinięcia tego skrótu); brak wzmianki o białkach B.370.

Niewystarczająco dokładny opis oznaczania IgE – czy była sporządzana krzywa kalibracyjna, czy też było to oznaczenie względnego poziomu IgE? Autorka nie podaje warunków reakcji wykrywającej heksoaminidazę – brak informacji o stężeniu substratu i czasie reakcji. Nawiasem mówiąc, to nie substrat jest fluoroforem, jak pisze Autorka, tylko produkt reakcji prowadzonej przez heksoaminidazę.

Opis oznaczania IgA przy użyciu testu Mouse IgA ELISA Quantitation Set jest niejasny. Sądzę, że w opisie zamiast „przeciwciała IgA” powinno być „przeciwciała anti-IgA”; brakuje informacji, jakie objętości surowicy i BALF nakładano, czy próbki były rozcieńczone czy nie. Jakich przeciwciał sprzęgniętych z HRP używano?

Oznaczanie IL-1 β . Dlaczego Autorka mierzyła absorbancję przy dwóch długościach fali (już po dodaniu kwasu siarkowego)?

Ocena histopatologiczna płuc. Brak informacji, ile preparatów, z ilu myszy, oraz ile pól widzenia analizowano w obrębie jednego preparatu. Jak wybierano pola widzenia?

Błędny opis doświadczenia nad wpływem białek B.370 na aktywność inflamasomu. Z opisu wynika, że komórki najpierw poddano działaniu bakterii, białek powierzchniowych, specyficznego inhibitora NLRP3 MCC950 przez 4 i 24 godziny, a dopiero później stymulowano komórki LPS-em i działano na nie nigeryciną. Opis doświadczenia zaprezentowany w Wynikach podaje odwrotną kolejność.

W opisie w Materiałach i Metodach czytamy, że sprawdzono aktywność nie tylko białek, ale także peptydoglikanu i polisacharydów na aktywność inflamasomu. Wyniki prezentują jedynie dane dotyczące bakterii i białek.

Wirowanie: Autorka podaje parametry wirowania albo jako wielokrotność g (prawidłowo), albo jako obroty na minutę (nieprawidłowo). Ten drugi sposób nie określa jednoznacznie siły działającej na komórki czy cząsteczki, gdyż ta zależy od wielkości rotora.

Adjuwant: Autorka podaje, że jako adjuwant stosowała sole aluminium z firmy Serva. Po polsku pierwiastek odpowiadający angielskiemu aluminum to glin; jedynym adiuwantem na bazie glinu sprzedawanym przez firmę Serva jest Alum-Gel-S, który jest wodorotlenkiem glinu.

Hodowla zawieszinowa: Przy opisie hodowli zawieszinowej Autorka stwierdza: „Komórki pasażowano, gdy osiągnęły 70-80% zarośnięcia objętości medium w butelce hodowlanej (konfluencja)”. Nie wiem, jak można oszacować procent zarośnięcia objętości medium. Gdyby komórki zajmowały 70-80% objętości medium, to nie przeżyłyby w konwencjonalnej butelce hodowlanej. Nie można stosować terminu „konfluencja” do określania gęstości hodowli.

Opis techniki Western blotting: zamiast „5% roztwór mleka w TBST” powinno być „5% roztwór mleka w proszku w TBST”

Izolacja RNA: W opisie czytamy „Następnie do każdej próbki dodano 1 μ l 50 mM (ThermoScientific, USA) i inkubowano” Nie wiadomo czego dodano!

PBS to nie jest bufor fosforanowy tylko sól fizjologiczna buforowana fosforanami.

Wyniki:

Poniżej przedstawiam moje uwagi krytyczne do poszczególnych doświadczeń i sposobu ich prezentacji:

1. Badanie wpływu szczepu *Bifidobacterium adolescentis* CCDM 370 na syntezę cytokin przez splenocyty (**Ryc. 3**). W opisie wyników dobrze byłoby pokazać wpływ bakterii na morfologię splenocytów – czy inkubacja z bakteriami nie prowadzi do śmierci komórek, co wpływałoby na poziom syntezy cytokin, a zatem ich stężenie w pożywce. Czy bakterie w tych warunkach przeżywają? giną? namnażają się?
2. Badanie wpływu białek B.370 na parametry analizowane w płucach charakteryzujące alergię w modelu alergii wziewnej indukowanej OVA (**Ryc. 10**). Autorka pisze, że liczba komórek produkujących śluz była mniejsza w płucach myszy, którym oprócz OVA podano białka B.370; w rozdziale Materiały i Metody jest podany opis barwienia PAS – tu oczekiwałabym danych liczbowych. Czy prawidłowe jest sformułowanie sugerujące, że cytokiny, których poziom mierzono w BALF, to cytokiny produkowane przez komórki płuc? Podpis do Ryc. 10E: „*Komórki płuc wyizolowano z myszy traktowanych OVA i białkami B.370, a następnie ponownie stymulowano alergenem (OVA)*” jest niezgodny z opisem w rozdziale Materiały i Metody, gdzie czytamy, że stężenie cytokin mierzono w BALF. Ta sama wątpliwość dotyczy oznaczania stężenia cytokin produkowanych przez „komórki płuc” myszy wolnych od mikroorganizmów (**Ryc. 12E** oraz tekst opisujący doświadczenie). Nigdzie w sekcji Materiały i Metody nie ma opisu izolacji komórek z płuc, ani też opisu hodowli komórek wyizolowanych z BALF.
3. Badanie wpływu białek B.370 na parametry analizowane w surowicy i w hodowli splenocytów (**Ryc. 11**). Autorka stwierdza, że białka B.370 „*mają tendencję do obniżania produkcji IFN γ w porównaniu z kontrolą*”. Wynik przedstawiony na Ryc. 11 nie wspiera tego stwierdzenia. Mediana poziomu IFN γ w grupie OVA jest ponad dwukrotnie **niższa** niż w grupie myszy, którym podano białka B.370. Wynik dotyczący IFN γ jest nietypowy; szkoda, że nie przedstawiono punktów obrazujących wyniki dla każdej myszy oddzielnie, tak jak to uczyniła Autorka np. dla badania ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne. W każdym razie wynik nie uprawnia do stwierdzenia, że białka B.370 „*mają tendencję do obniżania produkcji IFN γ* ”. Nie jest też jasne, w oparciu o jaką liczbę wyników zostały sporządzone wykresy na Ryc. 10 i 11. W żadnym miejscu pracy Autorka nie podaje, jak liczne były badane grupy, ile myszy było analizowanych. Z Ryc. 10F wynika, że doświadczenie przeprowadzono na grupach 5 i 6 myszy; natomiast w rozdziale Materiały i Metody Doktorantka pisze, że analiza obejmuje dwa niezależne doświadczenia – czy to znaczy, że do analizy wzięto materiał z dwóch myszy z każdej grupy? (to samo pytanie dotyczy doświadczeń na myszach wolnych od mikroorganizmów).

4. Nie jest jasne dlaczego w przypadku doświadczeń nad wpływem białek B.370 na myszy uwrażliwiane OVA i na myszy wolne od mikroorganizmów badano inne zestawy cytokin.
5. Autorka podsumowując wyniki badań na myszach wolnych od mikroorganizmów pisze, że białka B.370 nie indukują znacznej odpowiedzi układu odpornościowego. Czy ten wniosek broni się, jeśli weźmiemy pod uwagę ponad dziesięciokrotny wzrost poziomu TNF, IL-6 i MIP-1 α wydzielanych przez splenocyty? Ciekawe byłoby również sprawdzenie, czy w surowicy myszy wykrywa się przeciwciała specyficzne wobec białek B.370.
6. Co to jest IgG-FC? Również w Dyskusji pojawia się taki skrót.
7. Rycina 14. Jeśli, jak pisze Autorka „Wyniki pokazano jako średnia $\pm$ SD i wyrażono jako stosunek procentowy pomiędzy próbkami a „Medium” czyli komórkami hodowanymi w czystym medium bez stymulacji” to słupkom dotyczącym „medium” powinna odpowiadać wartość 100%, a nie, jak widzimy na wykresie, wartości ok. 115 i 105%.
8. **Doświadczenia dotyczące potencjalnego wpływu bakterii oraz białek B.370 na działanie inflamasomu** wywołują u mnie najwięcej sceptycyzmu. Pierwszy eksperyment polegał na określeniu wpływu bakterii i białek na żywotność komórek THP-1 zróżnicowanych do makrofagów. Według mnie, o czym pisałam poprzednio, zastosowany test nie jest w tym wypadku miarodajny. Wątpliwość Doktorantki powinny budzić wyniki, w których dodanie bakterii do komórek eukariotycznych powoduje wyraźny wzrost sygnału. Pani mgr Leszczyńska-Nowak uczestniczyła w badaniach, w których wykazano hamujący wpływ wysokich dawek *Bifidobacterium* na proliferację komórek eukariotycznych, a więc była świadoma tego, że wysokie dawki bakterii mają negatywny wpływ na komórki eukariotyczne. W przypadku komórek THP-1, które po zróżnicowaniu słabo proliferują, brak obniżenia sygnału w teście, który mierzy poziom białek zarówno w żywych, jak i martwych komórkach, nie oznacza braku negatywnego wpływu bakterii na komórki THP-1. Ale taki właśnie wniosek (brak wpływu) wyciągnęła Doktorantka z tego doświadczenia i na jego bazie interpretowała kolejny wynik. Wyraźne obniżenie poziomu IL-1 β w pożywce z hodowli THP-1 w obecności 10⁸ bakterii (**Ryc. 15**) interpretuje jako wynik zahamowania aktywności inflamasomu. Przede wszystkim wyciąganie wniosku o poziomie aktywności inflamasomu na podstawie jedynie pomiaru poziomu IL-1 β w medium jest nieuprawnione. Jeśli by doszło do zahamowania syntezy IL-1 β , a nie doszłoby do zahamowania syntezy i składania białek inflamasomu, to inflamasom byłby aktywny, a poziom IL-1 β w pożywce byłby niski. Dla mnie zastanawiające jest również to, że przy krótszym czasie inkubacji dawka bakterii 10⁷ nie ma żadnego wpływu na poziom IL-1 β , natomiast dawka 10⁸ maksymalnie obniża poziom IL-1 β (w stopniu takim jak inhibitor NLRP3).

Wyniki przedstawione na **Rycinie 16** nie wspierają wniosku, że bakterie hamują aktywność inflamasomu. **Tak przedstawione wyniki w ogóle nie pozwalają na ich rzetelną interpretację.**

Zacznę od samego niejasnego przedstawienia wyników:

- (i) Nie rozumiem, dlaczego Autorka zastosowała tutaj wykresy skrzypcowe (*violin charts*). Wykresy tego typu stosuje się przy dużej liczbie wyników i wówczas, gdy chcemy pokazać dystrybucję wielu punktów doświadczalnych. Wykresy na rycinie 16A przedstawiają wyniki uzyskane techniką western blotting. W rozdziale Metody Autorka stwierdza, że przeprowadziła dwa niezależne doświadczenia tą techniką. Na wykresie powinna mieć zatem dwa punkty, ew. średnią z dwóch wartości. Taka liczba wyników nie daje w ogóle możliwości przedstawienia ich na wykresie skrzypcowym.
- (ii) Wykresy na Rys. 16A i 16B to wg opisu osi OY i wg podpisu pod Ryciną wynik **stosunku** wykrytej ilości poszczególnych białek (lub poziomu mRNA) do ilości β -aktyny (lub mRNA β -aktyny). Jakie znaczenie fizyczne ma wartość „zero” przypisana próbce kontrolnej? Jakie fizyczne znaczenie mają wartości ujemne? Przy takich wykresach interpretowanie przedstawionych danych jest niemożliwe.
- (iii) Rozumiem, że zamysłem Autorki było zbadanie czy bakterie i pochodzące z nich białka powierzchniowe hamują aktywację inflamasomu. Obniżony poziom IL-1 β w pożywce (obserwowany w poprzednim doświadczeniu) może (choć nie musi) świadczyć o obniżonej aktywacji inflamasomu. Można to zbadać techniką western blotting analizując stosunek sygnałów prokaspazy-1 do kaspazy-1 oraz stosunek sygnałów pro-IL1 β do IL-1 β . Rycina 16C przedstawia jedynie wycinki blotów bez podania mas cząsteczkowych rozdzielonych w pierwszej ścieżce standardów. Na podstawie tego obrazu nie można wyciągnąć żadnych wniosków, bo widać jedynie po jednym prążku dla każdego białka i nawet nie wiadomo czy prążki odpowiadają dojrzałym białkom czy probiałkom. Wydaje się, że Autorka przeprowadzając analizę western blotting w ogóle nie miała takiego zamysłu, aby analizować stosunek dojrzałych białek do probiałek. Z tego co pisze, wynika, że interesował ją jedynie poziom analizowanych białek w komórkach. Ale bez obrazu całego blotu trudno też orzec czy synteza tych białek jest zahamowana w jakiegokolwiek grupie, gdyż aby to stwierdzić, należałoby dodać sygnały pochodzące od probiałka i dojrzałego białka. Oczywiście jeśli użyte przeciwciała wykrywają tylko fragment odpowiadający domenie pro, to na blocie będzie widoczna tylko forma „pro” i wzrost sygnału będzie świadczył wówczas o zahamowaniu aktywności inflamasomu. Ale czytelnik tego nie wie. Pani mgr Leszczyńska-Nowk nie rozważa również tego, że jeśli w pożywce po zahamowaniu aktywności inflamasomu jest niższe stężenie IL-1 β , to w komórkach należałoby się spodziewać wyższego stężenia tej cytokiny (jej proformy). Jeżeli obniżeniu ulega ekspresja genu IL-1 β , to jej brak w pożywce nie wynika z zahamowania działania inflamasomu, tylko niskiej ekspresji cytokiny.
- (iv) Dla funkcjonowania inflamasomu znaczenie może mieć poziom **białka** kaspazy-1, a nie poziom **mRNA**. A więc jeśli Autorka nie widzi różnic w poziomie białka kaspazy-1, nie powinna wyciągać wniosku, że bakterie hamują aktywność inflamasomu przez wpływ na ekspresję genu kodującego kaspazę-1 (i w Wynikach i w Dyskusji).
- (v) Poziom transkryptu dla kaspazy 1 jest identyczny w próbkach z komórek inkubowanych z bakteriami jak i z komórek inkubowanych z białkami. Dlaczego Autorka uznaje jeden z tych wyników za ważny a drugi za nieważny?

Drobne uwagi do opisu doświadczeń poświęconych aktywności inflamasomu NLRP3:

- (i) Autorka komentuje wynik eksperymentu dotyczącego potencjalnego wpływu białek B.370 na aktywność inflamasomu następująco: „**Niestety**, białka powierzchniowe B.370 nie powodowały obniżenia poziomu produkowanej IL-1 β .” Użycie słowa „niestety” jest nieprofesjonalne. Jednoznaczna odpowiedź na zadane naukowe pytanie, a taką Doktorantka uzyskała, powinno być dla Niej w pełni satysfakcjonujące.
 - (ii) Autorka pisze, odnosząc się do IL-1 β , kaspazy i NLRP3, że: „Białka te zostały wybrane, ponieważ są kluczowymi elementami budującymi inflamasom NLRP3 zapewniającymi mu funkcjonalność”. IL-1 β nie buduje inflamasomu – jest produktem jego działania na pro-IL-1 β .
9. Tytuły rycin powinny być bardziej precyzyjne. Powinny informować o istocie badań, które obrazują. Czyli raczej: *Wpływ bakterii Bifidobacterium adolescentis CCDM 370 i białek B.370 na funkcje układu odpornościowego w modelu alergii wziewnej indukowanej OVA*” zamiast „*Wyniki z mysiego modelu alergii wziewnej indukowanej OVA*”. Każda Rycina powinna mieć odrębny tytuł. W tej pracy Ryciny 10 i 11 oraz Ryciny 12 i 13 mają takie same tytuły. Każda Rycina powinna mieć główny tytuł – tu Rycina 14 ma jedynie podtytuły dla Ryc. 14A i 14B. Również podtytuły powinny być bardziej informatywne (np. Ryc. 10C – należało wspomnieć, że ocenie podlegał stan zapalny w przestrzeniach okołoskrzelowych i okołonaczyniowych).

Drobne uwagi do podpisów pod Rycinami:

Ryc. 6 (i także 16C) – Autorka powinna zaznaczyć masy cząsteczkowe białek w standardzie wielkości białek. Ryc. 8 – Podpis osi OY – powinien być po polsku!

Dyskusja jest napisana w sposób poprawny, choć miejscami Autorka nie uniknęła sformułowań tendencyjnych. Kładzie nacisk na te wyniki pochodzące z innych grup badawczych, które wspierają jej wnioski. Przykładem takiego podejścia jest odniesienie się do funkcji IL-10 w kontekście alergii. Innym przykładem takiego podejścia jest podkreślenie roli IL-12 w indukcji różnicowania limfocytów w kierunku Th1. Autorka pisze „Cytokina IL-12p70 indukuje różnicowanie limfocytów Th1 poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego STAT” ale nie pisze którego. Mamy 6 czynników STAT. Cytowane prace wskazują na STAT4. Ale Doktorantka zdaje sobie sprawę z tego, że STAT4 może być istotny także dla różnicowania limfocytów Th2, bo w innym miejscu cytuje publikację na ten temat.

Informacje na temat roli IL-6 i TNF są bardzo wybiórcze, w nieuprawniony sposób uogólnione i bardzo splotone. Trzy cytowane prace dotyczące roli TNF-u są sprzed 20, 30 i 35 lat!

W niektórych miejscach brakuje pogłębionej dyskusji. Przykładowo: Autorka podsumowując wyniki dotyczące ekspresji genów czynników transkrypcyjnych powtarza informację o tym, że zwiększona ekspresja *Rorc* związana jest z różnicowaniem limfocytów Th17, a ekspresja *Tbx21* jest istotna dla Th1, natomiast nie pisze, jakie to ma znaczenie dla alergii; co na przykład wynika ze wzrostu populacji Th17 dla alergii?

Nie rozumiem sformułowania: *Mechanizm działania probiotykówjestwyjaśniany poprzez ich zdolność dozwiększenia stosunku cytokin takich jak IL-4, IL-10/IFN- γ , czy Treg/TGF- β* – tu należało jasno wskazać na stosunek konkretnych cytokin do konkretnych cytokin, natomiast Doktorantka bezrefleksyjnie przekopiowała fragment ze

streszczenia cytowanej pracy.

Stwierdzenie w Dyskusji „*Istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że podanie bakterii probiotycznych wpływa także na aktywność inflamasyonu, co skutkuje zmniejszeniem stanu zapalnego dróg oddechowych i łagodzeniem objawów choroby alergicznej*” – w świetle badań Autorki i cytowanej przez nią literatury jest nieuprawnione, jest na wyrost.

W Dyskusji, w mojej opinii, brakuje rozważań na temat różnorodności białek powierzchniowych bakterii *Bifidobacterium adolescentis*. Autorka w swojej pracy traktuje badany preparat białkowy jako coś jednorodnego, niepodzielnego – i to jest w porządku. Ale warto było w podsumowaniu pracy zauważyć, że ten preparat, w skład którego wchodzi wiele białek, może zawierać białka o różnych aktywnościach – czasem nawet przeciwnych. Można by się pokusić w kolejnych badaniach o dalsze frakcjonowanie tego preparatu i analizę aktywności pojedynczych białek, a w tej pracy przedyskutować potencjalne aktywności znanych już dziś białek powierzchniowych *Bifidobacterium adolescentis*.

Uwagi dotyczące języka:

W recenzowanej pracy niestety napotkałam liczne błędy stylistyczne, terminologiczne, literowe, interpunkcyjne, które utrudniają czytanie pracy. Podaję garść przykładów:

1. We fragmencie streszczającym uzyskanie peptydoglikanu: „Z bakterii uzyskano ścianę komórkową, którą następnie oczyszczono za pomocą enzymów oraz dializowano”. To nie ścianę komórkową oczyszczono i dializowano tylko peptydoglikan oczyszczono dzięki strawieniu pozostałych składników ściany przez enzymy, a następnie preparat peptydoglikanu dializowano.
2. Przy opisie izolacji RNA czytamy zdanie dotyczące próbek: „*zmierzono im stężenie oraz stosunek A260/230 i A260/280 w spektrofotometrze.*” Prawdłowo byłoby: w spektrofotometrze **zmierzono absorbancję** próbek przy długościach fali światła 230, 260 i 280 nm, co pozwoliło na **oznaczenie stężenia RNA** oraz oszacowanie czystości preparatów.
3. Podpis pod Ryciną 9. „Mysie BM-DC stymulowano PBS (kontrola negatywna) oraz białka powierzchniowe w stężeniu 20 µg/ml”. Nie można powiedzieć, że komórki **stymulowano** PBS-em. W innym miejscu Autorka **stymuluje** komórki inhibitorem inflamasyonu. W języku polskim odmieniamy rzeczowniki i przymiotniki przez przypadki: „białkami powierzchniowymi” albo „preparatem białek powierzchniowych”.
4. W podpisie pod Ryc. 10 czytamy: „*Całkowity i swoisty dla OVA poziom przeciwciał IgA*”. Poziom nie jest swoisty. To przeciwciała mogą być swoiste.
5. „*Ekspresja genów mierzonych w mRNA*” – to zupełnie błędne sformułowanie – dodatkowo Autorka nie mierzy ekspresji genów; mierzy względny poziom mRNA.
6. Inne sformułowanie „*poddano analizie odpowiedź systemową, którą mierzono w surowicy krwi*” – w surowicy nie mierzy się odpowiedzi – mierzy się różne parametry, na podstawie których można wnioskować o odpowiedzi.
7. „*naiwny układ odpornościowy*” to błędne sformułowanie. Prawdłowo: wrodzony układ odpornościowy.

8. Sformułowanie „wywołanie *inflamasomu*”, którego Autorka używa w rozdziale „Wyniki” nie jest właściwe. Można mówić o aktywacji NLRP3, lub jeśli Autorka chce się odwoływać do dwóch składowych tej aktywacji, to może mówić o aktywacji transkrypcji składników NLRP3 i składania inflamasomu.
9. Ze zdania „*Badania dotyczące wpływu bakterii probiotycznych na rozwój alergii wskazują na korzystne działanie bakterii kwasu mlekowego na zmniejszenie infiltracji komórek, łagodząc w ten sposób stany zapalne i uszkodzenia tkanek.*” wynika, że badania łagodzą stany zapalne.
10. Fluorescencji nie wzbudza się falą tylko wzbudza się światłem o danej długości fali.
11. Nie nakłada się na płytkę krzywej standardowej tylko próbki, które posłużą do wykreślenia krzywej standardowej; nie ściąga się supernatantów ze stymulacji tylko pobiera pożywkę (medium) znad stymulowanych komórek; nie wykonuje się metody izolacji tylko po prostu izoluje się.
12. POChP to przewlekła obturacyjna a nie obstrukcyjna choroba płuc.
13. Przeciwciała są sprzęgnięte a nie sprzężone z enzymem czy fluoroforem.
14. Lista skrótów: niektóre skróty są zbędne, np. DNA czy ATP, czy skróty, które pojawiają się w pracy jeden raz. Niektóre skróty są błędnie przetłumaczone na język polski: np. *BRCA1/BRCA2-containing complex subunit 3* to „podjednostka 3 kompleksu zawierającego BRCA1/BRCA2”, a nie „podjednostka złożona zawierająca BRCA1/BRCA2”. Błędnie wyjaśnione są skróty CARD i NF-κB. GINA, to po polsku Światowa Inicjatywa na Rzecz Zwalczania Astmy, a nie „globalna inicjatywa dotycząca astmy”. WT to skrót od *wild type* a nie od *white type*.
15. Jednostka Dalton to jednostka masy cząsteczkowej a nie masy. A więc powinno być *wyizolowano białka o masach **cząsteczkowych** (a nie tylko masach) w zakresie 10 – 190 kDa*.
16. Niektóre używane przez Doktorantkę słowa to żargon laboratoryjny, np. falkony czy probówki eppendorf – lepiej napisać probówki o objętości 15 czy 50 ml oraz mikroprobówki.
17. Używanie sformułowania „*komórki traktowane czymś*” albo „*nietraktowane czymś*” – to anglicyzm, ale chyba walka z tym akurat sformułowaniem jest już przegrana.
18. Istnieją bardzo sztywne zasady zapisu nazw genów i białek, różne dla różnych gatunków. Geny człowieka zapisujemy kursywą, konkretnym akronimem przypisanym temu genowi, a w akronimie wszystkie litery są duże. Geny mysie zapisujemy kursywą, konkretnym akronimem przypisanym temu genowi, a w akronimie pierwsza litera jest duża a pozostałe małe. W taki sam sposób zapisujemy transkrypty. A więc w swojej pracy Doktorantka powinna zapisać geny następująco: *Tbx21*, *Foxp3*, *Rorc* oraz NLRP3, CASP1, IL1B.
19. W języku polskim nazwiska podlegają odmianie – zatem powinna być „metoda Koby” (twórca metody to pan Marcin Koba) a także „skrawki były oceniane przez 2 niezależnych specjalistów: Dágmara Šrutkovą i Tomáša Hudcovica.
20. Skrótownice używane w języku polskim podlegają odmianie. Nie tylko można, ale należy odmieniać HEPES, PBS, TNF itd. stosując odpowiedni zapis czyli z łącznikiem i końcówką

fleksyjną: w PBS-ie, HEPES-em, o TNF-ie. Autorka czasem nie stosuje odmiany skrótowców, czasem stosuje z błędnym zapisem, a czasem stosuje prawidłowy zapis.

21. Przy cytowaniu autorów prac w tekście Autorka używa skrótu „współp.” na określenie współpracowników. Zgodnie z wytycznymi Słownika Języka Polskiego PWN skrót od współpracownik i współpracownicy to „wsp.”
22. Skróty jednostek w literaturze naukowej. Autorka w wielu przypadkach nie stosuje skrótów: np. pisze całe słowa godziny, minuty, sekundy. W niektórych przypadkach stosuje skrót godz. W tekstach naukowych, a takim jest rozprawa doktorska, powinno się stosować przyjęte skróty jednostek miar. Skróta dla jednostek czasu: są litera „h”, min, litera „s”. Pod koniec dysertacji pojawia się skrót „h”.
23. Między liczbą a znakiem % nie powinno być odstępu.
24. W kilku miejscach pojawia się błędna odmiana słowa „eozynofile”, sporadycznie także „nautrofile”. Dopełniacz lm. to eozynofili i neutrofilii (lub równouprawnione eozynofilów i neutrofilów) a nie eozynofilii i neutrofilii (ten błąd kreuje Word; trzeba być czujnym).

Podsumowując:

Przedstawiona do oceny Rozprawa Doktorska pani mgr Katarzyny Leszczyńskiej-Nowak to **monografia naukowa**, w której Doktorantka **zaprezentowała dużą wiedzę teoretyczną** z tematyki związanej z podjętym ważkim problemem naukowym w dyscyplinie nauki biologiczne. W dysertacji przedstawiła również **wyniki własnych badań stanowiące oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**. Praca doktorska **zawiera streszczenie w języku angielskim**.

Zatem, mimo przedstawionych uwag krytycznych:

Stwierdzam, że rozprawa doktorska pani mgr Katarzyny Leszczyńskiej-Nowak spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) oraz wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

