



**UNIwersYTET ŁÓDZKI**  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
KATEDRA IMMUNOLOGII I BIOLOGII INFEKCYJNEJ  
ul. St. Banacha 12/16, 90-237 Łódź  
tel. (0-48-42) 635-44-72, 635-45-25  
faks: (0-48-42) 665-58-18  
e-mail: inmik@biol.uni.lodz.pl

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska,

Uniwersytet Łódźki, Instytut Mikrobiologii Biotechnologii i Immunologii

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, ul. Banacha 12/16

90-237 Łódź, Tel: (42) 6354186, e. mail: magdalena.chmiela@biol.uni.lodz.pl

Prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

Łódź dnia, 22.10.2018 r.

### OCENA

#### **Rozprawy doktorskiej mgr Joanny Gleńskiej-Olender pt . „Określenie swoistości serologicznej przeciwciał ludzkich wiążących się z lipopolisacharydami form S i R szczepu *Proteus mirabilis* O3”**

Możliwość stosowania antybiotyków w leczeniu zakażeń bakteryjnych jest coraz bardziej ograniczona ze względu na stale rosnącą oporność tych drobnoustrojów na leki tej grupy. Stosowanie antybiotyków sprzyja także rozwojowi zakażeń grzybiczych wywoływanych m.in. przez drożdżaki *Candida* spp., jak również oportunistyczne patogeny bakteryjne, do których należą pałeczki *Proteus* spp. Gatunki *P. mirabilis*, *P. penneri*, zastępują w układzie pokarmowym mikroflorę bakteryjną zniszczoną przez antybiotyki ale kolonizują także inne narządy i tkanki m.in. drogi moczowe, układ oddechowy czy kostny. Czynniki zakaźne są jedną z przyczyn reumatoidalnego zapalenia stawów (RA), które jest zapalną chorobą autoimmunologiczną. Podłożem tej choroby jest tzw. mimikra antygenowa, rozumiana jako podobieństwo pomiędzy komponentami drobnoustrojów a komponentami komórek i tkanek gospodarza. Czynniki zakaźne aktywują układ odpornościowy gospodarza, którego mechanizmy efektorowe, zarówno komórkowe, jak i humoralne są przyczyną patologicznej reakcji zapalnej i w konsekwencji uszkodzenia tkanek. W 1995r. Wilson i wsp. wykazali podobieństwo pomiędzy ureazą *P. mirabilis* (sekwencja IRRET) a ludzkim kolagenem (motyw LRREI) oraz pomiędzy hemolizyną tych bakterii (sekwencja ESRRAL) a cząsteczką HLA-DR gospodarza (sekwencja EQRRAA). Autorzy ci powiązali zakażenie *P. mirabilis* i wytwarzaną przez nie ureazę z postępem choroby reumatoidalnej. Na tej podstawie wysunęli hipotezę, że przeciwciała indukowane przez ureazę bakteryjną mają charakter autoprzeciwciał, rozpoznających kolagen. Tworzące się kompleksy immunologiczne, inicjują z udziałem dopełniacza oraz komórek immunopetentnych uszkodzenie stawów. Autorzy ci wykazali również podwyższony poziom przeciwciał rozpoznających peptydy, występujące w ruchomych regionach cząsteczki ureazy nie tylko *P. mirabilis* ale także innych bakterii oraz roślin.

Podstawą diagnostyki reumatoidalnego zapalenia stawów jest badanie serologiczne z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego ELISA lub technik wywodzących się z metody blotingu z wykorzystaniem odpowiednich znaczników, na obecność antycyklicznych cytrulinowych przeciwciał przeciwpeptydowych (anty-CCP), autoprzeciwciał oraz czynnika reumatoidalnego (RF).

Diagnostyka serologiczna nie jest jednoznaczna ponieważ u osób chorujących na RA wytwarzane przeciwciała często są niespecyficzne, mogą rozpoznawać antygeny o całkowicie lub tylko częściowo zgodnej sekwencji. Jedną z możliwości, która jest coraz częściej brana pod uwagę w takich badaniach jest zastosowanie zbiorów peptydów tzw. bibliotek peptydowych, które są syntezowane chemicznie umożliwiają identyfikację konkretnych epitopów w strukturze antygeny czynnika zakaźnego, a także typowanie aminokwasów niezbędnych do indukcji układu odpornościowego gospodarza. W diagnostyce medycznych coraz większe zastosowanie znajdują także metody z wykorzystaniem tzw. biosensorów chemicznych oparte na technice elipsometrii całkowitego wewnętrznego odbicia (TIRE) lub mikroskopii sił atomowych.

Opierając się na powyższych przesłankach Doktorantka włączyła się w swojej pracy doktorskiej w nurt badań mających na celu oznaczenie w surowicach pacjentów z RA i osób zdrowych przeciwciał przeciwko antygenom pałeczek z rodzaju *Proteus* rozpoznających antygeny lipopolisacharydów tych bakterii oraz przeciwciał przeciwureazowych, z wykorzystaniem testu immunoenzymatycznego ELISA oraz fluorescencyjnej techniki blotingu. Założyła, że bakteryjne antygeny białkowe a także cukrowe mogą indukować przeciwciała inicjujące w organizmie gospodarza patologiczną reakcję zapalną. Wskutek wiązania się z jego komponentami. Wykorzystała lipo polisacharyd *P. mirabilis* w formie gładkich oraz mutantów typu Ra lub Re w celu określenia fragmentów LPS odpowiedzialnych za wiązanie przeciwciał, a do potwierdzenia swoistości reakcji syntetyczne antygeny odzwierciedlające fragment części O-swoistej LPS *P. mirabilis* O3. W ocenie przeciwciał przeciwureazowych Autorka wykorzystwała syntetyczne peptydy zdeponowane na nośniku celulozowym, a w ocenie kompleksów immunologicznych zawierających antygeny cukrowe zastosowała technikę elipsometrii oraz mikroskopii sił atomowych.

Biorąc pod uwagę znaczenie pałeczek *Proteus* spp. jako potencjalnego czynnika etiologicznego RA , a także innych bakterii, uważam cel pracy za uzasadniony. Niezwykle aktualne są podjęte przez Autorkę badania zmierzające do potwierdzenia roli przeciwciał przeciwbakteryjnych w interakcji z antygenami gospodarza o sekwencjach wspólnych z LPS lub ureazą, w inicjowaniu patologicznej reakcji zapalnej w RA, z wykorzystaniem klasycznej metody ELISA, zmodyfikowanej metody blotingu oraz nowoczesnych metod elipsometrii i mikroskopii sił atomowych.

Praca została przygotowana w formie monografii według schematu typowego dla prac doświadczalnych. Wytłumaczenie koncepcji badań zostało poprzedzone rozbudowanym wstępem teoretycznym, w którym Autorka przedstawiła charakterystykę bakterii z rodzaju *Proteus* i ich czynników chorobotwórczości, udział czynników zakaźnych, w tym wchodzących skład mikrobiomu w rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów, koncepcję mimikry antygenowej jako przyczyny indukowania przez czynniki zakaźne przeciwciał, potencjalnie autoreaktywnych. Wstęp zawiera także obszerną charakterystykę lipopolisacharydu bakterii Gram-ujemnych, w tym pałeczek *Proteus* spp, z uwzględnieniem właściwości biologicznych i przebieg aktywacji dopełniacza. **Opisując właściwości biologiczne LPS Autorka przypisała je wyłącznie lipidowi A. Jest to podejście już raczej historyczne. Obecnie wiadomo, że aktywność biologiczna LPS zależy także od reszt cukrowych występujących w części O-swoistej LPS. W tym miejscu prosilibym Autorkę o przedstawienie przykładów drobnoustrojów, które w swoich oddziaływaniach z receptorami komórek gospodarza takie determinanty wykorzystują.**

We Wstępie na str. 20 Autorka zawarła następujący akapit dotyczący związku pomiędzy zakażeniem *Proteus* spp, ureazą bakteryjną lub roślinną a rozwojem reumatoidalnego zapalenia stawów: „Co zaskakujące (Wilson i wsp.) zauważyli podwyższony poziom IgG przeciwko peptydom odzwierciedlającym sekwencję ruchomych regionów ureazy z innych organizmów (bakterii i roślin). Wykryte przeciwciała rozpoznawały nie tylko jeden określony antygen, ale także antygeny o podobnej sekwencji, co prawdopodobnie wynikało z niestabilności układu odpornościowego”. Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie, co oznacza w tym kontekście niestabilność układu odpornościowego? Jakie jest zdanie Autorki na temat zdolności komponentów układu odpornościowego do reakcji krzyżowych?

We Wstępie opisane zostały także techniki elipsometrii całkowitego wewnętrznego odbicia oraz mikroskopii sił atomowych. Zamysł opisu obu technik wraz z podaniem rodzaju oznaczanych z ich użyciem parametrów uważam za bardzo dobry, biorąc pod uwagę to, iż są to narzędzia dopiero wprowadzane do diagnostyki medycznej.

W rozdziale 2 Autorka przedstawiła hipotezę badawczą. Założyła, że pałeczki *Proteus* spp. jako patogeny oportunistyczne wytwarzające ureazę oraz LPS, które wykazują podobieństwo strukturalne do pewnych komponentów gospodarza mogą inicjować wytwarzanie przeciwciał potencjalnie autoreaktywnych i za ich pośrednictwem przyczyniać się do rozwoju patologicznej reakcji zapalnej w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. W mojej opinii zawarte w tekście pracy sformułowanie hipotezy badawczej w następującym brzmieniu: **„Jako hipotezę badawczą założono, że jednym z elementów przeciwciał związanych z obecnością bakterii oportunistycznych są przeciwciała przeciwko bakteriom z rodzaju *Proteus*”**, jest mało precyzyjne

Rozdział Materiał i metody został opracowany poprawnie. Wszystkie stosowane w pracy procedury zostały opisane wystarczająco szczegółowo. Drobne uwagi dotyczące tego rozdziału są następujące. **PBS jest buforowanym fosforanami fizjologicznym roztworem chlorku sodu a nie buforem fosforanowym. Zwykle podaje się też molarność roztworu. W opisie izolowania przeciwciał klasy IgG z surowicy pacjentów brak jest danych dotyczących stężenia białka i sposobu przeliczenia zawartości IgG oczyszczonych używanych dalej w testach, w stosunku do stosowanych rozcieńczeń pełnej surowicy.** Na podkreślenie zasługuje umiejętność posługiwania się przez Doktorantkę zróżnicowanymi technikami, w tym klasycznym testem immunoenzymatycznym ELISA, metodą „dot blotingu” z zastosowaniem znacznika fluorescencyjnego, elipsometrii całkowitego wewnętrznego odbicia z wykorzystaniem nośnika opłaszczanego złotem do oceny grubości warstwy tworzonej przez badane preparaty LPS *P. mirabilis*, a także techniką mikroskopii sił atomowych, którą wykorzystano do badania kompleksów immunologicznych. W zakresie wykorzystania powyższych metod na podkreślenie zasługuje nawiązanie współpracy odpowiednio z Zakładem Fizyki Molekularnej, Instytutu Fizyki Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach oraz Laboratorium Bionanostruktur, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego.

Wyniki badań zostały opisane w rozdziale 4, w kilku podrozdziałach z wykorzystaniem rycin i dokumentacji tabelarycznej.

W badaniach wstępnych Autorka zastosowała test ELISA do potwierdzenia aktywności preparatów LPS *P. mirabilis* jako antygenów. W tym celu użyła króliczą surowicę odpornościową otrzymaną przez immunizację królików zawiesiną bakterii *P. mirabilis* szczepu O3. **Proszę o wyjaśnienie czy**

**korzystano z surowicy pojedynczego osobnika, czy mieszaniny surowic kilku osobników.** Preparaty LPS *P. mirabilis* S1959, R110/S1959 oraz R45/S1959 były rozpoznawane przez przeciwciała zawarte w surowicy zwierząt immunizowanych *P. mirabilis* O3 S1959. Przedstawione na Wykresach 1, 2 i 3 krzywe testu ELISA nie budzą zastrzeżeń. Uzyskane wyniki świadczą o występowaniu w surowicy anty-O3 (S1959) przeciwciał rozpoznających część O-swoistą, oligosacharyd rdzeniowy oraz komponentę lipidową LPS S1959. Potwierdzono również zdolność wiązania przez przeciwciała zawarte w surowicy króliczej unikalnej determinanty antygenowej antygeny O LPS (O3), którą tworzy lizyna w połączeniu z kwasem galakturonowym (Lys-GalA). Uzyskane wstępne wyniki badań były przesłanką do wykorzystania tychże antygenów w dalszych badaniach z zastosowaniem surowic zdrowych dawców oraz pacjentów chorujących na reumatoidalne zapalenie stawów.

W dalszej części opisu wyników przedstawione zostały dane dotyczące oceny przeciwciał anty-LPS *P. mirabilis* O3 w surowicach osób zdrowych i pacjentów z RA. W Tabelach od 2 do 9 zestawiono wartości absorbancji dla pełnej reakcji w teście ELISA z natywnym LPS S1959 oraz LPS mutantów (LPS R110/S1959 i LPS R45/S1959) lub ligandem Lys-GalA i niespecyficzne wartości absorbancji. Następnie na wykresach i rycinach w oparciu o wyniki absorbancji, po odjęciu wartości dla reakcji nieswoistej, dla każdej badanej surowicy osób zdrowych lub z RA, sporządzono krzywe przebiegu testu ELISA. We wszystkich surowicach osób zdrowych wykryto przeciwciała przeciwko natywnej formie LPS S1959 oraz LPS R110/S1959 i tylko w jednej surowicy nie wykryto przeciwciał anty-LPS R45/S1959. Autorka sugeruje, że uzyskane wyniki mogą wskazywać na częsty kontakt ludzi z antygenami *P. mirabilis*. Również w większości surowic pacjentów z RA wykryte zostały przeciwciała przeciwko natywnej formie LPS S1959 oraz przeciwciała anty-lipidowe, a także anty-oligosacharydowe wiążące odpowiednio LPS R45 lub R110. Ponadto wykryte zostały przeciwciała przeciwko syntetycznemu ligandowi Lys-GalA Wyniki testu ELISA dla wybranych pełnych surowic pacjentów z RA odnoszone były do wyników uzyskanych z oczyszczoną frakcją IgG.

Choć uzyskane przez Autorkę wyniki są interesujące to sposób ich opracowania powinien być bardziej precyzyjny. W testach ELISA wymagane jest wykonanie następujących kontroli tzw. technicznych:

- reakcja samego antygeny w środowisku mieszaniny chromogen-substrat na nośniku wolnym lub zablokowanym BSA
- reakcja surowicy badanej na nośniku opłaszczonym antygenem, w środowisku mieszaniny chromogen-substrat
- reakcja przeciwciał znakowanych na nośniku opłaszczonym antygenem, w środowisku mieszaniny chromogen-substrat

Wartości absorbancji uzyskane w tych wariantach pozwalają na określenie skuteczności blokowania i wyznaczenie tzw. reakcji nieswoistej w teście ELISA dla znakowanych przeciwciał oraz ustalenie wstępnego rozcieńczenia surowic badanych. Odpowiednio dobrane powinno być również stężenie antygenów. Autorka stosowała preparaty LPS w stężeniu 0,5 mg/ml. Być może zmniejszenie koncentracji antygeny spowodowałoby obniżenie reakcji nieswoistej. W przeprowadzonych eksperymentach często reakcja w teście ELISA była słabsza dla surowicy rozcieńczonej 1:200 niż w dalszych rozcieńczeniach, co również wskazuje na konieczność dalszej standaryzacji Test ELISA powinien być wystandaryzowany zarówno pod względem stężenia używanych antygenów, jak i

rozcieńczeń surowic, tak aby wprost proporcjonalny przebieg krzywej testu ELISA mieścił się w zakresie wartości absorbancji 0,2-2,0.

Należy również zaznaczyć, iż dane uzyskane dla surowic osób zdrowych powinny stanowić punkt odniesienia dla surowic osób z RA. Wartości absorbancji dla surowic osób zdrowych należy wykorzystać do wyznaczenia tzw. wartości odcięcia, która oznacza bazową dla danej populacji zawartość surowicznych przeciwciał o określonej swoistości. Miarą wartości odcięcia jest średnia wartość absorbancji dla optymalnego rozcieńczenia grupy surowic osób zdrowych powiększona o dwukrotną wartość odchylenia standardowego.

Aby zobrazować wyniki dla poszczególnych surowic badanych można wykonać również wykresy punktowe, co pozwala śledzić rozrzut tych wartości, a także wykresy słupkowe obrazujące wartości średnie. W tym ostatnim przypadku muszą być zamieszczone wartości odchylenia standardowego, czego na prezentowanych wykresach zabrakło. Można również prowadzić analizę porównawczą w oparciu o wartości absorbancji dla optymalnego rozcieńczenia surowic. Analiza taka może mieć charakter ilościowy zgodnie z zasadą, im wyższa wartość absorbancji tym większa zawartość przeciwciał. Proponuję przeprowadzenie takich analiz przed przygotowaniem manuskryptu w celach publikacyjnych. Brak syntetycznego opracowania wyjściowych wyników testów ELISA znacznie ogranicza możliwości ich interpretacji pomimo dużej wartości poznawczej. Aby można było wnioskować o przydatności wykonanych badań serologicznych w diagnostyce RA uzyskane wartości dla grupy z RA powinny być istotnie różne od wyników dla grupy kontrolnej. Dlatego tak szczegółowa analiza wyników badań jest konieczna.

**W opisie dotyczącym wyników uzyskanych dla oczyszczonych IgG ponownie nasuwa się pytanie w jaki sposób odnoszono je do rozcieńczenia pełnych surowic. Proszę o uszczegółowienie tej kwestii.**

**Proszę też Doktorantkę o odpowiedź czy z badanych surowic usuwany był czynnik reumatoidalny. Jego obecność może istotnie wpływać na interpretację wyników.**

W 2 surowicach, w tym 1 pochodzącej od osoby zdrowej i 1 od pacjenta z RA Autorka oceniła również występowanie przeciwciał wiążących się z peptydami stanowiącymi fragment ruchomy ureazy pałeczek *H. pylori*. Użyła 19 aminokwasowych sekwencji opłaszczonych na nośniku celulozowym. W teście immunofluorescencji oznaczała przeciwciała przeciwko pełnej oryginalnej sekwencji fragmentu ruchomego ureazy *H. pylori*, a następnie po podstawieniu kwasu asparaginowego na tyrozynie, cysteinie lub argininie w pozycji 5 lub na leucynie lub fenyloalaninie w pozycji 16. W opisie wyników na str. 84 czytamy: „Analiza biblioteki peptydów z 19-merowymi peptydami różniącymi się położeniem poszczególnych aminokwasów w sekwencji wykazała, że pacjenci z RA reagują z syntetycznymi antygenami w inny sposób w porównaniu z kontrolą –surowica krwi dawcy”. Ten opis jest zbyt ogólny. Proszę Doktorantkę o jego uściślenie. Brakuje też cytowania Tabeli 12. W Tabeli tej Autorka nie zamieszcza wyników dla reakcji tła, reakcji dla samych surowic i reakcji przeciwciał znakowanych.

**Uwaga, która nasuwa się po analizie wyników badań serologicznych dotyczy postępowania przez Autorkę uogólnieniem wskazującym na badanie wielu surowic pacjentów z RA, podczas gdy w większości testów analizowano wyniki uzyskane dla dwóch surowic oznaczonych nr 5 i 8. Wyniki takie należy uznać za wstępne.**

Autorka wykazała zdolność wyżej wymienionych surowic do reakcji z ludzkim kolagenem typu I, który zawiera w swojej strukturze lizynę, będącą również częścią syntetycznego epitopu Lys-GalA występującego w naturze, w łańcuchu O-swoistym LPS *P. mirabilis* S1959 (O3). **W opisie tej części wyników brak jest cytowania Wykresu 19 . Wartości absorbancji przytaczane w tekście na str. 85 nie są zgodne z wartościami absorbancji podanymi na wykresie 19.**

Autorka użyła w dalszych badaniach surowice pacjentów z RA, o numerach 5 i 8, po adsorpcji na płytkach opłaszczonych kolagenem, które następnie zastosowała w teście ELISA do oceny przeciwciał wiążących natywny LPS *P. mirabilis* S1959 oraz syntetyczny epitop Lys-GalA. Przedstawiła wyniki na wykresach 20 i 21 choć w tekście nie wymienia ich numeracji. Wykazała, że w badanych surowicach są przeciwciała wiążące zarówno kolagen, jak i LPS oraz syntetyczny epitop. Moim zdaniem należy w tej analizie połączyć wyniki dla surowic przed adsorpcją z wynikami po adsorpcji. Dalej Autorka analizuje wyniki uzyskane w teście ELISA dla frakcji IgG dwóch wyżej wymienionych surowic po adsorpcji do kolagenu, prezentowane w Tabeli 13. W opisie wyników na str. 87 czytamy: „... w reakcji enzymatycznej z antygenem LPS *P. mirabilis* S1959 oraz Lys-GalA-PAA oraz wyników testu adsorpcji, można zaobserwować pewną zależność”. Proszę Doktorantkę o uściślenie jaka to jest zależność ?

W dalszej części opisu wyników Autorka analizuje dane pochodzące z badań z wykorzystaniem metod fizyko-chemicznych, w których oceniała grubość warstwy molekularnej tworzonej na nośniku opłaszczonym złotem przez różne preparaty LPS *P. mirabilis* metodą elipsometrii. Zobrazowała także powierzchnię utworzonych agregatów metodą mikroskopii sił atomowych. W badaniach tych wykazała zdolność wszystkich badanych preparatów do wiązania się z nośnikiem. Pewne różnice w pomiarach dla poszczególnych preparatów Autorka tłumaczy różnicami w ich strukturze.

Posługując się powyższymi metodami fizyko-chemicznymi Autorka wykazała interakcję natywnego LPS *P. mirabilis* S1959 oraz epitopu syntetycznego Lys-GalA z przeciwciałami IgG anty-LPS O3 wzorcowej surowicy króliczej.

Rozdział 5 Dyskusja został opracowany w sposób nietypowy dla prac doświadczalnych, a mianowicie podzielony na podrozdziały wzorem opisu wyników. W Dyskusji zamieszczone zostały kolejne tabele i wykresy prezentujące wyniki. Moim zdaniem taki zabieg zaburza omawianie wyników własnych na tle wyników innych autorów. W tym rozdziale powinna się znaleźć zwięzła próba interpretacji uzyskanych wyników, ocena słabych punktów pracy, propozycja dalszych badań. Merytorycznie Dyskusja została poprowadzona poprawnie, ale jej forma powinna być bardziej spójna.

Piśmiennictwo. Autorka zacytowała w pracy 144 pozycje piśmiennictwa zarówno prace o znaczeniu historycznym, jak i najnowsze publikacje zamieszczone w czasopismach z listy JCR. Prace zostały dobrze wyselekcjonowane pod względem merytorycznym.

Strona edytorska. Pod względem edytorskim praca zawiera pewne niedociągnięcia językowe i stylistyczne, a także wspomniane braki w cytowaniu tabel i rycin. Uwagi te zostały przekazane Autorce z sugestią wprowadzenia poprawek przy przygotowaniu pracy do druku.

Podsumowanie. Do najważniejszych osiągnięć przedstawionej do oceny pracy należy zaliczyć:

- wykazanie w surowicach osób zdrowych oraz pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów przeciwciał rozpoznających LPS *P. mirabilis* S1959 w formie gładkiej, a także LPS pozyskanych z mutantów Ra oraz Re *P. mirabilis* O3,
- wykazanie w surowicach pacjentów z RA przeciwciał reagujących z kolagenem typu I, a także przeciwciał wiążących epitopy ureazy bakteryjnej oraz wykazanie, że pozycja aminokwasu w strukturze determinanty antygenowej jest istotna dla wiązania przeciwciał,
- wykazanie przydatności metody elipsometrii oraz mikroskopii sił atomowych do oceny tworzenia nanowarstwy przez LPS *P. mirabilis* na nośniku opłaszczonym złotem, co potencjalnie może być przydatne do oceny oddziaływania z komórkami gospodarza,
- wykazanie przydatności metody elipsometrii i mikroskopii sił atomowych do oceny tworzenia kompleksów immunologicznych ,

Wiosek sugerujący możliwość indukowania przez *P. mirabilis* przeciwciał potencjalnie reagujących z komponentami tkanki stawów gospodarza należy uznać za wstępny. W moim przekonaniu dalsze badania są konieczne na znacznie większej liczbie prób dla uzyskania wyników umożliwiających analizę statystyczną. Dalszej standaryzacji wymagają stosowane testy immunoenzymatyczne i fluorescencyjny test „ blokingu”. Należy również zoptymalizować sposób prezentacji wyników uzyskiwanych tymi metodami.

Podsumowując, wyniki zaprezentowane w pracy są źródłem wielu cennych informacji dotyczących możliwości wykorzystania zarówno technik serologicznych, jak i fizykochemicznych do identyfikacji w surowicach pacjentów z RA przeciwciał indukowanych przez pałeczki *P. mirabilis*, a także bakteryjne peptydy urazowe, które potencjalnie mogą przyczyniać się do rozwoju w organizmie gospodarza patologicznej reakcji zapalnej o charakterze autoimmunizacyjnym. Choć w chwili obecnej wyniki badań mają wartość badań podstawowych i jednocześnie wstępnych to należy dostrzec ich potencjał aplikacyjny, w kontekście poszukiwania nowych metod diagnostyki RA . W tym kontekście praca ma charakter nowatorski. Uzyskane wyniki są wartościowe. Badania powinny być kontynuowane w celach statystycznych, a ich wyniki optymalizowane cele wysunięcia bardziej ogólnych wniosków dotyczących różnicy pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie przez Doktorantkę różnych technik badawczych, w tym klasycznego testu ELISA, metody immunofluorescencyjnej, a ponadto techniki elipsometrii i mikroskopii sił atomowych, których wartość diagnostyczna jest dopiero ustalana. Wysiłek podjęty przez Doktorantkę i jego efekt w postaci przedłożonej mi do oceny monografii, a także dotychczasowy dorobek publikacyjny Doktorantki upoważniają mnie do przedłożenia Radzie Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach wniosku o dopuszczenie Pani mgr Joanny Gleńskiej-Olender do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z wyrazami szacunku,

Magdalena Mikołajczyk-Chmiela

KIEROWNIK  
Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej UŁ  
*M. Mikołajczyk-Chmiela*  
prof. dr hab. Magdalena Mikołajczyk-Chmiela