

Prof. dr hab. Adam Choma
Zakładu Genetyki i Mikrobiologii
ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Lublin, dn. 29.10.2018 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Gleńskiej-Olender

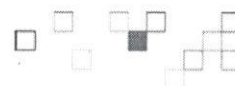
„Określenie swoistości serologicznej przeciwciał ludzkich wiążących się z lipopolisacharydami form S i R szczepu *Proteus mirabilis* O3”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Kacy w Zakładzie Mikrobiologii, Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach

Gram-ujemne bakterie z rodzaju *Proteus* są wszechobecne w środowisku naturalnym. Bakterie te są składnikiem fizjologicznego mikrobiomu jelitowego człowieka i zwierząt. W przypadku osłabienia organizmu gospodarza mogą stać się przyczyną jego infekcji. Szczególnie często izoluje się pałeczki *Proteus* z ran, szczególnie ran pooperacyjnych i odleżynowych oraz z zainfekowanych dróg moczowych. Zakażeniom układu moczowego sprzyjają interwencje chirurgiczne i długotrwałe cewnikowanie pacjentów. Szereg doniesień wskazuje na znaczenie infekcji bakteriami z rodzaju *Proteus* w powstaniu i rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów. W oparciu o reakcje serologiczne Kaufmann i Perch opracowali klasyfikację szczepów *Proteus* wyróżniając 49 serogrup. Obecnie liczba serogrup sięga osiemdziesięciu. Spośród tej liczby jedynie kilkanaście to serotypy zwykle izolowane od pacjentów. Wśród nich jest szczep 1959 *Proteus mirabilis* serotyp O3, którego lipopolisacharyd był obiektem badań prowadzonych w ramach przygotowywania rozprawy doktorskiej przez Panią mgr Joannę Gleńską-Olender. Praca doktorska mgr J. Gleńskiej-Olender zatytułowana „Określenie swoistości serologicznej przeciwciał ludzkich wiążących się z lipopolisacharydami form S i R szczepu *Proteus mirabilis* O3” w całej rozciągłości wpisuje się w tematykę badań prowadzonych w Zakładzie Mikrobiologii (UJK), którym kieruje profesor Wiesław Kaca. Badania te między innymi dotyczą udziału bakterii w powstawaniu i rozwoju chorób reumatycznych oraz znaczenia mimikry molekularnej w tym procesie. W swoich badaniach pracownicy Zakładu Mikrobiologii z powodzeniem stosują różnorodne, technologicznie zaawansowane metody analiz fizykochemicznych.

Uwagi o charakterze formalnym

Przedstawiona do oceny praca doktorska jest napisana w języku polskim, ma układ typowy dla prac eksperymentalnych i liczy 135 stron. W tekst zostały włączone tabele (w liczbie 15) oraz wykresy



(jest ich wg numeracji 25). Rozprawa została przygotowana starannie pod względem edytorskim. Autorka umiejętnie posłużyła się kolorem aby uwypuklić ważne dane w tabelach, sprawić by wykresy były bardziej przejrzyste, a rysunki bardziej czytelne. Podkreślając zalety strony graficznej rozprawy, przy bliższej lekturze nie sposób jednak nie zauważyć licznych uchybień. Wiele tabel, niezależnie od ich wielkości, Doktorantka dzieli między strony. Taki stan rzeczy utrudnia analizę danych. To samo zastrzeżenie dotyczy wykresów wraz z ich podpisami. Dodatkowo, część rycin zawierająca wyniki, zarówno w formie numerycznej (tabele) jak i w formie graficznej (wykresy), jest opisana błędnie jako wykresy (np. Wykres 7). Proponowałbym użycie wyłącznie bardzo ogólnego określenia „rycina”. Można go stosować zarówno do opisu wykresów jak i fotografii czy też rysunków. W rozprawie zauważyłem błędy w numeracji rycin. I tak, rycina (a właściwie ryciny) nr 17 są na stronie 68 i na stronie 88, ryciny o numerze 18 – zamieszczono na stronach 77 i 89, zaś kolejne dwie ryciny oznaczone numerem 19 spotykamy na stronach 80 i 90. Błędna numeracja dotyczy także dwóch tabel, gdzie numer 10 ma tabela na stronie 72 i tabela na stronie 76. Niezbyt szczęśliwym rozwiązaniem wydaje się umieszczenie w tekście wszystkich tabel z wynikami oznaczeń kolorymetrycznych testów immunoenzymatycznych. Takie postępowanie powiększa objętościowo pracę doktorską i utrudnia jej czytanie gdyż tekst jest pofragmentowany. Równoległe wiele z tych wyników powtórzono w formie wykresów. Rozwiązanie tego problemu widziałbym w umieszczeniu tych tabel w załączniku kończącym doktorat, a pozostawieniu w rozdziale „Wyniki” jedynie wykresów, które wydają się bardziej informatywne niż tabelaryczne zestawienia liczb. Szczególnie jest to widoczne w przypadku rycin, w których obok siebie zestawiono tabelę i obrazujący ją wykres (np. wykres 9(AiB), str. 65). Użycie terminu „dane liczbowe – wyniki w formie oryginalnej” do opisu danych wyjściowych/pierwotnych z pomiarów kolorymetrycznych nie jest właściwe, ponieważ wszystkie uzyskane przez Doktorantkę wyniki są wynikami oryginalnymi, a część z nich jest jedynie skorygowana (np. o wartość tła). Kolejna moja uwaga dotyczy zastosowanego przez Doktorantkę sposobu cytowania artykułów opierającego się na podaniu tylko nazwiska pierwszego autora i roku publikacji. Jest to bardzo nietypowy i nader rzadko stosowany system. Pozwala on na cytowania w zwięzłej formie, ale nie odróżnia on publikacji jedno- od wieloautorskich, a w wyjątkowych przypadkach jest niejednoznaczny. Pani mgr Joanna Gleńska-Olender stosuje go z prawie 100% konsekwencją (na stronie 23 znalazłem jeden wyjątek od tej reguły). Spis cytowanych pozycji literaturowych („Piśmiennictwo”) jest w zasadzie zredagowany jednolicie, jednak mimo to znalazłem co najmniej 8 (na 144 pozycji) odstępstw od przyjętej reguły w sposobie cytowania. Cytowane artykuły są to na ogół publikacje bieżące. Cytowania są dobrane starannie i poprawnie.

Merytoryczna ocena rozprawy

Tytuł pracy „Określenie swoistości serologicznej przeciwciał ludzkich wiążących się z lipopolisacharydami form S i R szczepu *Proteus mirabilis* O3” odzwierciedla jedynie część zagadnień poruszanych w dysertacji. Omówienie badań ściśle określonych tytułem pracy zajmuje rozdział nr. I „Badania immunoenzymatyczne” (z wyłączeniem rozdziału 4.7). Druga część doktoratu dotyczy charakterystyki fizyko-chemicznej LPS (S), LPS (Ra) i LPS (Re) z *P. mirabilis* O3, a także kompleksu LPSO3 (S) z IgG(anty-LPSO3) oraz kompleksu Lys-GalA-PAA z surowicą króliczą anty-LPSO3 osadzonych na powierzchni pokrytej warstewką złota. Badania te prowadzono przy użyciu elipsometru spektroskopowego i mikroskopu sił atomowych. Powyższe zadanie badawcze obejmowało także badanie warstwy osadzonych na podłożu stałym (mika) przeciwciał (frakcja IgG z surowicy króliczej anty-LPSO3) za pomocą mikroskopii sił atomowych przy zastosowaniu sondy ze związanymi cząsteczkami LPSO3. Zdaniem recenzenta druga część doktoratu mimo dużych walorów poznawczych jedynie w nieznacznym stopniu jest związana z tematem pracy zawartym w jej tytule. Zadanie to także nie jest precyzyjnie ujęte w rozdziale „Hipoteza i cele badawcze pracy”, gdzie Doktorantka stwierdza, że celem szczegółowym jest „Tworzenie kompleksów immunologicznych antygen-przeciwciała z antygenami cukrowymi z wykorzystaniem techniki elipsometrii oraz mikroskopii sił atomowych”. Całość opisanych i diskutowanych wyników powinna być objęta innym – zmodyfikowanym tytułem. Uważam, że wystarczyłoby nieco skorygować tytuł rozprawy, dodając np. frazę: „oraz charakterystyka fizyko-chemiczna wybranych antygenów, przeciwciał i ich kompleksów”, aby uchronić się przed zarzutem braku zgodności między tytułem pracy, a jej zawartością.

Rozprawę poprzedza trzystronicowy spis naukowych osiągnięć Doktorantki, znakomicie ułatwiający zapoznanie się z aktywnością naukową Kandydatki. Zaprezentowany dorobek jest bogaty i liczy osiem artykułów opublikowanych oraz jeden wysłany do czasopisma *Methods in Molecular Biology*. Pani mgr Joanna Gleńska-Olender zamieściła w tym wykazie 24 tytuły doniesień zjazdowych i sympozyjnych. Jednak jedynie szesnaście z tych doniesień jest firmowane nazwiskiem Doktorantki. Pozostałe osiem pozycji to prace innych autorów, wśród których wyróżnione (przez podkreślenie) jest nazwisko Wawszczyk. Czyż zatem jest to wykaz publikacji? Ta kwestia wymaga wyjaśnienia. Pomijając tę niejasność, zamieszczony spis osiągnięć jednoznacznie dowodzi, że Pani mgr Joanna Gleńska-Olender spełnia z nadwyżką wymogi ustawowo stawiane doktorantom.

Kolejno w rozprawie pojawia się „Wykaz skrótów”. Zwyczajowo jest to stały element tego typu opracowań. Uważam, że ma on sens wtedy, gdy autor często stosuje dany skrót nie wyjaśniając go za każdym razem w tekście. W przedłożonej pracy Autorka wielokrotnie używa równocześnie i skrót i pełną nazwę, a czasem dopełnia ją przytaczając jej brzmienie angielskie. Sam wykaz zawiera

skrót, których jedynym rozwinięciem jest pełna nazwa w języku angielskim. Są tam także błędy, jak np. skrót PEG tłumaczony jako „Elastyczny łącznik polietylenu glikolu (ang. Polyethylene Glycol)” zamiast powszechnie używanego i poprawnego określenia „glikol polietylenowy”.

W tematykę rozprawy wprowadza 30 stronicowy „Wstęp”, w którym można wyróżnić cztery bloki tematyczne. Pierwszy z nich wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z reumatoidalnym zapaleniem stawów oraz znaczeniem czynników środowiskowych w powstawaniu i rozwoju tej choroby. Wśród czynników pozagenetycznych mikrobiom jelita zajmuje poczesne miejsce. Doktorantka skupia swoją uwagę na bakteriach z rodzaju *Proteus*, które, będąc naturalnym składnikiem mikroflory układu pokarmowego człowieka, mogą w niesprzyjających warunkach stać się przyczyną szeregu infekcji. Szczególnie często bakterie *Proteus* kolonizują drogi moczowe. Postuluje się, że działanie ludzkiego układu immunologicznego skierowane przeciw obecności tych bakterii (a także niektórych innych) poza układem pokarmowym człowieka przyczynia się do rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów. Nic więc dziwnego, że Pani mgr Joanna Gleńska-Olender koncentruje się na opisie wybranych czynników wirulencji tych bakterii. Są nimi: lipopolisacharyd, wspólny enterobakteryjny antygen oraz ureaza. Doktorantka dużo miejsca poświęca ureazie oraz opisowi segmentowej struktury lipopolisacharydu izolowanego ze szczepu *P. mirabilis* O3 gdyż wiąże się on ściśle z tematyką Jej doktoratu. Wprowadzenie czytelnika doktoratu w arkana mikroskopii sił atomowych i elipsometrii całkowitego wewnętrznego odbicia wypełnia ostatni rozdział „Wstępu”. Podsumowując, ta część rozprawy jest dobrze napisana, a jej objętość pozostaje w dobrej proporcji z objętością pozostałych rozdziałów. Oprócz kilku niezręczności językowych (których tutaj nie będę przytaczał) i oczywistych pomyłek (jak np. hemoglobina *P. mirabilis*, str. 16) najbardziej rzucają się w oczy błędy, które zawiera Rycina nr. 4. Na tym schemacie przedstawiono między innymi nieregularny kształt obwiedziony linią łamaną podpisując go „powtarzająca się podjednostka”. Konsekwencją tego postępowania powinno być narysowanie co najmniej kilku takich elementów w strukturach obrazujących ECA_{LPS} , ECA_{CYC} i ECA_{PG} . Tego nie zrobiono, więc z Ryciny 4 można błędnie odczytać, że przedstawione polimery zawierają po jednej powtarzającej się podjednostce. Kolejna pomyłka to przypisanie elipsie zabarwionej wewnątrz kolorem niebieskim nazwy „L-fosfatydyloglicerol” podczas gdy powinno być „L-fosfoglicerol”. Równocześnie kwasy tłuszczowe wchodzące w skład ECA_{PG} nigdy w zaprezentowany sposób nie połączą się. Kumulacji błędów dopełnia fakt, że artykuł (Duda i wsp. 2009) za którym Doktorantka cytuje schemat (Ryc. 4) nie zawiera go. Jest on opublikowany z podobnymi błędami w artykule napisanym przez K. Kasperkiewicz i wsp. i opublikowanym na łamach Postępów Mikrobiologii w 2015 roku. Doktorantka nie zwróciła uwagi, że przygotowana przez Nią rycina 7 przedstawia wzór oligosacharydu, w którym elementy wzoru są poprzesuwane względem siebie i trudno z niego

odczytać poprawną „strukturę rdzenia lipopolisacharydu *Proteus mirabilis* R110/S1959”. Równocześnie opis powtarzającej się podjednostki *P. mirabilis* O3 zamieszczony u dołu strony 29 (cztery ostatnie wersy) rozmija się ze strukturą przedstawioną na rycinie nr 8.

W moim przekonaniu, w opisie elipsometrii, metody używanej przez Doktorantkę prawie wyłącznie do określania grubości mikrowarstw antygenów, przeciwciał czy też ich kompleksów na podłożu stałym (złoto, mika), zabrakło wzoru albo bliższego przedstawienia sposobu wyliczania tejże grubości z danych doświadczalnych (z wartości Delta, Psi). W opisie techniki PicoTREC zaskoczyło mnie zdanie napisane tak hermetycznym językiem, że musiałem go kilka razy przeczytać aby domyśleć się co Autorka chciała powiedzieć. Brzmi ono następująco: „[mapowanie rozpoznawcze pojedynczych molekuł - dopisek ACh] Pozwala na molekularne rozpoznanie w czasie dwuwymiarowego skanowania poprzez procesowanie asymetrycznej redukcji amplitudy oscylacji”.

Część doświadczalną rozprawy rozpoczyna rozdział „Hipoteza i cele badawcze pracy”, w którym Doktorantka formułuje ogólny cel pracy oraz podaje prowadzące do niego trzy podtematy. Cel badań przedstawiony przez Doktorantkę staje się jasny i przekonujący po usunięciu zdania trzeciego i czwartego z krótkiego wprowadzenia do tego jednostronicowego rozdziału. Dwa pierwsze spośród trzech celów szczegółowych wydają się zasadnie postawione, chociaż drugi wychodzi poza zakres tematyki określony w tytule rozprawy. Ostatni cel szczegółowy: „Tworzenie kompleksów immunologicznych antygen-przeciwciała z antygenami cukrowymi z wykorzystaniem techniki elipsometrii oraz mikroskopii sił atomowych” został źle sformułowany gdyż Doktorantka wykorzystując AFM i TIRE badała warstwy tworzone przez antygeny, przeciwciała i ich kompleksy (jak to było wcześniej powiedziane w niniejszej recenzji) a nie tworzyła kompleksy z wykorzystaniem wymienionych analitycznych technik badawczych.

W kolejnym rozdziale rozprawy zostały szczegółowo opisane użyte materiały oraz stosowane metody. Do badań wykorzystano lipopolisacharydy szczepu rodzicielskiego S1959 *P. mirabilis* O3 oraz jego dwóch szorstkich mutantów R110/S1959 (mutant Re) i R45/S1959 (mutant Ra). Używano również surowicy króliczej (ant-O3LPS), surowic pozyskanych od pacjentów z rozpoznany reumatycznym zapaleniem stawów oraz surowic od osób zdrowych (honorowych krwiodawców). W pracy wykorzystano także, przygotowane w IChO Wydziału Chemii Politechniki Łódzkiej, syntetyczne peptydy związane linkerem triazynowym z nośnikiem celulozowym. Bibliotekę 361 peptydów skonstruowano w oparciu o 19-aminokwasową sekwencję regionu ruchomego ureazy *H. pylori*. W całej pracy doktorskiej nie znalazłem wyjaśnienia, dlaczego Doktorantka badając przeciwciała skierowane przeciw czynnikom wirulencji *P. mirabilis* O3 wykorzystwała sekwencję oligopeptydową z ureazy *H. pylori*. Takie wyjaśnienie wydaje się konieczne. Na zakończenie analizy tej części pracy doktorskiej należy podkreślić, że zastosowany panel metod badawczych był

adekwatny do podjętych zadań badawczych, zaś zaplanowana metodyka wymagała od Doktorantki nie tylko znajomości technik stosowanych immunologii, ale także opanowania fizyko-chemicznych metod analizy makromolekuł, do których zaliczyć należy mikroskopię sił atomowych i elipsometrię całkowitego wewnętrznego odbicia.

Wykonując zaplanowane harmonogramem zadania badawcze Doktorantka skoncentrowała się początkowo na optymalizacji warunków reakcji immunoenzymatycznych wykorzystując do tego celu króliczą surowicę anti-O3LPS. Za wartości tła Doktorantka przyjęła najwyższe odczyty absorbancji z różnych serii testów kontrolnych. Kolejne doświadczenia wykazały, że surowica królicza anti-O3LPS zawiera przeciwciała rozpoznające poszczególne części LPS S1959 tj.: O-PS, oligosacharyd rdzeniowy oraz fragment (Kdo)₂-lipid A. Następną serię doświadczeń Doktorantka przeprowadziła wykorzystując syntetyczny antygen Lys-GalA połączony z nośnikiem poliakrylamidowym (PAA) dowodząc, że przeciwciała króliczej surowicy anti-LPSO3 rozpoznają epitop Lys-GalA będący fragmentem wielocukru O-swoistego lipopolisacharydu *P. mirabilis* (serotyp O3 szczep 1959). Po wyżej opisanych badaniach wstępnych Doktorantka przystąpiła do określania poziomu przeciwciał ant-O3LPS (oddzielnie dla LPS-S i dwóch form LPS-R oraz syntetycznego epitopu Lys-GalA-PAA) w surowicy osób zdrowych (krwiodawców) oraz osób z rozpoznaniem reumatoidalnym zapaleniem stawów. Celem uzyskania bardziej precyzyjnych wyników Doktorantka z wybranych surowic wyizolowała frakcje białek IgG i z ich wykorzystaniem przeprowadziła ponownie szereg oznaczeń immunoenzymatycznych. Powyższe doświadczenia zostały uzupełnione oznaczeniem metodą dot-blot poziomu przeciwciał, w wybranej surowicy osoby zdrowej i osoby z RZS, reagujących z peptydami biblioteki skonstruowanej na bazie 19-aminokwasowej sekwencji fragmentu ruchomego ureazy *H. pylori*. Ani w rozdziale „Materiały i metody” ani w „Wynikach” nie znalazłem odpowiedzi na pytanie, które surowice Doktorantka wybrała do wyżej opisanych doświadczeń. Wyizolowane frakcje białek IgG z surowic nr 5 i 8 (surowice pacjentów z RZS) były dodatkowo badane przy użyciu testów ELISA z wykorzystaniem kolagenu typu I, LPS-u S1959 i syntetycznego antygeny Lys-GalA-PAA. Doktorantka sprawdzała reaktywność frakcji IgG z wyżej wymienionych surowic w stosunku do LPSS1959 i Lys-GalA-PAA po procesie adsorpcji przeciwciał z surowicy anti-O3LPS na kolagenie typu I.

Dopełnieniem badań immunoenzymatycznych były analizy TIRE i AFM wybranych antygenów, przeciwciał i ich kompleksów, które przed badaniem osadzono na podłożu stałym (na powierzchni złota lub na mice). Doktorantka oceniała grubość tworzonym warstw, ich chropowatość oraz sposób rozmieszczenia i ułożenia biomakromolekuł na powierzchni nośnika. Doktorantka wykazała, że grubości warstw makromolekuł określone obiema metodami (TIRE i AFM) wzajemnie się potwierdzają i że TIRE może służyć jako prosta w wykonaniu metoda do pomiaru wielkości miceli

tworzących się z różnych lipopolisacharydów w środowisku wodnym. Mikroskop sił atomowych zaopatrzonego w sondę ze związanymi do niej antygenami z powodzeniem posłużył Doktorantce do topograficznego określenia położenia aktywnych w stosunku do sondy przeciwciał. Przydatność obu technik do badań struktur supramolekularnych tworzonych na powierzchniach stałych została potwierdzona przez Doktorantkę. Jak wynika ze statystyk bibliograficznych nie są to techniki instrumentalne, które dominują w badaniach biologicznych lub badaniach molekularnych. Zwykle służą one do analiz uzupełniających w konkretnych cyklach badawczych. Dobrym tego przykładem jest ich zastosowanie przez Doktorantkę.

Reasumując, badania wykonane przez Doktorantkę i opisane w przedłożonej rozprawie (mimo, że przeprowadzone na niewielkiej grupie osób) w przekonujący sposób potwierdzają powszechną obecność przeciwciał anti-LPS *Proteus mirabilis* O3 w społeczności regionu kieleckiego. Wykonane badania przybliżają nas do poznania skomplikowanych mechanizmów prowadzących do zachorowań na reumatoidalne zapalenie stawów. Przedstawione rezultaty badań immunoenzymatycznych (opartych głównie na technice ELISA) w pełni wypełniają cel przedłożonej rozprawy zawarty w jej tytule. Badania nad kompleksami przeciwciało-antygen prowadzone metodami fizykochemicznymi oraz badania immunologiczne z wykorzystaniem biblioteki peptydów otrzymanych na bazie elementu ruchomego ureazy *H. pylori* należy uznać za dodatkowe i uzupełniające w kontekście tytułu rozprawy.

Trzeba podkreślić, że recenzowana rozprawa doktorska wnosi nowe dane do nauki i w ten sposób pogłębia wiedzę z zakresu immunologii i mikrobiologii.

Uważam, że oceniana rozprawa spełnia warunki stawiane pracom doktorskim określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Wnoszę więc do Rady Naukowej Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie Pani mgr Joanny Gleńskiej-Olender do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

