



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ

im. Ludwika Hirszfelda

Polska Akademia Nauk

ul. Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław

tel. (4871) 370 9982, fax: (4871) 370 9975

<http://iitd.pan.wroc.pl>; e-mail: gamian@iitd.pan.wroc.pl

Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych

Wrocław, 21.11.2017 r.

Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej

Prof. dr hab. Andrzej Gamian

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Dominika Matusiaka pt. „Porównanie lipopolisacharydów (LPS) z form planktonicznych i tworzących biofilm wybranych szczepów *Proteus* spp.” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Antoniego Różalskiego

Jednym z czynników chorobotwórczości bakterii patogennych jest tworzenie biofilmu, czyli osiadłych, przylegających do podłoża mikrokolonii, otoczonych substancją zewnątrzkomórkową. Ważnym składnikiem biofilmu bakterii Gram-ujemnych jest lipopolisacharyd (LPS), cząsteczka o silnych właściwościach indukowania stanu zapalnego. Przedstawiona do oceny praca dotyczy próby odpowiedzi na pytanie o rolę LPS w tworzeniu biofilmu przez bakterie z rodzaju *Proteus* spp. a ściślej jak zmienia się struktura LPS przy wzajemnym przejściu formy planktonicznej do biofilmowej tego samego szczepu, oraz odwrotnego procesu, ważnego w rozsiewaniu zakażenia. Postawiony problem jest zasadny i ważny, gdyż z jednej strony podnosi kwestię biofilmu i jego składnika lipopolisacharydowego, a z drugiej strony antybiotykoodporności i problemów istotnych dla poznania mechanizmów patogenności. Zagadnienia te mają duże znaczenie biomedyczne, szczególnie w odniesieniu do *Proteus* spp., przedmiotu badań w tej pracy. Tematyka tych badań jest zgodna z wieloletnim programem realizowanym w Pracowni Mikrobiologii Ogólnej Zakładu Biologii Bakterii na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. Zarówno przedmiot badań, schemat doświadczeń jak i wybór parametrów do oceny, dokonane przez doktoranta stanowią właściwe i uzasadnione podejście dla uzyskania jednoznacznych wyników i odpowiedzi na zadane pytania.

Przedstawiona do recenzji praca ma typowy układ dla rozprawy doktorskiej, powszechnie stosowany w pracach doświadczalnych i zawiera 123 strony maszynopisu, w tym 20 rycin i 21 tabel, 184 pozycji piśmiennictwa, ponad połowa (57%) z ostatniej dekady, dalej wykaz stosowanych skrótów, wnioski oraz streszczenie w języku polskim i angielskim.

We wstępie pracy autor podaje ogólną charakterystykę rodzaju *Proteus*, opisuje najpierw główne czynniki patogenności tych drobnoustrojów, przy czym zwraca szczególną uwagę na

lipopolisacharyd (LPS), czyli endotoksynę, jako unikalny składnik ściany komórkowej i zarazem czynnik wywołujący stan zapalny u gospodarza. Następnie autor omawia poszczególne części endotoksyny, część O-swoistą, rdzeniową i tzw. lipid A, by przejść dalej do przedstawienia właściwości biologicznych LPS i klinicznych objawów indukcji stanu zapalnego przez endotoksynę, prowadzącego często do sepsy. Na końcu autor omawia szerzej biofilm będący przedmiotem pracy doktorskiej, jego ogólną charakterystykę i powstawanie, czynniki warunkujące tworzenie biofilmu, jedno z uwarunkowań jakim jest zjawisko porozumiewania się drobnoustrojów. Wreszcie omawia zakażenia układu moczowego z udziałem *Proteus*. Wstęp pracy jest napisany zwięźle, czytelnie, jest dobrze skonstruowany, świadczy o dużej wiedzy doktoranta, gdyż autor właściwie dobrał tematykę i piśmiennictwo, uzasadnił przedmiot badań, przedstawił go w jasny sposób.

Celem badań jaki założono w pracy było porównanie budowy lipopolisacharydów wyizolowanych z wybranych szczepów *Proteus* spp. z hodowli płynnych i biofilmowych, a także porównanie antybiotykooporności tych szczepów i zdolności ich lipopolisacharydów do stymulacji TNF- α przez komórki THP-1.

Dobór metod jest trafny dla realizacji zadań. Autor pokonał trudną pod względem metodycznym przeszkodę jaką było uzyskanie biofilmu w ilościach pozwalających otrzymanie LPS do całości badań, zwłaszcza strukturalnych, stąd należy docenić sposób podejścia do tego tematu, które uważam za właściwe. Skonstruowany bioreaktor do hodowli biofilmu okazał się bardzo dobrym, wydajnym urządzeniem. Metody biochemiczne oznaczania wybranych parametrów są poprawne, podane w sposób wyczerpujący. Autor zastosował metody immunochemiczne, takie jak immunobloting, ELISA, adsorbcję surowic, ponadto oznaczanie antybiotykooporności, hodowle komórkowe i oznaczanie cytokiny TNF- α . Analizę strukturalną wykonano przy pomocy spektroskopii NMR i spektrometrii MALDI-TOF.

Uzyskane wyniki przedstawiono i opisano jasno i rzeczowo, zostały dobrze udokumentowane na rycinach i w tabelach. W pierwszych doświadczeniach wyselekcjonowano trzy szczepy *Proteus* spp. intensywnie tworzące biofilm, po czym opracowano warunki tworzenia biofilmu. Wykazano, że lekooporność szczepów *P. mirabilis* była w biofilmie 2-64 razy wyższa niż u form planktonicznych tych samych szczepów. Interesująca była też obserwacja, że subinhibicyjne stężenia niektórych antybiotyków stymulowały wzrost biofilmu niektórych szczepów. Lipopolisacharydy wyizolowane z biomasy z hodowli biofilmowych wykazywały pewne różnice strukturalne w porównaniu z lipopolisacharydami otrzymanymi z biomasy hodowli planktonicznych tych samych szczepów. Swoiste surowice królicze pozwoliły na wykrycie rozpoznawanych przez odrębne populacje przeciwciał dwóch populacji LPS z hodowli osiadłej. Wyniki analiz elektroforetycznych wskazujące na krótszy LPS w formach biofilmowych zostały potwierdzone badaniem zawartości Kdo, gdyż LPS taki posiadał więcej Kdo. Autor wykorzystał umiejętnie dorobek i potencjał badawczy Zakładu Biologii Bakterii.

W dyskusji poszczególne etapy pracy są rzeczowo uzasadniane, a konsekwentnie i logicznie wyciągane wnioski z kolejnych doświadczeń służą całościowej realizacji zamierzonego celu, wyniki są omawiane krytycznie, porównane do danych z piśmiennictwa. Interesującą obserwacją jest opisanie wyższego poziomu O-acetylacji rybitolu w LPS z hodowli planktonicznej z podłoża rozcieńczonego w porównaniu do LPS z podłoża nierozcieńczonego, co autor słusznie uznał za ważną zmianę, gdyż taka różnica zazwyczaj pociąga za sobą konsekwencje biologiczne. Forma LPS z hodowli biofilmowej zawierała dodatkowy oligosacharyd rdzeniowy z wariantem bez 4-aminoarabinozy i wariantem z grupą acetylową. Jeżeli rozcieńczenie podłoża uznać za warunki stresowe dla bakterii, również ograniczony dostęp do podłoża w biofilmie, to różnice w budowie LPS odzwierciedlają reakcję na te zmiany. Z taką sytuacją reagowania bakterii na zmianę otoczenia jest też glicylacja rdzenia celem buforowania wpływu środowiska. Pojawia zatem pytanie, czy autor zauważył na widmach masowych jakiś wariant z glicyną, na przykład fragment różniący się masą cząsteczkową 57 Da. W pracy nie zaobserwowano zmian w lipidzie A, ani zmian poziomu TNF- α indukowanego w komórkach THP-1 przez LPS otrzymany z hodowli planktonowych i biofilmowych badanych szczepów.

Kilka uwag natury redakcyjnej zaznaczono na marginesie pracy, jednak nie mają one znaczenia merytorycznego i nie wpływają na ogólną bardzo dobrą ocenę pracy. Natomiast przed wysłaniem manuskryptu do druku należy uwzględnić poniższe uwagi, mianowicie w spisie piśmiennictwa nie podano rocznika (4). W tekście należy używać terminu spektrometria masowa zamiast spektroskopii masowej. Western blotting lub po spolszczeniu Western blotting to metoda, natomiast Western blot to membrana, wynik. Na stronie 15 odnośnie wartości ID_{50} należy uściślić lub poprawić wartości 100 czy 1000-krotnej różnicy dla szczepu dzikiego i mutanta. Na stronie 17 podano, że otoczka (CPS) u *Proteus* jest najprawdopodobniej identyczna z OPS, czy jest znana struktura CPS i do jakiego OPS jest podobna lub identyczna. Nie jest jasne zdanie na str. 20, ...Większość cukrów stanowią piranozy (poza rybozę – furanozę)... zdanie jest zbyt skrótowe, należy je rozwinąć. Na str. 48 w metodzie III.2.6 wydaje się, że pominięto wzór do oznaczania kwasów nukleinowych i białka. W podpisie pod rys. 6 lepiej: ...zależność wartości absorbancji od stężenia Kdo. W jakiej temperaturze ogrzewano LPS przed naniesieniem na żel do SDS-PAGE w met III.2.8. Rozdział III.2.9 jest 2 razy numerowany. Warto umieścić marker mas cząsteczkowych na rysunkach z SDS-PAGE i immunoblottingiem. Uwagi te wynikają z obowiązku recenzenta, ale nie wpływają na wartość merytoryczną ocenianej pracy.

W podsumowaniu chcę podkreślić, że praca jest wartościowa, została prawidłowo zaplanowana i zrealizowana, wnosi nowe elementy do wiedzy o biofilmie bakteryjnym, zmianach budowy endotoksyny przy przejściach form biofilmowych/planktonowych, mechanizmach patogenności *Proteus* spp. Praca wytycza kierunek dalszych badań odnośnie biofilmu, antybiotykoodporności, zakażeń bakteryjnych, a także potencjalnych biomedycznych zastosowań uzyskanych wyników. Doktorant wykazał się znajomością piśmiennictwa, które jest właściwie

wykorzystane, co dowodzi swobodnego poruszania się w omawianym zagadnieniu. Uzyskane wyniki mają znaczenie podstawowe.

Uważam, że rozprawa mgr Dominika Matusiaka zawiera oryginalny materiał doświadczalny i spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Dlatego wnioskuję do Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie tej pracy doktorskiej i dopuszczenie mgr Dominika Matusiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. W mojej opinii praca zasługuje na wyróżnienie, ze względu na nowatorskie podejście do badań biofilmu bakteryjnego.

KIEROWNIK
Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych

Prof. dr hab. Andrzej Gamian