



## DZIEKANAT

ul. Kuźnicza 35  
50-138 Wrocław

tel. +48 71 375 29 79 | +48 71 375 22 21

fax +48 71 375 28 95

wnb@uwr.edu.pl | www.biologia.uni.wroc.pl

Dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska, prof. nadzw. UWr

17.11.2017

Zakład Mikrobiologii

Instytut Genetyki i Mikrobiologii

Uniwersytet Wrocławski

## Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Dominika Macieja Matusiaka** wykonanej

w Pracowni Mikrobiologii Ogólnej Zakładu Biologii Bakterii

Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytetu Łódzkiego

pt. **"Porównanie lipopolisacharydów (LPS) z form planktonicznych  
i tworzących biofilm wybranych szczepów *Proteus spp.*"**

Promotor: prof. dr hab. Antoni Różalski

Promotor pomocniczy: dr Agnieszka Zabłotni

Współczesna mikrobiologia ma przed sobą wiele wyzwań. Niewątpliwie jednym z nich jest poznanie skomplikowanych zależności jakie są udziałem bakterii tworzących biofilmy. W bazie *PubMed* odnajdujemy ponad trzydzieści osiem tysięcy artykułów dotyczących tematyki biofilmów, jednak mimo tak dużej liczby publikacji i nieustannego rozwoju technik biologii molekularnej nasza wiedza w zakresie biologii biofilmów jest ciągle niepełna. Bakterie żyjące w społecznościach, dzięki zjawisku *quorum sensing* potrafią precyzyjnie i bardzo szybko dostosowywać się do nowych warunków, charakteryzują się często dużą plastycznością genomów, a w opinii niektórych badaczy wykazują cechę, którą zaczęto określać mianem inteligencji społecznej bakterii. W tym kontekście tematyka przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej jest w pełni zgodna z aktualnymi, ważnymi w

mikrobiologii trendami badawczymi. *Proteus mirabilis* będący obiektem badawczym w pracy doktorskiej, to bakteria wykazująca zdolność do wytwarzania biofilmu. Pałeczki *Proteus* to patogeny oportunistyczne odpowiedzialne za wywoływanie zakażeń ran, kości, zapaleń stawów, zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych, a także wywołujące infekcje dróg moczowych. Ważnym czynnikiem etiologicznym w tych zakażeniach jest gatunek *P. mirabilis*.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska napisana została w języku polskim i ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. W pracy Autor wyróżnił takie rozdziały jak: wstęp, cel i etapy pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz skrótów oraz piśmiennictwo.

Wstęp jest dobrym wprowadzeniem do eksperymentalnej części pracy. W początkowych rozdziałach pracy Autor dokonuje charakterystyki bakterii z rodzaju *Proteus*, poświęcając szczególnie dużo miejsca omówieniu czynników wirulencji tej bakterii. Jako, że praca doktorska dotyczy analiz lipopolisacharydów, Doktorant szczegółowo omawia budowę lipopolisacharydu (LPS), jego właściwości biologiczne i udział LPS w sepsie. We wstępie omówione zostały także etapy tworzenia biofilmu oraz zjawisko porozumiewania się drobnoustrojów jakim jest *quorum sensing*. Biorąc pod uwagę, iż bakterie z rodzaju *Proteus* mogą być przyczyną zakażeń układu moczowego we wstępie znalazł się także rozdział dotyczący tego zagadnienia. We wstępie Autor kilkakrotnie pisze, iż LPS jest jednym z najsilniejszych aktywatorów układu immunologicznego u ssaków. Proszę podczas obrony pracy doktorskiej o scharakteryzowanie jak przedstawia się zagadnienie dotyczące poziomu wrażliwości szczepów *Proteus* na bakteriobójcze działanie układu dopełniacza. Analiza merytoryczna wstępu potwierdza dobre teoretyczne przygotowanie Doktoranta do prowadzenia badań.

Cele postawione w pracy są precyzyjnie zdefiniowane. Głównym celem pracy było porównanie budowy LPS i wpływu LPS na wytwarzanie TNF- $\alpha$  przez komórki THP-1. LPS był izolowany z hodowli płynnych i biofilmowych



*P. mirabilis*. Założone przez Doktoranta cele pracy zostały zrealizowane, a otrzymane wyniki pozwoliły na sformułowanie poprawnych wniosków. Autor rozprawy w uzasadnieniu wyboru tematu pracy, pisze iż takie badania nie były do tej pory prowadzone, co jest zgodne z aktualnym stanem wiedzy. W bazach danych nie odnajdujemy prac dotyczących tak ujętego zagadnienia dotyczącego badań nad biofilmami tworzonymi przez pałeczki *P. mirabilis*.

W eksperymentalnej części pracy Doktorant wykorzystał klasyczne metody mikrobiologiczne dotyczące hodowli bakterii, metody biochemiczne przy badaniach endotoksyny, techniki elektroforetyczne, immunologiczne oraz statystyczne. Badania prowadzone były na klinicznych szczepach *P. mirabilis* (izolaty z moczu oraz izolaty z ran). Na wyróżnienie zasługuje stworzenie przez Doktoranta bioreaktora do hodowli biofilmu, który pozwolił na uzyskiwanie z dużą wydajnością biofilmów, niezbędnych do dalszych badań. Ten rozdział pracy doktorskiej oceniam jako dobrze przygotowany. Proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do następujących zagadnień dotyczących tej części pracy:

- ✓ na jakiej podstawie ustalono stężenia LPS, których używano do stymulacji komórek THP-1?
- ✓ w metodzie oceny intensywności tworzenia biofilmu przez wybrane szczepy bakterii Autor podaje, iż bakterie, inkubowano 24 lub 72 godziny, dlaczego wybrano 2 zakresy czasowe hodowli bakterii?
- ✓ dla części metod przedstawionych w rozdziale III.2. nie odnajduję źródeł literaturowych, dlaczego nie zostały podane?

Rozdział przedstawiający wyniki pracy jest bogaty w wykresy (ryciny), tabele, a także w dokumentację zdjęciową. Rozdział ten jest dobrze i przejrzysto napisany. Uważam, że uzyskane wyniki poszerzają naszą wiedzę nie tylko w zakresie badań podstawowych, ale także dają podstawy do przyszłego ich wykorzystania w doskonaleniu technik eradykacji biofilmów tworzonych przez pałeczki *Proteus*. Za szczególnie cenne uważam uzyskanie danych wskazujących na to, że w trakcie hodowli bakterii w biofilmie może dochodzić do syntezy dodatkowych

oligosacharydów w części rdzeniowej LPS *P. mirabilis* (oligosacharyd 2). Druga ciekawa obserwacja wskazuje na to, iż podczas wzrostu bakterii w biofilmie może dochodzić do skrócenia długości łańcuchów O-swoistych LPS *P. mirabilis*. Interesującym byłoby w przyszłości potwierdzenie tej obserwacji poprzez wykonanie badań na większej liczbie szczepów. Proszę o odpowiedź, jak Autor tłumaczy przedstawione w pracy zjawisko intensywniejszego tworzenia biofilmu przez drobnoustroje w podłożu ubogim w substancje odżywcze?

Dyskusja poprowadzona jest w sposób prawidłowy. Magister Dominik Matusiak syntetycznie i precyzyjnie dyskutuje uzyskane wyniki własne z wynikami uzyskiwanymi przez innych autorów. Autor rozprawy cytuje 184 prace naukowe, głównie anglojęzyczne. Zakres merytoryczny prac jest adekwatny do tematyki rozprawy. Proszę o uzasadnienie umieszczenia dopiero na końcu rozprawy, w rozdziale dyskusja, Ryciny 18 przedstawiającej proponowane struktury chemiczne oligosacharydów rdzeniowych *P. mirabilis*, tabeli 21 (wykaz frakcji lipidów A *P. mirabilis* 1B-m i *P. mirabilis* 9 B-M zaobserwowanych podczas analizy MALDI-TOF) oraz ryciny 20 (struktury chemiczne lipidów A *P. mirabilis*). Dlaczego te dane nie zostały umieszczone w rozdziale wyniki?

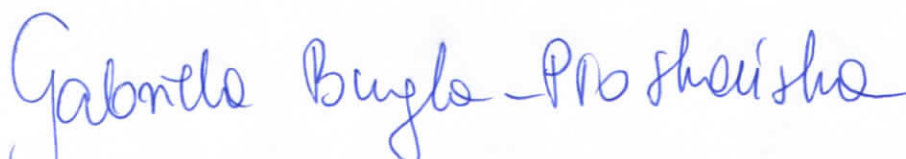
W pracy zdarza się Autorowi popełniać niezręczności językowe i zbędne zapożyczenia, np. bardziej poprawnym określeniem dla „srebrzenie żelu” wydaje się być „barwienie lipopolisacharydu z wykorzystaniem srebra” lub „barwienie żeli elektroforetycznych metodą srebrową”. Prawidłowa definicja dla skrótu CFU to jednostka tworząca kolonie, a MAC to kompleks atakujący błonę. Nie odnajduję także w wykazie skrótów definicji jakże ważnego skrótu THP-1. Strona edytorska zasadniczo nie budzi zastrzeżeń, choć w pracy pojawiają się błędy literowe czy stylistyczne.



Wyniki uzyskane przez mgr Dominika Macieja Matusiaka były przedstawiane na 5 konferencjach naukowych, a obecnie, jak wskazuje Doktorant są przygotowywane do druku w czasopiśmie *Medical Microbiology and Immunology*. Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Biologii Bakterii Uniwersytetu Łódzkiego posiadającym wieloletnie doświadczenie w zakresie badań nad czynnikami wirulencji pałeczek z rodzaju *Proteus*. Praca doktorska mgr Macieja Matusiaka jest niewątpliwie kontynuacją oraz uzupełnieniem badań prowadzonych w tej jednostce nad pałeczkami *Proteus*.

Pragnę zaznaczyć, że przedstawione w niniejszej recenzji uwagi krytyczne i pytania nie umniejszają wartości naukowej przedstawionej do recenzji pracy i są elementem dyskusji z Doktorantem.

Podsumowując stwierdzam, iż rozprawa doktorska mgr Dominika Macieja Matusiaka pt. "**Porównanie lipopolisacharydów (LPS) z form planktonicznych i tworzących biofilm wybranych szczepów *Proteus spp.***" została prawidłowo przygotowana i wykonana, uzyskano w niej interesujące wyniki. Stwierdzam iż: "Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.)". Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego z uprzejmą prośbą o dopuszczenie mgr Dominika Macieja Matusiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska, prof. nadzw. UW