



Łódź, 24.02.2021.

Dr hab. Maciej Cedzyński
Instytut Biologii Medycznej PAN,
Pracownia Immunobiologii Zakażeń,
ul. Lodowa 106
93-232 Łódź
e-mail: mcedzynski@cbm.pan.pl

Ocena rozprawy doktorskiej Mgr Malwiny Kawki

pt. „Interakcja *Mycobacterium tuberculosis* z ludzkim surowiczym amyloidem A”.

Gruźlica, choroba zakaźna występująca przede wszystkim w postaci płucnej, wciąż należy do najczęstszych przyczyn zgonów na świecie. Corocznie rozwija się u około 10 milionów osób, a liczba zgonów znacznie przekracza milion. W Polsce notuje się ponad 5000 przypadków rocznie, a współczynnik zachorowalności jest wyższy niż średnia w Unii Europejskiej. O szybkiej eliminacji patogenu lub rozwoju zakażenia w formie ostrej czy latentnej, w znacznym stopniu decyduje efektywność mechanizmów odporności wrodzonej, zarówno humoralnych, jak i komórkowych. Wiele czynników patogenności *Mycobacterium tuberculosis* pozwala tym bakteriom na skuteczne unikanie odpowiedzi lub wykorzystanie niektórych jej czynników do infekcji komórek docelowych. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Malwiny Kawki dotyczy oddziaływania komórek prątka gruźlicy z surowiczym amyloidem A, będącym ludzkim białkiem ostrej fazy oraz skutków tej interakcji w odniesieniu do zakażenia makrofagów.

Rozprawa składa się z typowych rozdziałów, jak Wstęp, Cel pracy (uzupełniony przez wyodrębnione Hipotezy badawcze), Materiał i metody, Wyniki, Wnioski, Dyskusja, Bibliografia. Zawiera także wymagane streszczenia w języku polskim i angielskim oraz opis dorobku naukowego Doktorantki. Obszerny i ciekawy rozdział „Wstęp” omawia między innymi historię pionierskich badań dotyczących *M. tuberculosis*, opracowania szczepionki BCG i wprowadzenia antybiotyków do leczenia gruźlicy, a także zagadnienia związane z epidemiologią tej choroby w Polsce i na świecie. W dalszej części, Autorka opisała oddziaływania wybranych rozpuszczalnych i związanych z komórką receptorów rozpoznających wzorce, a także białek macierzy zewnątrzkomórkowej i heparyny z Mtb oraz ich znaczenie w odpowiedzi na zakażenie tym patogenem. Zgodnie z tematyką prowadzonych badań, Mgr Malwina Kawka szczególną uwagę zwróciła na omówienie surowiczego amyloidu A, jego oddziaływań z drobnoustrojami i znaczenia w patogenezie infekcji. Wstęp opatrzony jest 8 interesującymi rycinami i 2 tabelami. Drobne uwagi edytorskie: czy powiększenie podane w opisie ryciny 1 (100x) jest prawidłowe?; w opisie ryciny 2 nie podano źródła przedstawionych fotografii; na ryc. 8 nie zaznaczono rodzaju syntazy tlenu azotu. W tekście występuje skrót „iNOS”, rozwinięty jednak jako „syntaza tlenu azotu”, także bez wskazania jej rodzaju.



Cel pracy został jasno sformułowany, w oparciu o 4 hipotezy badawcze (wydzielone jako odrębny rozdział), opatrzone krótkim, rzeczowym opisem przyjętych sposobów ich weryfikacji.

Rozdział „Materiał i metody”, dzięki zazwyczaj szczegółowym informacjom, dotyczącym zwłaszcza stosowanych procedur z pewnością umożliwi wykorzystanie pracy w celach dydaktycznych czy jako cenną pomoc w planowaniu doświadczeń przez innych badaczy. Na uwagę zasługuje szeroki zakres metod, którymi posługiwała się Doktorantka, co świadczy o jej wszechstronności. Dodatkowo, przejrzyste schematy przedstawione na rycinach 9 i 10 mogą być wykorzystane jako pomoc naukowa dla studentów czy młodych naukowców. Należy zwrócić uwagę, że przy pierwszej wzmiance producenta odczynników powinien wymieniony być także kraj pochodzenia. Zazwyczaj w rozprawach doktorskich wymienia się również podstawowy sprzęt wykorzystywany w badaniach.

W części „Wyniki”, Mgr Malwina Kawka przedstawia rezultaty swojej kilkuletniej pracy, w oparciu o przyjęty, wspomniany wyżej schemat czterech hipotez badawczych. Przedstawione dane świadczą o oryginalnym rozwiązaniu problemu naukowego, co jest jednym z ustawowych wymogów ubiegania się o uzyskanie stopnia doktora. Rozdział ten zawiera 19 rycin i 2 tabele.

Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należą:

- udowodnienie, że za przyłączanie surowiczego amyloidu A do powierzchni komórki Mtb odpowiedzialne są między innymi błonowe białka AtpA (Rv1308) i ABC (Rv2477c); wyniki te potwierdzają słuszność hipotez 1 i 2
- wykazanie, że surowiczy amyloid A (przy zastosowaniu wysokiego stężenia tego czynnika, co może odpowiadać fazie ostrej) nasila wnikanie komórek Mtb do oraz ich przeżywanie i namnażanie wewnątrz makrofagów – jako weryfikacja hipotezy 3
- wykazanie, że wskutek interakcji z A-SAA1 dochodzi do zmiany ekspresji genów *M. tuberculosis* (na poziomie transkrypcji), kodujących białka transportowe, dioksygenazę, endonukleazę IV i lipoproteinę LpqP, co potwierdza słuszność hipotezy 4.

Należy podkreślić, że wykazane u mutantów nadprodukcujących białka AtpA i ABC zmiany proteomu, jak zauważa Autorka rozprawy, prawdopodobnie są przyczyną ich obniżonego wnikania do makrofagów. Przedstawiona w tabeli 3 i omówiona w tekście analiza proteomiczna jest również znaczącym osiągnięciem naukowym Doktorantki. W związku z tym fragmentem pracy, chciałbym zapytać, które ze zmian ekspresji białek zdaniem Autorki mogą w najwyższym stopniu „maskować” czy wręcz odwracać efekt nadprodukcji białek AtpA i ABC.

Mam także kilka uwag redakcyjnych dotyczących rycin: niekiedy brakuje opisu poszczególnych ich części (np. panelu C na ryc. 11 i 12); w legendzie tych i kilku innych ilustracji brakuje informacji dotyczącej liczby przeprowadzonych badań (podana jest średnia i standardowy błąd średniej).

Wymienione wyżej, jak również inne wyniki prezentowane w rozprawie Mgr Malwiny Kawki przyczyniają się do znaczącego wzbogacenia wiedzy dotyczącej wzajemnych oddziaływań patogen-gospodarz i ich znaczenia w patogenezie gruźlicy. Należy podkreślić, że przeprowadzone badania stanowią istotną część szerszego projektu realizowanego przez Zespół kierowany przez Panią prof. Bożenę Dziadek a uzyskane dane mają duży potencjał aplikacyjny. Na uwagę zasługuje również uzyskanie przez Doktorantkę dofinansowania zadania badawczego w ramach konkursu dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich. Przedstawione wyniki mają



charakter nowatorski i świadczą o umiejętności planowania i wykonywania doświadczeń z wykorzystaniem szerokiego zakresu metod współczesnej biologii.

Wnioski, umieszczone w rozprawie nietypowo (przed rozdziałem „Dyskusja”) są zwięzłe, wyważone i w pełni uzasadnione przedstawionymi wyżej danymi doświadczalnymi. Autorka sformułowała 8 takich wniosków i podsumowała je trafnym uogólnieniem. Wspomniana „Dyskusja” zawiera omówienie własnych wyników Doktorantki, w odniesieniu do doniesień literaturowych. Fragment ten świadczy o umiejętności interpretacji wyników (co zostało wykazane już wcześniej, przy formułowaniu wniosków) i dociekliwości naukowej Pani mgr Malwiny Kawki.

W rozdziale „Streszczenie”, który z definicji ma charakter krótkiego tekstu, opis uzyskanych wyników wydaje się być jednak nieco zbyt zdawkowym. Autorka pomija też opis najważniejszych metod, którymi się posługiwała aby zrealizować cel pracy.

Rozdział „Bibliografia” stanowi wykaz 315 cytowanych pozycji, co świadczy o wnikliwym przestudiowaniu literatury związanej z tematyką pracy. Należy jednak zwrócić uwagę, że tylko 1 z nich została opublikowana w roku 2020. Wykorzystanie takich artykułów jak np.: Kathamutu GR i wsp., Altered systemic levels of acute phase proteins in tuberculous lymphadenitis and modulation after treatment. PLoS One, 2020, 15(5):e0233426, doi: 10.1371/journal.pone.0233426 czy Vietri L i wsp., Serum amyloid A: A potential biomarker of lung disorders. Respir Investig, 2020, 58(1):21-27, doi: 10.1016/j.resinv.2019.09.005 mogłoby wzbogacić rozdział „Dyskusja”. Oczywiście, należy pamiętać, że liczba publikowanych prac czyni zapoznanie się ze wszystkimi praktycznie niemożliwym, a Autorka rozprawy ma prawo wyboru najbardziej interesującej literatury, tak więc moja uwaga nie obniża wartości naukowej rozprawy.

Dorobek naukowy Mgr Malwiny Kawki, przedstawiony w odpowiednim rozdziale obejmuje 6 artykułów oryginalnych o sumarycznym IF=21,48, przy czym aż 4 prace zostały opublikowane w czasopiśmie, których współczynnik ten przekracza wartość 4. Doktorantka jest też współautorką kilkunastu komunikatów konferencyjnych i 1 artykułu popularnonaukowego. Dorobek ten zasługuje na bardzo wysoką ocenę.

Jako recenzent, muszę wspomnieć o drobnych błędach występujących w rozprawie, jak używanie terminu „prędkość” zamiast „przyspieszenie” przy podawaniu warunków wirowania (np. „przy prędkości 4000xg”). Ponadto, należy zauważyć, że fikoliny i kolektyny, to różne rodziny białek, mimo znacznego podobieństwa strukturalnego i funkcjonalnego, a białko MAP19 nie jest enzymem (Wstęp). Wykaz pozostałych błędów, natury interpunkcyjnej, językowej czy redakcyjnej został przekazany Doktorantce. Błędy te nie wpływają na bardzo wysoką wartość naukową ocenianej rozprawy, świadczącej o umiejętności prowadzenia badań za pomocą bardzo różnorodnych technik i dojrzałości naukowej Autorki.

Jak wspomniałem wcześniej, przedstawiona rozprawa, zatytułowana „**Interakcja *Mycobacterium tuberculosis* z ludzkim surowiczym amyloidem A**” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymagania dotyczące rozpraw doktorskich zawarte w Ustawie o stopniach



naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw Stopni Naukowych w Dyscyplinie Nauki Biologiczne z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Malwiny Kawki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na bardzo szeroki zakres przeprowadzonych badań, wartość uzyskanych i rzetelnie zinterpretowanych wyników, zwracam się także z wnioskiem o jej wyróżnienie.

Z wyrazami szacunku,

dr hab. Maciej Cedzyński, prof. IBM PAN


Kierownik
Pracowni Immunobiologii Zakazań