



WYDZIAŁ
BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA



Uniwersytet
ŁÓDZKI

2015-07-02

Dr hab. Katarzyna Lisowska, prof. nadzw. UŁ
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Biotechnologii
Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

Łódź, 29.06.2015 r.

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Darii Leszczyńskiej pt.

„Wpływ czynników hamujących lub indukujących wewnątrzkomórkową agregację białek na powstawanie bakterii tolerujących antybiotyki“

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana przez mgr Darię Leszczyńską w Katedrze Biochemii UG pod kierunkiem dr hab. Ewy Laskowskiej, prof. UG przy współpracy z prof. dr hab. Anną Kędzia. Dotyczy bardzo istotnego, zarówno z punktu poznawczego jak i praktycznego, zagadnienia powstawania komórek bakterii tolerujących antybiotyki.

Obecnie jednym z ważniejszych problemów zdrowia publicznego jest zwalczanie lekoopornych infekcji, powodowanych przez bakterie odporne na antybiotyki. Dużym zagrożeniem jest także powstawanie komórek tolerujących antybiotyki. Komórki przetrwałe, stanowiące nieliczną grupę komórek tolerujących antybiotyki, mogą pojawiać się w różnych populacjach bakteryjnych m.in w biofilmie. Komórki te mogą być przyczyną nawracających infekcji bakteryjnych, szczególnie w tych przypadkach, którym towarzyszy powstawanie biofilmu. Celem badań podjętych w pracy było zbadanie czynników, które hamują, bądź stymulują powstawanie bakterii tolerujących antybiotyki. Poznanie mechanizmów warunkujących tolerancję bakterii na antybiotyki, a w szczególności czynników, które powodują ponowną ich wrażliwość, może ułatwić opracowanie skutecznych terapii zwalczania lekoopornych infekcji. Biorąc pod uwagę fakt, że lekooporne infekcje często związane

z tworzeniem biofilmu stanowią rosnący problem medyczny i ekonomiczny, podjęte przez Doktorantkę badania są w pełni uzasadnione.

Dysertacja Pani mgr Darii Leszczyńskiej obejmuje 90 stron, z podziałem tekstu na rozdziały, o układzie typowym dla prac doświadczalnych. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę, że mógłby zostać wyodrębniony rozdział wnioski końcowe, które w moim przekonaniu są ważnym elementem pracy. Wskazują bowiem na umiejętności Doktoranta do formułowania wniosków z przedstawionych badań, nie stanowią jedynie syntetycznego podsumowania uzyskanych wyników. Praca ilustrowana jest 36 rycinami, 2 tabelami, zawiera cytaty ze 124 pozycji literaturowych. Tytuł pracy odpowiada przedstawionemu zakresowi badań.

Pracę doktorską mgr Darii Leszczyńskiej otwiera **Streszczenie** w języku polskim i angielskim, które jest dobrym podsumowaniem przeprowadzonych wielokierunkowych badań oraz uzyskanych, najważniejszych rezultatów.

W napisanym w zwarty, syntetyczny sposób **Wstępie** pracy Doktorantka scharakteryzowała komórki przetrwałe, kładąc szczególny nacisk na mechanizmy tworzenia tych komórek. Zwróciła uwagę na istnienie różnego rodzaju komórek przetrwałych, posiadających odrębne fenotypy i wynikające z tego różne mechanizmy tolerancji na antybiotyki. Następnie dokonała przeglądu aktualnej literatury, w której opisano czynniki stymulujące przekształcanie się komórek przetrwałych ponownie w komórki wrażliwe na leki. Opisała także zależność pomiędzy obecnością związków osmotycznie czynnych, a procesem agregacji białek. Cechą charakterystyczną bowiem starzejących się hodowli bakteryjnych, oprócz obecności komórek przetrwałych jest agregacja endogennych białek w komórkach bakteryjnych. Na szczególne podkreślenie zasługuje cytowanie przez mgr Leszczyńską najnowszej literatury w tym zakresie. Moim zdaniem Doktorantka wykazała się odpowiednią wiedzą w zakresie przedstawionej problematyki badawczej. Zagadnienia przedstawione we wstępie stanowią dobry podkład teoretyczny do przeprowadzonych badań.

Cel pracy został przez Doktorantkę sformułowany w formie opisowej, zakłada sprawdzenie związku pomiędzy poziomem powstawania komórek tolerujących antybiotyki, a agregacją białek w stacjonarnych hodowlach *E. coli*. Doktorantka założyła, że czynniki indukujące agregację białek będą stymulowały powstawanie bakterii przetrwałych, a hamowanie agregacji białek przez związki osmotycznie czynne będzie powodowało obniżenie poziomu tych komórek. Ponadto Autorka zaplanowała sprawdzenie wpływu innych czynników na proces powstawania komórek przetrwałych, takich jak poziom utlenionych białek, komórek VBNC czy stężenie ATP.

W rozdziale **Materiały i Metody** zwięźle przedstawiono warunki hodowli drobnoustrojów i metody oznaczania poziomu komórek przetrwałych, a także metody izolacji agregatów białkowych. W wyczerpujący, aczkolwiek bardzo syntetyczny sposób opisano także stosowane metody analityczne. Procedury zastosowane przez Autorkę wskazują na dobry warsztat biochemiczny i znajomość nowoczesnych metod analitycznych.

Zasadniczy rozdział pracy, **Wyniki** przeprowadzonych badań przedstawiono w sposób czytelny i jasny. Prezentacja ich zajmuje 32 strony wydruku. Dane eksperymentalne zostały udokumentowane wykresami przedstawiającymi krzywe wzrostu, poziom agregatów białkowych i komórek przetrwałych czy zdjęciami elektroforegramów. Dodatkowo przy niektórych wykresach Autorka zamieściła schemat doświadczenia, co znacznie ułatwia czytelnikowi analizę danych. Zwrócę tutaj uwagę na kilka najważniejszych osiągnięć Autorki:

1. Wykazanie, że tworzenie komórek przetrwałych jest związane z agregacją białek w hodowlach *E. coli*.
2. Stwierdzenie, że indukcja bądź hamowanie agregacji białek w komórkach *E. coli* przez związki osmotycznie czynne (trehaloza, betaina, glukoza, glicerol) jest zależne od ich stężenia.
3. Wykazanie, że liczba komórek tolerujących antybiotyki w stacjonarnych hodowlach *E. coli* nie jest zależna od poziomu utlenionych białek, stężenia ATP oraz poziomu bakterii VBNC.
4. Stwierdzenie, że związki osmotycznie czynne, a w szczególności trehaloza mogą uwrażliwiać wyizolowane komórki przetrwałe *E. coli* na wybrane antybiotyki (kanamycynę i ampicilinę). Także endogenna trehaloza *E. coli* hamuje tworzenie komórek przetrwałych w trakcie stacjonarnej fazy wzrostu.
5. Wykazanie, że badane związki osmotycznie czynne powodują obniżenie poziomu komórek przetrwałych w hodowlach *Pseudomonas aeruginosa*.
6. Opracowanie nowej metody izolacji bakterii przetrwałych z wykorzystaniem wirowania komórek *E. coli* poddanych szokowi cieplnemu w gradiencie gęstości Percollu.

W tym miejscu z obowiązku recenzenta przedstawiam uwagi i zapytania do tej części pracy:

1. Doktorantka stwierdza, że wyższe stężenia osmolitów indukują agregację białek i wzrost poziomu komórek przetrwałych. W przypadku zastosowania wysokich stężeń trehalozy nie zawsze obserwowano wzrost poziomu komórek przetrwałych (hodowle *P. aeruginosa* i uropatogennych szczepów *E. coli* oraz szczepu *E. coli* MC4100).

2. W przypadku betainy, nie tylko wysokie stężenia ale również niskie stężenia (0,05-0,1) powodowały wzrost poziomu agregacji białek i komórek przetrwałych. Poproszę o komentarz w tej kwestii.

Chciałabym podkreślić, że powyższe uwagi mają charakter dyskusyjny i nie wpływają na ogólną wysoką ocenę tej części pracy.

Dyskusja to kolejny dobrze napisany rozdział pracy. Dyskusja została poprowadzona w sposób bardzo systematyczny, poprzez analizę każdej grupy wyników i skonfrontowanie ich z jak najbardziej aktualnymi doniesieniami literaturowymi. Rozdział ten świadczy o bardzo dobrej znajomości tematyki badawczej, formułowania i weryfikacji hipotez oraz umiejętności krytycznego spojrzenia na własne wyniki.

Literatura, w liczbie 124 pozycji, została bardzo dobrze wyselekcjonowana ze światowego piśmiennictwa, zawiera zarówno prace oryginalne, jak i przeglądowe, pochodzące w ponad 70% z ostatnich dziesięciu lat.

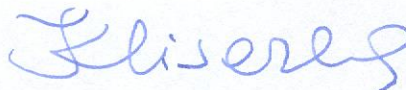
Podsumowanie

Przedstawiona do oceny praca doktorska wpisuje się w nurt badań związanych z poszukiwaniem nowych rozwiązań w terapii lekoopornych infekcji. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki bez wątpienia wzbogacają wiedzę na temat czynników wpływających na powstawanie komórek przetrwałych. Pracę wyróżnia nowatorska koncepcja, a w przyszłości zapewne użyteczność praktyczna otrzymanych wyników badań. Doktorantka wykazała się dobrym przygotowaniem teoretycznym w zakresie badanych zagadnień oraz wysokim stopniem samodzielności naukowej i eksperymentalnej.

Podsumowując moją ocenę, uważam, że praca jest bardzo wartościowa. Została napisana poprawnym językiem naukowym. W tekście występują nieliczne nieścisłości czy błędy związane z edycją tekstu, które zdarzają się nawet w najlepiej przygotowanej pracy np. Ryc. 3. brak odniesienia w legendzie dla numeru 5 i 6. Wszystkie te drobne usterki mają charakter formalny i nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, którą oceniam wysoko. O wysokim poziomie merytorycznym świadczy fakt, iż część uzyskanych przez Doktorantkę wyników została opublikowana w dwóch czasopismach z listy JCR (PloS One i Microbiology), w jednym z nich (PloS One IF=3,23) Doktorantka jest pierwszą Autorką. Stwierdzam, że opiniowana rozprawa doktorska mgr Darii Leszczyńskiej zawiera istotne elementy nowości naukowej.

Wniosek końcowy

Pod względem celowości podjęcia tematu, a także wykorzystanych metod i interpretacji uzyskanych wyników praca w pełni spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora. **Biorąc powyższe pod uwagę wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Darii Leszczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Dr hab. Katarzyna Lisowska, prof. nadzw.UŁ