



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Mikrobiologii

Dr hab. Joanna Koziel, prof. UJ

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani magister Klaudyny Krause zatytułowanej „Wpływ naturalnie występujących izotiocyjanianów na wirulencję *Vibrio cholerae*”

Przedstawiona do oceny dysertacja została wykonana pod kierunkiem pani promotor prof. dr hab. Agnieszki Szalewskiej-Pałasz oraz pana promotora pomocniczego dr Dariusza Nowickiego w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii, Wydziału Biologii, Uniwersytetu Gdańskiego.

Celem przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej była analiza wpływu wybranych izotiocyjanianów, będącymi pochodnymi siarkowych glikozydów, glukozynolanów na wirulencję bakterii gatunku *Vibrio cholerae*. Doktorantka podążała zatem w swoich badaniach atrakcyjnym nurtem poszukiwania nowych związków o charakterze antybakteryjnym, które byłyby alternatywą lub wspomagałyby dostępne metody terapeutyczne. Uzasadnieniem podjęcia takich badań są doniesienia epidemiologiczne, wskazujące na wzrastającą liczbę antybiotykoopornych szczepów bakteryjnych, w tym *Vibrio cholerae*, których eliminacja u zakażonych pacjentów stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny. Wśród związków analizowanych pod kątem powyższych zastosowań popularność zdobywają metabolity roślin, które były przedmiotem badań naukowych prowadzonych przez Doktorantkę. Należy pamiętać, że istotnym elementem poszukiwania nowych związków o charakterze antybakteryjnym w świetle ich późniejszego terapeutycznego zastosowania jest rzetelne poznanie molekularnego mechanizmu ich działania, czego podjęła się pani Krause w swojej pracy badawczej. W związku z powyższym, wybór tematu

przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej uważam za bardzo cenny naukowo i wpasowujący się w aktualne ścieżki badawcze.

Rozprawa doktorska pani Krause została napisana w klasycznym układzie będąc podzielona na rozdziały. Liczy 172 strony i zawiera wszystkie elementy wymagane dla tego typu prac, czyli streszczenia, wstęp, opis metod, wyniki przeprowadzonych badań, dyskusję, podsumowanie, spis rysunków i tabel oraz spis literatury, który obejmuje 325 pozycji. Pracę wieńczy opis dorobku naukowego Doktorantki, w tym lista publikacji i informacje o uzyskanych nagrodach.

Obszerny wstęp szczegółowo wprowadza czytelnika w tematykę pracy badawczej. Doktorantka opisała w nim wszystkie zagadnienia kluczowe w dalszej lekturze pracy. Znajdziemy tam szczegółowy opis patogenezы *Vibrio cholerae*, czynników zjadliwości tego drobnoustroju i mechanizmów regulacji jego wirulencji. Doktorantka nie pominęła także we wprowadzeniu omówienia używanych związków i ich dotychczasowo opisaney antybakteryjnej roli czy mechanizmu działania. Na uwagę zasługuje bardzo dobra konstrukcja tego rozdziału oraz przystępna forma, okraszona dobrze zaprojektowanymi rysunkami i tabelami, które ułatwiają zrozumienie tekstu i systematyzują przyswajane informacje. Praca ta wskazuje na doskonałe przygotowanie merytoryczne pani Krause do realizacji badań eksperymentalnych w wiodącej dla niej tematyce badawczej. Cel pracy został przedstawiony bardzo czytelnie i zakładał analizę antybakteryjnych właściwości badanych izotiocyjanianów wraz z poznaniem molekularnego mechanizmu ich działania. Doktorantka, założyła także ocenę wpływu badanych związków na regulację ekspresji genów zjadliwości *V. cholerae*, próbując tym samym poszerzyć naszą wiedzę o biologicznych skutkach ekspozycji tego chorobotwórczego mikroorganizmu na stosowane związki. Doktorantka rzetelnie opisała metody stosowane w swoich badaniach, dzięki czemu możliwym jest samodzielne odtworzenie eksperymentów. Wyniki przedstawiono w formie 4 Tabel i 34 rycin. Kolejność przedstawiania wyników przeprowadzanych doświadczeń w ocenianej rozprawie jest logiczna. Czytelnik swobodnie podąża tokiem realizacji prac badawczych. Uzyskane wyniki

zostały bardzo dobrze opisane i właściwie zinterpretowane. Tam, gdzie to było możliwe przeprowadzono analizę statystyczną. Dyskusja wyników została napisana poprawnie, w oparciu o dostępne, w tym najnowsze dane literaturowe. Znaleźć w niej wprawdzie można sporo powtórzeń z opisu części wyników, ale oceniam ją wysoko, bowiem znalazłam w niej odpowiedzi na większość nurtujących mnie pytań, jakie nasuwały się podczas lektury wcześniejszych części pracy. Bardzo cennym rozdziałem ocenianej rozprawy jest „Podsumowanie”, w którym Doktorantka przedstawiła syntetycznie najistotniejsze osiągnięcia swojej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, recenzowana praca doktorska rzetelnie udokumentowała antybakteryjne właściwości badanych izotiocyjanianów. Do najważniejszych odkryć tej pracy należy zaliczyć wyjaśnienie molekularnego mechanizmu ich działania, w tym procesu indukcji odpowiedzi ściślej związanej z wirulencją badanego gatunku. Wykazane przez Doktorantkę systemowe działanie izotiocyjanianów na zjadliwość *V. cholerae* wraz z udokumentowanym brakiem toksyczności tych związków na komórki ludzkie zachęca do kontynuacji badań na modelach *in vivo*, które jednoznacznie odpowiedzą na pytanie o możliwość ich terapeutycznego wykorzystania. Zatem, zaprezentowane w pracy wyniki oceniam wysoko i uważam, że są cennym przyczynkiem do dalszych badań.

Lektura niniejszej pracy nasuwa kilka pytań i uwag do autorki:

1. Na podstawie jakiego klucza dokonano wyboru izotiocyjanianów do badań?
2. W dyskusji można znaleźć porównanie stężeń innych izotiocyjanianów aktywnych biologicznie. Cennym byłoby zastosowanie w trakcie prowadzonych badań wybranego spośród nich, najszerzej opisanego związku jako kontroli pozytywnej. W których badaniach Doktorantka wprowadziła taką kontrolę?
3. Strona 82 – Ryc.13 C – czy podany procent zahamowania syntezy RNA 57, 80 i 91% jest przedstawiony na wykresie?
4. Strona 85 - Czy Doktorantka mogłaby zaproponować inne metody poza stosowanymi

w pracy, które można by wykorzystać do potwierdzenia braku uszkodzenia bakteryjnych błon komórkowych? Jaki jest mechanizm przenikania badanych izotiocyjanianów do wnętrza komórek bakteryjnych?

5. Czy analiza statystyczna na Rycinie 19 była wykonywana względem kontroli (K), czy też względem próbek traktowanych hydroksyamatem seryny (SHX) ?
6. Czy Doktorantka analizowała potencjalnie synergistyczny wpływ badanych związków, lub ich kombinację z antybiotykami?
7. Biorąc pod uwagę proponowane zastosowanie terapeutyczne badanych związków cennym byłoby określenie specyficzności ich działania względem gatunków patogennych w odróżnieniu od niepatogennych, co jest istotne w świetle zachowania równowagi mikrobiomu jelit.
8. Badane związki nie są toksyczne względem badanych linii komórkowych, jednakże cytowane prace wskazują, że mogą one regulować proces śmierci komórkowej, w tym indukować apoptozę (strona 37). Czy potencjalna regulacja innych rodzajów śmierci komórkowej, w tym autofagii przez badane związki mogłaby odgrywać rolę w zjadliwości *V. cholerae*, szczególnie związanej z działaniem toksyn tego patogenu?
9. W pracy można doszukać się drobnych niedociągnięć, w tym pojedyncze błędy językowe, gramatyczne i interpunkcyjne. Brak informacji o producentach wybranych odczynników, materiałów (3.4.14. oraz 3.4.15.). Podział rozdziału Materiały na szereg podrozdziałów jest dość osobliwy i wydaje się zbędny. Należy jednak podkreślić, że cała rozprawa została przygotowana z dużą starannością.

Podsumowanie

Chciałabym w swojej recenzji zaznaczyć, że praca pani Krause ma wysoką wartość naukową, a rozprawa jest przemyślaną, solidnie przygotowaną i spójną tematycznie dysertacją. Założone cele, możliwe do osiągnięcia dzięki wszechstronnemu warsztatowi metodycznemu, bogatej metodyce mikrobiologicznej, zastosowaniu technik genetyki

molekularnej, biochemii i biologii komórki zostały w pełni zrealizowane. Uzyskane wyniki stanowią cenny wkład w poznanie roli naturalnie występujących związków pochodzenia roślinnego o charakterze antybakteryjnym. Pragnę ponadto podkreślić, że załączona dokumentacja dowodzi, że Doktorantka jest osobą bardzo aktywną naukowo a lista publikacji z jej udziałem świadczy o jej zaangażowaniu w liczne projekty badawcze nie zaś ograniczenie do swojej pracy doktorskiej. Z wykazu przedstawionych publikacji wynika bowiem, że jest ona współautorką ośmiu innych publikacji naukowych, co jest znaczącym dorobkiem naukowym. Świadczy to o pasji Doktorantki do pracy naukowej. Ponieważ przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, zatem wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Klaudyny Krause do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uważam również, że praca doktorska kwalifikuje się do wyróżnienia.



Dr hab. Joanna Koziel, prof. UJ