



Dr hab. med. Bartosz Słomiński  
Katedra i Zakład Immunologii Medycznej  
Wydział Lekarski  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. Dębinki 1  
80-211 Gdańsk

Gdańsk, 09.09.2022

### Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr Klaudyny Krause

pt. „Wpływ naturalnie występujących izotiocyjanianów na wirulencję *Vibrio cholerae*”

Cholera należy do tych zakaźnych chorób jelitowych, które ze względu na częstość występowania i liczbę ofiar odegrały największą rolę w historii ludzkości. Generalnie, choroby szerzące się drogą pokarmową, infekcje układu pokarmowego oraz zatrucia pokarmowe, to drugi po zakażeniach górnych dróg oddechowych najczęstszy problem zdrowotny ludzi na całym świecie. Czynnikiem etiologicznym cholery jest *Vibrio cholerae*, przecinkowiec cholery, Gram-ujemna, posiadająca zdolność ruchu bakteria, która jest naturalnym składnikiem ekosystemów morskich. U ludzi, po zakażeniu najczęściej drogą fekalno-oralną, może powodować biegunkę prowadzącą w ciężkiej postaci do odwodnienia, wstrząsu hipowolemicznego i zgonu w ciągu zaledwie kilkunastu godzin. Dzięki zmianom klimatu, wywołująca nieustanne pandemie cholera, cały czas poszerza swój zasięg występowania, a powszechna mobilność ludzi i możliwość zachorowania po spożyciu zanieczyszczonej żywności sprawia, że *Vibrio cholerae* jest realnym zagrożeniem nie tylko dla ludności endemicznych rejonów jego występowania w Afryce, Azji i Ameryce Południowej, ale także i dla mieszkańców reszty świata.

Leczenie objawowe zakażeń *Vibrio cholerae* jest stosunkowo proste i polega na nawadnianiu oraz uzupełnianiu elektrolitów. Natomiast w leczeniu farmakologicznym stosuje się antybiotyki, przede wszystkim z grupy tetracyklin. Ostatnimi czasy obserwuje się lawinowy wzrost izolatów przecinkowca cholery opornych na te związki, co jest główną przyczyną niepowodzenia leczenia. Z uwagi na gwałtownie postępujący proces rozwoju lekooporności mikroorganizmów poszukuje się nowych sposobów walki z bakteriami patogennymi odpornymi na znane chemioterapeutyki. Jednym z takich podejść jest poszukiwanie związków, które umożliwiłyby choremu organizmowi zwiększenie szans na uporanie się z infekcją. Miałyby to nastąpić poprzez wyłączenie albo przynajmniej znaczne ograniczenie syntezy czynników wirulencji bakterii będących źródłem zakażenia. W ten nurt badań

idealnie wpisuje się przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Klaudyny Krause pt. „Wpływ naturalnie występujących izotiocyjanianów na wirulencję *Vibrio cholerae*”. Znaczenie naukowe i praktyczne tej tematyki nie pozostawia żadnych wątpliwości i jej podjęcie jest jak najbardziej uzasadnione.

Prezentowana do oceny rozprawa została wykonana w Katedrze Genetyki Molekularnej Bakterii Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem promotora, Pani prof. dr hab. Agnieszki Szalewskiej-Pałasz oraz dra Dariusza Nowickiego jako promotora pomocniczego. Głównym celem rozprawy było zbadanie wybranych izotiocyjanianów na rozwój i wirulencję przecinkowca cholery. Szczegółowo cel ten był realizowany poprzez określenie oddziaływania tych związków na rozwój *Vibrio cholerae*, a także opisanie ich antybakteryjnego mechanizmu działania oraz wpływu na ekspresję genów wirulencji i toksyczność wobec komórek eukariotycznych. Tak postawiony cel naukowy należy uznać za istotny, a jego realizacja odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim. Niewątpliwą korzyścią dla Doktorantki był też fakt, iż kierowana przez Panią prof. Agnieszkę Szalewską-Pałasz jednostka ma ugruntowany dorobek naukowy także w zakresie tematyki ocenianej rozprawy doktorskiej. Doktorantka zatem mogła skorzystać i, co postaram się wykazać poniżej, z powodzeniem skorzystała z solidnej wiedzy i warsztatu badawczego Zespołu.

Oceniana rozprawa ma klasyczny układ dla tego typu prac eksperymentalnych, liczy 172 strony i podzielona jest na właściwe rozdziały. Tytuł dysertacji w pełni odpowiada zawartej w niej treści i postawionym do rozwiązania problemom badawczym. Informacje zawarte we „Wstępie” świadczą o dobrym przygotowaniu teoretycznym Doktorantki, która wykazała się znajomością literatury przedmiotu i potrafiła przedstawić złożone zagadnienia w przejrzysty sposób, ilustrując je odpowiednio przygotowanymi rycinami. Rozdział „Materiały” opisuje wyczerpująco zastosowane odczynniki i aparaturę oraz użyty w doświadczeniach szczep bakterii. Opis metod jest jasny i na tyle precyzyjny, aby możliwe było ewentualne powtórzenie przeprowadzonych w pracy eksperymentów. Na podkreślenie zasługuje fakt wykorzystania nowoczesnych technik badawczych biologii molekularnej i obrazowania mikroskopowego, obok klasycznych analiz mikrobiologicznych czy biochemicznych. Zastosowanie tak szerokiej gamy różnorodnych metod niewątpliwie wymagało od Doktorantki dużego zaangażowania i pracowitości, a ich właściwe wykorzystanie pozwoliło uzyskać cenne i znaczące wyniki, które zostały starannie opracowane i przedstawione w kolejnym rozdziale dysertacji, stanowiącym zasadniczą część rozprawy. Rozdział „Wyniki” odzwierciedla realizację poszczególnych zadań badawczych postawionych przez Doktorantkę na początku pracy. Jest on napisany w sposób czytelny i uporządkowany, a zaprezentowana dokumentacja w formie rycin, zdjęć i tabel nie budzi większych zastrzeżeń. Na uwagę zasługuje fakt, iż wszystkie kluczowe wartości eksperymentalne wyznaczono na podstawie co najmniej trzech niezależnych pomiarów i wszędzie tam, gdzie było to uzasadnione, przeprowadzono odpowiednią analizę statystyczną, która istotnie potwierdza

zaobserwowane różnice, co pozwala na ich prawidłową interpretację. „Dyskusja” podsumowuje uzyskane wyniki w świetle najnowszych danych literaturowych oraz zakładanego celu pracy. Lektura tego rozdziału przekonuje mnie, że Doktorantka jest w pełni dojrzałym badaczem zdolnym do przeprowadzenia serii doświadczeń, a także właściwej ich interpretacji oraz przedstawienia na tle aktualnej wiedzy. Ostrożnie wyciąga też wnioski z wyników eksperymentów, unikając tym samym ich nadinterpretacji. Piśmiennictwo, na które powołuje się Autorka liczy 324 pozycje, głównie anglojęzyczne i z ostatnich lat, co potwierdza aktualność tematu będącego przedmiotem dysertacji. Pracę kończy „Podsumowanie”, które stanowi zwięzłą prezentację wniosków w kontekście postawionego celu rozprawy. Należy w tym miejscu podkreślić, iż cel ten został bez wątpienia osiągnięty, a uzyskane wyniki oprócz aspektu poznawczego mają też potencjalny charakter aplikacyjny – analizowane w tej pracy izotiocyaniany są obiecującymi związkami, które mogłyby w przyszłości znaleźć zastosowanie w leczeniu zakażeń *Vibrio cholerae*.

Niezależnie od mojej pozytywnej oceny rozprawy doktorskiej, z obowiązku recenzenta nie mogę pominąć pewnych uwag krytycznych. Ponadto, przy tak obszernej rozprawie i dużej ilości wyników doświadczeń, muszą się także pojawić pytania i wątpliwości, które przedstawiam poniżej.

1. Mimo iż język pracy jest ogólnie poprawny, to Autorce nie udało się uniknąć pewnych niefortunnych sformułowań, wyrażeń żargonowych oraz błędów literowych czy stylistycznych, których w manuskrypcie jest stosunkowo dużo.
2. We „Wstępie” zabrakło bardziej szczegółowych informacji o chromosomie bakteryjnym, który w przypadku *Vibrio cholerae* jest dosyć nietypowy.
3. We „Wstępie” (str. 16) autorka pisze, że biegunka występująca u zakażonych przecinkowcem cholery prowadzi do wstrząsu hipotensyjnego, podczas gdy chodzi o wstrząs hipowolemiczny.
4. W rozdziale „Materiały” brakuje charakterystyki wykorzystanych w pracy linii komórkowych HeLa i Vero.
5. Tytuł rozdziału 1.2. (str. 17) brzmiący „Patogeneza *Vibrio cholerae*” jest niepoprawny. Słowo „patogeneza” odnosi się do mechanizmu powstawania i rozwoju choroby, a nie czynnika ją wywołującego. Poprawnie byłoby „Patogeneza cholery” albo „Patogeneza zakażeń *Vibrio cholerae*”.
6. W rozdziale o odpowiedzi ścisłej u *Escherichia coli* (str. 27) Doktorantka pisze „Odpowiedź ścisłą opisano dla bakterii modelowych, jednakże została ona stwierdzona u wszystkich wolno żyjących bakterii” (podkreślenie moje), co nie może być prawdą, bo nawet nie znamy ułamka wszystkich wolno żyjących bakterii, a co dopiero wyrokować o ich fizjologii.
7. Tabela nr 3 (str. 60) obrazująca schemat badania biofilmu jest w tym miejscu mało czytelna. Lepiej byłoby ją umieścić w odpowiedniej pozycji rozdziału „Wyniki”.

8. Tytuł podrozdziału 4.9.2. (str. 64) sugeruje, że linia Vero jest pochodzenia ludzkiego, podczas gdy jest to linia komórkowa wywodząca się z nerki jednego z gatunków małp afrykańskich.
9. Wartości minimalnego stężenia bakteriobójczego oraz minimalnego stężenia bakteriostatycznego podaje się z reguły w mg/l, a nie mg/ml, co też później stwarza problemy, kiedy Doktorantka porównuje uzyskane przez siebie wyniki z danymi literaturowymi (str. 122 i 123).
10. Powyższe wartości wyznaczono nie na podstawie podwójnych rozcieńczeń, jak pisze Doktorantka (str. 72), tylko seryjnych.
11. Na rycinie 10 (str. 75), obrazującej żywotność komórek *Vibrio cholerae* po traktowaniu hodowli badanymi związkami, brak danych dla sulforafanu o stężeniu 10 x MIC.
12. Na rycinach 12 i 13 (str. 79 i 81) obrazujących syntezę kwasów nukleinowych brak danych dla niektórych stężeń użytych izotiocyjanianów.
13. Na str. 82 Doktorantka analizuje wyniki hamowania syntezy RNA w komórkach *Vibrio cholerae* po traktowaniu hodowli badanymi izotiocyjanianami i stwierdza, że jego poziom był taki sam dla badanych stężeń, oczywiście odpowiednio różny dla poszczególnych związków. Natomiast z ryciny 13, obrazującej ten eksperyment, wynika, że był podobny, ale nie identyczny. Również tutaj brak danych dla niektórych stężeń użytych izotiocyjanianów.
14. Na rycinie 19 (str. 90) Doktorantka pokazuje poziom alarmonu ppGpp w komórkach *Vibrio cholerae* po inkubacji z badanymi związkami. W przypadku izotiocyjanianu fenetylu spada on ze wzrostem jego stężenia, natomiast rośnie w przypadku sulforafanu. Czy ma Pani jakiś pomysł na możliwe wyjaśnienie tej, moim zdaniem, ciekawej obserwacji?
15. Dlaczego nie zbadano wpływu izotiocyjanianu benzylu na ekspresję genów wirulencji oraz ekspresję genów bakteriofaga CTX $\phi$  a także na poziom komórkowy toksyny cholery i żywotność eukariotycznych linii komórkowych?
16. Stwierdzenie Doktorantki (str. 114) - „uzyskane wyniki wskazują, że związki nie wpływają na żywotność linii komórkowych, a co za tym idzie, są bezpieczne jako potencjalne związki terapeutyczne” (podkreślenie moje) jest zbyt daleko idącą spekulacją.
17. Warto byłoby zbadać wpływ izotiocyjanianów i, co ważniejsze, lizatów bakteryjnych hodowanych w ich obecności, na komórki układu odpornościowego (np. wyizolowane jednojądrzaste komórki krwi obwodowej). Byłoby to ciekawe choćby z uwagi na fakt, iż zakażenie *Vibrio cholerae* nie powoduje klinicznie jawnego stanu zapalnego a także dosyć nietypowo stymuluje układ odpornościowy, indukując ścieżki odpowiedzi wrodzonej charakterystyczne dla infekcji wirusowych, a nie bakteryjnych. To oczywiście wybiega poza tematykę tej pracy, ale jako immunolog nie mogłem się tutaj oprzeć tej sugestii.

Lista powyższych uwag, wątpliwości i pytań może się wydawać długa, ale absolutnie nie umniejszają one wartości merytorycznej dysertacji. Powtórzę, przedłożoną mi do recenzji pracę doktorską Pani Klaudyny Krause zaliczam do interesującego i wartościowego opracowania, w którym przedstawiono i przekonująco uzasadniono tezy badawcze i która ewidentnie wnosi istotne elementy nowości naukowej.

Zasadniczym zadaniem recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku Pani Klaudyny Krause nie można jednak pominąć jej całego dorobku naukowego, który obejmuje współautorstwo 9 wysoko punktowanych prac. Co bardzo istotne dla ocenianej dysertacji, większość zawartych w niej wyników została opublikowana w uznanym czasopiśmie naukowym (*International Journal of Molecular Sciences*; IF = 6.208) co świadczy o nowości i wysokim poziomie przeprowadzonych badań. Trzeba też podkreślić, iż Pani Klaudyna Krause jest pierwszą autorką tej publikacji. Podsumowując, zarówno wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej i już częściowo opublikowane, jak i pozostały dorobek doktorantki, niezwiązany z tematyką dysertacji, oceniam bardzo wysoko.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wszelkie wymogi dotyczące rozpraw doktorskich 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 (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.), w zw. z art. 179. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.). Dlatego też zwracam się do Wysockiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani Klaudyny Krause do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wartość naukową oraz potencjał aplikacyjny uzyskanych wyników wnioskuję o stosowne wyróżnienie dysertacji.

  
Bartosz Słomiński

