



WYDZIAŁ BIOLOGII  
I OCHRONY  
ŚRODOWISKA  
Uniwersytet Łódzki

Łódź, 31 sierpnia 2021 r.

Prof. dr hab. Antoni Różalski  
Katedra Biologii Bakterii  
Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

### Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr Katarzyny Marceliny Dworaczek**  
pt. „Strukturalna i immunochemiczna charakterystyka polisacharydów O-swoistych  
*Aeromonas* sp. serogrupy O6”

Rozprawa doktorska mgr K.M. Dworaczek została wykonana w Katedrze Genetyki i Mikrobiologii w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod opieką dr hab. Anny Turskiej-Szewczuk, prof. UMCS jako Promotora.

Obiektem badań recenzowanej pracy doktorskiej są pałeczki Gram-ujemne z rodzaju *Aeromonas* żyjące w środowisku naturalnym w wodach słodkich i słonych oraz w glebie. Wśród nich wyróżnia się mezofilne bakterie ruchliwe, zdolne do wzrostu w temperaturze 35-37°C, a także psychrofilne formy nieruchliwe, preferujące niższą temperaturę do rozwoju 22-25°C. Obecna klasyfikacja rodzaju *Aeromonas*, uwzględniająca wyniki badań genetycznych i molekularnych, obejmuje 36 gatunków. Wśród nich są gatunki wywołujące zakażenia ryb hodowlanych oraz ludzi. Wyróżnia się 3 typy infekcji ryb: MAI (Motile *Aeromonas* Infection) ze zmianami na płetwach i skórze, MAS (Motile *Aeromonas* Septicaemia) – posocznicę krwotoczną i wrzodzenie (chorobę wrzodową). U ludzi dochodzi do zakażenia po spożyciu skażonej wody lub zakażonych ryb czy skorupiaków, bądź produktów pochodzenia zwierzęcego. Zakażenia u ludzi mają miejsce u osób starszych, u osób z obniżoną odpornością oraz małych dzieci i obejmują infekcje ran, tkanki łącznej, układu pokarmowego, prowadzą też do uszkodzenia dróg żółciowych oraz wątroby, a także bakteriemii. Do czynników warunkujących chorobotwórczość pałeczek *Aeromonas*, jak wszystkich bakterii Gram-ujemnych, zaliczamy lipopolisacharyd (LPS, endotoksynę). Wszystkie trzy regiony LPS – lipid A, region rdzeniowy i część O-swoista (OPS, antygen O) były już badane u wybranych szczepów *Aeromonas* sp. Zróznicowanie części O-swoistej LPS tych pałeczek

stanowi podstawę ich klasyfikacji antygenowej. Obecnie schemat tej klasyfikacji obejmuje 97 serogrup ustalonych na podstawie badań Sakazaki i Shimady oraz Thomasa i współpracowników oraz tzw. tymczasowych grup serologicznych (TGO, Provisional Groups) opartych na zróżnicowaniu antygeny O szczepów *Aeromonas* sp. izolowanych od ryb hodowanych w Polsce. Ustalono serogrupy dominujące tj. te, które obejmują szczepy *Aeromonas* najczęściej izolowane w Polsce z przypadków zakażeń karpia z przebiegiem MAI/MAS. Wśród tych serogrup wymieniana się O6. Szczepy zaliczone do tej serogrupy stały się obiektem badań mgr K.M. Dworaczek w doktoracie, których celem było ustalenie struktury chemicznej oraz badania immunochemiczne ich LPS. Przewiduje się, iż wyniki tych badań zostaną wykorzystane do opracowania szczepionki przeciwko bakteriom *Aeromonas* wywołujących MAI/MAS wśród karpia hodowanych w Polsce, co będzie stanowiło alternatywą do antybiotykoterapii metodę ochrony ryb szczególnie w gospodarstwach rybackich.

Cele szczegółowe rozprawy doktorskiej mgr K.M. Dworaczek objęły:

- 1) Badania immunochemiczne i serologiczne LPS wyizolowanego ze szczepu referencyjnego dla serogrupy O6 *A. hydrophila* JCM 3968 oraz szczepu *A. veroni* bv. *sobria* K557, izolatu od karpia.
- 2) Analizę chemiczną i strukturalną poszczególnych regionów LPS tych bakterii.
- 3) Wskazanie antygenów (szczepów) jako potencjalnych składników szczepionki zdolnej wywołać odpowiedź protekcyjną u karpia w Polsce.

Wyniki rozprawy doktorskiej mgr K.M. Dworaczek zostały opublikowane w dwóch oryginalnych pracach naukowych i jednym artykule przeglądowym (rozdział w monografii):

#### **Publikacja 1**

**Dworaczek Katarzyna**, Kurzylewska Maria, Karaś Magdalena A., Janczarek Monika, Pękala-Safińska Agnieszka, Turska-Szewczuk Anna. A unique sugar L-perosamine (4-amino-4,6-dideoxy-L-mannose) is a compound building two O-chain polysaccharides in the lipopolysaccharide of *Aeromonas hydrophila* strain JCM 3968, serogroup O6. *Marine Drugs*, 2019, 17(5), 254, DOI: 10.3390/md17050254. Impact Factor 2019: 4,073; Punkty MNiSW 2019:100

#### **Publikacja 2**

**Dworaczek Katarzyna**, Drzewiecka Dominika, Pękala-Safińska Agnieszka, Turska-Szewczuk Anna. Structural and serological studies of the O6-related antigen of *Aeromonas*

*veronii* bv. *sobria* strain K557 isolated from *Cyprinus carpio* on a Polish fish farm, which contains L-perosamine (4-amino-4,6-dideoxy-L-mannose), a unique sugar characteristic for *Aeromonas* serogroup O6. *Marine Drugs*, 2019, 17(7), 399, DOI: 10.3390/md17070399.

Impact Factor 2019: 4,073; Punkty MNiSW 2019:100

**Publikacja 3** – praca przeglądowa/rozdział w monografii

**Dworaczek Katarzyna**, Kurzylewska Maria, Turska-Szewczuk Anna. Interpretacja widm magnetycznego rezonansu jądrowego polisacharydów bakteryjnych. *Nauka i przemysł - lubelskie spotkania studenckie*. ISBN 978-83-227-9370-1. Wydawnictwo UMCS, Lublin, 2020. Punkty MNiSW 2020: 20

Kopie tych publikacji zamieszczono w rozprawie zawierającej ponadto m.in.. rozdziały: Streszczenie i Summary, Wstęp, Hipotezę i cel pracy, Omówienie wyników z uwzględnieniem zastosowanych metod badawczych, Dyskusję, Podsumowanie i Wnioski, Literaturę oraz w formie Aneksu CV doktorantki z wykazem dorobku, a także Oświadczenie współautorów prac, z wyszczególnieniem ich udziału w publikacjach.

We Wstępie Doktorantka przedstawiła krótko charakterystykę pałeczek *Aeromonas*, w tym wyniki badań genetycznych i molekularnych na których obecnie opiera się ich klasyfikacja, zagadnienia związane z chorobotwórczością tych bakterii u ryb i człowieka oraz szerzej budowę ich lipopolisacharydu i podstawy klasyfikacji opartej o zróżnicowanie antygeny O, a także wskazała na immunoprofilaktykę, jako alternatywne postępowanie pozwalające chronić ryby przed zakażeniem. Szerzej opisała wyniki badań chemicznych i ich interpretację, w szczególności uzyskane za pomocą analizy GC-MS, MALDI-TOF i NMR. Ta opisowa część rozprawy, ma zwarty charakter i stanowi podsumowanie i uzupełnienie informacji zawartych w opublikowanych pracach składających się na doktorat.

Publikując wyniki badań, w tym w dwóch wysoko notowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, Doktorantka uzyskała już pozytywną ocenę swojej pracy. Pragnę podkreślić, iż otrzymane przez nią dane znacząco wzbogacają naszą wiedzę o LPS pałeczek *Aeromonas*. Doktorantka ze współpracownikami wykryła 4-amino-4,6-dideoxy-L-mannozę (L-Rhap4NAc; N-acetyl-L-perosamina) cukier dotychczas niezidentyfikowany jako składnik antygenów O bakterii. Cukier ten tworzy jeden z dwóch OPS *A. hydrophila* JCM 3968 i *A. veroni* bv. *sobria* K557 [homopolimer  $\rightarrow 2$ )- $\alpha$ -L-Rhap4NAc-(1 $\rightarrow$ ]. Składnik ten występuje także w drugim OPS tych pałeczek, w *A. veroni* bv. *sobria* K557 jako jedyny cukier trisacharydowej podjednostki O-swoistej LPS [ $\rightarrow 2$ )- $\alpha$ -L-Rhap4NAc-(1 $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L-Rhap4NAc-(1 $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L-Rhap4NAc-(1 $\rightarrow$ ], a w *A. hydrophila* JCM 3968 w podjednostce O-swoistej dwie

reszty NAc-perozaminy są przedzielone resztą D-GalNAc [ $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -L-Rhap4NAc-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-GalpNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Rhap4NAc-(1 $\rightarrow$ ]. Biorąc pod uwagę te różnice w budowie jednego z dwóch OPS tych bakterii, co znalazło wyraz w wynikach reakcji serologicznych badanych LPS i surowic anty-O w układach homologicznych i heterologicznych, serogrupę O6 *Aeromonas* podzielono na dwie podgrupy (immunotypy) O6a i O6b. Pierwszy z wymienionych immunotypów reprezentuje szczep *A. hydrophila* JCM 3968, drugi zaś szczep *A. hydrophila* JCM 3968.

Mgr K.M. Dworaczek badała nie tylko antygeny O ww. szczepów rodzaju *Aeromonas*, ale również regiony rdzeniowe i lipid A z LPS tych bakterii. Wykazała, iż oligosacharydy rdzeniowe *A. hydrophila* JCM 3968 i *A. veroni* bv. *sobria* K557 stanowią dekasacharydy, ale o różnej strukturze, z dominującym udziałem heptoz i występowaniem reszty Kdo, podstawionej grupą fosforanową. W lipidzie A obu szczepów wykryto bisfosforylowany disacharyd glukozaminyloglukozaminowy, podstawiony 6 resztami kwasów tłuszczowych (heksaacyl lipid A).

Pragnę zwrócić uwagę na wykorzystanie w pracy doktorskiej przez mgr K.M. Dworaczek zaawansowanych metod analizy chemicznej lipopolisacharydów. Ich zastosowanie wymagało dobrego przygotowanie teoretycznego Doktorantki, które też potwierdziła, będąc pierwszą autorką pracy przeglądowej na temat interpretacji widm NMR polisacharydów bakterii.

Mgr K.M. Dworaczek zrealizowała założone cele pracy. Dyskusja własnych wyników badań Doktorantki na tle danych z literatury zasługuje na wysoką ocenę. Zestawienie literatury obejmuje najnowsze publikacje, które zostały zacytowane właściwie.

Na końcu rozprawy zamieszczono Oświadczenia Doktorantki i pozostałych współautorów prac już opublikowanych. Mgr K.M. Dworaczek ma przeważający udział w ich przygotowaniu tj. w sformułowaniu koncepcji badań, realizacji części praktycznej, interpretacji uzyskanych wyników i opracowaniu manuskryptów do publikacji. Jej procentowy udział przedstawia się następująco 67%, 65% i 90% odpowiednio w publikacjach 1, 2 i 3 wyżej wymienionych w recenzji. Oświadczenie Doktorantki koresponduje z oświadczeniami współautorek publikacji, które też szczegółowo przedstawiają swoją część pracy oraz udziały procentowe.

Uwagi:

- 1) W rozprawie przedstawiono nie tylko wyniki badań polisacharydów O-swoistych *Aeromonas* sp., ale także regionu rdzeniowego i lipid A ich LPS. W tytule pracy

o tym nie wspomniano. Nadmieniam, iż na stronie 16 dysertacji w celach szczegółowych wymieniono jako zadania badawcze analizy tych regionów LPS. Nie wspomniano o uzyskanych wynikach badań tych części LPS w rozdziale Podsumowanie i wnioski.

- 2) Na stronie 33 rozprawy Doktorantka Autorka wypowiedziała się odnośnie do składu szczepionki przeznaczonej do ochrony karpia w Polsce przed zakażeniami pałeczkami *Aeromonas*. Chciałbym zapytać, czy w przygotowaniu takiej szczepionki nie powinno uwzględnić wyników badań też innych niż LPS, powierzchniowych elementów tych bakterii, jako potencjalnych antygenów protekcyjnych.

Mgr K.M. Dworaczek jest współautorką 7 publikacji oryginalnych. W tym 2 składających się na rozprawę doktorską (wszystkie opublikowane w czasopismach z IF) oraz 1 artykułu przeglądowego, a także 4 rozdziałów w monografiach naukowych, w tym jednego, który został umieszczony w rozprawie. Jest też współautorką 7 doniesień na konferencjach międzynarodowych oraz 14 krajowych. Doktorantka ma udziały w zespołowych naukowych projektach badawczych finansowanych ze źródeł zewnętrznych oraz realizowała 4 granty indywidualne finansowane z funduszy badawczych UMCS w Lublinie. Otrzymała nagrodę i wyróżnienie za doniesienia naukowe na konferencjach oraz stypendium Prezydenta Miasta Lublina. Warta podkreślenia jest też jej działalność popularyzatorska i promocyjna macierzystej uczelni. W latach 2016-2018 reprezentowała doktorantów w Radzie Wydziału Biologii i Biotechnologii UMCS w Lublinie. Pracowała też w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Lublinie, biorąc udział w działaniach diagnostycznych SARS-Cov2.

Stwierdzam, iż przedstawiona mi do recenzji praca mgr Katarzyny Marceliny Dworaczek pt. „Strukturalna i immunochemiczna charakterystyka polisacharydów O-swoistych *Aeromonas* sp. serogrupy O6” spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne i zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z uprzejmą prośbą o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnoszę też o wyróżnienie rozprawy doktorskiej. Uważam, iż recenzowana praca jest wyróżniającą się, za czym przemawia przede wszystkim fakt opublikowania już dużej części jej wyników.

A. Nowak