

Łódź, dnia 15.03.2024

Dr hab. Agnieszka Torzewska, prof. UŁ  
Katedra Biologii Bakterii

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Marii Kurzylewskiej-Kubaczyńskiej zatytułowanej  
„Badania immunochemiczne antygeny O-swoistego oraz analiza regionu OGC  
warunkującego jego syntezę u szczepów *Aeromonas* sp. patogennych dla ryb  
hodowlanych”**

Wykonaną w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie- Skłodowskiej  
w Lublinie

Promotor: dr hab. Anna Turska -Szewczuk, prof. UMCS

Rozprawa doktorska została przedstawiona w formie powiązanych tematycznie artykułów wraz z opisem. Pierwsza część rozprawy omawia osiągnięcie i składa się z kilku rozdziałów typowych dla prac dyplomowych i są to: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, hipoteza i cel pracy, opis metod, dyskusja, wnioski i podsumowanie oraz wykaz literatury. Ta część rozprawy jest pod względem edytorskim bardzo dobrze przygotowana. W dalszej części znajdują się publikacje stanowiące podstawę dysertacji wraz z oświadczeniami współautorów. Podstawą rozprawy doktorskiej są trzy prace oryginalne opublikowane w czasopiśmie z listy JCR oraz dwie prace przeglądowe (jako rozdziały monografii) opublikowane w wydawnictwie UMCS Lublin. Łączny współczynnik impact factor tych prac to 8,975 a sumaryczna liczba punktów MNiSW to 340 pkt. Wyniki badań opublikowano w uznanym czasopiśmie Carbohydrate Research co świadczy o tym, że zostały już one pozytywnie zweryfikowane przez innych specjalistów z prezentowanej w badaniach dyscyplinie. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, i co prawda nie

zostało zamieszczone w pracy oddzielne oświadczenie o udziale Doktorantki w pracach, ale na podstawie zamieszczonych oświadczeń współautorów prac wkład Doktorantki można uznać za dominujący. Cała praca jest spójną dobrze udokumentowaną całością.

We wstępie pracy Autorka skupia się na ogólnej charakterystyce bakterii z rodzaju *Aeromonas* ich czynników chorobotwórczości i patogenezie chorób przez nie powodowanych. Ważną częścią jest dokładna charakterystyka lipopolisacharydu tych bakterii wraz z opisem regionu kodującego antygen O i wykorzystania znajomości sekwencji kodujących region OGC w molekularnym serotypowaniu tego gatunku drobnoustrojów. Ta część pracy bardzo dobrze wprowadza w tematykę prowadzonych badań. W tekście podana jest informacja o potencjalnym zastosowaniu lipopolisacharydu jako antygeny szczepionkowego lub substancji adiuwantowej. Adiuwant powinien się charakteryzować niską toksycznością i dotychczas zastosowane lipopolisacharydy jako adiuwanty ze względu na swoją naturalną budowę chemiczną lipidu A lub poprzez modyfikacje tej struktury są mało toksyczne. Z informacji zawartych na temat budowy lipidu A w tej części pracy wynika, że ten LPS może posiadać działanie toksyczne. *Proszę o informacje czy wiadomo jaką aktywność biologiczną posiada lipid A bakterii rodzaju Aeromonas i czy ze względu na tą toksyczność można go rozpatrywać jako substancję adiuwantową?*

Więcej informacji teoretycznych Autorka zawarła w dwóch rozdziałach monografii gdzie można znaleźć informacje dotyczące molekularnego serotypowania bakterii z rodzaju *Aeromonas* oraz przegląd dotychczasowych danych na temat badań immunochemicznych lipopolisacharydu *Aeromonas* i ich zastosowań w immunoprofilaktyce zakażeń u ryb. W tekstach tych przedstawiony jest schemat postępowania, łącznie z opisaną metodyką badań w oparciu o prace prowadzone w innych ośrodkach naukowych jak i prace własne z udziałem Doktorantki. Hipoteza i cel pracy są bardzo jasno sformułowane.

W swojej pracy doktorskiej mgr Maria Kurzylewska-Kubaczyńska zajęła się problematyką profilaktyki zakażeń u ryb bakteriami z rodzaju *Aeromonas*. Bakterie rodzaju *Aeromonas* są Gram-ujemnymi pałeczkami zasiedlającymi głównie środowisko wodne ale izolowane są również z gleby i produktów żywnościowych. Ze względu na liczne czynniki chorobotwórczości mogą być patogenami ryb, płazów gadów i zwierząt stałocieplnych. U ludzi do zakażenia dochodzi przez skażoną tymi drobnoustrojami wodę, a głównym patogenem człowieka jest *Aeromonas hydrophila*. Niewątpliwie jednym z istotnych czynników chorobotwórczości jest lipopolisacharyd, a znajomość struktury jego O antygeny znajduje



również zastosowanie w serotypowaniu tego rodzaju, dociekaniach epidemiologicznych oraz immunoprofilaktyce. W tym ważnym właśnie nurcie badań jest prezentowana rozprawa doktorska.

Głównym celem rozprawy doktorskiej były badania polisacharydów O -swoistych wybranych trzech szczepów *Aeromonas* należących do serogrupy PGO1, znaczącej w patogenezie posocznicy krwotocznej MAS i infekcji MAI u ryb w gospodarstwach hodowlanych. Cel ten realizowany był poprzez określenie budowy antygenów O badanych szczepów, ich badania immunochemiczne, poznanie organizacji regionu OGC kodującego informacje o syntezie polisacharydu O-swoistego oraz zaproponowanie w oparciu o uzyskane wyniki składu antygeny szczepionkowego dla serogrupy PGO1.

Jak wspomniano do doświadczeń w pracy wybrano szczepy należące do istotnej serogrupy w patogenezie chorób ryb hodowlanych. W treści pracy znajduje się informacja iż poza tą serogrupą równie często izolowane są szczepy należące do 8 innych serogrup izolowanych z hodowli karpia i pstrągów w Polsce. *Czy drobnoustroje te poza różną strukturą antygeny O różniły się też wirulencją? Jak było kryterium wyboru do badań serogrupy PGO1?*

Metody zastosowane w pracy są dobrze dobrane i pozwalają na osiągnięcie stawianych celów w pracy. Obejmują one metody związane z izolacją lipopolisacharydów i ich części O-swoistej, badań immunologicznych obejmujących testy immunoenzymatyczne takie jak: ELISA i technikę Western blot. Analizy chemiczne i strukturalne O-PS oparte były między innymi na spektrometrii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS), techniką spektroskopii  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR, ważnym etapem badań była analiza regionu kodującego syntezę antygeny O.

Lipopolisacharydy izolowano z trzech szczepów bakteryjnych : *A. popoffii* A4, *A. sobria* K928 i *A. hydrophila* Pt679. W opisie metody otrzymywania lipopolisacharydów badanych szczepów *Aeromonas* podana została informacja, że przed izolacją LPS metodą fenolowo-wodną zawiesinę poddano działaniu enzymów w celu eliminacji kwasów nukleinowych i białek. Taka procedura opisana jest nie w każdej z prac wchodzących w osiągnięcie. *Czy w pozostałych przypadkach ten etap pominięto, czy też w każdym przypadku metoda była taka sama? Proszę również o informacje dlaczego trawienie mające na celu oczyszczenie preparatu LPS z kwasów nukleinowych i białek przeprowadzono przed jego izolacją a nie po i jakie zalety ma taka procedura.*

Otrzymane produkty analizowane były z zastosowaniem wspomnianych już technik analitycznych i pozwoliły na ustalenie ich struktury chemicznej. Antygeny O badanych szczepów są zbliżonej budowy, wszystkie są zbudowane z pentasacharydów o rozgałęzionej strukturze. Podobieństwo dotyczy trzech reszt L-ramnozy i amino-6-deoksyheksozy. Różnice pomiędzy polisacharydami badanych szczepów dotyczą podstawników terminalnej reszty 3-amino-D-fukozy oraz pozycji glikozylacji dwupodstawionej ramnozy przez 3-amino-3,6-dideoksygalaktozę ( $\alpha$ -D-Fuc3N) przy C-2 lub C-3.

W dalszej części pracy zastosowano badania immunologiczne w celu określenia wspólnych epitopów determinujących swoistość serologiczną badanych polisacharydów O-swoistych. Badania te wykonano z zastosowaniem poliklonalnych króliczych surowic odpornościowych otrzymanych przeciwko szczepom badanym oraz surowicy referencyjnej skierowanej swoiście przeciw serogrupie do której te szczepy zostały zaklasyfikowane.

Reaktywność surowic sprawdzano w testach immunoenzymatycznych ELISA i Western blot w układach homologicznych i heterologicznych. W celu potwierdzenia podobieństwa antygenowego reakcje sprawdzano również z surowicami absorbowanymi wybranymi antygenami. *Czy w tym przypadku absorbcja surowic masą bakteryjną, czyli źródłem dużej mieszanki bakteryjnych antygenów nie wpływa negatywnie na reaktywność danego układu?* Doświadczenia wykazały, że wszystkie badane antygeny O mają wspólne epitopy z antygenem O szczepu referencyjnego serogrupy PGO1. O-PS *A. popoffii* A4 i *A. sobria* K928 są bardziej zbliżone antygenowo a *A. hydrophila* Pt679 wykazuje największe podobieństwo do antygeny serogrupy PGO1. Wyniki te pozwoliły na wyróżnienie w serogrupie PGO1 dwóch podgrup PGO1a (A4, K928) i PGO1b (Pt679)

Zróznicowanie w strukturze potwierdziła analiza regionu kodującego syntezę polisacharydu O-swoistego. W badaniach rozpoznano geny odpowiedzialne za syntezę podjednostek cukrowych i ich polimeryzacji oraz genów, które różnicują te regiony. Pozwoliło to na potwierdzenie przynależności szczepów A4 i K928 do innej podgrupy w serogrupie PGO1 niż szczep Pt679. Rozwój tych badań może się przyczynić do opracowania molekularnych metod serotypowania i klasyfikacji bardzo zróżnicowanego rodzaju bakterii *Aeromonas* a to ma dużą wartość poznawczą i aplikacyjną.

W świetle uzyskanych wyników Doktorantka proponuje kompozycje wszystkich trzech badanych szczepów . *A. popoffii* A44 i *A. sobria* K928 ze względu na immunomodulujący epitop oraz *A. hydrophila* Pt679 ze względu na podobieństwo jego antygeny O do antygeny



referencyjnego dla serogrupy PGO1 jako antygeny szczepionkowe. *Proszę o informacje jaki jest proponowany schemat immunizacji ryb tego typu szczepionkami oraz jaka jest droga podawania materiału szczepionkowego.*

Poza publikacjami wchodzącymi w skład pracy doktorskiej mgr Maria Kurzylewska-Kubaczyńska jest współautorką 5 prac naukowych i 6 rozdziałów w monografii. O dużej aktywności naukowej Doktorantki świadczy również aktywny udział w konferencjach łącznie wykazała 22 doniesienia konferencyjne w tym dwa zostały wyróżnione nagrodą przez komitety naukowe. Brała udział jako wykonawca w trzech projektach badawczych oraz otrzymała stypendium rektora UMCS i Prezydenta Miasta Lublin dla wyróżniających się doktorantów. Doktorantka wykazywała również aktywność organizacyjną i promocyjną biorąc udział w warsztatach i organizacji konferencji naukowych.

Podsumowując rozprawa doktorska mgr Marii Kurzylewskiej-Kubaczyńskiej jest pracą naukową, która stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Wyniki badań posiadają wartość poznawczą oraz mogą mieć znaczenie aplikacyjne w opracowaniu szczepionek stosowanych w leczeniu i immunoprofilaktyce chorób ryb w akwakulturach. Doktorantka stosuje nowoczesny warsztat badawczy, dobrze zna metodologię i zasady planowania badań naukowych, a także posiada umiejętności krytycznej analizy uzyskanych wyników i prowadzenia dyskusji.

Na tej podstawie stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Marii Kurzylewskiej-Kubaczyńskiej spełnia warunki określone przepisami Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. z 2018t. poz. 1668 z późniejszymi zmianami) oraz Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 22018r. poz. 1669 z późniejszymi zmianami). W związku z tym, zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Marii Kurzylewskiej-Kubaczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Agnieszka Torzewska

