



Poznań, 12.03.2024 r.

Prof. dr hab. Adam Kaznowski

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

Rozprawę doktorską stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych składający się z trzech oryginalnych prac doświadczalnych i dwóch przeglądowych. Przed dostarczonym wydrukiem ww. artykułów autorka zamieściła opracowanie z następującymi rozdziałami: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, hipoteza i cel pracy, metody, dyskusja, podsumowanie z ośmioma wnioskami, literatura oraz oświadczenia współautorów publikacji. Dysertacja została przygotowana pod kierunkiem pani dr hab. Anny Turskiej-Szewczyk, prof. UMCS w Lublinie. Rezultaty pracy doktorskiej zawarto w następujących wieloautorskich artykułach, opublikowanych w angielskojęzycznych czasopismach zamieszczonych na listach, Journal Citation Reports oraz A Ministerstwa Edukacji i Nauki:

1. M. Kurzylewska, K. Dworaczek, A. Turska-Szewczuk, Structure of the lipopolysaccharide O-antigen of *Aeromonas encheleia* strain A4 representing the new PGO1 serogroup of aeromonads prevailing in Polish aquaculture, *Carbohydrate Research*, 2022, 519, art. 108602 (IF 2,975, MEiN 100).
2. M. Kurzylewska, A. Bomba, K. Dworaczek, A. Pękala-Safińska, A. Turska-Szewczuk, Structure and gene cluster annotation of the O-antigen of *Aeromonas sobria* strain K928 isolated from common carp and classified into the new *Aeromonas* PGO1 serogroup, *Carbohydrate Research*, 2023, 528, art.108809 (IF 2,975, MEiN 100) .
3. M. Kurzylewska, A. Turska-Szewczuk, K. Dworaczek, A. Bomba, D. Drzewiecka, A. Pękala-Safińska, Immunochemical studies and gene cluster relationships of closely related O-antigen of *Aeromonas hydrophila* Pt679, *Aeromonas popoffii* A4, and *Aeromonas sobria* K928 strains classified into the PGO1 serogroup dominant in Polish aquaculture of carp and rainbow trout, *Carbohydrate Research*, 2023, 531, art. 108896 (IF 2,975, MEiN 100).

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań
tel. +48 61 829 59 37, fax. +48 61 829 55 90
akazn@amu.edu.pl



W skład dysertacji doktorskiej włączono dwa przeglądowe artykuły polskojęzyczne:

1. M. Kurzylewska, M. Laban, K. Dworaczek, A. Turska-Szewczuk, Serotypowanie molekularne jako potencjalne narzędzie w typowaniu bakterii z rodzaju *Aeromonas*. Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie. ISBN 978-83-227-9503-3, wyd. UMCS, Lublin, 2021, str. 23-26.
2. M. Kurzylewska, K. Dworaczek, A. Turska-Szewczuk, Badania immunochemiczne lipopolisacharydów i antygenów O-bakterii z rodzaju *Aeromonas* patogennych dla ryb w celu określenia składnika dla immunoprofilaktyki zakażeń pałeczkami w hodowlach ryb. Nauka i przemysł – lubelskie spotkania studenckie. ISBN 978-83-227-9603-0, wyd. UMCS, Lublin, 2022, str. 12-15.

Wyniki doświadczalne zostały opublikowane w bardzo dobrym specjalistycznym naukowym czasopiśmie *Carbohydrate Research* a prace przeglądowe są wartościowym wprowadzeniem w problematykę serotypowania molekularnego bakterii oraz immunochemicznych badań LPS. W pracach przeglądowych oprócz opisanie metod stosowanych w serotypowaniu molekularnym i określeniu struktury antygenów O bakterii zawarto także część otrzymanych i opublikowanych wcześniej wyników badań własnych dotyczących pałeczek *Aeromonas* sp. Godne podkreślenia jest, że Kandydatka do stopnia doktora we wszystkich publikacjach jest pierwszym autorem. Ze złożonych oświadczeń współautorów wynika, że jej udział był znaczący w projektowaniu, wykonaniu, opracowaniu wyników i przygotowaniu artykułów do druku.

Dysertacja doktorska dotyczy pałeczek *Aeromonas* sp., które powszechnie występują w czystych i zanieczyszczonych wodach powierzchniowych. Od początku lat osiemdziesiątych XX w. notuje się wyraźny wzrost zainteresowania tymi bakteriami, co jest związane ze stwierdzeniem ich obecności w wodzie pitnej, glebie, żywności oraz próbkach pobranych od chorych ludzi i zwierząt. Szczepy niektórych gatunków *Aeromonas* mogą być u ludzi czynnikiem etiologicznym posocznicy, zapalenia żołądka i jelit, zapalenia płuc, zakażenia ran, układu moczowo-płciowego i innych chorób. Pałeczki *Aeromonas* sp. powodują także zakażenia zwierząt zimnokrwistych i stałocieplnych. Szczególnie ważna jest chorobotwórczość dla ryb gdyż bakterie te mogą przyczynić się do dużych strat ekonomicznych w gospodarstwach rybackich hodujących karpie, pstrągi, łososie i inne gatunki. Wybór tematu, którego



dalekosiężnym celem jest uzyskanie szczepionek ograniczających występowania chorób karpiowatych i pstrągów uważam za bardzo trafny. Jest to jednak zadanie trudne i wieloetapowe. W badaniach podjętych wcześniej przez innych autorów zidentyfikowano, które szczepy pałeczek *Aeromonas* sp. są dominujące w powodowaniu masowych zakażeń i śnięcia ryb w gospodarstwach hodowlanych w Polsce.

Celem pracy pani mgr Marii Kurzylewskiej-Kubaczyńskiej było określenie struktury polisacharydów O-swoistych LPS oraz organizacji genetycznej regionów kodujących ich syntezę (OGC) u wybranych trzech szczepów *Aeromonas* spp. oraz serologicznego ich zróżnicowania, co powinno w przyszłości umożliwić opracowanie składu szczepionki profilaktycznej w zapobieganiu zakażeniom z udziałem urzęsionych szczepów *Aeromonas* sp. (infekcja MAI) i w posocznicy krwotocznej (MAS) u ryb hodowlanych.

Badania przeprowadzono na trzech szczepach: *Aeromonas popoffii* A4 (wcześniej zaliczonego do gatunku *A. encheleia*), *A. sobria* K928 i *A. hydrophila* Pt679, otrzymanych z Zakładu Chorób Ryb, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Wyniki badań serologicznych w testach aglutynacji, Western blotting i ELISA udowodniły, że antygeny O trzech ww. szczepów należą do grupy PGO1 chociaż występują pomiędzy nimi różnice. LPS po wyizolowaniu z błony zewnętrznej bakterii hydrolizowano i poddano badaniom metodami, chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS) i spektroskopią magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H i ^{13}C NMR). Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że antygeny O ww. trzech szczepów mają podobny schemat struktury i zbudowane są z rozgałęzionych pięciocukrowych podjednostek, które mają liniowy wielocukier zawierający trzy reszty L-ramnozy i amino-6-deoksyheksozę (D-FucN lub D-QuiN). Występują jednak różnice w części terminalnej łańcucha O – swoistego, gdzie u szczepów *A. popoffii* A4 i *A. sobria* K928 3-amino-D-fukoza związana jest z grupą 3-hydroksymasłową a u *A. hydrophila* Pt679 z N-acetylową. Na powyższej podstawie i innych różnic w budowie antygeny O zaproponowano podział serogrupy PGO1 na dwie podgrupy. Przeprowadzone analizy regionów DNA kodujących syntezę antygeny O (OGC) ww. trzech szczepów ujawniły ich wysokie podobieństwo, ale wykazały także różnice w wielkościach, liczbie otwartych ramek odczytu i składzie genowym. Doktorantka wskazała geny, które ze względu na specyficzność grupy serologicznej PGO1 mogą być użyteczne w serotypowaniu



molekularnym. Pani mgr Maria Kurzylewska-Kubaczyńska uzyskane rezultaty umiejętnie przedyskutowała i omówiła krytycznie odwołując się do najnowszego piśmiennictwa.

Najważniejszymi osiągnięciami rozprawy doktorskiej pani mgr Marii Kurzylewskiej-Kubaczyńskiej są:

- określenie struktury polisacharydów O-swoistych trzech szczepów *Aeromonas* spp. patogenicznych dla ryb,
- wykrycie uwarunkowania swoistości serologicznej antygenów O szczepów *A. popoffii* A4, *A. sobria* K928 i *A. hydrophila* Pt679,
- ustalenie organizacji regionu kodującego syntezę antygeny O szczepów *A. popoffii* A4, *A. sobria* K928 i *A. hydrophila* Pt679 oraz wytypowanie genów markerowych do serotypowania molekularnego serogrupy PGO1 i dwóch podgrup: PGO1a i PGO1b.

Jako recenzent zgłaszam kilka uwag dotyczących polskojęzycznego opracowania przygotowanego przez Doktorantkę. Chciałbym jednak zaznaczyć, że nie umniejszają one wartości naukowej rozprawy doktorskiej, która jest moim zdaniem wysoka i została przedstawiona w opublikowanych pięciu artykułach.

1. Tytuł i cel pracy moim zdaniem nie są najlepiej sformułowane. W tytule należy podać rezultat pracy, a nie postępowanie służące jego osiągnięciu (badanie).
Celem nie powinno być badanie. Cel to stan lub obiekt do którego się dąży i powinien odpowiedzieć na pytanie co ma być oczekiwanym rezultatem pracy, np. struktura, budowa itp., a nie sposób postępowania, czyli czynność (badanie) prowadząca do osiągnięcia zamierzonego wyniku. Niestety obserwuję, że w ostatnich latach słowa takie jak badanie czy analiza są bezzasadnie stosowane w tytułach i celach prac.
2. W opracowaniu własnym Doktorantka podała, że jednym z badanych szczepów był *A. popoffii* A4, natomiast w publikacji 1 na którą się powoływała wymieniono *A. encheleia* A4. Wystąpił brak zgodności pomiędzy tymi dwoma źródłami i można było odnieść wrażenie, że badano szczepy należące do dwóch różnych gatunków. Autorka nie wytłumaczyła tej różnicy w swoim opracowaniu, co jest niedopatrzeniem. Dopiero w publikacji 3 wyjaśniono przyczyny



- reklasyfikacji szczepu A4. Wiem, że systematyka i identyfikacja bakterii *Aeromonas* sp. są trudne, ale zmianę klasyfikacji ww. szczepu należało w tekście wyjaśnić.
3. W pracach brak szczegółowych informacji o odpornościowej surowicy referencyjnej PGO1. Dla jakiego szczepu ją uzyskano? Gdyby był on również przebadany podobnie jak wybrane trzy izolaty to wówczas stanowiłby on odniesienie i mógł być wykorzystany do celów porównawczych a interpretacja wyników reakcji krzyżowych aglutynacji byłaby pełniejsza i wyjaśniona różnicami w strukturze antygenów O.
 4. Doktorantka w opracowaniu własnym kilkakrotnie błędnie powoływała się na artykuły, które nie były źródłowymi ani przeglądowymi a autorzy cytowali prace innych badaczy, czyli było to cytowanie cytowań, co nie powinno mieć miejsca. Poniżej podaję przykłady:
 - W opracowaniu własnym str. 9, 14 wiersz od dołu, Doktorantka powołuje się na pracę Kitagawa i in. 2022, a powinna być Fernandez-Bravo i Figueras 2020, na którą to pracę powołują się w swoim tekście Kitagawa i in. 2022,
 - Str. 15 ostatni wiersz, Autorka powołuje się na pracę Wanga i in., 2017 w odniesieniu do identyfikacji serotypów *Aeromonas* sp. podczas gdy w cytowanej pracy brak takich danych.
 - Str. 14, 15 wiersz od góry, Doktorantka powołuje się na pracę Wanga i in. 2017 o częstości występowania drogi syntezy antygenów O u *E. coli* ale ww. autorzy badali *E. albertii* a tylko w dyskusji wspomnieli porównawczo o *E. coli* powołując się na publikację Iguchi i in. 2015.
 - Str. 9, 5 wiersz od góry, pani mgr Maria Kurzylewska-Kubaczyńska powołała się na pracę Di Guida i in. 2022, w której nie przedstawiono wyników swoich badań, ale zacytowano dane z artykułu Fernandez-Bravo i Figueras, 2020.
 5. Str. 33, 8 wiersz od dołu, wniosek 6. Autorka napisała "...,, geny charakteryzują się wysokim poziomem identyczności na poziomie sekwencji aminokwasowych dla białek/enzymów przez nie kodowanych, wskazując na ich bliskie pokrewieństwo". W powyższym fragmencie występuje kilka nieprawidłowości. Pierwsza dotyczy niezręczności językowej fragmentu: ...wysoki poziom identyczności na poziomie sekwencji... Ponadto nie rozumiem jak geny



mogą wykazywać wysoki poziom identyczności w sekwencji aminokwasowej? Zwracam także uwagę, że podobieństwo to nie pokrewieństwo oraz, że nie „różnice w budowie antygenów O znajdują odzwierciedlenie w zawartości genów swoistych dla procesów syntezy ...” a różnice genetyczne odzwierciedlają się w różnorodności antygenów O.

6. Str. 19, 4 wiersz od góry, zamiast ciężaru molekularnego powinno być ciężar cząsteczkowy.

Na podstawie wyników badań własnych autorka sformułowała osiem wniosków. Sądzę, że to nadmierna liczba, niektóre można było połączyć, np. 2 i 4 a wobec braku eksperymentów potwierdzających skuteczność uzyskania odporności u ryb po zastosowaniu szczepionki zawierającej antygeny badanych szczepów wniosek ósmy jest przedwczesny.

Pani mgr Maria Kurzylewska-Kubaczyńska przeprowadziła badania wielokierunkowe, kompleksowe i w ich realizację włożyła sporo pracy. Rozprawa doktorska wykazuje umiejętność prowadzenia przez nią pracy naukowej. Dysertacja doktorska stanowi rozwiązanie postawionego problemu naukowego, w którym uzyskano ważne i oryginalne rezultaty, znacznie poszerzające wiedzę o strukturze antygenów O szczepów *Aeromonas* spp. chorobotwórczych dla ryb hodowlanych. Użycie odpowiednich metod i algorytmów postępowania zagwarantowało rzetelną i obiektywną ocenę wyników oraz wyciągnięcie wniosków, które odpowiadają na postawione cele.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, w moim przekonaniu, zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”(Dz. U. z dnia 30 sierpnia 2018 r. poz. 1668 ze zm.) w pełni spełnia wymagania stawiane dysertacjom o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie wniosek o dopuszczenie mgr Marii Kurzylewskiej-Kubaczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6, Collegium Biologicum, 61-614 Poznań
tel. +48 61 829 59 37, fax. +48 61 829 55 90
akazn@amu.edu.pl