



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Dr hab. inż. Jolanta Łukasiewicz

Wrocław, 24.04.2017 r.

Zakład Immunochemii

Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek

## RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Pawłowskiej pt. "Wpływ cytokin prozapalnych na cytotoksyczność amyloidu *Escherichia coli* dla komórek nabłonka jelit" wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Beaty Sobieszkańskiej.

Przedstawiona do oceny praca dotyczy oceny *in vitro* wpływu fimbrii spiralnych, funkcjonalnych białek amyloidowych, chorobotwórczych i niepatogennych pałeczek *E. coli* na niestymulowany cytokinami prozapalnymi i zmieniony zapalnie nabłonek jelita. Obejmuje m. in. charakterystykę mikrobiologiczną i genetyczną dwóch wybranych szczepów – potencjalnie patogennego szczepu E32/2 (patotyp DEAC) oraz niepatogennego, laboratoryjnego szczepu K12<sub>600</sub> oraz ich mutantów izogenicznych pozbawionych zdolności syntezy fimbrii spiralnych, pod kątem obecności tych struktur, a następnie wykorzystanie ww. szczepów w testach *in vitro*, w celu charakterystyki procesów adhezji, inwazji oraz ich cytotoksyczności względem linii ludzkich komórek nabłonka jelita Caco-2 niestymulowanych i stymulowanych cytokinami prozapalnymi. Dodatkowym atutem pracy, umożliwiającym prawidłową interpretację wyników w odniesieniu do roli fimbrii spiralnych, jest izolacja, charakterystyka i wykorzystanie w testach *in vitro* oczyszczonych preparatów tych antygenów.

Podjęta przez Panią mgr Barbarę Pawłowską tematyka jest ważna i aktualna, gdyż dotyczy zrozumienia złożonych procesów zachodzących na styku pałeczek *E. coli* z organizmem gospodarza. Badania nad fimbriami spiralnymi rozpoczęto stosunkowo niedawno, zważywszy, że doniesienia o ich biosyntezie u bakterii pochodzą z 1989 r., a procedurę ich oczyszczania opracowano w 1991 r. i stosowana jest do dzisiaj bez



większych zmian przez grupy zajmujące się problematyką tych białek amyloidowych. Co więcej, ważnym przyczynkiem dla prowadzenia tego typu badań jest nie tylko znaczenie fimbrii spiralnych dla funkcji życiowych bakterii i ich rola w patogenezie zakażeń jelitowych wywoływanych przez *E. coli* czy *Salmonella* spp. oraz nieswoistych zapaleń jelit, ale również podobieństwo strukturalne tych cząsteczek do ludzkich amyloidów powstających w przebiegu różnych chorób, m. in. choroby Alzheimer'a. Rzuca to nowe światło na problematykę interakcji między gospodarzem a prawidłowym lub zmienionym chorobowo mikrobiomem.

Przedstawiona do recenzji praca, obejmująca 140 stron, charakteryzuje się prawidłowym układem dla rozprawy doktorskiej i obejmuje następujące rozdziały: Wstęp, Cele Pracy, Materiały i Metody, Wyniki wraz z ich omówieniem, Dyskusję i Wnioski. Dopełnieniem opracowania są streszczenia w j. polskim i angielskim, spisy rycin, tabel, skrótów i piśmiennictwa oraz odczynników i aparatury wykorzystanej w badaniach. Praca została przygotowana bardzo starannie i jak na tak obszerne opracowanie, zawiera nieliczne błędy językowe. Liczbę rycin (w liczbie 55) i tabel (w liczbie 19) oraz ich tematykę dobrano w sposób optymalny. W przejrzysty sposób ilustrują one informacje dotyczące podstaw merytorycznych zgłębianego zagadnienia oraz wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych badań.

Wstęp jest bardzo dobrze skonstruowany i napisany jasno i czytelnie. Doktorantka trafnie dobrała zakres przedstawionych informacji do zaplanowanych celów badawczych. W oparciu o aktualną literaturę, Autorka przedstawia w nim charakterystykę patogennych i niepatogennych szczepów *E. coli* wraz z podstawowymi informacjami dla głównych patomechanizmów zakażeń przewodu pokarmowego wywoływanych przez ten gatunek bakterii. Warto nadmienić, że część tej tematyki została przez Autorkę oraz Promotora omówiona i rozwinięta w opublikowanej w 2016 r. pracy przeglądowej w *Postęпах Mikrobiologii*, pokazując, że Pani mgr Barbara Pawłowska bardzo dobrze porusza się w zagadnieniach patomechanizmów zakażeń wywoływanych przez *E. coli*. W kolejnych



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

fragmentach wstępu Autorka omawia bardzo szczegółowo toksyczne i funkcjonalne białka amyloidowe mikroorganizmów, w tym interesujące ją bakteryjne fimbrie spiralne. Ta część wstępu, zawierająca również podstawy biogenezy fimbrii spiralnych, w pełni wyczerpuje zakres informacji niezbędny dla zrozumienia celów i wyników przedłożonej rozprawy doktorskiej. Ważnym zagadnieniem, które kończy tę część pracy doktorskiej, jest charakterystyka nabłonka jelita jako środowiska procesów biologicznych będących w zakresie zainteresowań badawczych Doktorantki – rozwój stanu zapalnego wraz z opisem wpływającego na ten stan repertuaru cytokin. Autorka opisuje pokrótce pozytywne i negatywne aspekty stanu zapalnego w jelicie w odpowiedzi na obecność patogenów, przywołując jako jedno ze szandarowych przykładów zachwiania homeostaty odpowiedzi zapalnej - nieswoiste zapalenia jelit. Ten fragment wstępu początkowo budzi pewien niedosyt recenzenta, gdyż pozbawiony jest informacji, na temat wpływu stanu zapalnego na zmienność receptorów odpowiedzialnych za interakcje nabłonka jelita oraz innych komórek układu odpornościowego z patogenami. Czytelnik przekonuje się jednak szybko, że dużą ilość tej wiedzy Doktorantka przywołuje w Dyskusji, gdzie konfrontuje swoje wyniki badań z doniesieniami literaturowymi. Autorka pisząc Wstęp popełniła niewiele błędów językowych lub merytorycznych, które wyszczególniono poniżej. W określeniu „toksyna Shiga” prawidłowa pisownia wymaga użycia dużej litery w słowie „Shiga”, które nawiązuje do prof. Kiyoshi Shiga, który w latach 20-tych XX w. odkrył bakterie wywołujące czerwonkę, nazywając je *Bacillus dysenterie* (obecnie *Shigella*) oraz wskazał na istnienie toksycznych czynników wytwarzanych przez ten gatunek, m. in. toksynę Shiga. W odniesieniu do nomenklatury stosowanej w mikrobiologii, skróty takie jak sp. czy spp. powinny być pisane czcionką normalną (nie kursywą). W opinii recenzenta, trafniejszym wydaje się użycie symbolu  $\beta$  w określeniu „beta-amyloid”. W Tabeli 1 brak jest wyjaśnienia dla skrótu CNS. Na str. 10 Autorka błędnie nazywa monomery PSM białkami, gdyż zgodnie z danymi literaturowymi są to peptydy (Patrz: PNAS, 2012, 109:1281). Z tym fragmentem tekstu wiąże się też użycie błędnego skrótu dla tych peptydów – PMS zamiast



PSM. Ostatnim z nielicznych błędów jest nazwanie produktów działania trombiny na fibrynogen fibrynopeptydazami A i B (poprawnie: fibrynopeptydy A i B) (str. 20).

Szczegółowe cele pracy zostały jasno i precyzyjnie sformułowane, a następnie konsekwentnie realizowane. Opis stosowanych materiałów i metod został poprawnie i wyczerpująco opisany. Drobne uchybienia, w żaden sposób niewpływające na wartość ocenianej pracy doktorskiej to: brak opisu składu buforu HF (Tabela 3, spis odczynników) oraz niepoprawna pisownia „metyl- $\alpha$ -D-mannopiranozyd” (str. 31, poprawna forma to: „metylo- $\alpha$ -D-mannopiranozyd”). Dodatkowo w odczuciu recenzenta, odpowiedniejszym miejscem dla uzasadnienia wyboru linii komórkowej Caco-2 (str. 38-39) jest Dyskusja.

W kolejnym rozdziale pracy przedstawiono wyniki. Podobnie jak reszta pracy, są one jasno opisane i w pełni udokumentowane rycinami i tabelami. Autorka scharakteryzowała oba wybrane do badań szczepy *E. coli* (E32/2 i K12<sub>C600</sub>) pod kątem ich zdolności do syntezy fimbrii spiralnych. Badaniom szczepów dzikich towarzyszyły doświadczenia na mutantach izogenicznych pozbawionych zdolności syntezy białek amyloidowych. Mutanty te otrzymano i scharakteryzowano w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej, co pokazuje pewien stopień interdyscyplinarności ocenianej pracy doktorskiej. Wyniki otrzymane przez mgr Barbarę Pawłowską potwierdziły założenie wskazane w celach pracy, gdzie patogenny szczep E32/2 izolowany z błony śluzowej jelita dziecka z nieokreślonym zapaleniem jelita grubego (patotyp DAEC) wytwarza wysoki poziom tych białek amyloidowych, w przeciwieństwie do ich niższego poziomu na powierzchni komórek laboratoryjnego szczepu K12. Autorka oceniała poziom ekspresji fimbrii spiralnych stosując kilka metod: barwienie czerwienią Kongo i kurkumina, ocenę dwójłomności wybarwionych preparatów w świetle spolaryzowanym, w teście immunofluorescencji pośredniej z wykorzystaniem króliczych surowic skierowanych przeciwko fimbriom spiralnym *E. coli*. Na uznanie zasługuje fakt, że analizę fenotypu bakterii Autorka uzupełniła o analizę genetyczną obecności genów kodujących fimbrie spiralne. Obserwacje związane z fenotypem i genotypem badanych szczepów trafnie uzupełniła o wyniki dotyczące izolacji i charakterystyki białek





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

amyloidowych z obu szczepów dzikich. Otrzymane białka wykorzystano w niektórych doświadczeniach, jako alternatywę dla bakterii, co pozwoliło na bezpośrednią ocenę ich wpływu na badane zjawiska, tj. żywotność komórek Caco-2, integralność monowarstwy nabłonka oraz indukcję wytwarzania IL-8 przez niestymulowane i stymulowane cytokinami komórki.

Najważniejszym wyzwaniem badawczym recenzowanej pracy jest opisanie roli fimbrii spiralnych w patogenezie szczepów *E. coli* w odniesieniu do modelu *in vitro* nabłonka jelita niestymulowanego i objętego stanem zapalnym (stymulowanego zestawem prozapalnych cytokin). Docenić należy fakt objęcia badaniami zarówno pełnych komórek bakteryjnych, jak i izolowanych amyloidów. Obserwując wpływ badanych szczepów, Autorka wykazała, że stan zapalny znacząco zmienia reakcję nabłonka (monowarstwy komórek Caco-2) na obecność patogenu - wyraźnie zwiększał adhezję i inwazję szczepu patogenego E32/2 do komórek nabłonka w porównaniu ze szczepem laboratoryjnym ekspresjonującym niższy poziom fimbrii spiralnych. Poziom adhezji obserwowany dla obu dzikich szczepów był zdecydowanie większy niż dla mutantów izogenicznych, co wskazywało na rolę fimbrii spiralnych w tym procesie. Dalej, stan zapalny zwiększał inwazję szczepu patogenego E32/2, przy czym jego mutant izogeniczny pozbawiony fimbrii spiralnych wykazywał o wiele wyższą zdolność do inwazji zarówno stymulowanych jak i niestymulowanych cytokinami komórek Caco-2. Pokazało to, że obecność badanych białek amyloidowych nie wpływa bezpośrednio na proces inwazji, co obszernie wyjaśniono w Dyskusji. Jeśli chodzi o integralność monowarstwy nabłonka komórek Caco-2 niestymulowanego i stymulowanego cytokinami, efekt działania szczepów dzikich i mutantów izogenicznych po 3 godz. inkubacji był podobny. Autorka obserwuje istotne statystycznie różnice dopiero po 24 godz. inkubacji, kiedy to wyraźnie widać, że czynnikiem wpływającym na zmiany integralności monowarstwy komórek jest czas inkubacji w obecności bakterii. W dalszym etapie Pani mgr Barbara Pawłowska stosując oczyszczone preparaty wykazuje, że wzrost czasu inkubacji komórek Caco-2 zarówno niestymulowanych, jak i znajdujących się w stanie zapalnym, pogłębia zaburzenia



integralności monowarstwy komórek. Mierząc poziom uwalnianego do podłoża enzymu cytozolowego LDH, Autorka wykazała, że dla komórek niestymulowanych poziom i obecność fimbrii spiralnych nie ma wpływu na cytotoksyczność wybranych szczepów. Natomiast stan zapalny wyraźnie wzmacnia cytotoksyczność szczepu patogennego E32/2, przy czym jego mutant izogeniczny wykazywał podobne właściwości, co wskazuje na brak znaczenie fimbrii spiralnych dla tego procesu. Ostatnia część wyników prezentuje wpływ stanu zapalnego na stymulację odczynu zapalnego poprzez indukcję wytwarzania IL-8. Porównawcze badania szczepu dzikiego i mutantu wyraźnie pokazują, że obecność fimbrii spiralnych osłabia wytwarzanie odczynu zapalnego zarówno w układzie z komórkami niestymulowanymi, jak i stymulowanymi cytokinami. Zjawisko to, obserwowane dla pełnych komórek, potwierdziły badania przeprowadzone na preparatach oczyszczonych, przy czym zjawisko wyraźnej atenuacji obserwowano jedynie dla monowarstwy nabłonka jelita niestymulowanej cytokinami prozapalnymi. Jak widać same amyloidy nie były toksyczne dla komórek nabłonka jelita, natomiast hamowały uwalnianie IL-8 przez komórki niestymulowane cytokinami, co Autorka przytacza jako potwierdzenie wcześniejszych doniesień na temat roli fimbrii spiralnych jako antygeny umożliwiającego skuteczną kolonizację nabłonka jelita przez pałeczki *E. coli*.

Poniżej przedstawiono uwagi, dotyczące rozdziału Wyniki. Ryc. 19 przedstawia wiązanie kurkuminy przez szczep K12 hodowany w temperaturze 37 °C. Wynik interpretowany jest jako brak ekspresji fimbrii spiralnych u tego szczepu w zastosowanych warunkach (37 °C). Jednak w opinii recenzenta wygląd kolonii przypomina ten z Ryc. 17 i powinien być zinterpretowany jako pozytywny, co potwierdzają dalsze wyniki badań. Jeśli nie jest to tylko błąd, to w przypadku wątpliwości wynik ten należało potwierdzić innymi metodami, np. z wykorzystaniem immunofluorescencji pośredniej dla szczepu K12 hodowanego w temperaturze 37 °C. Czy w przypadku testu immunofluorescencji pośredniej z wykorzystaniem króliczych przeciwciał anti-fimbrie amyloidowe, część testów kontrolnych nie powinna polegać na inkubacji bakterii z surowicą królika nieimmunizowanego lub jedynie z przeciwciałem II-rzędowym (kozie przeciwciała anti-IgG królicze znakowane FITC). Proszę



wytlumaczyć rozbieżności wysokości prążków obserwowanych na Ryc. 29 (rozdział elektroforetyczny monomerów CsgA) i Ryc. 30 (immunobloting) względem markerów wielkości białek w odniesieniu do oczekiwanych mas cząsteczkowych: 17 kDa dla monomerów i 32 kDa dla dimerów. Prążek białka wskazany dla dimeru znajduje się na wysokości markera, który wskazywałaby raczej na obecność trimeru. Niektóre wartości przedstawione w Tabeli 16 zostały błędnie zacytowane w opisie wyników znajdującym się powyżej tabeli. W części tabel (np. Tabela 6, 7, 10 i inne), Autorka stosuje zamiast wartości dla badanego parametru skrót „no” – nie oznaczono. Proszę o wyjaśnienie znaczenia tego skrótu, tj. czy odnosi się on do niewykonania pomiaru, czy też pomiar nie był możliwy ze względu na poziom mierzonych parametrów. Czytelnik oczekiwałaby wyjaśnienia braku tych wyników, w tekście lub w legendzie do tabel.

W opinii recenzenta Autorka osiągnęła założone cele badawcze prawidłowo dobierając metodykę badań. Mając jednak na uwadze złożoność procesów zachodzących na styku patogen/monowarstwa komórek nabłonka Caco-2, istotnym wydaje się przedyskutowanie kilku aspektów związanych z założeniami przyjętymi podczas wykonywania doświadczeń.

Interesuje mnie opinia Doktorantki na temat stopnia czystości otrzymanych preparatów fimbrii spiralnych. Do izolacji białek amyloidowych Doktorantka użyła metody Collinsona i wsp. opublikowanej w 1991 r. Jest to metoda, która bez większych modyfikacji do dziś jest wykorzystywana w tym celu przez inne grupy badawcze zajmujące się tematyką tych białek, która obejmuje etap dezintegracji i lizy komórek bakteryjnych. Czystość preparatu potwierdzono pod kątem obecności białek i kwasów nukleinowych. Czy Autorka posiada wiedzę na temat innych potencjalnych zanieczyszczeń tego preparatu, np. lipopolisacharydu (LPS), które to mogłyby wpłynąć na wyniki testów *in vitro*. O jakie metody preparatywne i analityczne można by uzupełnić tą część badań, aby wykluczyć ewentualne zanieczyszczenia? Czy nie byłoby uzasadnione przygotować kontrolnie preparat izolowany z mutanta izogenicznego, aby ocenić lub wykluczyć obecność takich potencjalnych zanieczyszczeń?



Należy docenić fakt, że Autorka była świadoma roli antygenów, takich jak LPS w badanych oddziaływaniach. W Dyskusji Doktorantka pisze, że aby wykluczyć rolę LPS, część badań prowadzono właśnie na oczyszczonych preparatach fimbrii spiralnych.

Kolejne pytanie związane z wynikami pracy doktorskiej, dotyczy zastosowania w badaniach narzędzia, jakim były poliklonalne surowice królicze skierowane przeciwko oczyszczonym fimbriom spiralnym *E. coli*. Jak pokazały wstępne testy fluorescencji pośredniej i zahamowania polimeryzacji monomerów CsgA, przeciwciała te rozpoznawały epitopy CsgA zarówno na monomerach, jak i na powierzchni złożonych struktur tych białek amyloidowych. Autorka zakładała, że przeciwciała takie mogą być dobrym inhibitorem dla procesów indukowanych przez białka amyloidowe, tym samym stanowić pewien rodzaj kontroli ułatwiający interpretacje badanych procesów. Nieoczekiwanie, jak sama pisze, preinkubacja bakterii bądź preparatów białek z surowicami albo wzmagala pewne procesy, jak np. adhezja, albo nie miała na nie wpływu (np. badanie integralności monowarstwy komórek Caco-2). Wartości TEER dla hodowli komórek Caco-2 niestymulowanych i stymulowanych cytokinami, nie wykazywały różnic statystycznych, gdy porównywano hodowlę w obecności jedynie białek amyloidowych lub białek amyloidowych traktowanych wcześniej swoistymi przeciwciałami anti-CsgA. Ciekawe byłoby przeprowadzenie doświadczenia na polimeryzację CsgA w warunkach zbliżonych do warunków hodowli (bufory, obecność surowicy, czas inkubacji). Czy w opinii Autorki tego typu doświadczenie byłoby zasadne i jest możliwe do wykonania? Gdyby mimo preinkubacji z przeciwciałami anti-CsgA dochodziło z jakiegoś powodu do polimeryzacji monomerów do białek amyloidowych, w opinii recenzenta, przy tak dużych agregatach, jakimi są fimbrie spiralne, być może trudno oczekiwać znacznego wpływu sterycznego swoistych przeciwciał na aktywności biologiczne amyloidu. Kolejne pytanie ma charakter dyskusji i nawiązuje do wyników obserwowanych dla mutantów izogenicznych. Czy możliwe jest, że usunięcie genu odpowiedzialnego za wytwarzanie fimbrii spiralnych mógł spowodować dodatnie lub ujemne zmiany w ekspresji innych czynników wirulencji tych





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA  
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71  
www.iitd.pan.wroc.pl

szczepów? W przypadku wyników przedstawionych w Tabeli 6, ciekawym uzupełnieniem kontroli mogło być użycie surowicy królika nieimmunizowanego.

Pani mgr Barbara Pawłowska, zdając sobie sprawę ze złożoności mechanizmów leżących u podstaw badanych przez nią procesów, ostrożnie formułuje wnioski, które są prawidłowe i w pełni poparte uzyskanymi przez nią wynikami. W obszernej Dyskusji, Autorka wnikliwie i rzeczowo ustosunkowała się do wyników badań własnych, odnosząc je do przekroju prac opublikowanych od czasu zidentyfikowania fimbrii spiralnych u *E. coli* i *Salmonella* sp. Sposób prowadzenia dyskusji świadczy o bardzo dobrej znajomości tematu i prawidłowej ocenie własnych osiągnięć. Doktorantka wykazała się dobrą znajomością piśmiennictwa i problematyki związanej ze złożonością patomechanizmów zakażeń wywoływanych przez *E. coli*. Wykaz cytowanych publikacji obejmuje 214 pozycje piśmiennictwa, w tym najnowsze doniesienia z ostatnich 3 lat skrupulatnie omówione w Dyskusji. W Dyskusji Autorka zestawia, jak sama to określa „sprzeczne/kontrowersyjne” wyniki różnych grup badawczych, gdzie w układach z komórkami typu makrofagi/monocyty fimbrie spiralne wykazują właściwości stymulujące wytwarzanie IL-8, a w liniach komórkowych wyprowadzonych z nabłonka jelita są czynnikiem atenuującym. W opinii recenzenta w żadnej mierze nie są to wyniki sprzeczne czy kontrowersyjne, ale wyraźnie wskazują one na to jak ważny jest rodzaj użytej linii komórkowej (tkanki, z której ta linia się wywodzi) i repertuar oraz zmienność środowiskowa receptorów ekspresjonowanych przez daną linię komórkową. Dyskusja bardzo dobrze prezentuje złożoność procesów stanowiących przedmiot badań prowadzonych przez mgr Barbarę Pawłowską. Choć opisane wyniki badań dostarczyły wielu nowych wskazówek dla dalszego zgłębiania roli fimbrii spiralnych w patogenezie zakażeń jelitowych, wydaje się, że w przyszłości warto rozważyć kontynuację badań polegających na ocenie ekspresji receptorów dla tych białek amyloidowych, takich jak m. in. TLR1/TLR2 na powierzchni stymulowanych cytokinami i niestymulowanych komórek Caco-2. Ułatwiłoby to Doktorantce wyjaśnienie otrzymanych wyników na poziomie molekularnym oraz skorelowanie swoich obserwacji z danymi literaturowymi.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ  
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Podsumowując stwierdzam, że cel pracy został osiągnięty. Realizując swoją pracę doktorską Pani mgr Barbara Pawłowska dostarczyła kolejnych cennych wyników na temat hamującej roli fimbrii spiralnych w odniesieniu do nabłonka jelita, szczególnie tych pionierskich związanych z obserwacją pewnych mechanizmów patogenezы w środowisku stanu zapalnego nabłonka jelita. Nieliczne uwagi merytoryczne przedstawione w niniejszej recenzji, które mają raczej charakter dyskusji niż wskazywania uchybień, w żaden sposób nie umniejszają jakości przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej. Wyniki przedstawiają cenne dane, które wyznaczają przynajmniej kilka kierunków dla dalszych badań, które z powodzeniem realizowane są w zespole Promotora pracy doktorskiej Pani mgr Barbary Pawłowskiej – prof. dr hab. Beaty Sobieszczańskiej. Za najciekawsze z nich uważam korelację badanych procesów z typem linii komórkowych (tkanek przewodu pokarmowego) i rodzajem ekspresjonowanych przez nie receptorów istotnych z punktu widzenia patomechanizmów *E. coli*. W podsumowaniu chcę podkreślić, że mimo nielicznych uwag krytycznych, praca jest bardzo wartościowa, została prawidłowo zrealizowana i wnosi oryginalny i istotny wkład do wiedzy o roli fimbrii spiralnych dla żywotności i strategii inwazyjności patogennych szczepów *E. coli* oraz wpływu stanu zapalnego na badane procesy. Część zagadnień poruszanych we wstępie zostało opublikowanych w postaci wspomianej wcześniej pracy przeglądowej (Pawłowska BK i Sobieszczańska MB. Postępy Mikrobiologii, 2016, 55, 119-131), w której Pani mgr Barbara Pawłowska wraz z Promotorem są autorkami.

Podsumowując, rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Tym samym wnoszę z pełnym przekonaniem o jej przyjęciu i dopuszczenie mgr Beaty Pawłowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
Dr inż. hab. Jolanta Łukasiewicz