

Wzrost 28.09.2015  
M. Podmorzka Oko

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO

wpl. dn. 11 WRZ. 2015

L.dz. DL/ 3116/15  
Znak sprawy (D)

**OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR MICHAŁA TURNIAKA p.t.  
„WPLYW INWAZYJNYCH, ENTEROAGREGACYJNYCH SZCZEPÓW  
*Escherichia coli* NA FAGOCYTOZĘ I APOPTOZĘ MAKROFAGÓW**

Przedmiotem badań mgr Michała Turniaka były enteroagregacyjne szczepy *Escherichia coli* (EAEC) izolowane z próbek kału od dorosłych osób z zespołem jelita nadwrażliwego (IBS). Jak wiadomo szczepy EAEC są przyczyną przewlekłych biegunek, często o charakterze epidemii, na całym świecie. O ich znaczeniu dla medycyny świadczy fakt, że w wielu regionach świata plasują się one na drugim miejscu, po ETEC, jeżeli chodzi o częstość zakażeń wywołujących biegunki. Pomimo tego, ciągle wiele aspektów dotyczących ich epidemiologii, czy patogenności, zwłaszcza jeżeli chodzi o tzw. atypowe EAEC, jest słabo poznanych. Stąd wybór tematu pracy doktoranta uważam za aktualny i ważny zarówno pod względem poznawczym jak i praktycznym.

Recenzowana praca posiada układ właściwy dla tego typu opracowań. Rozpoczyna się wstępem dobrze świadczącym o znajomości piśmiennictwa i zagadnień dotyczących realizowanego tematu dysertacji. Część pierwsza tego rozdziału poświęcona jest ogólnym informacjom, które dotyczą patogenów jelitowych oraz szczepów *E. coli* wywołujących zakażenia przewodu pokarmowego człowieka. Po nich następują podrozdziały poświęcone zagadnieniom związanym z procesem fagocytozy, zarówno od strony komórki-gospodarza, jak i fagocytowanych pałeczek *E. coli*. Ostatnia, w moim odczuciu zbyt obszerna część wstępu poświęcona została apoptozie. Omówiono w niej nie tylko zmiany zachodzące w komórkach apoptotycznych i mechanizmy apoptozy oraz udział bakterii, w tym *E. coli*, w tym procesie, ale również, już niepotrzebnie, metody stosowane do wykrywania komórek apoptotycznych. Natomiast ich kosztem można było z powodzeniem poświęcić więcej miejsca np. genom, których dotyczą wyniki badań. Dla przykładu, o grupach filogenetycznych i warunkujących je genach dowiadujemy się dopiero na stronie 42, gdzie poświęcono im zaledwie kilka zdań. Z kolei, w rozdziale „1.2.2. Inwazja *E. coli* do komórek gospodarza” mowa jest tylko o części inwazyj, dla których geny są analizowane w części eksperymentalnej pracy. Inne uwagi dotyczące tego rozdziału. Dla ryciny 1 brak jest właściwego opisu., a co więcej jest on w języku angielskim, co kłóci się z podstawowym językiem opracowania, jakim jest język polski. Co oznaczają występujące na niej cyfry i skróty? Bez tych objaśnień rycina jest niezrozumiała dla czytelnika. Brak odniesienia w tekście do ryciny 3. Str. 9: Co autor rozumie przez „prozapalny szlak apoptozy makrofagów”

i „apoptozę komórek żernych w wyniku aktywacji kaspazy-1”? Tym niemniej, mimo tych uwag, generalnie ta część dysertacji napisana została jasno i przystępnie, dobrą polszczyzną. Chciałbym tylko zwrócić uwagę na dwa żargonowe terminy stosowane przez Autora, których powinien unikać w przyszłości. Pierwszy z nich to „ligacja”, która co prawda w biologii molekularnej odnosi się do reakcji katalizowanej przez ligazę, ale w kontekście używanym przez Autora powinna być zastąpiona słowem „oddziaływanie” lub „łączenie się”. Drugi z tych terminów to „detoksykacja”. Nie można mówić o „detoksykacji NO”, bo w tym konkretnym kontekście chodzi o rozkład tego związku, a detoksykacja oznacza sposób leczenia od uzależnień, polegający na nagłym odstawieniu substancji psychoaktywnej, lub w znaczeniu bardziej potocznym, oczyszczenie organizmu ze szkodliwych lub niepożądanych substancji.

O dobrym przygotowaniu Doktoranta do pracy badawczej świadczy rozdział „Materiały i metody”. Jak z niego wynika, w czasie wykonywania swojej pracy doktorskiej mgr Michał Turniak zapoznał się z podstawowymi technikami mikrobiologicznymi, hodowlą komórek eukariotycznych, a także niektórymi metodami biologii molekularnej wykorzystywanymi w analizie genów oraz stosowanymi w biologii komórki, jak testy na apoptozę. Ten rozdział, pozornie najłatwiejszy do napisania, kryje w sobie niebezpieczeństwo zarówno używania wyrażen żargonowych, jak i zbyt skrótowych, i tym samym mało zrozumiałych, opisów stosowanych metod, czego nie uniknął momentami i Autor dysertacji. Typowym żargonem laboratoryjnym są na przykład takie wyrażenia jak „trypsynizacja”, „monolayer”, czy „worteksować”. Pozostałe uwagi tego typu zamieściłem na marginesach pracy. Proszę również pamiętać, że przy podawaniu parametrów wirowania powinniśmy używać wartości „g”. Jeżeli chcemy posługiwać się obr/min (rpm), to musimy, obok typu wirówki, podać również szczegóły dotyczące stosowanego rotora i ewentualnie próbki wirówkowej. Podobnie, w przypadku wytrząsarki rotacyjnej podając liczbę obrotów/min należało uwzględnić model tego urządzenia i firmę, która je produkuje, bowiem bez tych danych ta informacja jest bezużyteczna. Chciałem również zwrócić uwagę na brak nazwy firmy przy wielu odczynnikach. I wreszcie pytanie do Doktoranta dotyczące wykonania testu na inwazyjność pałeczek *E. coli*. Standardowo, w tego typu testach, komórki po inkubacji z bakteriami płucze się, a następnie w celu pozbycia się resztek nieodpłukanych, związanych z powierzchnią komórek, drobnoustrojów traktuje gentamycyną. I dopiero po inkubacji komórek eukariotycznych z antybiotykiem poddaje się je lizie. Tymczasem w opisanym teście brakuje tego etapu. Dlaczego?

Oczywiście najważniejszym rozdziałem każdej pracy doktorskiej, zwłaszcza eksperymentalnej, są „Wyniki”. W przypadku dysertacji mgr Michała Turniaka, najważniejsze dokonania Doktoranta dają się streścić w następujący sposób:

1. Wszystkich 5 szczepów izolowanych z przypadków IBS wykazywało agregacyjny typ adhezji do komórek nabłonkowych w teście *in vitro*. Stąd zaliczono je do enteroagregacyjnych szczepów *E. coli* (EAEC). Pomimo tego, że reprezentują one patotyp EAEC, to dwa z nich nie posiadają genu *aggr* i *aap*, które są genami charakterystycznymi dla tego patotypu. Stąd określone je jako atypowe EAEC.

2. Powyższych 5 szczepów, ze względu na ekspresję genów determinujących przynależność do określonej grupy filogenetycznej, zaliczono do filogrupy B2 lub D, a więc do grup, do których należą pozajelitowe wirulentne szczepy *E. coli*.

3. W zgodzie z powyższą charakterystyką, wszystkie analizowane szczepy izolowane od chorych z IBS wykazywały wysoki poziom inwazji do komórek wywodzących się z nabłonków. Co się z tym łączy, wszystkie posiadały przynajmniej jeden gen kodujący inwazyjność, białka warunkujące inwazyjność w przypadku *E. coli*. Tym niemniej nie stwierdzono korelacji pomiędzy obecnością genu kodującego określoną inwazyję, a poziomem inwazji. Tak samo liczba genów kodujących te białka, obecnych w genomie danego szczepu, nie korelowała z poziomem inwazji.

4. Na patogeny charakter izolatów *E. coli* pochodzących od pacjentów z IBS i należących do patotypu EAEC, wskazują również badania nad ich fagocytozą przez makrofagi. Po ich sfagocytowaniu, wszystkich 5 szczepów było zdolnych do przeżycia wewnątrz makrofagów przez cały okres trwania eksperymentu (5 dni), a co więcej, dla części z nich obserwowano intensywne namnażanie bakterii w komórkach gospodarzach.

5. Nie znaleziono korelacji pomiędzy indeksem fagocytarnym a indeksem przeżywalności, a także pomiędzy zdolnością pałeczek *E. coli* do przeżywania w makrofagach, a obecnością genów kodujących enzymy antyoksydacyjne i genu kodującego yersiniobaktynę, które w ogromnej mierze odpowiadają za ten proces. Ten brak korelacji dotyczył również genu *chuA*, którego białkowy produkt także bierze udział w przeżywalności *E. coli* w makrofagach. Jakkolwiek dla tych dwóch ostatnich genów, ich brak w szczepach referencyjnych miał generalnie związek z gorszą lub brakiem przeżywalności bakterii w tych komórkach. A więc geny kodujące yersiniobaktynę i białko wiążące hem ChuA wydają się być cechą charakterystyczną dla patotypu EAEC.

6. Stwierdzono, że większość analizowanych szczepów *E. coli*, które przeżywają wewnątrz makrofagów, hamuje zarówno spontaniczną jak i indukowaną staurosporyną apoptozę komórek-gospodarzy po 48 godzinach po internalizacji bakterii w wyniku fagocytozy.

Eksperymenty, na podstawie których uzyskano omówione powyżej wyniki, zostały zaplanowane w sposób prawidłowy, z wykorzystaniem odpowiednio dobranych metod. Merytorycznie, w większości nie budzą one większych zastrzeżeń. Pewne uwagi i pytania ich dotyczące znajdują się poniżej.

Według Autora, brak korelacji pomiędzy zdolnością pałeczek *E. coli* do przeżywania w makrofagach, a obecnością genów kodujących enzymy antyoksydacyjne wskazuje, „że najprawdopodobniej inne czynniki bakteryjne miały wpływ na ich dłuższe utrzymywanie się w komórkach żernych”. W związku z tym stwierdzeniem, chciałbym zwrócić uwagę, że nie tyle obecność danego genu, ale poziom jego ekspresji decyduje o danej cesze fenotypowej. A więc, obserwowane różnice w przeżywalności pomiędzy szczepami mogą być wynikiem różnic w ekspresji/aktywności enzymów odpowiedzialnych za przeżywanie pałeczek *E. coli* w makrofagach, co najprościej można by było wykazać już na poziomie mRNA, np. metodą PCR w czasie rzeczywistym. Ta sama uwaga dotyczy również braku korelacji pomiędzy przeżywalnością a obecnością genów dla yersiniobaktyny oraz genu *chuA*, chociaż w tym przypadku brak tych genów w szczepach referencyjnych miał generalnie związek z gorszą lub brakiem przeżywalności bakterii w makrofagach. W mojej opinii nie można mówić o związku pomiędzy ekspresją fimbrii typu 1-go na powierzchni pałeczek *E. coli* a indeksem fagocytarnym, jak to sugeruje autor. Nie pozwala na to zbyt mała liczba izolatów uniemożliwiająca jakąkolwiek analizę statystyczną. Również nie mogę zgodzić się z twierdzeniem, że szczepy EAEC izolowane z przypadków IBS indukowały apoptozę makrofagów w ciągu pierwszych 24 godzin od ich internalizacji, ponieważ obserwowane różnice w stosunku do kontroli są niewielkie i na pewno nie są istotne statystycznie. A jeżeli tak jest, to brak mi wytłumaczenia dlaczego raz indukują one apoptozę, a w drugim przypadku tzn. po 48 godzinach lub w obecności staurosporyny, ją hamują. Bardzo proszę Doktoranta o ustosunkowanie się do tych moich uwag i wątpliwości. Inne, bardziej szczegółowe uwagi dotyczące tego rozdziału zamieszczam poniżej.

Brak odniesienia w tekście do ryciny 14 powoduje, że nie wiadomo jaki był cel zamieszczenia dwóch fotografii (A i B) obrazujących to samo zjawisko. Natomiast, co miałyby znacznie większy sens, można było zilustrować ryciną pozostałe typy adhezji. Brak

odniesienia w tekście dotyczy zresztą i niektórych innych rycin/wykresów, np. Wykresu 1. Brakuje mi również obrazów żeli agarozowych z rozdzielonymi produktami reakcji PCR. Tego typu ryciny w obecnych czasach są zbyteczne, jeżeli chodzi o publikacje, jednakże w takich opracowaniach jak praca doktorska są dowodem na opanowanie przez kandydata do stopnia doktora technik badawczych prezentowanych w rozdziale „Materiały i Metody”. Proszę pamiętać, że w opracowaniach typu praca magisterska lub doktorska, czy też publikacje, nie ma czegoś takiego jak „Wykresy”. Są albo „Ryciny”, albo „Rysunki”. Wreszcie, czemu miały służyć eksperymenty, w których apoptozę makrofagów indukowano, poza staurosporyną, również bufaliną i kamptocyną, które nie były wykorzystywane w żadnym innym eksperymencie. Również, nie bardzo wiem czemu ma służyć rycina 20, ze względu na brak opisów czego dotyczą poszczególne wykresy!

Rozdział „Dyskusja”, podobnie jak wstęp pracy, napisany jasno i przystępnie, świadczy o dobrej znajomości problematyki przez Doktoranta. Krok po kroku, doświadczenie po doświadczeniu, Autor uzasadnia potrzebę ich wykonania, konfrontując wyniki własne, tam gdzie można, z danymi literaturowymi, dowodząc umiejętności w zakresie doboru i posługiwania się piśmiennictwem naukowym. Jedyna uwaga, jaka nasunęła mi się podczas czytania tego rozdziału, to jego zbyt duża długość, ponieważ niektóre zawarte w nim informacje są powtórzeniem tego, co zostało już opisane we wcześniejszych rozdziałach.

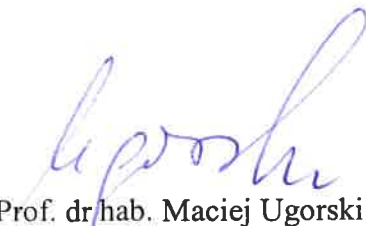
Mniej natomiast podobają mi się przedstawione przez Autora dysertacji wnioski. Jest ich zbyt wiele i bardziej przypominają streszczenie wyników niż właściwe wnioski. Na przykład, wniosek 1 i 7 można było z powodzeniem połączyć w jeden, jako że dotyczy tego samego zjawiska. Poza tym, nie bardzo rozumiem, czym kierował się Autor przy ustalaniu kolejności wniosków. Jest ona dla mnie nieco przypadkowa i chaotyczna.

Na zakończenie chciałbym zaznaczyć, że wiele z zamieszczonych w recenzji uwag dotyczy strony redakcyjnej pracy. Mam nadzieję, że przydadzą się one Doktorantowi w pisaniu kolejnych prac i będą mu pomocne w przyszłych dokonaniach. Równocześnie chciałbym podkreślić, że cel pracy został osiągnięty. Doktorant wykazał się zarówno dobrym przygotowaniem praktycznym, o czym świadczy bogaty warsztat badawczy oraz uzyskane wyniki badań eksperymentalnych, jak i teoretycznym, czego dowodzi cała dysertacja. W związku z powyższym, przedstawiona mi do recenzji praca, tak ze względu na prezentowaną problematykę, uzyskane wyniki, jak i warsztat badawczy spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki. Dlatego wnoszę do wysokiej Rady Wydziału

---

Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie  
magistra Michała Turniaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, dnia 8 września 2015 roku



Prof. dr hab. Maciej Ugorski