



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

Kierownik: prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz

ul. Wieniawskiego 3  
61-712 Poznań

tel. 61 8546 138

fax 61 8546 140

e-mail: szkaradkiewicz@poczta.onet.pl

Wzrost 22.01.2018  
M. Podhorska-Okolof  
WYDZIAŁ LEKARSKI  
Prodziekan ds. Nauki  
prof. dr hab. Marzena Podhorska-Okolof

## Ocena

### pracy doktorskiej mgr Pawła Serka

### pt.: „Biochemiczna i immunologiczna charakterystyka porównawcza bakteryjnych białek enolazowych oraz ich rola receptorowa dla plazminogenu ludzkiego”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. med. Andrzeja Gamiana

Oceniana praca dotyczy charakterystyki wybranych właściwości biologicznych enolazy izolowanej z cytozolu i błony zewnętrznej komórek bakterii *Salmonella enterica* Typhimurium. Enolaza jest enzymem glikolitycznym, wprawdzie znanym od 1934 roku, jednak dopiero w latach 90-tych zaczęto uzyskiwać dane wykazujące jej nieenzymatyczne funkcje. Dobrze już udokumentowano, że enolaza występuje w cytozolu różnych komórek eukariotycznych, jak również prokariotycznych oraz jest wyeksponowana na ich powierzchni. Wiadomo obecnie, że enolaza powierzchniowa stanowi białko receptorowe dla plazminogenu, zapewniając jego konwersję do aktywnej plazminy, katalizującej fibrylizację, a także rozpad wielu substancji międzykomórkowych i cząsteczek błony podstawnej. System aktywacji plazminogenu wydaje się odgrywać kluczową rolę w wielu procesach

fizjologicznych i patofizjologicznych u człowieka, w tym związanych z inwazyjnością i patogennością drobnoustrojów, rozwojem i tworzeniem przerzutów nowotworów złośliwych, a także z indukcją autoimmunizacji. Ze względu na powyższe, enolazy bakteryjne są w ostatnich latach przedmiotem intensywnych badań, jako wielofunkcyjne białka, promujące rozwój zakażeń i autoimmunizację. W kontekście powyższych danych, temat pracy jest więc całkowicie uzasadniony, podejmuje bowiem aktualne i oryginalne zagadnienie.

Praca ma układ typowy dla rozprawy doktorskiej. Liczy 94 strony wydruku komputerowego, jest podzielona na wstęp, z wydzielonym celem pracy, część metodyczną, prezentację wyników i dyskusję z wnioskami. Autor cytuje 263 pozycje piśmiennictwa, z czego około 40 % stanowią pozycje z okresu ostatniej dekady. Praca jest ilustrowana 17 rycinami i 2 tabelami.

We wstępie pracy przedstawiono aktualne dane opisujące strukturę i funkcję enolazy ludzkiej oraz bakteryjnej ze szczególnym uwzględnieniem udziału tego białka w procesach patofizjologicznych u człowieka. Jednocześnie, Autor bardzo obszernie scharakteryzował aktualnie obowiązującą taksonomię bakterii z rodzaju *Salmonella*, ich chorobotwórczość, zwłaszcza pałeczek *Salmonella* nie-durowych (wywołujących zatrucia pokarmowe i salmonelozę), epidemiologię i leczenie zespołów chorobowych. Autor wskazał na poważne znaczenie narastającej lekooporności pałeczek *Salmonella*. Jednak szkoda, że w tym kontekście nie zwrócono uwagi na występujące w ostatnich latach, również w Europie wielolekooporne szczepy *Salmonella enterica* Typhimurium (szczepy DT104). Część wstępna stanowi szerokie studium wiedzy o enolazie i bakteriach z rodzaju *Salmonella*. Jednak, wiele informacji i cytowań literaturowych (ok. 76%) zwłaszcza dotyczących różnych aspektów klinicznych i epidemiologicznych zakażeń pałeczkami *Salmonella* nie jest bezpośrednio związanych z tematem pracy.

Cel pracy i zadania badawcze zostały jasno przedstawione, a następnie konsekwentnie realizowane. Autor w pierwszym etapie pracy, stosując metody

biochemiczne (frakcjonowanie masy bakteryjnej, technikę chromatografii jonowymiennej, analizę spektrometrii mas sprzężoną z chromatografią cieczową) otrzymał enolazę cytozolową i błonową z komórek *Salmonella enterica* Typhimurium (PCM 2565), a ponadto wyizolował ludzką beta-enolazę z homogenatu mięśni poprzecznie prążkowanych oraz plazminogen ludzki z osocza, przy użyciu chromatografii powinowactwa. Jednocześnie, opracowano test immunoenzymatyczny ELISA dla wykrywania króliczych immunoglobulin przeciwko enolazie cytozolowej *Salmonella* oraz dla badań immunoreaktywności tego białka z surowicami, pochodzącymi od chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów z 4 Szpitala Wojskowego we Wrocławiu. W drugim etapie pracy przeprowadzono badania własności receptorowych uzyskanej bakteryjnej enolazy błonowej dla plazminogenu ludzkiego, stosując technikę immunoblotingu. Dwa kolejne etapy badań polegały na analizach reaktywności błonowej i cytozolowej enolazy bakteryjnej z przeciwciałami wobec alfa- oraz beta-enolazy ludzkiej, a także – na ocenie reaktywności bakteryjnej enolazy cytozolowej z surowicami pochodzącymi od chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów. W pracy zastosowano nowoczesne biochemiczne techniki badawcze, odpowiadające międzynarodowym standardom, co jest niewątpliwą zasługą Prof. dr hab. Andrzeja Gamiana – Kierownika Katedry Biochemii Lekarskiej UM we Wrocławiu i promotora tej pracy.

Uzyskane rezultaty zostały opisane oraz udokumentowane w tabelach i na rycinach. Jednak szkoda, że wyniki zwłaszcza etapu I nie zostały przedstawione klarowniej, natomiast komentarze metodyczne powinny być bardziej uporządkowane. Przykładowo, Autor prezentuje immunobloting z enolazą cytozolową *Klebsiella pneumoniae* (str. 41 i 56), jednak brak jest danych odnośnie jej pochodzenia i otrzymywania, podobnie brak jest danych odnośnie pozyskiwania fragmentów ludzkich mięśni poprzecznie prążkowanych (str. 40). Z kolei, dwa różne opisy metodyczne opracowanego testu

immunoenzymatycznego ELISA (str. 38 i 42) dla wykrywania króliczych przeciwciał oraz immunoreaktywności z surowicami pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów wobec enolazy cytozolowej *Salmonella*, przedstawione w jednym opisie w dwóch wariantach byłyby bardziej przejrzyste. Autor wykazał, że przeciwciała przeciwko ludzkiej alfa- i beta-enolazie rozpoznają enolazowe białko błony zewnętrznej pałeczek *Salmonella*. Jednocześnie, udokumentował reaktywność krzyżową enolazy błonowej i cytozolowej pałeczek *Salmonella* z przeciwciałami skierowanymi przeciwko enolazie cytozolowej *Klebsiella pneumoniae*. Ponadto, potwierdził wiązanie otrzymanego plazminogenu do enolazowego białka błonowego *Salmonella* (frakcji nr 95). W badaniach surowic pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów stwierdzono obecność przeciwciał klasy IgG i IgM reaktywnych z enolazą cytozolową *Salmonella*, co sugeruje udział białek enolazowych w etiopatogenezie tej autoimmunologicznej choroby.

W dyskusji omówiono otrzymane wyniki własne i w odniesieniu do aktualnego piśmiennictwa. Dyskusja jest szczegółowa, dobrze przeprowadzona, podejmuje szereg aspektów zagadnienia. Świadczy to o dobrym teoretycznym przygotowaniu doktoranta, o jego dojrzałości naukowej.

Wnioski pracy wynikają z rezultatów przeprowadzonych badań i są merytorycznie uzasadnione.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że wymienione uwagi nie obniżają wartości merytorycznej pracy, a mogą być przydatne Autorowi w dalszych badaniach i przygotowaniu publikacji.

Oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm).

Dlatego mam zaszczyt wnieść do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o przyjęcie tej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, w moim przekonaniu praca zasługuje na wyróżnienie i nagrodę.

Poznań, dnia 16.01.2018r.

KIEROWNIK  
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej

  
Prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz