Prof. dr hab. Mieczysława Irena Boguś
Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN
Warszawa

OCENA
PRACY DOKTORSKIEJ

mgr Anety Sowa-Jasiłek

pt.: „Przeciwgrzybowe właściwości lizozymu i peptydu anionowego 2 *Galleria mellonella*"

Wysoka sprawność systemu obronnego owadów przed licznymi entomopatogenami jest uważana za główny czynnik sprawczy ewolucyjnego sukcesu owadów. Znaczne zintensyfikowanie w ostatnich latach prac nad mechanizmami odpowiedzi immunologicznej owadów zaowocowało identyfikacją wielu białek i peptydów przeciwbakteryjnych oraz przeciwgrzybowych jak również wykazaniem znacznych podobieństw pomiędzy owadami i ssakami w sposobie przekazywania sygnałów kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania układu odpornościowego. Nadal jednak mechanizmy regulacji odpowiedzi immunologicznej owadów na inwazję patogenów są dalekie od rozszyfrowania. Z tego względu decyzja o podjęciu badań dotyczących przeciwgrzybowych właściwości dwóch konstytutywnych elementów systemu odpornościowego mola woskowego *Galleria mellonella*: lizozymu oraz peptydu anionowego 2 jest w pełni uzasadniona.

Recenzowana praca posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich, liczy ogółem 178 stron zawierających 6 rozdziałów i obszerny spis literatury (221 pozycji). W tekście zamieszczono 35 rycin, 9 wykresów i 10 tabel.

Część doświadczalną pracy poprzedza teoretyczny Wstęp, w którym Doktorantka, opierając się na aktualnych danych piśmiennictwa naukowego, przedstawiła charakterystykę układu odpornościowego owadów. Znaczna część Wstępu poświęcona została roli białek i peptydów odpornościowych w ochronie owadów przed mikroorganizmami. Zamieszczone we Wstępie dane zostały zaprezentowane w sposób kompetentny, wskazujący na dobre

przygotowanie Doktorantki do realizacji własnych zamierzeń badawczych. Zagadnienia poruszone we Wstępie ściśle wiążą się z doświadczalną częścią pracy. Cele pracy zostały sformułowane prawidłowo i w przejrzysty sposób.

Do realizacji zaplanowanych badań Doktorantka wykorzystała bardzo zróżnicowaną metodykę badań: od hodowli owadów i mikroorganizmów poprzez badania biochemiczne do obrazowania struktury zewnętrznej i wewnętrznej komórek grzyba *Candida albicans* za pomocą mikroskopu sił atomowych, elektronowego mikroskopu transmisyjnego oraz mikroskopu konfokalnego.

W toku prac eksperymentalnych Doktorantka wykazała, że lizozym i peptyd anionowy 2 (AP2) występujące konstytutywnie w hemolimfie larw *G. mellonella* ograniczają przeżywalność komórek patogennego grzyba *C. albicans*. Oba czynniki antymikrobowe w istotny sposób zmieniają topografię i modyfikują właściwości powierzchni komórek grzyba (sprężystość i adhezję). Badania z użyciem lizozymu znakowanego FITC udokumentowały przemieszczanie się lizozymu do wnętrza komórek grzyba. Doktorantka wykazała również, że przeciwgrzybowe działanie lizozymu nie jest związane z jego aktywnością enzymatyczną. Interakcji lizozymu z komórkami *C. albicans* prawdopodobnie towarzyszy zaburzenie funkcjonowania kanałów potasowych w błonie komórkowej skutkujące wypływem jonów potasowych oraz indukcją apoptozy. Komórki *C. albicans* podane działaniu lizozymu wykazują cechy charakterystyczne dla komórek apoptycznych: eksternalizację fosfatydyloseryny, zmiany aktywności mitochondriów oraz kondensację chromatyny.

Oceniając przedstawioną mi do recenzji pracę stwierdzam, iż:

- praca została napisana w sposób jasny i zrozumiały,
- szata graficzna rozprawy jest staranna,
- obszerny wstęp (41 stron) stanowi dobre teoretyczne wprowadzenie do zagadnień będących przedmiotem badań Autorki,
- zadania jakie sobie postawiła Doktorantka są jasno sformułowane,
- metody użyte w badaniach (opisane na 29 stronach) zostały dobrane w sposób właściwy,
- wyniki badań bogato udokumentowane rycinami, tabelami i zdjęciami, zostały przedstawione na 57 stronach w sposób nie budzący zastrzeżeń,
- w dyskusji (11 stron) Autorka umiejętnie i w sposób rzeczowy konfrontuje uzyskane wyniki z danymi dostępnymi w literaturze fachowej,

- bogate piśmiennictwo jest właściwie dobrane i obejmuje aktualną wiedzę dotyczącą poruszanych zagadnień.

W trakcie analizy rozprawy zauważyłam, że pewne jej fragmenty wymagają korekt. Wśród zauważonych uchybień są drobne błędy i nieporadności stylistyczne. Jest też kilka fragmentów budzących zastrzeżenia merytoryczne.

1. Wstęp

Klasyfikacja hemocytów owadzich nastręcza od dziesięcioleci wielu problemów, dlatego budzi wątpliwości zasadność oparcia się przez autorkę wyłącznie na bardzo lakonicznym opisie i schemacie Kavanagh i Reeves (2004) przedstawiającym 6 rodzajów hemocytów u Lepidoptera. Tym bardziej, że postulowana w 1974 roku przez Price i Radcliffe obecność koagulocytów nigdy nie została potwierdzona u *Galleria mellonella*, podobnie jak i drogi dojrzewania poszczególnych klas hemocytów przedstawione na rycinie 4.

2. Materiały i metody

- W zestawieniu materiałów i odczynników użytych w pracy nie ujęto wszystkich odczynników np. składników buforów, pominięto bufory PPB, podczas gdy np. DMSO pojawia się dwukrotnie choć pod dwiema różnymi nazwami. Brak jednolitego nazewnictwa (nazwy handlowe, pełne nazwy chemiczne, nazwy skrócone, wzory sumaryczne) utrudnia korzystanie z powyższego zestawienia.
- Niekonsekwencją jest brak podania składu pożywki LB podczas gdy skład dwóch podłoży YPD został zaprezentowany w Tabeli 3.
- Pewien kłopot sprawiła mi metodyka określania przeżywalności *C. albicans*. Zgodnie z opisem na stronach 65-66 próby kontrolne i badane każdorazowo wykonywano w 4 powtórzeniach, natomiast wyniki przestawione na wykresach 1- 4 są średnimi z 3 niezależnych eksperymentów. Czy rozbieżność dotycząca ilości powtórzeń wynika tylko z pomyłki pisarskiej, czy może z jakiś powodów odrzucono część wyników? Doktorantka badała wpływ lizozymu i AP2 na przeżywalność komórek i protoplastów *C. albicans*. Przeżywalność po inkubacji z tymi czynnikami ustalano na podstawie zliczania ilości powstałych kolonii drożdżaka. Za 100% przeżywalności przyjęto ilość kolonii w próbach kontrolnych. Ponieważ próby kontrolne również wykonywano w 3 lub 4 powtórzeniach pojawiają się następujące pytania:

- w jaki sposób ustalano owe 100% (czy była to np. średnia z 3 lub 4 powtórzeń),
- na wykresach 1-4 nie ma odchyleń standardowych dla kontroli ponieważ arbitralnie przyjęto ilość kolonii kontrolnych za 100%. Jednakże jest mało prawdopodobne aby ilość kolonii była w każdym niezależnym powtórzeniu taka sama. Jak autorka rozwiązała problem zmienności występujący w kontroli w kontekście analizy statystycznej?

- Mam też kilka zastrzeżeń odnośnie opracowania statystycznego wyników dotyczących przeżywalności. Na wykresie 1 błędnie zaznaczono istotność statystyczną. Najwyższa różnica została stwierdzona pomiędzy kontrolą (100% przeżywalności) a efektem inkubacji komórek *C. albicans* z lizozymem o stężeniach 2,5 μM i 1 μM (przeżywalność na poziomie 0% i 56%), natomiast na wykresie istotność statystyczna tych danych została oznakowana jako niewielka (*$p<0,05$) a najwyższą istotność statystyczną (**$p<0,01$) przypisano 85% przeżywalności po inkubacji z 0,5 μM lizozymu. Z kolei opis danych przedstawionych na wykresie 3 jest niekonsekwentny. Na stronie 89 autorka pisze: „Przeżywalność komórek *C. albicans* po 15 minutach, 1 godzinie, 3 godzinach, 5 godzinach i 24 godzinach inkubacji w obecności 5 μM AP2 wynosiła, odpowiednio, 77%, 72%, 90%, 87%, i 95%. Wartości te różniły się statystycznie od kontroli. " Natomiast trzy linijki niżej autorka pisze: „…różnica w poziomie przeżywalności po 3 godzinach i 5 godzinach inkubacji z czynnikiem była w granicach błędu statystycznego". Co więcej, na wykresie dane dla 3 godzin inkubacji grzyba z AP2 oznaczone są jako istotne statystycznie, choć patrząc na zakres odchylenia standardowego można mieć co do tego poważne wątpliwości. Podobne zastrzeżenia dotyczą danych przedstawionych na wykresie 4. Zastanawia mnie również dlaczego doktorantka wybrała nieparametryczny test Kruskala-Wallisa do analizy wyników. Test ten ma znacznie słabszą moc interpretacyjną uzyskanych danych w porównaniu z jednoczynnikową analizą wariancji ANOVA. Autorka na stronie 84 oświadcza, że „ze względu na brak rozkładu normalnego lub brak równości wariancji w wynikach" do analizy danych wykorzystano test Kruskala-Wallisa. Jakie metody zostały użyte do wykazania braku rozkładu normalnego zmiennych?
- Irytujące jest wielokrotne powtarzanie informacji o tym gdzie znajduje się laserowy skaningowy mikroskop konfokalny LSM 5 Pascal. W Materiałach i metodach informacja ta pojawia się 6 razy.

3. Nieporadności stylistyczne:

Str. 23 Sformułowanie „Plazmatocyty – komórki adherentne ze znaczną ilością cytoplazmy i drobnymi ziarnistościami, które biorą udział w fagocytozie, nodulacji i enkapsulacji" sugeruje, że ziarnistości biorą udział w fagocytozie, nodulacji i enkapsulacji podczas gdy w procesach tych biorą udział plazmatocyty.

Str. 51 Fraza „… obniżenie funkcji układu odpornościowego …" jest zbyt dużym skrótem myślowym.

Str. 64 Fragment „… dostrzeżono tylko pojedyncze kolonie w przeciwieństwie do gęstej murawy kolonii, którą otrzymano …" brzmi dziwnie.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji. Autorka w przedstawionej rozprawie doktorskiej wykazała umiejętność samodzielnego rozwiązywania postawionych zadań naukowych, dobre opanowanie użytych metod badawczych oraz znajomość piśmiennictwa. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią Jej oryginalne osiągnięcia i poszerzają wiedzę na temat roli białek i peptydów antymikrobowych w reakcjach odpornościowych owadów.

Stwierdzam, że przekazana mi do recenzji dysertacja doktorska mgr Anety Sowa-Jasiłek pt.: „Przeciwgrzybowe właściwości lizozymu i peptydu anionowego 2 *Galleria mellonella*" w pełni odpowiada wymaganiom określonym w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnioskuję o dopuszczenie Autorki tej rozprawy do dalszych, przewidzianych ustawą, etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 26.08.2016

Prof. dr hab. Mieczysława Irena Boguś