

Prof. zw. dr hab. Barbara Plytycz
Emerytowany profesor Instytutu Zoologii UJ
e-mail: barbara.plytycz@uj.edu.pl

Kraków, 20 sierpnia 2016

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr **Anety Sowa-Jasiłek** zatytułowanej
"Przeciwgrzybowe właściwości lizozymu i peptydu anionowego 2 *Galleria mellonella*"

Pani mgr Aneta Sowa-Jasiłek wykonała pracę doktorską pod kierunkiem Pani profesor dr hab. Małgorzaty Cytryńskiej, w Zakładzie Immunobiologii Instytutu Biologii i Biochemii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Eksperymenty finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu PRELUDIUM doktorantki oraz grantu OPUS Promotora, Pani prof. M. Cytryńskiej. Część wyników rozprawy doktorskiej już jest opublikowana w bardzo dobrej artykule zespołu: Sowa-Jasiłek A., Zdybicka-Barabas A., Stączek S., Wydrych J., Mak P., Jakubowicz T., Cytryńska M., zatytułowanym „**Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme**”, opublikowanym w roku 2014 w specjalistycznym czasopiśmie „Peptides” (53: 194-201).

Zespół Pani profesor Teresy Jakubowicz wprowadził w Zakładzie nowy model badawczy – gąsienice barciaka większego, *Galleria mellonella*. Od lat z podziwem obserwuję aktywność naukową Zespołu, sukcesywnie poszerzającego zasób wiedzy na temat reakcji odpornościowych tego owada na różne klasy patogenów, w tym grzyby i bakterie (wśród nich groźne również dla ludzi), z zastosowaniem systematycznie poszerzanego spektrum metod badawczych. Miałam przyjemność przyczynić się do usamodzielniania kolejnych Uczniów Pani Profesor T. Jakubowicz poprzez recenzowanie ich prac habilitacyjnych, a teraz uczestniczę w procesie oceny doktoratu Jej „naukowej wnuczki”, Pani mgr Anety Sowa-Jasiłek, doktorantki Pani profesor dr hab. M. Cytryńskiej.

Doktorantka włączyła się do cyklu badań nad aktywnością przeciwgrzybiczną lizozymu i peptydu anionowego 2 (AP2) *G. mellonella*, należących do czynników odpornościowych obecnych konstytutywnie w hemolimfie larw barciaka. Przeprowadziła serię precyzyjnie zaplanowanych, pomysłowych doświadczeń ze starannie dobranymi grupami kontrolnymi. Analizowano w nich żywotność i aktywności metaboliczną drożdży *Candida albicans* oraz zmiany ich powierzchni i struktury wewnętrznej w obecności lizozymu i/lub AP2, z wykorzystaniem nowoczesnych technik badawczych. Następnie podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmów przeciwgrzybiczego działania

lizozymu. Wszystkie wyniki są jasno przedstawione na licznych wykresach i fotografiach oraz poddane krytycznej analizie.

Za spadek żywotności *C. albicans* w obecności lizozymu i/lub AP2 był odpowiedzialny głównie lizozym. Po kilku godzinach na powrót przybywało komórek, co interpretowano jako proliferację tych, które przeżyły. Analiza próbek wybarwionych metodą LIVE/DEAD z użyciem laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego pozwoliła na stwierdzenie przejściowego spadku aktywności metabolicznej i zaistnienie zmian morfologii komórek w obecności lizozymu i/lub AP2, przy czym najsilniejszy spadek odnotowano w grupach lisenina+AP2, co sugeruje synergizm obu czynników. Zastosowanie mikroskopii sił atomowych (AFM) pozwoliło zaobserwować, udokumentować i przeanalizować zmiany powierzchni komórek *C. albicans* pod wpływem lizozymu i/lub AP2. Przy pomocy mikroskopu elektronowego transmisyjnego (TEM) stwierdzono wzrost grubości ściany komórek z próbek eksperymentalnych w stosunku do kontrolnych, co tłumaczono wzrostem ich adhezji w obecności zastosowanych czynników.

Dalsze badania zmierzały do wyjaśnienia mechanizmów przeciwgrzybowej aktywności lizozymu *G. mellonella*. Z użyciem laserowego mikroskopu konfokalnego obserwowano oddziaływanie lizozymu znakowanego fluoroforem FITC z komórkami oraz pozbawionymi ścianą komórkowej protoplastami *C. albicans*. Udowodniono, że w obu przypadkach FITC-lizozym przedostaje się do wnętrza komórki. Można więc było oczekiwać enzymatycznego działania lizozymu na elementy ściany komórkowej grzybów. W pomysłowych eksperymentach nie wykazano jednak aktywności β -glukazanowej ani chitynolitycznej lizozymu *G. mellonella* w stosunku do *C. albicans*, co sugeruje istnienie mechanizmów nieenzymatycznych.

Eksperymentalnie udowodniono podobną przeżywalność komórek i protoplastów poddanych działaniu lizozymu, toteż właśnie protoplasty użyto do wykrycia symptomów apoptozy (czyli eksternalizację fosfatydyloseryny, utratę aktywności mitochondriów i kondensację chromatyny) pod wpływem lizozymu. Dokonano tego z użyciem mikroskopu konfokalnego, a w przyszłości można w tym celu zastosować również cytometrię przepływową.

Uwieńczeniem pracy było przetestowanie hipotezy, że przeciwgrzybowe działanie lizozymu *G. mellonella* może wynikać z zaburzenia funkcjonowania kanałów potasowych w komórkach *C. albicans*. Komórki i protoplasty *C. albicans* inkubowano więc w obecności lizozymu i/lub inhibitorów kanałów potasowych – jonów tetraetyloamoniowych (TEA). Okazało się, że zablokowanie tych kanałów uniemożliwia przeciwgrzybowe działanie lizozymu.

Wyniki tak pięknych eksperymentów zostały wnikliwie przedyskutowane w kontekście innych doświadczeń zespołu lubelskiego oraz osiągnięć naukowców z ośrodków zagranicznych. Część wyników już jest opublikowana (Sowa-Jasiłek et al. 2014), pozostałe zasługują na szybkie wysłanie do Redakcji wysokiej rangi czasopism specjalistycznych.

Rozprawa doktorska Pani Anety Sowa-Jasiłek ma układ tradycyjny. Przedstawiony mi egzemplarz, liczący 178 stron, obejmuje „Summary” w języku angielskim, oraz wykaz 65 skrótów i oznaczeń, po czym następuje XII rozdziałów, czyli: I) obszerny „Wstęp” (strony 14-53); II) „Cel pracy” zawarty w trzech punktach; III) precyzyjnie zaprezentowane „Materiały i metody” (str. 56-84); IV) „Wyniki” przedstawione jasno i bogato ilustrowane (str. 85-145); V) wyczerpującą „Dyskusję” (str. 146-156); VI) „Wnioski” zawarte w 7 punktach; VII) „Literaturę” obejmującą 221 dobrze dobranych pozycji; VIII) „Spis rycin” (35 rycin, w tym wielu złożonych); IX) „Spis tabel” (10 tabel); X) Spis wykresów (10 wykresów).

Dostrzeżone usterki rozprawy:

- 1) Głównym defektem rozprawy jest brak streszczenia w języku polskim oraz niedopracowane edytorsko streszczenie angielskie (utrudniające czytanie rozbić tekstu przez podanie pełnych danych bibliograficznych cytowanych prac; brak kursywy przy wielu nazwach gatunków).
- 2) Autorka we „Wstępie” zamieściła liczne ryciny zaczerpnięte ze źródeł anglojęzycznych. W rozprawie polskojęzycznej, przy ich modyfikacji warto było wprowadzić odnośniki w języku polskim. Czy Autorka otrzymała zgodę wydawnictw na użycie tych ilustracji?
- 3) Opis Ryc. 23. Wszystkie próby były badane, zarówno kontrolne jak i poddane działaniu lizozymu i/lub AP2, zatem te drugie powinny być nazwane eksperymentalne. Małe wakuole (wskazane strzałkami niebieskimi) pojawiły się (choć ja ich nie dostrzegam...) tylko w próbkach eksperymentalnych.
- 4) Str. 131. Dlaczego jest tu odwołanie do Ryciny 8?
- 5) W pracy pojawiły się nieliczne usterki językowe, np. „mitochondium” zamiast „mitochondrium” w opisie ryciny 29 (strony 119-121); czy na stronach 54 i 150 chodzi o „osmolalność”, czy „osmolarność”?
- 6) Str. 144. Ja bym raczej użyła terminu „zablokowanie kanałów”, niż ich „wyblokowanie”

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Praca doktorska Pani Anety Sowa-Jasiłek zatytułowana "Przeciwgrzybowe właściwości lizozymu i peptydu anionowego 2 *Galleria mellonella*" wnosi wiele nowego do zrozumienia interakcji lizozymu *G. mellonella* z komórkami grzybów *C. albicans*, co może mieć istotny wpływ na dalszy rozwój nauk biomedycznych.

Pomimo dostrzeżonych usterek, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Anety Sowa-Jasiłek spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r., poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Stwierdzam również, że przedstawioną pracę można uznać za wyróżniająca się.

Barbara Płytycz

