

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

**OCENA
PRACY DOKTORSKIEJ**

mgr Anny Siemińskiej-Kuczer

pt.: „Humoralna odpowiedź odpornościowa gąsienic

***Galleria mellonella* na zakażenie bakterią *Pseudomonas aeruginosa*”**

Lekooporność patogennych drobnoustrojów stanowi niezwykle poważny problem ochrony zdrowia ludzi. Jednym z bardzo niebezpiecznych patogenów jest pałeczka ropy błękitnej, *Pseudomonas aeruginosa*, bakteria oportunistyczna wywołująca zakażenia osób z obniżoną odpornością i powodująca zakażenia wewnątrzszpitalne. Leczenie osób zainfekowanych *Pseudomonas aeruginosa* jest utrudnione ze względu na dużą oporność tej bakterii na antybiotyki. W poszukiwaniu nowych leków, skutecznych w zwalczaniu zakażeń *P. aeruginosa*, bardzo przydatne są badania mechanizmów patogenezы z zastosowaniem modeli zwierzęcych. W ostatnich latach badania nad oddziaływaniem różnych organizmów patogennych na wrodzone reakcje immunologiczne często prowadzone są z użyciem larw mola woskowego *Galleria mellonella*. Zalety tego modelu zwierzęcego to łatwa hodowla w warunkach laboratoryjnych przez cały rok, niski koszt hodowli, stosunkowo duże rozmiary larw umożliwiające stosowanie różnych technik badawczych, ale najważniejszą zaletą jest dobrze udokumentowane duże podobieństwo wrodzonych reakcji odpornościowych owadów i ssaków. Istotne znaczenie ma również możliwość prowadzenia badań z użyciem owadów bez konieczności uzyskiwania zgody komisji etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach. Podjęcie przez doktorantkę badań mających na celu analizę wybranych aspektów wrodzonej odpowiedzi odpornościowej larw *G. mellonella* na zakażenie dwoma szczepami *P.*

areuginosa: szczepem klinicznym oraz szczepem entomopatogennym, jest w pełni uzasadnione.

Recenzowana praca posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich i liczy ogółem 171 stron. Obszerny spis literatury zawarty jest na 27 stronach. W tekście zamieszczono 50 rycin ilustrujących w zdecydowanej większości (44 ryciny) wyniki prac eksperymentalnych prowadzonych przez Doktorantkę.

Część doświadczalną pracy poprzedza teoretyczny Wstęp, w którym Doktorantka, opierając się na danych piśmiennictwa naukowego, przedstawiła obecny stan wiedzy na temat mechanizmów odpornościowych owadów oraz czynników warunkujących wirulencję *P. areuginosa*. 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 jasny sposób.

Do realizacji zaplanowanych badań Doktorantka wykorzystwała zróżnicowaną metodykę, poczynając od hodowli owadów i mikroorganizmów, poprzez badanie aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej hemolimfy owadów, oznaczanie aktywności oksydazy fenolowej, oczyszczanie alkalicznej proteazy produkowanej przez *P. areuginosa* aż do analizy jakościowej i ilościowej białek i peptydów odpornościowych.

W toku prac eksperymentalnych Doktorantka wykazała, że:

- zakażenie larw *G. mellonella* bakteriami *P. areuginosa* stymuluje aktywność antymikrobową, zarówno przeciwbakteryjną jak i przeciwgrzybową, ich hemolimfy;
- za wzrost aktywności antymikrobowej hemolimfy zainfekowanych owadów odpowiedzialne są indukowalne niskocząsteczkowe peptydy;
- alkaliczna proteaza wyizolowana z bakterii *P. areuginosa* wstrzyknięta do larw *G. mellonella* aktywowała układ oksydazy fenolowej, natomiast w warunkach *in vitro* enzym ten hamował aktywację profenolooksydazy, ale nie miał wpływu na aktywną oksydazę fenolową;
- wstrzyknięcie larwom *G. mellonella* alkalicznej proteazy z *P. areuginosa* zwiększało aktywność antymikrobową hemolimfy, co było skorelowane z pojawieniem się niskocząsteczkowych peptydów.

Oceniając przedstawioną mi do recenzji pracę stwierdzam, iż:

- praca została napisana w sposób przejrzysty i zrozumiały,
- szata graficzna rozprawy jest staranna,
- wstęp opisany na 33 stronach stanowi dobre teoretyczne wprowadzenie do zagadnień będących przedmiotem badań Autorki,
- zadania jakie sobie postawiła Doktorantka są jasno sformułowane,
- metody użyte w badaniach (opisane na 21 stronach) zostały dobrane w sposób właściwy, choć niektóre z nich zostały opisane zbyt pobieżnie w sposób uniemożliwiający czytelnikowi ich odtworzenie,
- wyniki badań bogato udokumentowane rycinami zostały przedstawione na 49 stronach w sposób nie budzący zastrzeżeń,
- w dyskusji (15 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 oraz fragmenty wymagające, do pełnego zrozumienia toku postępowania Autorki podczas wykonywania badań, dodatkowych informacji. Brak istotnych informacji technicznych daje się odczuć w rozdziale „Materiały i metody” oraz w rozdziale „Analiza wyników”

Informacje, których Doktorantka nie podała:

W rozdziale 3.4.3. Oczyszczanie alkalicznej proteazy

- Jaka była wielkość porów membrany dializacyjnej.
- Na jakim sprzęcie i w jaki sposób oczyszczano alkaliczną proteazę za pomocą chromatografii jonowymiennej: jaka była szybkość przepływu buforów przez kolumnę, ile frakcji zebrano, a także wobec jakiego buforu przeprowadzono dializę białek wyeluowanych z kolumny.

W rozdziale 3.4.4. Identyfikacja białek metodą LC-MS-MS/MS

- Czy badania te Doktorantka wykonała osobiście czy może były to badania zlecone wyspecjalizowanemu laboratorium spektrometrii mas np. w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN.

W rozdziale 3.4.12. Oznaczanie aktywności przeciw bakteriom Gram-ujemnym

- Jakie stężenie cekropiny B zastosowano jako standard do oceny aktywności przeciwbakteryjnej.
- W jaki sposób obliczano poziom aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Informacja, że zastosowano algorytm wg. Hultmark i in. 1982 jest zbyt lakoniczna - należało ten algorytm podać.

W rozdziale 3.4.13. Oznaczanie aktywności przeciw bakteriom Gram-dodatnim

- Jaką ilość bakterii *Bacillus circulans* dodawano do podłoża.

W rozdziale 3.4.14. Oznaczanie aktywności hemolimfy typu lizozym

- Jakich stężeń lizozymu białka jaja kurzego użyto do wyznaczenia krzywej wzorcowej.

W rozdziale 3.4.16. Oznaczanie aktywności oksydazy fenolowej w warunkach *in vivo*

- Ze zdania „Do 2 µl hemolimfy owadów (10-krotnie rozcieńczonej) dodawano 18 µl buforu ...” wynika, że przed dodaniem buforu hemolimfa została 10-krotnie rozcieńczona, ale nie podano czym ją rozcieńczono.

W rozdziale 3.4.26. Western blot (immunoblotting)

- Czy przeciwciała pierwszorzędowe przeciw AprA były królicze.

W rozdziale 3.4.27. Analiza jakościowa i ilościowa białek/peptydów hemolimfy

- Ile fenyloitiomocznika (PTU) dodano do 0,1% roztworu kwasu trójfluorooctowego (TFA).
- Czy badania opisane w tym rozdziale polegające na frakcjonowaniu polipeptedów z hemolimfy za pomocą chromatografii cieczowej oraz ich sekwencjonowanie Doktorantka wykonała osobiście czy zostały one zlecone wyspecjalizowanemu laboratorium.

W rozdziale 4.1.3. Analiza jakościowa i ilościowa peptydów odpornościowych obecnych w hemolimfie zakażonych gąsienic:

- Brak jest jakiegokolwiek ilustracji dokumentującej wynik rozdziału chromatograficznego (opisanego w rozdziale 3.4.27.) w postaci uzyskanych 13 frakcji polipeptydów.
- Brak informacji dotyczącej wyników sekwencjonowania wyizolowanych polipeptydów uniemożliwia ocenę czy prawidłowo zidentyfikowano obecność w

hemolimfie następujących peptydów: peptydu anionowego-1, Gm defensyny, peptydu bogatego w prolinę-2, peptydu bogatego w prolinę-1, peptydu anionowego-2, peptydu cekropino-D-podobnego, Gm peptydu moricino-B-podobnego, Gm gallerimycyny, Gm apolipoforycyny a także białek apolipoforyny III oraz lizozymu. Na stronie 82 jest jedynie lakoniczne stwierdzenie, że obecność tych peptydów i białek została zidentyfikowana, ale bez żadnej dokumentacji mogącej to potwierdzić.

- Opis Ryciny 16 zatytułowanej „Profil białek i peptydów ekstraktów z hemolimfy gąsienic zakażonych bakteriami *Pseudomonas*” jest bardzo nieprecyzyjny - nie wiadomo co przedstawiają poszczególne ścieżki obrazu elektroforetycznego, czy elektroforezie poddane zostały frakcje uzyskane w wyniku rozdzielu chromatograficznego (na zdjęciu jest 13 ścieżek), czy nieoznakowana ścieżka z lewej strony to marker a jeśli tak to jakie są masy cząsteczkowe tego wzorca.
- Sposób przeprowadzenia pomiarów stężenia zidentyfikowanych białek i peptydów jest niejasny. Czy białka i peptydy wyekstrahowane z hemolimfy frakcjonowano za pomocą RP-HPLC, następnie rozdzielano elektroforetycznie, transferowano na membranę PVDF, barwiono CBB R-250, poszczególne prążki wycinano i obecne w nich białka lub peptydy eluowano, w eluatach mierzono absorbancję a zawartość eluatów identyfikowano za pomocą sekwencjonowania? Jeśli taki był tok postępowania to czym eluowano białka i peptydy i jaka była wydajność tego procesu?
- W jaki sposób zidentyfikowano dysmutazę ponadtlenkową.

Inne drobne uchybienia:

- Przy opisach warunków wirowania czasami podawane jest „rcf”, czasami „g” a czasami „rpm”. Informacja o „rpm” bez podania modelu wirówki i rotoru jest bezużyteczna.
- W opisach rycin 42 i 43 jest informacja, że gwiazdkami oznaczono istotny wzrost aktywności jednak na rycinach tych nie ma gwiazdek natomiast są oznaczenia literami „a”, „b” i „c” ale informacji co oznaczają te litery brak.
- Strona 114 sformułowanie „... użyto... hemolimfy gąsienic nakłutych saprofitycznymi bakteriami...” jest zbyt daleko posuniętym skrótem myślowym.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji, którą oceniam pozytywnie. Autorka w przedstawionej rozprawie doktorskiej wykazała umiejętność rozwiązywania postawionych zadań naukowych, dobre opanowanie metod badawczych oraz znajomość piśmiennictwa. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią Jej oryginalne osiągnięcia i znacząco poszerzają wiedzę na temat istotnych aspektów wrodzonej odpowiedzi odpornościowej larw *G. mellonella* po zakażeniu dwoma szczepami pałeczki ropy błękitnej (entomopatogennym i izolatem klinicznym) oraz po wstrzyknięciu do jamy ciała alkalicznej proteazy, czynnika wirulencji *P. aeruginosa*.

Stwierdzam, że przekazana mi do recenzji dysertacja doktorska mgr Anny Siemińskiej-Kuczer pt.: „Humoralna odpowiedź odpornościowa gąsienic *Galleria mellonella* na zakażenie bakterią *Pseudomonas aeruginosa*” 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, 3.06.2019


Prof. dr hab. Mieczysława Irena Boguś