

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

**OCENA
PRACY DOKTORSKIEJ**

mgr Sylwii Kariny Stączek

**pt.: „Indukcja odpowiedzi immunologicznej *Galleria mellonella* przez α -1,3-glukan
wyizolowany ze ściany komórkowej grzyba *Aspergillus niger*”**

Grzyby patogenne stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi, zwierząt oraz roślin hodowlanych. *Aspergillus niger* zwany też czarnym kropidlakiem lub czarną pleśnią to kosmopolityczny grzyb pleśniowy często powodujący groźne zakażenia u ludzi z osłabionym układem odpornościowym. Komponenty ściany komórkowej grzybów odgrywają istotną rolę, jako czynniki wirulencji. Za główny wzorzec molekularny grzybów, rozpoznawany przez układ odpornościowy gospodarza, uważany jest β -1,3-glukan natomiast rola α -1,3-glukanu również obecnego w strukturach wielu grzybów jest poznana w znacznie mniejszym stopniu. Przedstawiona mi do oceny praca doktorska dotyczy udziału α -1,3-glukanu wyizolowanego z *Aspergillus niger* w indukcji odpowiedzi immunologicznej. Badania przeprowadzono z użyciem larw mola woskowego *Galleria mellonella* jako organizmu modelowego. Larwy tego gatunku są coraz częściej stosowane w badaniach nad oddziaływaniem różnych organizmów patogennych na wrodzone reakcje immunologiczne ze względu na bardzo duże podobieństwo strukturalne i funkcjonalne odporności wrodzonej ssaków i owadów. Istotne znaczenie ma również niski koszt hodowli tych owadów oraz brak ograniczeń ze strony komisji etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach. Podjęcie przez doktorantkę badań mających na celu analizę wybranych aspektów wrodzonej odpowiedzi odpornościowej larw *G. mellonella* na podanie α -1,3-glukanu wyizolowanego z *Aspergillus niger* jest w pełni uzasadnione.

Recenzowana praca posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich i liczy ogółem 212 stron, z czego spis literatury zajmuje 41 stron. W tekście zamieszczono 54 ryciny i 6 tabel stanowiących w większości dokumentację wyników prac eksperymentalnych prowadzonych przez Doktorantkę.

Część doświadczalna pracy jest poprzedzona teoretycznym wstępem, w którym Doktorantka, opierając się na danych piśmiennictwa naukowego, przedstawiła aktualny stan wiedzy na temat mechanizmów odpornościowych owadów oraz czynników warunkujących wirulencję *A. niger*. Zamieszczone we Wstępie dane zostały przedstawione w sposób rzetelny, wskazujący na dobrą znajomość literatury fachowej i odpowiednie przygotowanie Doktorantki do realizacji zamierzeń badawczych zaplanowanych w pracy doktorskiej. Zagadnienia poruszone we Wstępie ściśle wiążą się z doświadczalną częścią pracy. Cele pracy zostały sformułowane kompetentnie i w sposób klarowny.

Doktorantka w swej pracy stosowała zróżnicowaną metodykę: prowadziła hodowle owadów oraz mikroorganizmów, badała aktywność przeciwbakteryjną i przeciwgrzybową hemolimfy owadów, oznaczała aktywności oksydazy fenolowej, analizowała zmiany w profilu białkowym hemolimfy immunizowanych owadów, badała immunolokalizację apolipoforyny III w hemocytach oraz zmiany hemocytogramu a także identyfikowała białka wiążące się z α -1,3-glukanem.

W wyniku przeprowadzonych prac eksperymentalnych Doktorantka wykazała, że:

- wstrzyknięcie α -1,3-glukanu larwom *G. mellonella*, choć nie wpływało na ich przeżywalność, jednak aktywowało komórkową i humoralną odpowiedź immunologiczną;
- α -1,3-glukan stymulował aktywność przeciwgrzybową i przeciwbakteryjną w hemolimfie poprzez zwiększenie poziomu ekspresji w ciele tłuszczowym genów kodujących gallerimycynę, galiomycynę, cekropinę oraz inhibitor metaloproteinaz;
- podanie owadom α -1,3-glukanu powodowało wzrost poziomu lizozymu i apolipoforyny III w ich hemolimfie;
- α -1,3-glukan w czasie od 15 minut do 4 godzin po wstrzyknięciu larwom hamował aktywność oksydazy fenolowej, po czym następował wzrost aktywności tego enzymu utrzymujący się przez 2 kolejne godziny a następnie kolejny spadek aktywności; prawdopodobną przyczyną zahamowania aktywności oksydazy fenolowej może być związanie się α -1,3-glukanu z

prooksydazą fenolową oraz czynnikiem aktywującym oksydazę fenolową
obecnymi w hemolimfie *G. mellonella*;

- spośród siedmiu zidentyfikowanych białek hemolimfy *G. mellonella*, które
związały się z α -1,3-glukanem dwa znane są z tego, że wiążą się również z β -
1,3-glukanem.

Oceniając przedstawioną mi do recenzji pracę stwierdzam, iż:

- praca została napisana starannie i w sposób zrozumiały,
- szata graficzna rozprawy jest bardzo staranna; na szczególną pochwałę zasługują
przygotowane przez Doktorantkę liczne schematy będące jej własnym autorskim
opracowaniem,
- wstęp opisany na 49 stronach, stanowiący teoretyczne wprowadzenie do zagadnień
będących przedmiotem badań Doktorantki, jest dobrze skonstruowany,
- zadania, jakie sobie postawiła Doktorantka są sformułowane w przejrzysty sposób,
- materiały i metody użyte w badaniach (opisane na 30 stronach) zostały dobrane w
sposób właściwy,
- wyniki badań zostały przedstawione na 47 stronach w sposób nie budzący
zastrzeżeń,
- w dyskusji zajmującej 22 strony Autorka kompetentnie i w sposób wyważony
porównuje 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 uzupełnień
i wyjaśnień.

Strona 74 - brak pochodzenia *A. niger*.

Strona 82 - należało przytoczyć algorytm Hultmarka, na który powołuje się Autorka.

Strony 82- 84 - jakich stężeń cekropiny B, amfoterycyny B i lizozymu użyto do sporządzenia
krzywych kalibracyjnych.

Strona 95 - brak informacji o pochodzeniu przeciwciała skierowanego przeciwko
apolipoporynie III. Czy było to przeciwciało królicze?

Strona 100 - na jakiej podstawie przyjęto założenie, że objętość hemolimfy larw *G. mellonella* w ostatnim stadium o masie około 250 mg wynosi 70 μ l. Z moich doświadczeń wynika, że jest to wartość zaniżona. Czy dokonywano pomiarów np. metodą rozcieńczeniową?

Strona 114 Rycina 34 - brak odnośnika do Ryciny 43 powoduje, że czytelnik w tym miejscu rozprawy nie wie w jaki sposób zidentyfikowano na żelu apolipoforynę III. Dopiero Rycina 43 na stronie 126 to wyjaśnia.

Strona 115 - przydałyby się konkretne dane w postaci np. sekwencji aminokwasów potwierdzających identyfikację peptydów antymikrobowych. Informacja zawarta w zdaniu „W ekstraktach hemolimfy owadów nieimmunizowanych oraz immunizowanych α -1,3-glukanem i DMSO zidentyfikowano osiem peptydów i białek odpornościowych: defensynę *G. mellonella* (galiomycyna), peptyd bogaty w prolinę 1, peptyd bogaty w prolinę 2, cekropinę D, peptyd anionowy 1, peptyd anionowy 2 oraz lizozym i apolipoforynę III” jest niewystarczająca.

Strona 104 Rycina 27 - brak analizy statystycznej.

Ryciny 30, 31, 38, 39, 40, 42 - przeprowadzając analizę statystyczną porównywano pomiędzy sobą efekty podania różnych immunogenów, ale nie porównywano efektów tych immunogenów z wartościami odpowiednich parametrów u owadów nieimmunizowanych. Dla czytelnika przyzwyczajonego do tego, że na wykresach gwiazdkami lub innymi znakami graficznymi zaznaczane są przede wszystkim dane eksperymentalne różniące się w sposób istotny statystycznie od wartości kontrolnych, sposób przedstawienia przez Autorkę wyników analiz statystycznych wprowadza w konfuzję. Na przytoczonych wykresach bardzo często gwiazdki znajdują się nad słupkami, które w sposób ewidentny nie są różne od słupków dotyczących owadów nieimmunizowanych.

Ryciny 43 i 45 - w opisach pod obu rycinami jest informacja, że względny poziom apoLp-III był oznaczany w hemolimfie gąsienic immunizowanych i nieimmunizowanych oznaczonych literą „N”. Na wykresach tych jednak nie umieszczono wartości dla gąsienic kontrolnych.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji, którą oceniam pozytywnie. Doktorantka w przedstawionej rozprawie 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 immunizacji α -1,3-glukanem pochodzącym z patogennego grzyba *A. niger*.

Stwierdzam, że przekazana mi do recenzji dysertacja doktorska mgr Sylwii Kariny Stączek pt.: „Indukcja odpowiedzi immunologicznej *Galleria mellonella* przez α -1,3-glukan wyizolowany ze ściany komórkowej grzyba *Aspergillus niger*” 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