



UNIwersytet
Warszawski

Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Fizjologii Bakterii
dr hab. Radosław Stachowiak



Warszawa, 30.08.2021 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Grygorczuk-Płanety, pt.:

**„Analiza oddziaływania lizozymu ludzkiego na komórki drożdżaka
Candida albicans”**

**wykonanej w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-
Skłodowskiej pod kierunkiem Prof. dr hab. Małgorzaty Cytryńskiej**

Lizozym należy do podstawowych elementów odporności nieswoistej, pierwszej linii obrony przed mikroorganizmami patogennymi. Należy też do najlepiej zbadanych enzymów biorących udział w procesach odpornościowych, zarówno ze względu na swoją istotność jak i niewątpliwie okres przez jaki jest już badany. Wkrótce będziemy obchodzili 100-lecie odkrycia lizozymu przez Aleksandra Fleminga, choć waga tego odkrycia jak i potencjalne zastosowania zostały w dużej mierze przyćmione przez znacznie bardziej słynne dokonanie tego badacza, czyli odkrycie penicyliny. Chociaż lizozym jest aktywny przede wszystkim wobec bakterii, a w szczególności bakterii Gram-dodatnich, wykazuje także aktywność względem innych organizmów, w tym grzybów z rodzaju *Candida*. Naturalnie znacznie mniej wiadomo na temat skuteczności oraz mechanizmów oddziaływania lizozymu na inne niż bakterie mikroorganizmy. Jednocześnie należy zauważyć, że wraz z rozwojem cywilizacyjnym rośnie zagrożenie ze strony patogenów oportunistycznych, takich jak *Candida albicans*. Te umiarkowanie groźne patogeny mogą wywołać poważną w skutkach infekcję w sytuacji

osłabienia organizmu, obniżonej odporności czy występowania wielu jednostek chorobowych u jednego pacjenta. W obecnych, pandemicznych czasach, znaczenie tzw. chorób współistniejących zyskało szczególnie na znaczeniu. Dlatego też temat, którego podjęła się Pani mgr Katarzyna Grygorczuk-Płaneta uważam za interesujący oraz istotny.

Recenzowana rozprawa doktorska ma formę spójnego tematycznie opracowania o klasycznym układzie, typowym dla prac o charakterze eksperymentalnym, z podziałem na Streszczenie (w języku polskim i angielskim), Wstęp, Cel pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusję, Wnioski i Bibliografię. Dodatkowo, praca zawiera pomocne elementy: wykaz skrótów stosowanych w pracy, spis elementów graficznych (tabele i ryciny) oraz aneks zawierający informacje na temat dorobku Doktorantki.

Rozprawa jest przygotowana starannie, zarówno pod względem językowym jak i graficznym, z zachowaniem odpowiednich proporcji długości poszczególnych rozdziałów. Doktorantka nie ustrzegła się jednak drobnych niedociągnięć, niezręcznych sformułowań czy skrótów myślowych (takich jak „mutant w ścianie”), które jednak są nieliczne i w związku z tym, nie wpływają na pozytywny odbiór całości rozprawy.

Wstęp rozprawy w bardzo dobrym stopniu wprowadza czytelnika do tematyki badań. Pierwszy podrozdział wstępu przynosi podstawowe informacje na temat mechanizmów patogenezы *C. albicans*, w szczególności zdolności do pleomorfizmu, adhezji, tworzeniu biofilmu oraz wytwarzania enzymów proteolitycznych. Kolejna część wprowadzenia jest poświęcona chorobotwórczości *C. albicans*, najczęstszым jednostkom chorobowym metodom leczenia oraz peptydom odpornościowym. Ostatni podrozdział wstępu jest, zgodnie z tematem pracy, poświęcony w całości lizozymowi. Autorka w tekście wstępu wymienia także inne gatunki rodzaju *Candida*, które mogą wywoływać infekcje u ludzi. Zabrakło mi w tym zestawieniu gatunku *C. auris*. Jest to patogen który niedawno został rozpoznany jako rosnące zagrożenie. Chociaż z pewnością jest to mniej znany gatunek od pozostałych, ale właśnie tym bardziej dobrze byłoby go wspomnieć w

zestawieniu. Tym bardziej, że gatunek ten szybko się rozprzestrzenia i posiada duży potencjał lekooporności. Poza wspomnianym detalem we wstępie nie brak żadnych informacji, rozdział ten zawiera kompletne kompendium wiedzy na wszystkie zagadnienia jakie zostały poruszone w przedstawionej pracy.

Cel pracy został bardzo dokładnie i jasno przedstawiony, zawiera także wypunktowane najważniejsze kierunki badań. Eksperymenty zostały bardzo dobrze zaplanowane, kolejne doświadczenia bazują na wynikach poprzednich i dostarczają kolejnych danych na temat oddziaływania lizozymu na komórki *C. albicans*.

Część metodyczna pracy została przedstawiona w postaci scalonego rozdziału zawierającego zarówno materiały, jak i metody. Takie przedstawienie stosowanych technik oraz odczynników i szczepów, choć wygodne, sprawia że niektóre elementy nie zajmują należnego im miejsca. Przykładowo użyte w badaniach szczepy *C. albicans* nie są opisane dokładnie w odpowiednim rozdziale czy tabeli tylko są wymienione niejako przy okazji opisu warunków hodowli. Mam też zastrzeżenie odnośnie doboru szczepów stosowanych w pracy. Badania przeprowadzono na trzech szczepach: szczepie dzikim *C. albicans* oraz dwóch mutantach. Wspomniany szczep dziki jest izolatem klinicznym, pochodzącym z jamy ustnej człowieka. W pracy badano dwa zmodyfikowane szczepy o ciekawych i przydatnych do zaplanowanych badań właściwościach. Pierwszy z nich to *C. albicans* Myco 3 charakteryzujący się obniżoną zawartością chityny ścianie komórkowej przy jednocześnie zwiększonej zawartości β -1,3-glukanu. Kolejny mutant to szczep NGY 357, który podobnie jak poprzedni syntetyzuje więcej glukanu, ale w przeciwieństwie do szczepu Myco 3 wytwarza również więcej chityny. W podanym zestawieniu wyraźnie brakuje szczepu dzikiego, wyjściowego dla badanych mutantów. Z pewnością laboratorium z którego uzyskano mutanty posiada szczep wyjściowy, duża szkoda, że nie dostarczyli również szczepu macierzystego dla szczepów Myco 3 oraz NGY 357. Pozwoliłoby to lepiej ocenić na ile obserwowane różnice

pomiędzy badanymi mutantami a szczepem dzikim wynikają ze szczególnych właściwości badanych szczepów. Niezwykle cenne i wartościowe jest zastosowanie w tego typu pracy szczepu klinicznego, który pozwala ocenić efekt działania lizozymu na szczep który stanowi realne zagrożenie dla zdrowia. Byłoby jeszcze bardziej cenne, gdyby udało się uzyskać więcej szczepów klinicznych, pochodzących z innych źródeł i zasiedlających inne nisze organizmu, gdyż takie szczepy potrafią się istotnie między sobą różnić. Domyślam się, że ograniczenia w liczbie i różnorodności stosowanych szczepów były spowodowane brakiem czasu oraz dostępu do odpowiednich placówek, co zrozumiałe w obecnej sytuacji. W części metodycznej moją uwagę zwróciła także procedura oczyszczania lizozymu, który później był stosowany w badaniach. Jest to godne pochwały, gdyż większość badaczy zadowala się jakością produktów oferowanych przez komercyjnych dostawców. Zastanawiam się czy nie było możliwe zakupienie lizozymu (który z pewnością nie jest unikalnym, niszowym produktem) o odpowiedniej jakości od innego dostawcy, co umożliwiłoby jednak szybsze i łatwiejsze uzyskiwanie materiału do badań. Sam opis stosowanych metod nie pozostawia żadnych wątpliwości, Autorka rozprawy w sposób wyczerpujący opisuje procedury prowadzenia doświadczeń.

Pani mgr Katarzyna Grygorczuk-Płaneta znakomicie poradziła sobie z zaplanowaniem i przeprowadzeniem doświadczeń oraz opracowaniem całej metodyki badawczej. Opis wyników rozpoczyna analiza przeżywalności całych komórek oraz protoplastów badanych szczepów. Lizozym istotnie zmniejszył przeżywalność całych komórek jednocześnie nie wpływając w istotny sposób na protoplasty, co udowodnia że głównym celem lizozymu jest ściana komórkowa. Dalszego potwierdzenia dla tej tezy dostarczają wyniki badania mutantów cechujących się zmianami w składzie ściany komórkowej, które to miały również inną niż szczep dziki przeżywalność pod wpływem lizozymu. Te ciekawe wyniki pozostawiają pewien niedosyt, Autorka badała wpływ lizozymu w określonym zakresie stężeń (0,5-4 μ M). Pozostawia to bez odpowiedzi takie pytania: jakie jest

stężenie lizozymu które nie wpływa istotnie na przeżywalność *C. albicans* oraz czy jest możliwa całkowita eradykacja *C. albicans* przy użyciu lizozymu? W kolejnych eksperymentach Doktorantka potwierdziła, że wykazany spadek przeżywalności jest związany ze zmianami metabolicznymi *C. albicans* oraz że lizozym obniża potencjał reprodukcyjny tych drożdżaków. Autorka rozprawy nie ograniczyła się tylko do badań o ogólnych, ale zastosowała również techniki molekularne, żeby potwierdzić że spowolnienie cyklu komórkowego jest związane ze zwiększeniem aktywności metakaspazy, enzymu kontrolującego cykl komórkowy u drożdży. Wychodząc ze sprawdzonej już tezy, że głównym celem lizozymu jest ściana komórkowa, Autorka zbadała morfologię komórek *C. albicans* poddanych działaniu lizozymu. Zaobserwowano istotne zmiany strukturalne, które zmniejszyły elastyczność komórek i siłę adhezji. Stosując barwienie, Doktorantka udowodniła też oddziaływania lizozymu na polisacharydowe składniki ściany komórkowej *C. albicans*. W 8. rozdziale wyników Autorka wykazała, że lizozym ludzki nie posiada aktywności chitynolitycznej, a tym samym oddziałuje na komórki *C. albicans* poprzez inny mechanizm. W ostatnim rozdziale wyników mgr K. Grygorczuk-Płaneta przedstawia rezultaty niezwykle skomplikowanego i ciekawego eksperymentu, w którym badała interakcję lizozymu z glukanem metodą interferometrii biowarstwowej. Dokładniej, zbadano wiązanie z laminaryną, ponieważ β -1,3 glukan jest bardzo słabo rozpuszczalny w wodzie. Przeprowadzony eksperyment wykazał zdolność lizozymu ludzkiego do wiązania z laminaryną. Na podstawie podobieństw strukturalnych laminaryny z glukanem można wnioskować, że z podobnym powinowactwem badany enzym wiąże również glukan obecny w ścianie komórkowej *C. albicans*.

Rozprawę doktorską podsumowuje bardzo dobra Dyskusja, w której Doktorantka rzeczowo i wyczerpująco omawia uzyskane wyniki i przedstawia je w kontekście aktualnych, odpowiednio dobranych pozycji literaturowych.

Rozprawę doktorską mgr Katarzyny Grygorczuk-Płanety oceniam jako bardzo dobrą. Doktorantka zrealizowała postawione cele naukowe, uzyskując wyniki o dużej wartości poznawczej oraz potencjale aplikacyjnym w biotechnologii medycznej. Równie wysoko oceniam odpowiedni dobór metodyki, sposób zaplanowania i realizacji kolejnych zadań badawczych, a także interpretacji i krytycznej dyskusji uzyskanych wyników.

Wniosek końcowy

W mojej opinii oceniana rozprawa w pełni spełnia wymogi ustawowe stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym, zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Grygorczuk-Płanety do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wartość naukową uzyskanych wyników, ich znaczenie nie tylko z punktu widzenia biologii, ale również biotechnologii medycznej oraz wysokiej aktywności publikacyjnej Doktorantki, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Dr hab. Radosław Stachowiak

