

Prof. dr hab. Wojciech Kamysz
Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej
Wydział Farmaceutyczny
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 30.08.2021

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt. „Analiza oddziaływania lizozymu ludzkiego na komórki drożdżaka *Candida albicans*”,
wykonanej przez Panią magister Katarzynę Grygorczuk-Płanetę.

Niewątpliwie jedną z zasług drobnoustrojów jest przyczynianie się do utrzymania ogólnego dobrostanu organizmu człowieka. Przykładem takiego działania jest zwiększenie przyswajalności składników pokarmowych oraz wytwarzanie niektórych witamin przez mikroflorę jelitową. Z drugiej strony bakterie i grzyby mogą być przyczyną chorób, także tych kończących się zgonem pacjenta. *Candida albicans* jest drożdżakiem wchodzącym w skład naturalnej flory ludzkiego organizmu. Drożdżaki występują na powierzchni skóry, błon śluzowych jak i w przewodzie pokarmowym. W pewnych sytuacjach *C. albicans* może być czynnikiem etiologicznym zakażenia. Dzieje się tak gdy organizm posiada osłabiony układ odpornościowy. W związku z tym, szczególnymi grupami ryzyka są pacjenci z zespołem nabytego niedoboru odporności (AIDS – ang. Acquired Immune Deficiency Syndrome), a także osoby stosujące immunosupresanty (np. po przeszczepach), pacjenci onkologiczni (szczególnie chorzy na białaczkę, chłoniaka i szpiczaka mnogiego), osoby w podeszłym wieku, oraz pacjenci, u których w wyniku inwazyjnych działań medycznych mogło dojść do zakażenia. Grzybice mogą dotyczyć zarówno krwi jak i powierzchni ciała m.in. skóry, błon śluzowych, paznokci. W wyniku obecności komórek patogenu w krwioobiegu może dojść do rozsiewu drożdżaków drogą krwi (tzw. rozsiew krwiopochodny) powodującego grzybicze zapalenie ośrodkowego układu nerwowego, wnętrza gałki ocznej czy też wsierdzia. Najczęstszą przyczyną grzybic są drożdżaki z gatunku *C. albicans*. Rzadziej izolowanymi patogenami są m.in. *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, oraz *C. krusei*. Grzybicze zakażenia układowe stanowią wciąż duże

wyzwanie terapeutyczne. Śmiertelność grzybic układowych i uogólnionych zależy od rozpatrywanego obszaru geograficznego, a także gatunku wywołującego infekcję i może sięgać nawet 80%. W celu zwalczania infekcji grzybiczych stosuje się m.in. leki z grupy azoli (m.in. flukonazol, ketokonazol), echinokandyn, czy też amfoterycynę B. Jednym z komponentów chroniących organizm przed zakażeniem jest lizozym, będący składową odporności wrodzonej. Lizozym jest białkiem enzymatycznym, które wytwarzane jest przez wiele różnych gatunków organizmów, w tym przez człowieka. Występuje on w komórkach układu odpornościowego oraz płynach ustrojowych i wykazuje aktywność przeciwbakteryjną oraz przeciwgrzybiczą. Działanie przeciwdrobnoustrojowe związane jest z hydrolizą peptydoglikanu wchodzącego w skład ściany komórkowej, co prowadzi do zachwiania równowagi oraz uwrażliwienia komórki na czynniki zewnętrzne takie jak ciśnienie osmotyczne. W efekcie może dojść do uszkodzenia błony komórkowej i wydostania się części zawartości wewnątrzkomórkowej poza jej obręb, co może doprowadzić do śmierci komórki. Działanie przeciwdrobnoustrojowe lizozymu ludzkiego wobec *C. albicans* tłumaczy się jego aktywnością hydrolityczną wobec polisacharydu wchodzącego w skład ściany komórkowej. Celem pracy było zgłębienie mechanizmu stojącego za obserwowaną aktywnością przeciwgrzybiczą. Praca doktorska Pani mgr Katarzyny Grygorczuk-Płanety składa się ze 121 stron, w tym streszczenia w języku polskim oraz angielskim, spisu treści, wykazu stosowanych skrótów, 38 rysunków, jednej fotografii oraz 3 tabel. Praca została podzielona na wstęp, część literaturową, opis celu pracy, wykorzystanych materiałów oraz opis metod, wyniki i ich dyskusję, opis dorobku naukowego, bibliografię, a także spis rycin i tabel. Rozprawa jest przygotowana w sposób staranny i jej układ jest typowy dla tego typu prac. Przygotowane ilustracje są czytelne i wzbogacają monografię sprawiając, że jej treść staje się jeszcze bardziej przystępna.

W części teoretycznej Doktorantka w sposób precyzyjny i wyczerpujący przedstawiła informacje dotyczące *C. albicans*. Uwzględnione zostały czynniki wirulencji, chorobotwórczość oraz terapie stosowane w zwalczaniu zakażeń. Ponadto szczegółowo opisano ścianę komórkową oraz typy lizozymu wraz z mechanizmem ich działania. Jednocześnie Autorka wskazuje na to, że najlepiej zbadanym jest lizozym pochodzący z białka jaja kurzego, zaś mechanizm działania lizozymu ludzkiego wymaga szczegółowych badań, które stały się przedmiotem niniejszej rozprawy. W istocie zbadanie mechanizmu leżącego u podstaw

aktywności przeciwgrzybiczej lizozymu jest istotnym zagadnieniem. Lepsze zrozumienie sposobu działania naturalnych elementów układu odporności nieswoistej jest ważne nie tylko z poznawczego punktu widzenia ale także nabiera szczególnego znaczenia biorąc pod uwagę fakt narastania oporności na leki stosowane w zakażeniach grzybiczych. Zrozumienie mechanizmu działania może stanowić podstawę do dalszych prac mających na celu opracowanie nowych rozwiązań terapeutycznych lub profilaktycznych z udziałem lizozymu lub jego analogów.

Autorka za cel pracy postawiła sobie określenie wpływu lizozymu ludzkiego na komórki *C. albicans*. Do realizacji niniejszego celu konieczne było przeprowadzenie szeregu badań obejmujących m.in. określenie możliwości oddziaływania lizozymu z β -1,3-glukanem i jego degradacji enzymatycznej, a także aktywności chitynolitycznej. Ponadto uwzględniono wpływ lizozymu na przeżywalność komórek drożdżaka, ich aktywność metaboliczną, żywotność, aktywność metakaspaz oraz powierzchnię komórki. W badaniach uwzględniono trzy szczepy *C. albicans*, przy czym jeden z nich był izolatem klinicznym z jamy ustnej. Dwa pozostałe szczepy były mutantami – Myco 3 oraz NGY 357. Pierwszy z nich charakteryzował się obniżoną zawartością chityny i zwiększoną zawartością β -1,3-glukanu w ścianie komórkowej, zaś drugi z nich cechowała obniżona zawartość mannanu i fosfomannanu oraz zwiększony udział chityny i β -1,3-glukanu. Zastosowanie szczepów różniących się budową ściany komórkowej pozwoliło na zbadanie hipotezy mówiącej o różnym znaczeniu poszczególnych składników ściany komórkowej dla aktywności lizozymu ludzkiego.

Realizując poszczególne cele dysertacji, Doktorantka wykazała się znajomością wielu technik badawczych, które umiejętnie wykorzystywała w praktyce. W ramach prac nad rozprawą Pani mgr Katarzyna Grygorczuk-Płaneta umiejętnie zaplanowała badania, a także zastosowała szereg technik niezbędnych w pracy laboratoryjnej z zakresu mikrobiologii i biologii molekularnej. Poza bardzo dobrym warsztatem mikrobiologicznym w rozprawie wykorzystano także obrazowanie komórek przy użyciu mikroskopii sił atomowych, skaningowego mikroskopu konfokalnego, czy też interferometrię biowarstwową. Przeprowadzone badania doprowadziły do uzyskania interesujących rezultatów, na podstawie których Doktorantka wyciągnęła istotne wnioski. Wykorzystane w pracy protoplasty pozwoliły w pierwszej

kolejności potwierdzić tezę mówiąca o tym, że to właśnie ściana komórkowa jest celem działania lizozymu. Za najbardziej doniosłe osiągnięcia niniejszej rozprawy uważam:

- Określenie działania lizozymu ludzkiego skracającego czas reprodukcji szczepów oraz redukującego liczbę podwojeń;
- Określenie wpływu lizozymu ludzkiego na przeżywalność i aktywność metaboliczną;
- Wskazanie na związek pomiędzy działaniem lizozymu a cyklem komórkowym oraz kształtem komórek;
- Postawienie hipotezy mówiącej o tym, że zawartość chityny w ścianie komórkowej ma związek z czasem życia komórki;
- Wskazanie na zmieniające się pod wpływem lizozymu właściwości powierzchni komórek *C. albicans*, w tym ich chropowatości oraz adhezji;
- Stwierdzenie braku aktywności enzymatycznej lizozymu ludzkiego wobec chityny oraz β -1,3-glukanu oraz wskazanie na występowanie oddziaływań lizozymu z β -1,3-glukanem, co zaowocowało postawieniem hipotezy o nieenzymatycznym mechanizmie działania przeciwgrzybiczego.

Przeprowadzone przez Panią mgr Katarzynę Grygorczuk-Płanetę badania pozwalają lepiej zrozumieć mechanizm działania lizozymu ludzkiego na komórki drożdżaka *C. albicans*. Należy docenić szeroki zakres przeprowadzonych prac – od badań przeżywalności poprzez badania powierzchni komórki, jej właściwości, żywotności oraz aktywności metakaspaz, a z drugiej strony badań aktywności enzymatycznej lizozymu i jego nieenzymatycznego oddziaływania z komórką. Kompleksowe podejście do problemu badawczego doprowadziło Doktorantkę do osiągnięcia zamierzonego celu. Rezultatem badań są nie tylko wartościowe wyniki i poszerzenie wiedzy w danej dziedzinie ale także powstanie nowych hipotez badawczych. Innymi słowy, Doktorantka nie tylko wzbogaca stan wiedzy o nowe fakty ale także w ramach rozprawy starała się ukierunkować kolejne prace badawcze, których wyniki mogłyby jeszcze precyzyjniej odpowiedzieć na pytania związane z mechanizmem stojącym za aktywnością przeciwgrzybiczą ludzkiego lizozymu. W związku z powyższym bardzo wysoko oceniam poziom merytoryczny niniejszej dysertacji. W pracy występują jednak nieliczne błędy interpunkcyjne. Wydaje się, że niektóre zwroty mogłyby być bardziej adekwatne, np. „peptydy te stanowią

pierwszą linię aktywności przeciwdrobnoustrojowej będąc efektorami odporności nieswoistej” (str. 28), „mutanty w ścianie komórkowej” (str. 39), czy też „płodność *C. albicans*” (str. 64). Uwagi te nie wpływają na wysoką wartość merytoryczną pracy. Ponadto prosiłbym Doktorantkę o udzielenie odpowiedzi na następujące pytania:

- Czy uzasadnione byłoby przeprowadzenie dodatkowych badań z zastosowaniem szczepu referencyjnego pochodzącego z kolekcji ATCC? Jakie korzyści mogłyby z tego płynąć?
- Czy otrzymane wyniki badań aktywności enzymatycznej lizozymu ludzkiego (β -1,3-glukanazowej i chitynolitycznej) wykluczają mechanizm działania przeciwgrzybiczego oparty o aktywność enzymatyczną?

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji dysertacja Pani Katarzyny Grygorczuk-Płanety pt. „Analiza oddziaływania lizozymu ludzkiego na komórki drożdżaka *Candida albicans*”, spełnia wszystkie wymagania merytoryczne i formalne stawiane rozprawom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.) z uwzględnieniem art. 179 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Grygorczuk-Płanety do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej

prof. dr hab. Wojciech Kamysz