

Dr hab. Anna Krasowska prof. UWr
Zakład Biotransformacji
Wydział Biotechnologii
ul. F. Joliot-Curie 14a
50-383 Wrocław

Wrocław, 21.02.2024

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Wójcik-Mieszawskiej

pt. „*Analiza działania frakcji polisacharydowo-proteinowej otrzymanej z płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta* na komórki grzyba *Candida albicans*”*

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Marty Fiołki prof. Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie,

w Instytucie Nauk Biologicznych na Wydziale Biologii i Biotechnologii

Rozprawa doktorska pani mgr Sylwii Wójcik-Mieszawskiej dotyczy analizy oddziaływania frakcji białkowo-polisacharydowej pochodzącej z płynu celomatycznego dżdżownic *Dendrobaena veneta* na komórki grzyba *Candida albicans* oraz charakterystyki tego aktywnego czynnika. Doktorantka w swojej pracy wykorzystwała metody mikroskopii optycznej, skaningowej, transmisyjnej mikroskopii elektronowej, mikroskopii sił atomowych oraz cytometrię przepływową i proteomikę.

Ze względu na stale rosnącą liczbę zachorowań na grzybice wywołane przez *C. albicans* oraz lekooporność tego grzyba, bardzo ważne i uzasadnione jest opracowanie nowych terapii czy znalezienie nowych substancji zabijających. Poszukiwanie takich związków zwykle odbywa się na drodze modyfikacji chemicznych struktur już stosowanych antymykotyków, stosowaniu ich w terapiach skojarzonych z innymi aktywnymi przeciwgrzybowo związkami oraz poszukiwaniu substancji czynnych w środowisku naturalnym. Autorka niniejszej rozprawy doktorskiej wybrała tą trzecią ścieżkę postępowania. Słusznie zwróciła uwagę na to, że preparaty pochodzące z dżdżownic wykazują wielokierunkowe, terapeutyczne działanie,

takie jak np. przeciwzapalne, przeciwnowotworowe czy właśnie przeciwdrobnoustrojowe, co stwierdzono w wielu laboratoriach na świecie, głównie w krajach Dalekiego Wschodu.

Ocena poprawności struktury pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska składa się ze *Streszczeń* w języku polskim i angielskim, *Wstępu*, rozdziałów pt. *Hipoteza i Cel Pracy*, *Stosowane Metody* oraz *Omówienie Wyników*, *Dyskusji*, *Podsumowanie i Wnioski*, i *Bibliografii*. Przedstawiona do recenzji praca zawiera również cztery publikacje, których kopie zostały dołączone, jak i *Oświadczenia* autorów tych prac o ich wkładzie w uzyskaniu wyników.

Rozprawa doktorska obejmuje następujące publikacje:

1. Marta J. Fijołka, **Sylwia Mieszawska**, Paulina Czaplewska, Aneta Szymańska, Katarzyna Stępnik, Weronika Sofińska-Chmiel, Tomasz Buchwald, Kinga Lewtak, (2020), *Candida albicans* cel wall as a target of action for the protein-carbohydrate fraction from coelomic fluid of *Dendrobaena veneta*, Scientific Reports, 10(1), 16352
2. Marta J. Fiołka, Paulina Czaplewska, **Sylwia Wójcik-Mieszawska**, Aleksandra Lewandowska, Kinga Lewtak, Weronika Sofińska-Chmiel, Tomasz Buchwald, (2021), Metabolic, structural, and proteomic changes in *Candida albicans* cells induced by the protein-carbohydrate fraction of *Dendrobaena veneta* coelomic fluid, Scientific Reports, 11(1), 16711
3. **Sylwia Wójcik-Mieszawska**, Kinga Lewtak, W. Sofińska-Chmiel, Jerzy Wydrych, Marta J. Fiołka, (2023), Atypical changes in *Candida albicans* cells treated with the Venetin-1 complex from earthworm coelomic fluid, Scientific Reports, 13(1), 2844
4. **Sylwia Wójcik-Mieszawska**, Kinga Lewtak, Ewa Skwarek, Dawid Dębowski, Agata Gitlin-Domagalska, Jakub Nowak, Jerzy Wydrych, Jarosław Pawelec, Marta J. Fiołka, (2023), Autophagy of *Candida albicans* cells after the action of earthworm Venetin-1 nanoparticle with protease inhibitor activity, Scientific Reports, 13(1), 14228.

Powyższe prace stanowią spójną całość i jest to zgodne z art. 13 pkt. 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003, Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami tzn. z zapisem mówiącym, że rozprawa doktorska może mieć formę „...spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopiśmie naukowych...”. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie Scientific Reports i wykazują sumaryczny współczynnik oddziaływania IF = 19,37. Z Oświadczeń Doktorantki i współautorów przedstawionych publikacji wynika, że pani Sylwia Wójcik-Mieszawska w znacznej mierze przyczyniła się do

uzyskania wyników, m. in. otrzymywała kompleks substancji aktywnych z dżdżownic, wykonywała szereg analiz mikroskopowych, przygotowywała próby do analiz proteomicznych, FTIR i AFM, jak również brała udział w wykonywaniu tych doświadczeń. Ponadto z oświadczeń wynika, że Doktorantka brała udział w redagowaniu manuskryptów. Chciałabym również podkreślić, że całkowity dorobek Doktorantki to 7 publikacji, o łącznym IF=33,7.

Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawę doktorską pani Wójcik-Mieszawskiej stanowi cykl publikacji, które ukazały się drukiem w latach 2020-2023, w czasopiśmie Scientific Reports, ocenionych przez niezależnych recenzentów i edytorów. Moja ocena merytoryczna jest również pozytywna i nie mam zastrzeżeń co do formy i treści pracy Doktorantki.

W swojej pracy Doktorantka uzyskała cenne wyniki, które wskazały na przeciwgrzybową rolę frakcji białkowo-polisacharydowej, izolowanej z płynu celomatycznego (PC) wydzielanego przez dżdżownice z gatunku *D. veneta*. Autorka pracy wykazała, że badane izolaty wywołały spadek żywotności *Candida albicans* na drodze apoptozy i nekrozy, zmiany w ścianie komórkowej tego grzyba, zaburzenia w podziale materiału genetycznego między dzielące się komórki, łączenie się DNA mitochondrialnego z jądrowym. Wykazała także obecność autofagosomów, pęcherzyków autofagalnych i powiększonych wakuol. Zmienił się również poziom białek szoku cieplnego, białek kontrolujących funkcje mitochondriów i rybosomów oraz biorących udział w regulacji poziomu reaktywnych form tlenu. Po analizie proteomicznej, okazało się, że głównymi białkami w izolatach z dżdżownic są lizeniny.

W innych laboratoriach na świecie wykazano działanie toksyczne, a nawet letalne płynu celomatycznego w organizmach kręgowców, o czym wspomina Doktorantka we Wstępie swojej pracy. Za działanie niepożądane odpowiada m. in. lizenina gdyż wiąże się specyficznie ze sfingomieliną występującą m.in. w układzie nerwowym i erytrocytach. Z prac pani profesor Fiołki i współpracowników wynika, że kompleks białkowo-polisacharydowy wykazywał aktywność przeciwnowotworową m. in. wobec komórek raka płuca i linii raka jelita grubego, i nie wywoływał działania cytotoksycznego na prawidłowe komórki nabłonka oskrzeli i jelita grubego. Mam w związku z tymi badaniami pytanie o to, dlaczego PC z zawartością lizeniny nie jest cytotoksyczny wobec komórek nabłonka jelita?

Interesuje mnie także odpowiedź na pytanie czy PC, a w szczególności lizenina oddziałuje również na inne sfingolipidy, a w szczególności na sfingolipidy błon komórkowych *C. albicans*? Czy są publikacje opisujące wynik takich badań?

Obserwacje poczynione przez Autorkę pracy doktorskiej wskazują wyraźnie na zmiany w ścianie komórkowej *C. albicans* pod wpływem działania PC. Wiadomo, choćby z prac mojej grupy badawczej, że zmiany w poziomie ergosterolu plazmalemy wywołują znaczące zmiany w ścianie komórkowej tego grzyba. Doktorantka obserwowała plejotropowy efekt PC na elementy komórek *C. albicans*, być może spowodowany reakcją PC i zawartej w nim lizeniny właśnie ze sfingolipidami.

W swojej pracy pani Wójcik-Mieszawska postawiła aż sześć zadań, które następnie konsekwentnie zrealizowała i opublikowała. Z wnioskami zgadzam się i nie mam do nich uwag.

Ocena strony edytorskiej rozprawy

Część wprowadzająca rozprawy doktorskiej została napisana poprawnym językiem polskim, a tekst cechuje duża spójność i powoduje to komfort czytania. Mam uwagę co do braku cytowań literatury w rozdziale opisującym metodykę. Powoduje to wrażenie, że wszystkie metody zostały opracowane przez Doktorantkę, co nie jest raczej prawdą, gdyż w publikacjach są już cytowania innych prac, w których stosowano większość metod, na podstawie których wzorowała się Autorka doktoratu.

Uważam również, że niektóre fragmenty Dyskusji mogłyby być uzupełnione dodatkowymi wiadomościami. Na przykład na stronie 28 Doktorantka napisała, że preparaty odslaniające PAMPs w ścianie komórkowej grzybów mogą być pożądanymi farmaceutykami, co jest oczywiście prawdą, lecz zamiast odnośnika mogłaby się znaleźć informacja o tym dlaczego tak jest. Na stronie 29 jest informacja, że testowany preparat spowodował wzrost poziomu Sod1, czy chodzi o enzym? W zdaniu następnym jest już mowa o genie Sod1. Geny w przypadku *C. albicans* pisze się dużymi literami, stąd moja niepewność czy chodzi o poziom białka, czy ekspresję genu?

Podsumowanie

Pani mgr Sylwia Wójcik-Mieszawska w swojej rozprawie doktorskiej pt. „*Analiza działania frakcji polisacharydowo-proteinowej otrzymanej z płynu celomatycznego dżdżownicy Dendrobaena veneta na komórki grzyba Candida albicans*” uzyskała oryginalne wyniki, które otwierają dalsze perspektywy badawcze i aplikacyjne, a przedłożona rozprawa doktorska potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Moja recenzja jest pozytywna, tym bardziej, że rezultaty zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach, których recenzenci niejako zastąpili mnie w obowiązku oceniania.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Sylwii Wójcik-Mieszawskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie ze względu na zaprezentowany wysoki poziom, kompletność doświadczeń, szerokie ujęcie tematu, zwięzłe, jasne przedstawienie wyników, nie budzące wątpliwości podsumowanie i wnioski pracy wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani mgr Sylwii Wójcik-Mieszawskiej.

Dr hab. Anna Krasowska prof. UW