

Prof. dr hab. Anna Malm
Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin, dn. 22.02.2024 r.

UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
20-093 Lublin, ul. dr W. Chodźki 1
tel./fax 81 448-71-00

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani 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 naukowym Pani dr hab. Marty Fiołki, prof. UMCS w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne

Drożdżaki z rodzaju *Candida* należą do drobnoustrojów oportunistycznych wywołujących zarówno grzybice powierzchniowe, często o charakterze przewlekłym i nawracającym, jak i ciężkie, zazwyczaj zagrażające życiu, grzybice głębokie. Kandydozy stanowią ważny problem współczesnej medycyny z uwagi na wysoką częstość kolonizacji błon śluzowych przez *Candida* spp. (nawet do 70% zdrowych osób) oraz rozpowszechnienie w populacji czynników predysponujących do nadmiernej proliferacji drożdżaków, głównie immunosupresji. Najczęstszym czynnikiem etiologicznym kandydoz jest *Candida albicans*. Należy podkreślić, że leczenie kandydoz jest trudne z powodu ograniczonej liczby antymikotyków oraz narastającej lekooporności drożdżaków. Recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się w aktualny i ważny nurt badawczy dotyczący poszukiwania nowych substancji pochodzenia naturalnego o działaniu przeciwdrobnoustrojowym.

Rozprawa doktorska Pani mgr Sylwii Wójcik-Mieszawskiej jest oparta o cykl czterech tematycznie powiązanych prac oryginalnych, załączonych w dysertacji, które ukazały się w Scientific Reports w latach 2020-2023. Sumaryczny IF tych publikacji wynosi 19,369, a całkowita liczba punktów ministerialnych – 560. Udział Doktorantki w przygotowaniu tych publikacji był znaczący, co potwierdzają Jej oświadczenia oraz stosowne oświadczenia współautorów tych publikacji dołączone do rozprawy doktorskiej. W oświadczeniach współautorów przedstawiono wkład poszczególnych

badaczy w przygotowanie tych prac oraz wyrażono zgodę na ich wykorzystanie przez Panią mgr Sylwią Wójcik-Mieszawską w postępowaniu o nadanie stopnia doktora.

Część opisowa rozprawy doktorskiej zawiera następujące rozdziały: „Wstęp”, „Hipoteza i cel pracy”, „Stosowane metody oraz omówienie wyników”, „Dyskusja”, „Podsumowanie i wnioski” oraz „Bibliografia”. Ta część pracy jest poprzedzona wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim. W recenzowanej rozprawie zamieszczono również życiorys naukowy Doktorantki.

Celem pracy doktorskiej Pani mgr Sylwii Wójcik-Mieszawskiej była analiza działania frakcji polisacharydowo-białkowej otrzymanej z płynu celomatycznego dżdżownic *Dendrobaena veneta* na komórki *C. albicans* przy użyciu metod mikroskopowych (mikroskopii optycznej, fluorescencyjnej, elektronowej – skaningowej i transmisyjnej, sił atomowych), spektroskopowych i cytometrii przepływowej, jak również charakterystyka bioaktywnego składnika. Powyższy cel był realizowany w ramach sześciu zadań badawczych. Należy zaznaczyć, że recenzowana dysertacja jest kontynuacją tematyki badawczej nad aktywnością biologiczną frakcji polisacharydowo-białkowej otrzymanej z płynu celomatycznego dżdżownic *D. veneta* prowadzonej przez Panią dr hab. Martę Fiołkę, prof. UMCS w Katedrze Immunobiologii Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

We Wstępie Doktorantka zawarła dane literaturowe wskazujące, że dżdżownice stanowią bogaty rezerwuar substancji bioaktywnych o szerokim spektrum właściwości. Przedstawiła również aktualne problemy dotyczące zakażeń wywoływanych przez grzyby z rodzaju *Candida*, w tym ograniczone opcje terapeutyczne oraz narastającą lekooporność drożdżaków.

Szczegółowe omówienie stosowanych w toku pracy metod badawczych świadczy o opanowaniu przez Doktorantkę warsztatu badawczego, a zakres przeprowadzonych badań zasługuje na podkreślenie.

W toku szeroko zakrojonych badań nad działaniem przeciwgrzybiczym frakcji polisacharydowo-białkowej otrzymanej z płynu celomatycznego *D. veneta* Doktorantka udokumentowała szereg zmian morfologicznych i funkcjonalnych w obrębie komórek *C. albicans*, jak również organelli komórkowych, powodujących zaburzenie homeostazy komórkowej. Obserwowano m.in. zmianę kształtu komórek, ich agregację, powstawanie komórek wielojądrowych czy tworzenie form nitkowatych, co może świadczyć o zaburzeniach podziałów komórkowych. Innym efektem było rozwarstwienie i degradacja ściany komórkowej wraz z odsłonięciem głębszych warstw zbudowanych z beta-glukanu. Zmiany dotyczące wakuoli, obejmowały powiększenie tych organelli i zwiększenie ich liczby, jak również pojawienie się autofagosomów i ciałek autofagalnych. Zmiany w obrębie mitochondriów polegały na ich powiększeniu i wydłużeniu kształtu wraz z degradacją tych organelli oraz zaburzeniem ich funkcji. Wykazano również wzrost poziomu ROS (ang. reactive oxygen species) wraz ze wzrostem poziomu dysmutazy ponadtlenkowej Sod1. Pod wpływem badanej frakcji, zaobserwowano tworzenie olbrzymich jąder komórkowych poprzedzone migracją DNA

mitochondrialnego w kierunku DNA jądrowego oraz ich fuzją. Ponadto, Doktorantka zaobserwowała znaczący spadek liczby żywych komórek drożdżaka, w tym komórek o aktywnych mitochondriach. Wykazała również, że śmierć komórek *C. albicans* następowała na drodze apoptozy, nekrozy i autofagii. Ciekawe obserwacje dotyczyły aktywności hamującej badanej frakcji polisacharydowo-białkowej wobec proteaz serynowych: matryptazy-1, matryptazy-2 oraz chymotrypsyny, jak również jej efektu na białka szoku cieplnego HSP (ang. heat shock protein).

Ponadto, w toku przeprowadzonych badań frakcja polisacharydowo-białkowa otrzymana z płynu celomatycznego *D. veneta* została scharakteryzowana pod względem chemicznym. Dominującymi białkami okazały się białka należące do grupy lizenin – lizenina oraz LRP-2 (ang. lysenin-related protein-2). Wykazano, że frakcja ta nazwana w kolejnych publikacjach jako Venetin-1 zawierała jednorodne nanocząsteczki o wielkości około 58 nm.

Doktorantka w „Dyskusji” omówiła uzyskane w toku pracy wyniki badań w aspekcie wyjaśnienia potencjalnego mechanizmu działania przeciwgrzybicznego badanej frakcji polisacharydowo-białkowej z płynu celomatycznego *D. veneta* oraz możliwych zastosowań medycznych frakcji polisacharydowo-białkowych izolowanych z innych organizmów.

W oparciu o uzyskane wyniki badań Doktorantka sformułowała osiem wniosków, które według mnie nie są zbyt fortunnie sformułowane. Oczekiwałabym raczej dwóch/trzech wniosków o charakterze ogólnym, zawierających najistotniejsze informacje.

Chciałabym zaznaczyć, że wyniki prezentowane w rozprawie doktorskiej Pani mgr Sylwii Wójcik-Mieszawskiej mają wysoki potencjał poznawczy oraz dużą wartość merytoryczną, jak również stanowią ważną przesłankę do dalszych badań o charakterze aplikacyjnym. Jednak sposób ich przedstawienia poprzez przyporządkowanie wyników z poszczególnych publikacji do stosowanych metod badawczych budzi moje wątpliwości. Nie jest to moim zdaniem dobre rozwiązanie. Wyniki powinny być zgrupowane tematycznie, przedstawiając całościowy obraz działania przeciwgrzybiczego frakcji polisacharydowo-białkowej otrzymanej z płynu celomatycznego *D. veneta* (Venetin-1) na poziomie komórkowym, sub-komórkowym oraz molekularnym.

Czy mogę prosić Doktorantkę o wyjaśnienie, dlaczego jako model badawczy zastosowano kliniczny szczep *C. albicans* typu dzikiego? W tego typu badaniach stosuje się zazwyczaj zdefiniowane szczepy wzorcowe zdeponowane w ogólnodostępnych kolekcjach drobnoustrojów.

Czy mogę prosić Doktorantkę o syntetyczne przedstawienie proponowanego mechanizmu działania przeciwgrzybicznego frakcji polisacharydowo-białkowej otrzymanej z płynu celomatycznego *D. veneta*? Czy można określić, które z obserwowanych efektów mają charakter pierwotny, a które wtórny?

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr Sylwii Wójcik-Mieszawskiej pt. „Analiza działania frakcji polisacharydowo-proteinowej otrzymanej z płynu celomatycznego dżdżownicy *Dendrobaena veneta* na komórki grzyba *Candida albicans*” spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz.742).

Stanowi oryginalne i wartościowe rozwiązanie nowego problemu badawczego. Cel pracy doktorskiej został zrealizowany, a wyniki szeroko zakrojonych badań umożliwiły poznanie wielokierunkowego mechanizmu działania przeciwgrzybicznego badanej frakcji polisacharydowo-białkowej. Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością nowoczesnego warsztatu badawczego, zwłaszcza w zakresie metod mikroskopowych, jak również umiejętnością współpracy w zespole badawczym.

W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Wójcik-Mieszawskiej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Farmaceutycznej

prof. dr hab. n. farm. Anna Malm