ZAKŁAD BIOFIZYKI

Lublin, 18 listopada 2016 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr. Marcina Zawrotniaka pt. „Wpływ czynników wirulencji *Candida albicans* oraz promieniowania ultrafioletowego i wybranych leków na proces formowania neutrofilowych pułapek zewnątrzkomórkowych"

Organizm człowieka stanowi środowisko zamieszkania wielu drobnoustrojów, w tym również chorobotwórczych. Jedynie dzięki aktywności immunologicznej, kolonizacja tych ostatnich nie prowadzi do rozwoju wielu chorób, potencjalnie śmiertelnych dla gospodarza. Na liście takich chorób, poczesne miejsce zajmują grzybice wewnątrzustrojowe, a problemy związane z nimi nabierają w ostatnich latach szczególnej wyrazistości, między innymi wobec zjawiska antybiotykoodporności, pandemii wirusa HIV oraz coraz bardziej powszechnej transplantacji organów. Odpowiedzią na coraz częstsze inwazje grzybicze jest poszukiwanie nowych antybiotyków. Niestety, nie możemy się poszczycić wieloma sukcesami w tym obszarze. Najbardziej skuteczny, ratujący życie antybiotyk przeciwgrzybiczy, amfoterycyna B, znany i badany jest już od kilkudziesięciu lat. Pomimo tego nie udało się, jak dotychczas, obniżyć jego znaczącej toksyczności dla pacjentów, porównywanej z pożądanymi efektami terapeutycznymi. Grzybice wewnątrzustrojowe rozwijają się głównie w warunkach obniżonej odporności gospodarza, co wskazuje, iż terapia antygrzybiczna realizowana mogłaby być na drodze

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl

stymulacji układu odpornościowego. Sugestia taka wskazuje strategiczne cele naszej aktywności naukowo-badawczej, związanej z pełnym poznaniem mechanizmów molekularnych na drodze których realizowane jest unieszkodliwianie komórek grzybów w organizmie człowieka. W ten właśnie, aktualny oraz ważny nurt aktywności badawczej wpisuje się rozprawa doktorska mgr. Marcina Zawrotniaka.

Praca doktorska mgr. Marcina Zawrotniaka wykonana została pod kierunkiem dr hab. Marii Rąpały-Kozik, w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalityki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Praca zredagowana została według typowego, optymalnego moim zdaniem układu, w języku polskim, na 141 stronach maszynopisu. Właściwy tekst rozprawy poprzedzony jest spisem treści, wykazem stosowanych skrótów oraz streszczeniami w językach polskim i angielskim. Wstęp, prezentowany jako rozdział 4., wprowadza czytelnika w obszar wiedzy związany z zasadniczymi elementami mechanizmów obronnych organizmu, w szczególności opisywane są neutrofile, ich odpowiedź na infekcje, w tym neutrofilowe pułapki zewnątrzkomórkowe (NET, ang. Neutrophil Extracellular Traps). W ramach rozdziału wstępnego prezentowane są również zasadnicze informacje związane z budową oraz czynnikami wirulencji drożdżaków z gatunku *Candida albicans*. Już na wstępie, zarysowane są również problemy związane bezpośrednio z interakcją *Candida albicans* z układem odpornościowym oraz ekspozycją neutrofili na promieniowanie z zakresu UV, które to zagadnienia związane są bezpośrednio z zasadniczymi celami rozprawy. Rozdział wstępny zredagowany został, moim zdaniem, w sposób niezwykle przejrzysty oraz rozbudzający ciekawość poznawczą, w oczekiwaniu na lekturę opisów przeprowadzonych badań własnych doktoranta. Opisy te poprzedza prezentacja celów pracy doktorskiej, zredagowanej w ramach krótkiego rozdziału 5. Z rozdziału tego dowiadujemy się, że Autor podjął się realizacji zadań badawczych w ramach trzech odrębnych (choć powiązanym) grup zagadnień: (i) ocena wpływu czynników wirulencji *C. albicans* na proces netozy, (ii) określenie wpływu promieniowania ultrafioletowego na proces netozy oraz (iii) określenie zdolności modulacji netozy przez wybrane leki. W mojej ocenie, postawione cele były niezwykle rozbudowane oraz bardzo ambitne jak na projekt doktorski. Nie wzbudziło to jednak mojego lęku, czy aby nie zbyt ambitne, wobec faktu, iż cele doktoratu formułuje się zwykle na końcowych etapach redagowania rozprawy. Prezentację przeprowadzonych badań poprzedza

opis używanych materiałów, wykaz wykorzystywanego sprzętu laboratoryjnego i zastosowanej aparatury badawczej oraz prezentacja procedur eksperymentalnych związanych z przygotowaniem próbek oraz prowadzeniem analiz. Zamieszczone opisy oraz odwołania literaturowe są, moim zdaniem, na tyle precyzyjne, iż umożliwiają odtworzenie analogicznych eksperymentów. W tym miejscu swojej oceny chciałbym zwrócić uwagę na zastosowanie wielu komplementarnych metod biochemicznych oraz technik obrazowania i badania komórek, umożliwiających wieloaspektową oraz pogłębioną analizę problemów związanych z mechanizmami oddziaływania *C. albicans* z neutrofilami. Najważniejszą częścią rozprawy doktorskiej, stanowiącą o jej bardzo wysokim poziomie naukowym, jest opis przeprowadzonych prac eksperymentalnych oraz interpretacji wyników, prezentowany w ramach rozdziału 7. Rozdział ten zredagowany został w oparciu o podstrukturę, odzwierciedlającą trzy grupy zagadnień, zapowiadane już w ramach prezentacji celów rozprawy. Uzyskane wyniki poddane zostały wieloaspektowej dyskusji, prezentowanej w ramach rozdziału 8. W związku z niezwykle rozbudowanym projektem doktorskim, przeprowadzone badania doprowadziły do uzyskania znacznej liczby cennych wyników naukowych. W ich grupie podkreślić chciałbym:

1. Wykazanie, iż jedna z form morfologicznych *C. albicans* (forma strzępkowa) jest szczególnie aktywna w generowaniu odpowiedzi immunologicznej na drodze formowania NET.
2. Wykazanie, że neutrofile generują odpowiedź immunologiczną w formie NET w odpowiedzi na kontakt z izolowanymi z powierzchni *C. albicans* β-glukanami oraz mannanami. Jednocześnie wykazano niższą aktywność w tego typu odpowiedzi, składników białkowych błony komórkowej (enolazy, adhezyny).
3. Wytypowanie białkowych receptorów powierzchniowych neutrofili, zaangażowanych w rozpoznawanie wybranych czynników *C. albicans*, skutkujących produkcją NET.
4. Wykazanie, iż promieniowanie z zakresu UV w sposób znaczący indukuje uwalnianie NET, przy poziomie dawek nie powodującym indukcji apoptozy oraz śmierci neutrofili.
5. Charakterystyka interakcji odpowiedzi typu NET z popularnymi lekami o stężeniach terapeutycznych.

Jak już podkreślałem, rozprawa doktorska mgr. Marcina Zawrotniaka jest dziełem wielowątkowym, przynoszącym konkretne informacje związane z wieloma otwartymi problemami naukowymi, pobudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. Zależność stężeniowa odpowiedzi typu NET na obecność β-glukanów (Rys. 7, str. 65) posiada wyraźne maksimum. Osobiście, kierowany intuicją, przewidywałbym zależność typu „krzywej nasycającej się". Ciekaw jestem jaki może być mechanizm odpowiadający za kształt tej zależności.
2. W badaniach ukierunkowanych na rozpoznanie receptorów w błonach neutrofili związanych z odpowiedzią typu NET stosowano specyficzne przeciwciała, blokujące aktywność tych białek. Czy możliwe jest, że wobec znacznych rozmiarów przestrzennych przeciwciał blokowane są również inne, sąsiadujące receptory, co może potencjalnie zaburzać wyniki analiz?

Chciałbym również podkreślić bardzo wysoki poziom edytorski rozprawy. Mógłbym zaproponować Autorowi dosłownie pojedyncze modyfikacje. Oto ich krótka lista:

1. Wykresy na stronach 84, 85, 87, 94: proponuję opis osi rzędnych „Intensywność fluorescencji" w miejsce „Fluorescencja", czyli wielkość nie zaś zjawisko fizyczne. Z drugiej jednak strony, przyznaję, iż w wielu specjalistycznych artykułach spotykam tę drobną usterkę powszechnie,
2. Str. 64, 10. wiersz od dołu, jest „w szerokim zakresie" a chodziło zapewne o „w szerokim zakresie stężeń",
3. Str. Rys. 111, 13. wiersz od góry, zamiast „Wobec z braku" proponuję „Wobec braku".

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż Pan mgr Marcin Zawrotniak przedstawił bardzo wartościową rozprawę doktorską, zredagowaną na podstawie wyników cyklu pomysłowo zaprojektowanych oraz precyzyjnie wykonanych prac badawczych. Ważna część tych wyników została równolegle opublikowana w trzech artykułach, w tym w renomowanym

czasopiśmie specjalistycznym *Infection and Immunity*. Pomimo stosunkowo krótkiego okresu jaki upłynął od daty publikacji, prace te cytowane były już 46 razy. W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. Marcina Zawrotniaka spełnia z nadmiarem warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Co więcej, w moim odczuciu, walory samej rozprawy, w szczególności zaś ogromna liczba rezultatów oraz ich ranga, sprawiają iż rozprawę doktorską postrzegam jednoznacznie jako wyróżniającą, mogącą służyć za wzór zarówno w aspekcie poziomu naukowego jak i staranności językowej oraz poziomu edycji. Gratulując Doktorantowi oraz Pani Promotor tak wartościowych rezultatów uprzejmie proszę Wysoką Radę Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie pana mgr. Marcina Zawrotniaka do dalszych etapów postepowania doktorskiego.