

**Ocena rozprawy doktorskiej**  
**pt. „Protekcynna rola komórek *Candida albicans* względem bakterii *Porphyromonas gingivalis* formujących biofilm mieszany występujący w schorzeniach przyzębia”**  
**przedstawionej przez Panią magister DOMINIKĘ BARTNICKĄ**

Jama ustna stanowi niezwykle skomplikowany ekosystem, w którym bytuje ponad 700 gatunków bakterii zdolnych oddziaływać między sobą, formując biofilmy, a także z komórkami gospodarza. Zaburzenie równowagi tego ekosystemu może prowadzić do rozwoju stanów zapalnych przyzębia. Do drobnoustrojów zaangażowanych w te procesy należą beztlenowe bakterie *Porphyromonas gingivalis* dysponujące szeregiem czynników wirulencji, jak fimbrie, gingipainy, czy deiminaza peptydyloargininowa. Częstym składnikiem mieszanych biofilmów są też drożdżaki *Candida albicans*, należące do komensalnej mikroflory jamy ustnej. Dzięki działaniu czynników wirulencji, takich jak adhezyny, czy sekrecjonowane proteazy aspartylowe, *C. albicans* ma wpływ zarówno na zachowanie się innych komponentów mikroflory, jak i na komórki gospodarza.

Biorąc pod uwagę możliwość występowania *P. gingivalis* i *C. albicans* jako składników mieszanego biofilmu, Doktorantka podjęła się niezwykle ambitnego zadania określenia wzajemnych interakcji zachodzących między tymi drobnoustrojami w biofilmie, roli wybranych czynników wirulencji obu patogenów w tych interakcjach, a także wpływu biofilmu mieszanego na komórki gospodarza, na przykładzie keratynocytów, makrofagów oraz fibroblastów. W tym także szerokim podejściu wykorzystano, w różnych konfiguracjach, szereg mutantów bakteryjnych i drożdżowych pozbawionych możliwości wytwarzania poszczególnych czynników wirulencji. Na podkreślenie zasługuje fakt opracowania trzech modeli formowania biofilmu mieszanego, które, do pewnego stopnia, mogą odzwierciedlać warunki *in vivo*: (i) modelu, w którym *C. albicans* wchodzi w interakcję z dojrzałym biofilmem bakteryjnym, (ii) modelu, w którym *P. gingivalis* oddziałuje z dojrzałym biofilmem drożdżowym oraz (iii) modelu wspólnego, kiedy oba mikroorganizmy jednocześnie zasiedlają powierzchnię. Badania biofilmów przeprowadzono w warunkach



tlenowych oraz beztlenowych. Przeanalizowano żywotność i poziom adhezji obu patogenów w biofilmach i zobrazowano sposób ich wzajemnego położenia w tych strukturach. Przebadano również efekt oddziaływania biofilmów mieszanych na poziom ekspresji genów wybranych cytokin i chemokin w keratynocytach, makrofagach i fibroblastach. Co istotne, w przypadku fibroblastów analizie poddano komórki uzyskane od osób zdrowych oraz pacjentów z chorobami przyzębia.

Recenzowana praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, liczy 204 strony (w sumie 7 rozdziałów, w tym Appendix). Zawiera obszerny spis literatury (329 pozycji), wykaz skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. W pracy zamieszczono 42 rysunki oraz 4 tabele. We Wstępie Doktorantka scharakteryzowała infekcje bakteryjne jamy ustnej, ze szczególnym uwzględnieniem roli czynników wirulencji *P. gingivalis* w rozwoju chorób przyzębia, udział czynników wirulencji *C. albicans* w powstawaniu zakażeń jamy ustnej oraz odpowiedź komórek nabłonkowych, leukocytów polimorfojądrzastych i fibroblastów na infekcje wywoływane przez tego drożdżaka. Zagadnienia te zostały zaprezentowane w sposób kompetentny, świadczący o bardzo dobrej znajomości literatury w zakresie podejmowanych badań. Cele pracy, zarówno cel główny, jak i cele szczegółowe zostały dobrze sprecyzowane.

Wyniki uzyskane przez Doktorantkę zostały szczegółowo przeanalizowane na 73 stronach rozprawy. Wykazano, między innymi, że:

- (i) stabilny biofilm formowany jest przez *P. gingivalis* z formą strzępkową *C. albicans*,
- (ii) komórki *C. albicans* wytwarzające strzępki oraz bakterie wytwarzające fimbrie są najbardziej podatne na formowanie biofilmu mieszanego, szczególnie w warunkach beztlenowych,
- (iii) kontakt *P. gingivalis* z biofilmem *C. albicans* działa stymulująco na przeżywalność bakterii, zwłaszcza w warunkach tlenowych,
- (iv) gingipainy biorą udział w regulacji formowania biofilmu mieszanego, o czym może świadczyć: obniżenie zdolności tworzenia biofilmu przez mutanta *P. gingivalis* pozbawionego gingipain i spadek adhezji *C. albicans* do dojrzałego biofilmu utworzonego przez tego mutanta,





- (v) adhezyny Als3 i Hwp1 oraz proteiny aspartyłowe Sap4-6, Sap8, Sap9-10 *C. albicans*, a także deiminaza peptydyloargininowa *P. gingivalis* odgrywają ważną rolę w formowaniu biofilmu mieszanego,
- (vi) poziom ekspresji genów kodujących IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1 i TNF- $\alpha$  w keratynocytach oraz makrofagach poddanych kontaktowi z mieszanym biofilmem ulega zmianom, w zależności od mutanta bakteryjnego oraz czasu kontaktu – generalnie mieszana infekcja powoduje wzrost ekspresji genów mediatorów stanu zapalnego w keratynocytach, natomiast w makrofagach powoduje wzrost ekspresji genu dla IL-1 $\beta$ , a spadek ekspresji pozostałych analizowanych genów, wskazując na obniżoną zdolność makrofagów do odpowiedzi na mieszany biofilm,
- (vii) fibroblasty od osób cierpiących na choroby przyzębia są słabiej kolonizowane przez formę strzępkową *C. albicans* oraz są mniej wrażliwe na stymulację wybranymi czynnikami wirulencji *C. albicans* niż fibroblasty od osób zdrowych,
- (viii) czynniki wirulencji *C. albicans*, szczególnie proteazy Sap, mogą powodować różnicowanie fibroblastów w miofibroblasty.

Wyniki przedstawione w recenzowanej pracy wyraźnie wskazują na działanie protekcyjne *C. albicans* wobec *P. gingivalis* w mieszanych biofilmach. Pokazują również bezsprzecznie, jak bardzo skomplikowane są zależności między oboma składnikami takiego biofilmu. Z tego względu, omówienie wyników stałoby się bardziej czytelne, gdyby każdy podrozdział zakończono krótkim akapitem podsumowującym opisane w nim wyniki. Chociaż w pełni zdaję sobie sprawę, że przy zastosowanej ilości wariantów nie byłoby to proste.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka podjęła się niełatwego zadania odniesienia uzyskanych wyników do oraz ich interpretacji w świetle dostępnych danych literaturowych. Wykazała się tu szerokim podejściem do zagadnienia i dobrym zrozumieniem tematyki. Na podkreślenie zasługuje fakt kontynuacji badań z wykorzystaniem modelu *in vivo*, których rezultaty przytoczone w Dyskusji potwierdziły obserwacje poczynione *in vitro*. Niemniej jednak, niedosyt budzi brak podsumowania wyników rozprawy oraz zdefiniowania płynących z nich wniosków.





Po analizie całości pracy, nasuwa się pytanie: Czy, biorąc pod uwagę, że *C. albicans* ma protekcyjny wpływ na *P. gingivalis*, można zakładać, że eliminacja tego drożdżaka z jamy ustnej mogłaby przyczynić się do zwalczania chorób przyzębia?

Jak zazwyczaj, podczas czytania rozprawy pojawiły się pewne wątpliwości, o wyjaśnienie których proszę Doktorantkę:

- Materiały i Metody, str. 66-67, punkt 3.2.1.6 – Na jakiej podstawie określano właściwości adhezyjne bakterii i drożdży w biofilmie? Zakładając, że w biofilmie mogą znajdować się zarówno komórki żywe, jak i martwe, można by sądzić, że barwienie drożdży Calcofluor White, pokazuje raczej zawartość tych komórek w biofilmie. Wzrost poziomu fluorescencji może wskazywać na większą ilość komórek, niekoniecznie na większą zdolność do adhezji. Czy obecność martwych komórek pozostających w obrębie biofilmu mogła mieć wpływ na uzyskane wyniki?

- Materiały i Metody, str. 67, punkt 3.2.1.8 – Jeśli XTT nie dostaje się do wnętrza komórek, to w jaki sposób możliwa jest „redukcja XTT do pochodnych formazanu dzięki działaniu oksydoreduktaz mitochondrialnych i dehydrogenaz w aktywnych metabolicznie komórkach”?

- Materiały i Metody, str. 75, punkt 3.2.3.5 – Jaki wpływ na wzrost bakterii i drożdży mają różne podłoża do hodowli komórek ludzkich (DMEM, KBM-Gold, RPMI-1640) – czy różny skład tych podłoży mógł mieć wpływ na uzyskane rezultaty?

- Wyniki, str. 107 – Czy eliminacja gingipainy RgpB jest jakoś rekompensowana, np. przez wzrost ekspresji genów kodujących pozostałe gingipainy? Jeśli one biorą udział w adhezji, wtedy wzrost formowania biofilmu mógłby wynikać ze zwiększenia ich ilości w biofilmie.

W trakcie analizy rozprawy doktorskiej zauważyłam też pewne potknięcia, które nie wpływają na ocenę merytoryczną całości pracy, jednakże z obowiązku recenzenta wymienię niektóre z nich:

- w rozprawie przewijają się określenia typu „gatunek *Candida*”, „z gatunku *Streptococcus*”, itp. (np. str. 28, 29, 31, 47, 157) – zapewne chodziło o „rodzaj *Candida*”, czy „z gatunków *Streptococcus*”, itp.,





- pełna dwuczłonowa łacińska nazwa gatunkowa powinna być stosowana, gdy po raz pierwszy podawana jest w tekście; przy każdym kolejnym użyciu stosuje się formę skróconą,
- w rozprawie pojawia się określenie „produkcja” czy „nadprodukcja” i tu pada nazwa analizowanego genu (np. str. 143, 166, 169, 170, 171, 172) - powinno być „ekspresja”,
- Tabela 1 i 2 – „Referencje” - po polsku „Źródła” albo „Dane literaturowe”,
- rysunki – w niektórych brak objaśnienia skrótów (np. Rys. 11 – j.w.; Rys. 40 – K, TGF), brak wyraźnego określenia co stanowiło kontrolę (np. Rys. 15, 16, 36), nieprawidłowe oznaczenie osi (wykresy na Rys. 19 – powinno być  $\mu\text{m}$  zamiast  $\mu\text{M}$ ).

W podsumowaniu oceny pragnę podkreślić, że praca doktorska Pani magister Dominiki Bartnickiej prezentuje wysoki poziom naukowy i stanowi istotny wkład w wyjaśnienie złożonych zależności między drobnoustrojami w biofilmie mieszanym *P. gingivalis*-*C. albicans* oraz oddziaływań takiego biofilmu z komórkami gospodarza. Praca jest niewątpliwie kopalnią danych dotyczących udziału poszczególnych czynników wirulencji *P. gingivalis* i *C. albicans* w formowaniu dwuskładnikowego biofilmu.

Uważam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani magister Dominiki Bartnickiej pt. „Protekcjna rola komórek *Candida albicans* względem bakterii *Porphyromonas gingivalis* formujących biofilm mieszanym występujący w schorzeniach przyzębia”, spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim 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. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Pani magister Dominiki Bartnickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 19 czerwca 2020 r.