



Ocena rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Bartnickiej pt. „Protekcyjna rola komórek *Candida albicans* względem bakterii *Porphyromonas gingivalis* formujących biofilm mieszany występujący w schorzeniach przyzębia”

Rozprawa doktorska mgr Dominiki Bartnickiej została zrealizowana w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalitik Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Rapała-Kozik. Promotor Doktorantki od wielu lat zajmuje się badaniami skoncentrowanymi m.in. na mechanizmach związanych z infekcjami z udziałem *Candida albicans*. Tematyka podjęta w pracy doktorskiej przez Doktorantkę stanowi ich kontynuację i wpisuje się w nurt nowoczesnych badań nad patogenezą chorób jamy ustnej, zwracając szczególną uwagę na problem mieszanych infekcji bakteryjno-drożdżowych.

Rozprawa doktorska to 204 strony drukowanego tekstu wraz z rysunkami i tabelami. Zawiera ona wszystkie elementy wymagane dla tego typu prac, zamieszczone we właściwym układzie. Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę swojej pracy doktorskiej spisem treści, szczegółowym spisem stosowanych skrótów i symboli oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Obszerny wstęp stanowi bardzo szczegółowe wprowadzenie do tematyki pracy badawczej. Kolejne rozdziały, Materiały i metody, Wyniki oraz Dyskusja, pomimo zaprezentowania w nich ogromnej liczby metod i uzyskanych wyników, przedstawione są w sposób umożliwiający właściwą ocenę pracy doktorskiej. Chociaż zdaniem Recenzenta, pomocne byłoby zamieszczenie krótkich podsumowań uzyskanych wyników na końcu każdego podrozdziału opisującego wyniki. Piśmiennictwo obejmuje 329 pozycji literaturowych, z których większość to doniesienia z ostatnich lat, świadczące o wysokiej wartości i aktualności badanego problemu naukowego. Praca zawiera także spis opublikowanych prac, w których Doktorantka jest współautorem, a także załącznik opisujący doświadczenia niewchodzące w skład pracy doktorskiej, ale ułatwiające odniesienie się do uzyskanych w pracy doktorskiej wyników. Zdaniem Recenzenta zawartość tej pracy jest tak obszerna, że mogłaby stanowić podstawę dwóch prac doktorskich, zwłaszcza, że część wyników już została opublikowana.

Świadczy to o dużej pracowitości Doktorantki i zaangażowaniu w dążeniu do pełnego zrozumienia badanych procesów.

Głównym celem pracy doktorskiej było zbadanie mechanizmu wzajemnych oddziaływań zachodzących pomiędzy *C. albicans* i *Porphyromonas gingivalis*, przede wszystkim w procesie tworzenia biofilmu mieszanego i jego wpływu na rozwój chorób przyzębia. Szczegółowe cele obejmowały identyfikację bakteryjnych czynników wirulencji istotnych dla tworzenia biofilmu, analizę drożdżowych czynników wirulencji zaangażowanych w proces tworzenia biofilmu, charakterystykę odpowiedzi modelowych komórek gospodarza w odpowiedzi na kontakt z biofilmem bakteryjno-drożdżowym oraz analizę odpowiedzi fibroblastów, pozyskanych od osób zdrowych i chorych z chorobami przyzębia, na kontakt z biofilmem drożdżowym. Założone cele pracy doktorskiej zdaniem Recenzenta zostały w pełni zrealizowane.

W rozdziale Materiały i metody mgr Dominika Bartnicka szczegółowo i w sposób przejrzysty przedstawiła odczynniki, materiały, sprzęt oraz techniki i metody zastosowane podczas realizacji pracy doktorskiej. Zastosowanie szerokiego spektrum interdyscyplinarnych metod i technik z zakresu hodowli bakteryjnych i komórkowych, mikrobiologii, biologii molekularnej, biochemii, mikroskopii, w tym doświadczeń wykonanych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, świadczy nie tylko o dobrej wiedzy teoretycznej Doktorantki, która do realizacji postawionych zadań potrafi sama dobrać lub zastosować wskazane przez innych odpowiednie metody badawcze, ale także o nabytych, szerokich umiejętnościach praktycznych.

W obszernym rozdziale Wyniki Recenzent nie zauważył błędów merytorycznych, a uzyskane dane, pomimo ogromnej liczby wyników, są przedstawione w sposób pozwalający na ich prawidłową ocenę. Nawet jeśli czasami zdjęcia z mikroskopii fluorescencyjnej (np. Rysunek 35 na str. 146 lub Rysunek 38 na str. 152) niezbyt dobrze oddają rzeczywistość obserwowaną pod mikroskopem, to braki te uzupełnia opis tych wyników. Drobne nieścisłości (np. na str. 129 stwierdzenie „Następnie przy wykorzystaniu ilościowej metody Real-Time PCR przeprowadzono analizę poziomu ekspresji genów ...”) nie wpływają na wartość przedstawionych wyników. Chociaż część uzyskanych wyników nie można zaliczyć do innowacyjnych, to stanowią one bardzo cenną podstawę do dalszych badań. Są to dane polegające na opracowaniu metod badawczych, które mogą być wykorzystane do dalszych doświadczeń lub wyniki z przesiewowych doświadczeń, w których zanalizowano odpowiedź różnych komórek na czynniki bakteryjne i drożdżowe, pozwalające w przyszłości na skoncentrowanie się na wybranych problemach badawczych. Recenzent tylko ma nadzieję, że nawet te wyniki, uznawane jako opracowanie metod lub uznawane jako tzw. wyniki „wstępne”

lub „negatywne”, też zostaną włączone w przyszłości do publikacji. Część wyników potwierdza, także w zakresie prowadzonych przez Doktorantkę badań, różnice wynikające z rodzaju badanego szczepu *P. gingivalis*, a w przypadku *C. albicans*, formy drożdżaka. Co ważne, praca doktorska zawiera wiele wartościowych wyników naukowych, z których ogromna część to dane nowe, wnoszące istotny wkład w dziedzinę dalszej charakterystyki podstaw patogenności *P. gingivalis* oraz *C. albicans*. Efektem tej pracy jest ogromna liczba wyników opisujących czynniki wykorzystywane przez bakterie oraz drożdże w mieszanych infekcjach, które występują nie tylko u osób chorych z chorobami przyzębia, ale mogą mieć znaczenie u osób ze współistniejącymi chorobami układowymi. Co ważne, część z tych wyników została już opublikowana, czyli została poddana dogłębnej ocenie przez specjalistycznych recenzentów czasopism.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w pracy doktorskiej Recenzent zalicza:

- 1) opracowanie metod tworzenia oraz weryfikacji biofilmów mieszanych w warunkach tlenowych i beztlenowych, złożonych z *P. gingivalis* i *C. albicans*;
- 2) wskazanie najbardziej istotnych dla tworzenia biofilmów mieszanych czynników wirulencji produkowanych przez bakterie oraz drożdże;
- 3) analizę odpowiedzi komórek gospodarza (zarówno modelowych linii komórkowych, jak i komórek pozyskanych od osób zdrowych i chorych) na kontakt z biofilmem mieszanym.

W krótkim ich podsumowaniu można stwierdzić, że uzyskane wyniki pozwoliły Doktorantce na ogólne stwierdzenie, że czynniki produkowane przez drożdże *C. albicans* mogą wspomagać przeżywalność bakterii *P. gingivalis* w mieszanym biofilmie bakteryjno-drożdżowym, najprawdopodobniej przez „ukrywanie” bakterii przed układem immunologicznym gospodarza oraz wpływ na tworzenie warunków beztlenowych.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka krytycznie ocenia uzyskane wyniki i ich potencjalne znaczenie, szeroko odnosi się do wiedzy dostępnej w literaturze, a także wskazuje na konieczność dalszych badań. Podczas dyskusji Doktorantka odnosi się także do własnych wyników uzyskanych w doświadczeniach z wykorzystaniem mysiego modelu zwierzęcego. Ta część badań (opisana w postaci załącznika) nie wchodzi w zakres właściwej pracy doktorskiej, ale uzyskane z nich wyniki uzupełniają uzyskaną wiedzę i ułatwiają wyjaśnienie podstaw przedstawionego procesu patogenezy. Pomimo tak wielu podejść badawczych oraz analizowanych problemów badawczych, a także uzyskanej ogromnej liczby wyników, dyskusja jest klarowna.

Pomimo przejrzystego przedstawienia uzyskanych wyników oraz dogłębnej dyskusji, Recenzent prosi o dodatkowe, krótkie ustosunkowanie się Doktorantki do kilku pytań

nasuwających się po lekturze ocenianej pracy doktorskiej, głównie w celu poszerzenie dyskusji zawartej w pracy doktorskiej:

- 1) Na stronie 87 Doktorantka pisze: „Drożdżaki *C. albicans* mogą również wchodzić w interakcję m.in. z bakteriami beztlenowymi, takimi jak *F. nucleatum*lub wręcz z bezwzględnie beztlenowcami, którymi są bakterie *P. gingivalis* ...” W odniesieniu do bakterii *P. gingivalis* zamiennie stosowane są w literaturze pojęcia „bakterie beztlenowe” i „bezwzględne beztlenowce”. Recenzent uważa, że bakterie *P. gingivalis* wytworzyły pewne mechanizmy, które pozwalają im na krótkotrwałe przeżycie w warunkach tlenowych i prosi o takie przykłady.
- 2) Wyniki uzyskane z wykorzystaniem mutantów bakterii *P. gingivalis* pozbawionych możliwości produkcji gingipain, chociaż różniące się w zależności od metody tworzenia biofilmu, czasu tworzenia biofilmu i warunków atmosferycznych, generalnie wskazują na istotne znaczenie tych enzymów w konkurowaniu o środowisko podczas tworzenia biofilmu przez bakterie *P. gingivalis* z *C. albicans*. Czy potencjalne zastosowanie inhibitorów gingipain odniosłoby podobny skutek ?
- 3) Część pracy skoncentrowana na odpowiedzi układu immunologicznego gospodarza na obecność czynników wirulencji produkowanych przez bakterie i drożdże jest, zdaniem Recenzenta, najtrudniejsza do interpretacji. Przyczyną tego jest nie tylko różna i często niejednoznaczna odpowiedź komórek gospodarza w odpowiedzi na obecność bakterii i drożdży, wynikająca np. z różnego stopnia zróżnicowania i polaryzacji makrofagów. Także zróżnicowana powierzchnia komórek mikroorganizmów, wynikająca ze zmiany składu białkowego na powierzchni mutantów oraz rodzaj zastosowanego szczepu bakterii lub formy drożdżaków wpływa na taką odpowiedź, co w części pokazuje w swojej pracy Doktorantka. Czy taka możliwość może mieć odzwierciedlenie np. w różnej zawartości/składzie nie tylko części białkowej, ale także cukrowej na powierzchni mikroorganizmów, eksponowanej na rozpoznanie przez układ immunologiczny gospodarza ?
- 4) Dlaczego w badaniach poświęconych analizie wpływu głównych czynników wirulencji *C. albicans* na tworzenie biofilmu mieszanego Doktorantka zastosowała tylko model wspólny ? Podobny model został zastosowany także w celu zbadania odpowiedzi komórek gospodarza na czynniki wirulencji produkowane przez mikroorganizmy.

Pod względem edytorskim praca doktorska jest napisana bardzo dobrze, a nieliczne błędy nie wpływają na jej wartość merytoryczną. Poza tym, uzyskane wyniki zostały już i z pewnością

zostaną przedstawione w wersji anglojęzycznej. Dlatego też, Recenzent nie wymienia ich szczegółowo.

Zasadniczo zadaniem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku mgr Dominiki Bartnickiej nie można jednak pominąć całego dorobku naukowego, który obejmuje 8 prac, w tym 3 prace zawierające znaczącą część wyników uzyskanych podczas realizacji pracy doktorskiej, opublikowane w bardzo dobrych czasopismach naukowych. Dlatego też, zarówno wyniki przedstawione w pracy doktorskiej i już częściowo opublikowane, a także pozostały opublikowany dorobek naukowy Doktorantki, niezwiązany z tematyką rozprawy doktorskiej, oceniam bardzo wysoko.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Dominiki Bartnickiej pod względem naukowym całkowicie spełnia zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Także pod względem formalnym rozprawa ta spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r., z późniejszymi zmianami. Dlatego też, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na wartość naukową wyników oraz opublikowanie już części wyników uzyskanych w ramach pracy doktorskiej, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Dominiki Bartnickiej stosowną nagrodą.

