



nencki institute
of experimental biology

POLSKA AKADEMIA NAUK
**INSTYTUT BIOLOGII DOŚWIADCZALNEJ
IM. M. NENCKIEGO**

Pracownia Sygnałów Komórkowych i Zaburzeń Metabolicznych

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Tel. (0 22) 589 22 61; Fax. (0 22) 822 53 42

E-mail: adobrzyn@nencki.gov.pl; <http://www.team.nencki.gov.pl>

Prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń
Pracownia Sygnałów Komórkowych
i Zaburzeń Metabolicznych
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Warszawa 29.06.2017

RECENZJA
rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Czyżewskiej

**pt. „Biochemiczne i molekularne cechy grzybów *Malassezia pachydermis*
izolowanych od psów”**

Wiele gatunków drożdżaków z rodzaju *Malassezia* to komensale naturalnej flory mikrobiologicznej skóry. Niektóre z nich, takie jak np. grzyby *M. pachydermatis* mają jednak właściwości patogenne i wywołują grzybice skórne. Stwierdza się je najczęściej u zwierząt towarzyszących człowiekowi (psy i koty), mogą jednak stać się również czynnikiem etiologicznym uogólnionych grzybic u ludzi. Ponadto, grzyby z rodzaju *Malassezia* identyfikowane są jako patogeny nasilające zmiany skórne związane z innymi chorobami. Duże zróżnicowanie genetyczne gatunków *Malassezia* pozwala przypuszczać, że prawdopodobnie istnieją indywidualne różnice w patomechanizmie chorób wywoływanych przez poszczególne szczepy tych grzybów. Wiadomo także, że w przebiegu infekcji wywołanej grzybami z rodzaju *Malassezia* istotną rolę odgrywają również predyspozycje samego gospodarza. Nie wiadomo jednak czy istnieją cechy poszczególnych szczepów wpływające na mechanizm patogenezy zakażeń *M. pachydermatis* oraz jakie czynniki można uznać za markery ich patogenności. Dlatego też zadanie określenia biochemicznych i molekularnych właściwości grzybów *M. pachydermatis*, w zależności od źródła izolacji (psy chore na zapalenie ucha zewnętrznego lub nie wykazujące objawów choroby), którego w swojej rozprawie podjęła się mgr Urszula Czyżewska, należy uznać za niezwykle istotne i trafne.

Rozprawa doktorska mgr Czyżewskiej przedstawia wyniki badań zrealizowanych w Zakładzie Cytobiochemii Instytutu Biologii Uniwersytetu w Białymstoku pod kierunkiem dr. hab. Adama Tylickiego oraz dr. Marka Bartoszewicza. Maszynopis zawiera 150 stron i ma

klasyczny układ. Całość jest podzielona na następujące rozdziały: 1) Wykaz skrótów (2 strony), 2 i 3) Streszczenia w języku polskim i angielskim (po 2 strony), 4) Wstęp (28 stron), 5) Cel pracy (2 strony), 6) Materiał i Metody (36 stron), 7) Wyniki (37 stron), 8) Dyskusja (14 stron), 9) Wnioski (1 strona), 10) Literatura (15 stron), 11) Spis tabel i rycin (6 stron). Rozprawa została przygotowana starannie pod względem edycyjnym i nomenklaturowym. W zasadzie jedynym uchybieniem pod tym względem jest użycie pojęcia triglicerydy (str. 32) zamiast triacyloglicerole, aczkolwiek w pozostałych częściach rozprawy termin ten jest używany prawidłowo.

W rozdziale Wstęp doktorantka przedstawiła szczegółowe informacje dotyczące grzybów z rodzaju *Malassezia*. Opisano m. in. choroby związane z zakażeniem tymi grzybami u ludzi i zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem *M. pachydermatis*. Najbardziej interesująca jest część dotycząca genetycznego oraz biochemicznego zróżnicowania grzybów z rodzaju *Malassezia*, która powinna zostać opublikowana w formie artykułu poglądowego. Rozdział 'Wstęp' zawiera niezbędne informacje, które wprowadzają czytelnika w tematykę badań zaprezentowaną w dalszej części dysertacji. Rozdział ten, tak jak i cała praca, jest napisany bardzo klarownym językiem.

Celem badawczym postawionym w rozprawie jest weryfikacja hipotezy, że „występowanie cech różniących *M. pachydermatis* pochodzących od zwierząt zdrowych lub z objawami *otitis externa* wskazuje na istnienie typowo komensalnych, jak i potencjalnie patogennych szczepów w obrębie gatunku”. W celu weryfikacji tej hipotezy utworzono bazę szczepów *M. pachydermatis* wyizolowanych od zwierząt zdrowych oraz psów z objawami zapalenia ucha zewnętrznego. Następnie wykorzystując metody z zakresu: biologii molekularnej (analiza podobieństwa genetycznego metodą losowej amplifikacji polimorficznego DNA oraz poprzez analizę sekwencji nukleotydowych polimorficznych fragmentów transkrybowanych ITS-1), biochemii (pomiar aktywności enzymów, analiza zawartości oraz skład kwasów tłuszczowych z użyciem metod chromatograficznych) oraz proteomiki (porównanie profili białkowych za pomocą jednokierunkowej elektroforezy denaturującej, analiza profili białkowych metodą elektroforezy dwukierunkowej z wykorzystaniem identyfikacji białek metodą przy użyciu spektrometrii mas), dokonano charakterystyki biologicznej obu grup szczepów. Na podkreślenie zasługuje fakt wykorzystania bardzo nowoczesnej metodyki zarówno z zakresu biochemii jak i biologii molekularnej. Metodyka ta została szczegółowo opisana, a szeroki zakres użytych technik wskazuje na bardzo dobre przygotowanie mgr Czyżewskiej do przyszłej pracy naukowej.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji badań zaprezentowano w formie 18 czytelnych rycin i 7 tabel. Przeprowadzone analizy wykazały istnienie korelacji pomiędzy profilem genetycznym szczepów *M. pachydermatis* a źródłem jego pochodzenia (pies zdrowy lub chory na zapalenie ucha zewnętrznego). Stwierdzono także wysoką zmienność genetyczną wewnątrz gatunku oraz wyodrębniono grupy z przewagą szczepów o wspólnym pochodzeniu, co wspiera hipotezę o istnieniu szczepów potencjalnie patogennych w obrębie gatunku, które posiadają właściwości ułatwiające infekcję. Następnie wykazano, że aktywność fosfolipaz A, B i C jest podwyższona u szczepów wyizolowanych od psów z zapaleniem ucha zewnętrznego w porównaniu do psów zdrowych. Jest to ważne odkrycie o potencjale diagnostycznym. Nie stwierdzono natomiast istotnych statystycznie zmian w aktywności dehydrogenazy jabłczanowej, kinazy pirogronianowej oraz liazy izocytrynianowej, co wskazuje na podobny metabolizm energetyczny u szczepów patogennych i niepatogennych. Analiza profilu lipidowego w szczepach *M. pachydermatis* wykazała, że szczepy niepatogenne charakteryzują się znacznie wyższą zawartością estrów ergosterolu w porównaniu do szczepów izolowanych od psów chorych. Wykazano także, że na pożywce bez dodatku lipidów szczepy izolowane od psów bez objawów zapalenia ucha zewnętrznego zawierają więcej kwasów tłuszczowych, triacylogliceroli oraz ergosterolu, a także kwasu behenowego i lignocerynowego. Wykazują również wyższą wartość stosunku SFA/MUFA w grupie szczepów izolowanych od psów bez objawów choroby. Na uwagę zasługuje również fakt, że u szczepów izolowanych od chorych psów stwierdzono obecność kwasu nerwonowego, którego nie było u szczepów wyizolowanych od psów zdrowych. Zidentyfikowano także 5 białek charakterystycznych wyłącznie dla szczepów patogennych. Tak jak w przypadku aktywności fosfolipaz, wydaje się, że w przyszłości różnice te mogą być wykorzystane w celach diagnostycznych. Jednak, jak zauważyła krytycznie sama Doktorantka, ostateczne potwierdzenie istnienia szczepów typowo komensalnych i potencjalnie patogennych wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań klinicznych. Rozdział 'Wyniki' napisany jest klarownym językiem i przedstawia bardzo interesujące dane, zawiera jednak także pewne uchybienia. Skala na rycinie 16 zaczyna się od wartości '0,7' a nie jak powszechnie przyjęto '0'. Zabieg ten miał zapewne na celu uwidocznienie zaobserwowanych różnic, jednak do tego wystarczą zaprezentowane wyniki analizy statystycznej. Poza tym, symbole istotności statystycznych znajdują się nietypowo przy opisie grup/parametrów przy osi X a nie, tak jak jest to ogólnie przyjęte, nad słupkami prezentującymi wartości. Utrudnia to zrozumienie przedstawionych rezultatów.

Otrzymane przez mgr Czyżewską oryginalne wyniki eksperymentalne zostały omówione w odniesieniu do dostępnego stanu wiedzy w rozdziale 'Dyskusja'. Doktorantka krytycznie

odniosła się do uzyskanych rezultatów oraz wskazała na potrzebę dalszych analiz proteomicznych w celu potwierdzenia, że szczepy *M. pachydermatis* pochodzące od psów chorych na zapalenie ucha zewnętrznego definitywnie różnią się od szczepów uzyskanych od psów bez klinicznych objawów tej choroby. Sposób omówienia wyników świadczy o dojrzałości naukowej mgr Czyżewskiej. Podkreślić chciałabym także fakt umieszczenia w spisie cytowanych publikacji aż 168 pozycji, których większość została opublikowana w ostatnich latach. Cała dyskusja dowodzi, że Pani mgr Urszula Czyżewska z łatwością porusza się w trudnych zagadnieniach związanych z biologią grzybów. Logicznym podsumowaniem zaprezentowanych i omówionych w Dyskusji wyników są zaprezentowane w pięciu punktach wnioski.

Pewien niedosyt budzą natomiast następujące zagadnienia:

- W jaki sposób kwalifikowane były zwierzęta do grupy kontrolnej oraz do grupy z objawami zapalenia ucha zewnętrznego? Brak jest także informacji jaka była płeć i wiek zwierząt, jakie testy diagnozujące *otitis externa* przeprowadzono, jakie były kryteria wykluczenia, czy rozpatrywano obecność chorób współistniejących? Jest to o tyle istotne, że rozwój choroby wywołanej przez *M. pachydermatis* może być w dużej mierze uzależniony od stanu fizjologicznego, metabolicznego i hormonalnego zwierzęcia.
- Jednym z ciekawszych wyników jakie uzyskała Doktorantka jest wykazanie zależności pomiędzy zawartością MUFA i wirulentnością *M. pachydermatis*. Czy znane są potencjalne mechanizmy, poprzez które zwiększona zawartość MUFA może wpływać na patogenność badanych szczepów?
- Przy analizie lipidów uwagę zwraca fakt, że w badanych szczepach *M. pachydermatis* brak jest diacylogliceroli (lub ich zawartość jest na granicy detekcji). W komórkach eukariotycznych diacyloglicerole (DAG) to bardzo aktywne związki sygnałowe, będące produktem reakcji katalizowanej przez fosfolipazę C (PLC). Czy biorąc pod uwagę wyraźne różnice w aktywności PLC u badanych szczepów patogennych i niepatogennych, nie należałoby się spodziewać różnic w zawartości DAG?
- Doktorantka sugeruje, że uzyskane wyniki mogłyby być w przyszłości wykorzystane w diagnostyce. Pytanie, jak taki test diagnostyczny mógłby wyglądać i jaką miałby przewagę nad obecnie istniejącymi metodami określania patogenności drożdżaków?
- W jaki sposób uzyskane wyniki mogłyby być wykorzystane w działaniach profilaktycznych oraz czy, w ocenie Doktorantki, uzyskane dane mogą w przyszłości pozwolić na zaproponowanie nowych celów w terapii grzybicy?

Przedstawioną do oceny pracę oceniam bardzo wysoko. Autorka podjęła się odpowiedzi na trudne pytanie czy patogenność oportunistów uwarunkowana jest wyłącznie czynnikami zależnymi od gospodarza, czy też szczepy patogenne posiadają niezależne mechanizmy wirulencji aktywowane przez czynniki zewnętrzne. Na podkreślenie zasługuje fakt, że część wyników zaprezentowanych w dysertacji została już opublikowana w pracy Czyżewska et al. (2016) Comparison of lipid profiles of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from dogs with *otitis externa* and without clinical symptoms of disease. *Mycoses* 59: 20-27.

Podsumowując, przedstawiona do oceny praca spełnia wymogi art. 13 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.). Zwracam się zatem do Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Urszuli Czyżewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Dolnyś