



Wrocław, 3 sierpnia 2015 r.

Ocena pracy doktorskiej mgr. inż. Adama Ząbka zatytułowanej:

„Charakterystyka metaboliczna wybranych grzybów chorobotwórczych  
za pomocą narzędzi metabolomicznych”

Systemowe badanie metabolitów jest obiecującym i szybko rozwijającym się nurtem badawczym. Jakościowe i ilościowe analizy profili metabolicznych mogą przyczynić się do odkrycia nowych markerów różnicujących organizmy w różnych stanach fizjologicznych czy patologicznych i w związku z tym mogą mieć znaczenie diagnostyczne. Rozwój metabolomiki jest obecnie ułatwiony przez zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), która umożliwia szybką identyfikację metabolitów i ich oznaczenia ilościowe.

Praca doktorska mgr. inż. Adama Ząbka poświęcona jest właśnie testowaniu możliwości zastosowania techniki NMR do kilku różnych układów biologicznych. Temat jest nad wyraz aktualny, a sama rozprawa znakomicie ilustruje obecne możliwości użycia metod NMR do rozwiązywania problemów metabolomicznych.

Rozprawa doktorska mgr. inż. Dąbka to napisany po polsku maszynopis liczący 145 stron. Układ pracy odbiega od tradycyjnego podziału na *Wstęp, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusję, Streszczenie i Literaturę*. W rozprawie doktorskiej główne części to: rozdział 1, czyli *Wstęp*; rozdział 2 zatytułowany *Materiały i metody wykorzystywane w badaniach metabolomicznych*; rozdział 3 dotyczący przedstawienia i dyskusji wyników badań nad metabolomiką lekoopornych i lekowrażliwych szczepów *Candida*; rozdział 4, w którym opisane są i przedyskutowane wyniki na temat porównawczej charakterystyki trzech patogennych gatunków grzybów; rozdział 5 traktujący o metabolomice tworzenia biofilmu przez *Aspergillus fumigatus* oraz rozdział 6 dotyczący działania przeciwgrzybicznego olejku grejpfrutowego na *Aspergillus fumigatus*. Ponadto rozprawa zawiera *Podsumowanie i wnioski* oraz *Bibliografię*. Natomiast brakuje streszczenia napisanego w języku angielskim.

Praca jest starannie napisana i estetycznie zilustrowana. Cztery manuskrypty, w których pierwszym autorem jest mgr inż. Ząbek, przedstawiające wyniki badań doktoratu, zostały wysłane do redakcji *PLoS ONE*. Na stronach 121-122 doktoratu można też znaleźć listę dziewięciu prac niezwiązanych z realizacją doktoratu, których współautorem jest doktorant. Tak obszerna lista publikacji bardzo dobrze świadczy o doktorancie, jako kandydacie do stopnia naukowego doktora.

We *Wstępie*, autor przedstawia wszystkie zagadnienia, które są niezbędne dla zrozumienia doktoratu: pojęcia z zakresu metabolomiki, podstawy spektroskopii NMR, analizę widm NMR wraz z identyfikacją metabolitów, zasady algorytmów analizy danych, analizę statystyczną oraz analizę szlaków metabolicznych. Jest to bardzo dobrze i kompetentnie napisany rozdział.

W rozdziale *Materiały i metody wykorzystywane w badaniach metabolomicznych* mgr inż. Ząbek obszernie i wnikliwie przedstawia wszelkie szczegóły techniczne przeprowadzanych doświadczeń, w tym hodowle grzybów wraz z hodowlą biofilmu, izolację metabolitów, pomiary widm NMR. Zabrakło jednak w tym rozdziale podania pochodzenia odczynników stosowanych w pracy.

W rozdziałach od 3 do 6 doktorant zestawiał, omówił i wnikliwie przedyskutował uzyskane wyniki. Rozdziały te są niezależne i zredagowane w ten sposób, że rozpoczynają się rodzajem krótkiego wprowadzenia, następnie omówione są wyniki, po których następuje ich dyskusja i podsumowanie. Przy kilku niezależnych wątkach badawczych wydaje się to być dobrym rozwiązaniem, ułatwiającym lekturę rozprawy. Poniżej odnoszę się w punktach do najważniejszych i najciekawszych wyników uzyskanych w doktoracie.

1. Stosując podejście metabolomiczne do badania mechanizmów lekooporności grzybów z rodzaju *Candida*, doktorant wykazał różnice w stężeniu niektórych metabolitów w porównaniu ze szczepami lekowrażliwymi. Przykładowo, stężenie octanu, mrówczanu i winianu było podwyższone, zaś stężenie trehalozy, glicyny, alaniny, bursztynianu i kilku innych metabolitów było obniżone. Autor postuluje, że może być to związane z wykorzystywaniem przez szczepy lekooporne innych źródeł węgla niż glukoza oraz z lepszym przystosowaniem tych szczepów do warunków hipoksji, występującej w tkance zarażonej pleśnią.

2. W niezależnej serii badań mgr inż. Ząbek zastosował badania metabolomiczne z użyciem NMR do analizy trzech różnych gatunków grzybów strzępkowych: *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum* i *Geotrichum candidum*. Jak pokazał doktorant, każdy z tych gatunków wykazywał odmienny profil metaboliczny. Autor postuluje, że na podstawie jego badań najbardziej chorobotwórczy wydaje się być *A. fumigatus*, gdyż jego metabolizm jest szczególnie ukierunkowany na ochronę ścian i błon komórkowych oraz gromadzenie mannitolu, jako substancji zapasowej. Zgodnie z wnioskiem doktoranta analizy metabolomiczne mają potencjał do użycia ich w celach taksonomicznych.
3. W kolejnej serii badań autor studiował proces tworzenia biofilmu przez *Aspergillus fumigatus*, stosując kwas arachidonowy jako substancję sygnałową. Związek ten miał stymulujący wpływ na wzrost tej pleśni, powodując zwiększenie biomasy biofilmu oraz prowadząc do obniżenia szlaków metabolomicznych.
4. W ostatniej serii badań mgr inż. Ząbek zajmował się działaniem olejków eterycznych zawartych w skórce grejpfruta na rozwój lekoopornego gatunku *A. fumigatus*. Autor stwierdził, że olejek ten działa wielokierunkowo na pleśń, powodując rozpad ściany komórkowej oraz inaktywację szlaków syntezy tej ściany, degradację białek oraz aktywację mechanizmów antyoksydacyjnych.

Podsumowując autor uzyskał ciekawe wyniki dotyczące metabolomiki kilku gatunków grzybów z wykorzystaniem protonowego NMR, który znajduje się na początkowym etapie rozwoju. Użycie NMR w badaniach metabolomiki grzybów jest wysoce oryginalne. Wyniki uzyskane przez doktoranta mają charakter zarówno czysto poznawczy (zastosowanie metabolomiki w taksonomii grzybów), jak i aplikacyjny (analiza porównawcza szczepów lekoopornych i lekowrażliwych, działanie olejku grejpfruta, powstawanie biofilmu). Opisane powyżej najważniejsze wyniki doktoratu uważam za wysoce oryginalne i bardzo wartościowe. W realizacji pracy doktorskiej doktorant sprawnie wykorzystał liczne programy komputerowe. Zastosowane analizy statystyczne są na wysokim poziomie.

Moje pytania do doktoranta:

1. Na ile analiza metabolomu przeprowadzona w warunkach hodowli może korelować z warunkami *in vivo*? Czy są na ten temat opublikowane dane?

Uwagi do doktoratu:

1. Czy rysunki 1.11, 1.12, 4.6 i 6.7 były opracowane samodzielnie?
2. W języku polskim części dziesiętne oddziela się przecinkiem, a nie kropką.

Podsumowując, moja ocena przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej mgr. inż. Adama Ząbka zatytułowanej: „Charakterystyka metaboliczna wybranych grzybów chorobotwórczych za pomocą narzędzi metabolomicznych” jest wysoce pozytywna a rozprawa spełnia warunki ujęte w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z 2003 r. Wnoszę o dopuszczenie przez Wysoką Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej mgr. inż. Adama Ząbka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Wnioskuje też o wyróżnienie rozprawy, której wyniki, choć dopiero w trakcie publikowania, są wysoce oryginalne, wartościowe i osiągnięte znacznym nakładem pracy i umiejętności badawczych.

Jacek Otlewski



