

dr hab. Sebastian Gnat, prof. UP
Katedra Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Zakład Mikrobiologii
ul. Akademicka 12
20-033 Lublin
tel. 81 445 60 93
e-mail: sebastian.gnat@up.lublin.pl

Lublin, 12 października 2021 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Kingi Lewtak pt.

**„Przeciwbakteryjna i przeciwgrzybowa aktywność ekstraktów otrzymanych z
wybranych gatunków roślin”**

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Marty Fiołki, prof. UMCS w Katedrze Biologii
Komórki i Immunobiologii Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-
Skłodowskiej

W ostatnich latach zauważalny jest “epidemiologiczny renesans” chorób zakaźnych wywoływanych przez grzyby oraz gruźlicy. Paradoksalnie, pomimo znaczącego postępu w medycynie, na początku trzeciego tysiąclecia możliwości terapeutyczne tych zakażeń wciąż są bardzo ograniczone. Pierwsze obawy związane z narastającą prevalencją chorób zakaźnych o etiologii grzybiczej i gruźlicy pojawiły się w pierwszych dziesięcioleciach XX wieku. Powodów takiego stanu upatrywano w różnych czynnikach środowiskowych i antropopresji. Od tamtego czasu zainteresowanie kliniczną terapią przeciwgrzybiczą i przeciwgruźliczą stopniowo wzrastało, aczkolwiek tempo opracowywania nowych leków aż do dnia dzisiejszego jest bardzo wolne. Pomimo dostępności przynajmniej kilku klas leków przeciwgrzybiczych przeznaczonych do



użytku klinicznego, stanowią one ograniczone spektrum w kontekście dostępnych dla nich celów komórkowych. Należy zaznaczyć, że aż cztery z ośmiu klas obecnie dostępnych leków przeciwgrzybiczych tj. polieny, azole, alliloaminy i pochodne morfoliny działają na poziomie błony komórkowej. Z kolei pochodne azolowe, w tym imidazole i triazole pomimo najszerszego spektrum działania jako leki o właściwościach grzybobójczych są obarczone zjawiskiem narastającej na nie tzw. oporności nabytej, niejednokrotnie opisywanej w literaturze. Ponadto, leki azolowe wchodzi w interakcje z innymi lekami, co stwarza duże problemy w odniesieniu do pewnych grup pacjentów. Natomiast w przypadku leków przeciwgrzybiczych wymieniane są dwie grupy leków, tj. leki I- i II-rzutu, a wśród nich przede wszystkim izoniazyd, etambutol, pirazynamid, etionamid i fluorochinolony. W zasadzie niewielka liczba leków i wolne tempo rozwoju nowych farmaceutyków nie byłyby problemem, gdyby obecnie stosowane terapie były wysoce skuteczne. Niestety, wskaźniki dotyczące występowania działań niepożądanych i oporności w leczeniu wahają się od 20% do 100%, w zależności od organizmu i stanu odporności gospodarza. Inny problem wynikający z powszechnego stosowania leków, związany z nakładającymi się mechanizmami ich działania i tożsamymi celami komórkowymi, jest powstawanie fenotypów oporności wielolekowej (MDR, Multi-Drug Resistance) obserwowanych wśród coraz większej liczby patogennych grzybów i prątków. Z tego powodu nie tylko testowanie *in vitro* leków przeciwgrzybiczych i przeciwgrzybiczych, ale także poszukiwanie nowych syntetycznych i naturalnych substancji leczniczych wpisuje się w koncepcję opisu „świętego Graala” terapii, stanowiąc aktualne zadanie dla środowiska mikrobiologów. W tym kontekście podjęcie przez mgr K. Lewtak tematu analizy aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów z łądyg podkwiatostanowych pelargonii rabatowej (*Pelargonium zonale*) i nasion ślazuwca pensylwańskiego (*Sida hermaphrodita*) uważam za uzasadnione, a także dobrze wpisujące się w światowe trendy badawcze w dyscyplinie nauk biologicznych.

Manuskrypt ocenianej rozprawy ma strukturę i układ typowy dla prac doktorskich, liczy 169 stron wydruku komputerowego, a tekst został podzielony na VI głównych rozdziałów, tj. Wstęp, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki, Dyskusja i Wnioski. Ponadto, w spisie piśmiennictwa wskazanych zostało 176 referencji cytowanych w dysertacji. Dokumentacja uzyskanych wyników i wykonanego przeglądu



literatury została przedstawiona na 41 rycinach i w 7 tabelach, których spis został umieszczony w dwóch osobnych rozdziałach na końcu pracy doktorskiej. W tym miejscu zaznaczam, że w rozdziale Materiały i metody znajduje się dodatkowych 5 tabel bez przypisanego numeru i nieuwzględnionych w spisie. Natomiast na początku pracy zamieszczony został pełny wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Wartym zauważenia elementem pracy jest Aneks, w którym Doktorantka przedstawiła swój życiorys naukowy. Na pochwałę zasługuje wysoka aktywność naukowa mgr K. Lewtak, która obejmuje współautorstwo w 9 publikacjach w czasopiśmie posiadających *Impact Factor*, z czego w dwóch widnieje jak pierwszy autor. Dodatkowo, w spisie dorobku wskazane zostało współautorstwo w 11 rozdziałach do monografii naukowych, aktywny udział w 13 krajowych i 15 międzynarodowych konferencjach, uczestnictwo w opracowaniu 2 patentów i kierowanie 5 projektami wewnętrznymi UMCS dla młodych naukowców. Zaangażowanie naukowe Doktorantki zostało nagrodzone przez Polskie Towarzystwo Botaniczne nagrodą II-stopnia dla młodych pracowników nauki w 2016 roku.

Wstęp rozprawy doktorskiej obejmuje 33 strony i składa się z 3 głównych podrozdziałów, w których przedstawiona jest charakterystyka mikrobiologiczna i kliniczna grzybów z gatunku *Candida albicans* oraz prątków saprofitycznych *Mycobacterium smegmatis*, drobnoustrojów modelowych blisko spokrewnionych z prątkami gruźliczymi *Mycobacterium tuberculosis*, a także omówione są właściwości przeciwdrobnoustrojowe związków o pochodzeniu roślinnym. Doktorantka przedstawia w tym rozdziale 7 rycin i 1 tabelę, które zdecydowanie zwiększają wartość poznawczą przeglądu literatury, umożliwiając łatwiejsze zorientowanie się w temacie. Ponadto, do wszystkich rycin zostało wskazane źródło, co jest dobrą praktyką w nauce i podkreśla dbałość o prawidłowe posługiwanie się prawami własności intelektualnej. W mojej ocenie za mało uwagi zostało poświęcone na scharakteryzowanie leków przeciwgrzybiczych, ich mechanizmów działania i prevalencji oporności mikrobiologicznej jaka notowana jest obecnie wśród grzybów chorobotwórczych, szczególnie często dla *C. albicans*, mikroorganizmu będącego w głównym zainteresowaniu Doktorantki. Zwracam również uwagę na prawidłowe nazewnictwo grup leków przeciwgrzybiczych, błędem jest stosowanie terminu antybiotyk do



wszystkich terapeutyków. W tym kontekście należy poprawić błąd zaklasyfikowania alliloamin do antybiotyków przeciwgrzybiczych, prawidłowo są to chemioterapeutyki.

Celem pracy doktorskiej mgr K. Lewtak było otrzymanie i analiza aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybowej ekstraktów roślinnych z łodyg podkwiatostanowych *P. zonale* oraz nasion *S. hermaphrodita*. W rozdziale zostało przedstawionych 7 szczegółowych celów pracy, którymi była selekcja ekstraktów pod kątem aktywności typu lizozymu z wykorzystaniem zawiesiny bakterii *Micrococcus luteus*, a następnie analiza działania dwóch ekstraktów o najwyższej aktywności, pochodzących z roślin wymienionych w głównych celach pracy doktorskiej, na dynamikę metaboliczną, morfologię i ultrastrukturę komórek szczepu dzikiego *C. albicans*, szczepów wzorcowych *C. albicans* i *C. krusei* pozyskanych z kolekcji ATCC oraz prątków *M. smegmatis*. Ponadto, oceniona została cytotoksyczność ekstraktów *P. zonale* i *S. hermaphrodita* w stosunku do prawidłowych komórek fibroblastów skóry ludzkiej oraz scharakteryzowany biochemicznie i proteomicznie ekstrakt nasion *S. hermaphrodita*.

Rozdział Materiały i metody obejmuje 29 stron maszynopisu, a wszystkie informacje zostały uporządkowane według klasycznego układu, w którym materiały zostały wymienione w pierwszym paragrafie przed opisem metodyki przeprowadzonych doświadczeń. Sposób przedstawienia procedur badawczych jest w większości bardzo szczegółowy, a zorientowanie się w koncepcji zaplanowanych analiz ułatwia podział tej części pracy doktorskiej na aż 27 podrozdziałów. Pewien niedosyt pozostawia mikrobiologiczna część metodyki. Doktorantka w podrozdziale 1.6. wymieniła wykorzystane w badaniach szczepy mikroorganizmów bez ich charakterystyki, co wydaje się istotnym brakiem w przypadku izolatu klinicznego *C. albicans*. Można się domyślić, że określenie izolatu klinicznego wskazuje na pozyskanie grzyba z przypadku chorobowego. Szerszy opis przedstawiający źródło pochodzenia tego izolatu, jednostkę chorobową, a także dane dotyczące stosowanej u pacjenta terapii byłyby bardzo użyteczne w kontekście prowadzenia analiz związanych z detekcją nowych naturalnych substancji leczniczych. W tym paragrafie należało wskazać również bakterię *Micrococcus luteus*, który to mikroorganizm został wykorzystany do oznaczania aktywności typu lizozymu. Ponadto, nie zostały przedstawione wystarczające dane dotyczące przednamnażania



drobnoustrojów i ich przetrzymywania pomiędzy wykonywaniem doświadczeń. Zwyczajowo w charakterystyce hodowlanej drobnoustrojów podawany jest przynajmniej czas prowadzenia inkubacji, temperatura i rodzaj zastosowanego podłoża, a przy bankowaniu szczepów wskazywany jest krioprotektant bądź nazwa komercyjnego zestawu do zamrażania. W moim odczuciu również nazwa podrodziału jest niefortunna, raczej zamiast „*stosowane mikroorganizmy*” należałoby użyć określenia „*wykorzystane w badaniach mikroorganizmy*”. Z formalnej strony oceny pracy zwracam uwagę na brak numeracji tabel umieszczonych w podrozdziale Materiały, co stwarza problem samej Doktorantce, bowiem zamiast kierować do konkretnego numeru tabeli wskazuje na „*tabelę w punkcie III.1.4 rozdziału Materiały i metody*”.

Pewne wątpliwości budzi opis procedury oznaczania minimalnego stężenia hamującego ekstraktów z łądyg *P. zonale* oraz nasion *S. hermaphrodita* wobec prątków i grzybów. Doktorantka zastosowała metodykę własną, co jest zrozumiałe ze względu na analizę substancji pochodzenia naturalnego. Niemniej jednak opis wykonania doświadczenia znacząco odbiega od standardów przygotowanych przez Komitety Międzynarodowe, np. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) dla badania lekowrażliwości prątków i grzybów. Uzasadnionym byłoby posłużyć się ustaloną normą postępowania aby uzyskać wyniki o większym potencjale porównawczym do danych literaturowych dostępnych dla leków konwencjonalnych. Takie podejście pozwoliłoby również znacznie lepiej pozycjonować wyniki na arenie międzynarodowej, co w moim odczuciu mogłoby przyczynić się do uzyskania wartościowej oryginalnej publikacji.

Ponadto, zastanawia mnie twierdzenie wskazujące, że drobnoustroje do analizy minimalnego stężenia hamującego ekstraktów znajdowały się w fazie logarytmicznego wzrostu, który to etap namnażania został określony na podstawie gęstości optycznej hodowli płynnej przy długości fali świetlnej wynoszącej 600 nm, w pracy doktorskiej zapisane jako OD600. Z doświadczenia własnego nie wydaje mi się, aby fazę wzrostu drobnoustrojów można było określić na podanej przez Doktorantkę podstawie, bowiem zależy to od wielu czynników, m. in. gęstości początkowej inokulum, żywotności mikroorganizmów w materiale wyjściowym, temperatury i czasu inkubacji itp., które to zmienne nie zostały określone. Dodatkowo, przy badaniu minimalnego stężenia



hamującego na płycie 96-dołkowej, w studzienkach przygotowuje się wzrastające stężenia analizowanych substancji, do których dodaje się wystandaryzowane inokulum mikroorganizmów. Z opisu przedstawionego w pracy doktorskiej wynika, że doświadczenie wykonywano w odwróconej kolejności. Ponadto, Doktorantka nie podała temperatury i czasu inkubacji przed odczytem wyników badania dla grzybów *C. albicans*. Pomimo tych uwag metodycznych nie wydaje mi się, aby opisane sposoby postępowania w jakikolwiek sposób mogły obniżyć wiarygodność uzyskanych wyników. Z edytorskiej strony należy wskazać na dosyć chaotyczny sposób podawania producentów odczynników i urządzeń laboratoryjnych. Doktorantka nie ustaliła w tym względzie jednolitej reguły, a w różnych miejscach podawane są informacje o nazwie producenta albo o nazwie wraz siedzibą albo brak tych danych w ogóle.

Rozdział Wyniki obejmuje 53 strony i podzielony jest na 5 głównych podrozdziałów, w których Doktorantka charakteryzuje aktywność typu lizozymu u wybranych gatunków roślin, stanowiące badanie wstępne do wskazania ekstraktów pozyskanych z dwóch gatunków roślin jako najbardziej obiecujących pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej, a następnie szczegółowo opisuje to działanie. Ponadto, w wykonanych przez mgr K. Lewtak analizach została oceniona cytotoksyczność ekstraktu z łądyg podkwiatostanowych *P. zonale* i nasion *S. hermaphrodita* wobec prawidłowych komórek fibroblastów, a także szczegółowo omówiona charakterystyka chemiczna nasion ślazuwca pensylwańskiego. Do przedstawienia wyników Doktorantka posłużyła się 31 rycinami i 6 tabelami. Na słowa uznania zasługują ryciny przedstawiające zdjęcia wykonane z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej oraz fluorescencyjnej, które stanowią bardzo dobry materiał poglądowy i z nawiązką spełniają swoją funkcję. Drobnym błędem we wszystkich opisach tych rycin jest zastosowanie terminu „znacznik”, w rzeczywistości jest to po prostu „skala”.

W kontekście dalszych badań zastanawiam się również nad oceną cytotoksyczności ekstraktu z łądyg podkwiatostanowych *P. zonale*. Doktorantka wykonała badania dla stężeń ekstraktu 75, 150 i 200 µg/ml, konkludując w dyskusji i wnioskach o działaniu toksycznym wobec fibroblastów ze względu na oznaczenie około 20-30% komórek martwych po 72 godzinach inkubacji, a minimalne stężenie hamujące



(w skrócie podawane w pracy jako MIC według standardów międzynarodowych) wobec prątków *M. smegmatis* i grzybów *C. albicans* zostało wyznaczone na odpowiednio 25 i 12,5 µg/ml. Może warto powtórzyć analizy dla niższych stężeń, odpowiadających wartościom MIC i nie zamykać drogi kolejnych badań, bowiem działanie przeciwdrobnoustrojowe ekstraktu *P. zonale* wydaje się być obiecujące.

Rozdział Dyskusja obejmuje 11 stron i stanowi omówienie uzyskanych wyników badań w odniesieniu do danych dostępnych w literaturze naukowej. Doktorantka prowadzi czytelnika przez temat bardzo płynnie, a poszczególne paragrafy rozdziału korespondują z informacjami zawartymi we Wstępie, co świadczy o dobrej znajomości tematu i rozeznaniu w problematyce terapii chorób zakaźnych, zwłaszcza w kontekście poszukiwania alternatywnych substancji przeciwdrobnoustrojowych. Zaznaczenia wymaga fakt, że wykonane badania były w dużej mierze nowatorskie, a ekstrakt z nasion ślazuwca pensylwańskiego został objęty patentem, którego współautorem była mgr K. Lewtak z udziałem 45%. Z tego względu prowadzenie dyskusji było utrudnione bowiem w literaturze podobnych danych naukowych nie ma bądź są tylko fragmentaryczne. Niemniej jednak sposób prezentacji tematu w dyskusji przekonuje o istotnej aktywności przeciwdrobnoustrojowej ekstraktów z części wegetatywnych *P. zonale* i nasion *S. hermaphrodita*. Ponadto, szczegółowe scharakteryzowanie mechanizmów ich działania oraz wpływu toksycznego na komórki fibroblastów skóry ludzkiej stanowi ważne osiągnięcie Doktorantki na tle współczesnej wiedzy biologicznej. Szkoda, że w zakończeniu dyskusji nie zostały wyznaczone cele na dalsze badania. Niewątpliwie przedstawione wyniki należy traktować jako wstępne ze względu na prowadzenie analiz tylko na pojedynczych izolatach środowiskowych i klinicznych wybranych mikroorganizmów prokariotycznych i eukariotycznych. Ze strony edytorskiej zwracam uwagę na brak spójności w cytowaniu piśmiennictwa. Doktorantka stosuje zamiennie nazwisko pierwszego autora i skrót „*i in.*” albo „*i wsp.*” albo całe określenie „*i współpracownicy*”.

Na podstawie uzyskanych wyników i przeglądu literatury naukowej Doktorantka przedstawiła dwa wnioski. W jednym z nich wskazuje na skuteczne działanie przeciwgrzybowe i przeciwbakteryjne ekstraktów *S. hermaphrodita* oraz brak ich cytotoksyczności. W drugim wniosku mgr K. Lewtak ocenia surowy ekstrakt z *P. zonale*



jako toksyczny, co pomimo aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyklucza ten preparat z wykorzystania jako źródła potencjalnego terapeutyku. Obydwa wnioski uważam za uzasadnione i potwierdzone przedstawionymi w pracy doktorskiej wynikami. Pewną uwagę mam do pierwszego z wniosków, w którym Doktorantka użyła terminu „*terapia przeciwgrzybowa*”. W kontekście terapii powinno się stosować określenie przeciwgrzybicza. Wnioski zostały potwierdzone przez 10 obserwacji, będących w rzeczywistości podsumowaniem uzyskanych wyników. Wydaje mi się, że lepszym rozwiązaniem byłoby zastosowanie formuły wniosków także do tych obserwacji i ujednoczenie tego rozdziału.

Spis piśmiennictwa zawiera 176 pozycji, w większości stanowiących oryginalne publikacje w czasopismach posiadających współczynnik *impact factor*. Duży odsetek cytowanych pozycji to artykuły, które ukazały się w ostatnich latach, co podkreśla aktualność prowadzonych przez Doktorantkę badań. Wykaz publikacji został przygotowany z należytą starannością według jednolitego schematu, a wszystkie wymienione w spisie pozycje zostały zacytowane w tekście rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, rozprawę doktorską mgr Kingi Lewtak pt. „*Przeciwbakteryjna i przeciwgrzybowa aktywność ekstraktów otrzymanych z wybranych gatunków roślin*” oceniam bardzo wysoko, a jako mocne punkty wymieniam skrupulatną podbudowę teoretyczną zamieszczoną we Wstępie i kontynuowaną w Dyskusji, ciekawie sformułowany Cel pracy, zastosowanie nowatorskich metod badań oraz merytorycznie i skrupulatnie opisane wyniki. Doktorantka nie ustrzegła się pojedynczych błędów i uchybień, które w ostatecznej ocenie nie wpływają na ogólną wartość poznawczą dysertacji.

W mojej ocenie przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania zawarte w 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 64 poz. 1789 z późn. zm.) w zw. z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające Ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.), zatem przedkładałam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej o dopuszczenie mgr Kingi Lewtak do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk ścisłych i



przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne. Ponadto, ze względu na uzyskanie wyników przyczyniających się w stopniu znacznym do rozwoju dyscypliny naukowej przy zastosowaniu nowoczesnej metodyki oraz bardzo dobrych wskaźników bibliometrycznych Doktorantki wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy stosowną nagrodą.

Sebastian Gurt

