

Zakład Biofizyki Molekularnej

Katedra Biofizyki

Lublin 27.05.2025

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Mitury

pt.: „*Aktywność przeciwgrzybicza kompozycji złożonych z antybiotyku amfoterycyny B i wybranych pochodnych 1,3,4-tiadiazoli*”

Tematem niniejszej rozprawy doktorskiej, autorstwa Pani mgr Katarzyny Mitury, jest szczegółowa ocena interakcji antybiotyku amfoterycyny B (AmB) z wybranymi związkami z grupy 1,3,4-tiadiazoli, która uwzględnia zarówno badania właściwości biologicznych (aktywność przeciwgrzybiczą i cytotoksyczną *in vitro*), jak również analizy spektroskopowe. Uzasadnienie wybranej tematyki badań znajduje się już na początku rozprawy, gdzie Doktorantka, zaznacza że AmB to skuteczny, lecz toksyczny lek przeciwgrzybiczy. W celu zmniejszenia działań niepożądanych występujących podczas stosowania tego antybiotyku, podjęto próby znalezienia związków komplementarnych, z grupy pochodnych 1,3,4-tiadiazoli. W ramach przeprowadzonych badań wyłoniono związek najbardziej obiecujący, oznaczony w skrócie jako „C1”. W terapii skojarzonej z AmB, pochodna ta wykazuje silne działanie synergistyczne (tj. zwiększoną aktywność przeciwgrzybiczą) oraz niską cytotoksyczność. Badania morfologiczne i analizy z wykorzystaniem spektroskopii FTIR, potwierdziły odmienny mechanizm działania C1 – zakłócenie biogenezy ściany komórkowej i indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach *C. albicans*. Otrzymane wyniki wskazują na wysoki potencjał terapii skojarzonej AmB-C1 w leczeniu zakażeń grzybiczych. Już w tym miejscu warto podkreślić interdyscyplinarny charakter pracy doktorskiej, która ma fundamentalne znaczenie zarówno dla rozwoju wiedzy podstawowej, jak i innowacyjnych zastosowań medycznych. Uważam, że rezultaty zaprezentowane w przedstawionej mi do recenzji rozprawie doktorskiej, otwierają nowe perspektywy dla rozwoju badań w dziedzinie biologii, farmakologii oraz szeroko rozumianej spektroskopii molekularnej, umożliwiając przy tym kontynuację prowadzenia prac nad poszukiwaniem nowych leków o silnych właściwościach przeciwgrzybiczych, czyli uwzględniających problem, który aktualnie stanowi dla ludzkości jedno z najważniejszych wyzwań naukowych. Rozprawa została przygotowana w Zakładzie Biologii Komórki, Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, pod kierunkiem Pana Prof. dr hab. Mariusza Gagosia.

W rozdziale pierwszym dysertacji oznaczonym jako Wstęp, Doktorantka przedstawiła charakterystykę problematyki związanej ze stosowaniem popularnych leków o działaniu

przeciwwgrzybiczym. Pani mgr Katarzyna Mitura podkreśliła, że w ostatnich latach obserwuje się wzrost przypadków inwazyjnych infekcji grzybiczych (ang. *invasive fungal infection*, IFI), które wiążą się z wysoką śmiertelnością, zwłaszcza u pacjentów z obniżoną odpornością, tj. osób po przebytych transplantacjach lub zmagających się z takimi chorobami jak AIDS czy nowotwory. Z lektury tej części rozprawy dowiadujemy się, że pomimo postępu w diagnostyce i terapii, leczenie IFI nadal stanowi ogromne wyzwanie terapeutyczne, ze względu na trudności diagnostyczne, ograniczoną liczbę skutecznych leków oraz rozwój oporności patogenów. Główne czynniki utrudniające leczenie to niska selektywność leków oraz pojawianie się szczepów wielolekoopornych (ang. *Multidrug Resistant*, MDR; ang. *Extensively Drug Resistant*, XDR i *Pandrug-Resistant*, PDR). Doktorantka w sposób bardzo klarowny zaznaczyła, że w leczeniu IFI stosuje się kilka klas leków, do których zaliczamy: azole, makrolidy polienowe, echinokandyny, fluorowane pochodne pirymidyny oraz alliloaminy. Każda z wymienionych grup posiada jednak liczne ograniczenia, takie jak np. działania niepożądane, wąskie spektrum działania czy niekorzystne interakcje z innymi lekami. Ponadto rosnąca oporność patogenów grzybowych na te środki, dodatkowo znacząco pogarsza rokowania terapeutyczne. W związku z tym, istnieje ogromna potrzeba opracowywania nowych strategii terapeutycznych. Zatem celem niniejszej pracy doktorskiej jest ocena potencjału nowych pochodnych 5-podstawionych 2-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazoli, jako związków wspomagających działanie AmB. Związki te, oprócz niskiej toksyczności wykazują aktywność wobec wybranych patogennych szczepów grzybowych i mogą stanowić obiecującą alternatywę w terapii IFI. Należy również podkreślić niezwykłą staranność prezentacji, zarówno w postaci redagowanego tekstu jak i zawartych rysunków oraz grafik nie tylko w części wstępnej, ale także w całej dysertacji. Moim uznaniem w tej części pracy, cieszy się fakt podkreślenia przez Doktorantkę konieczności poszukiwania alternatywnych metod terapeutycznych w leczeniu grzybic, z których kompozycje synergistyczne stanowią bardzo obiecujące i nowatorskie podejście lecznicze.

Następnie, rozdział drugi, zatytułowany „Część teoretyczna”, został przez Doktorantkę podzielony na dwie ważne części. W pierwszej z nich, Pani mgr Katarzyna Mitura bardzo dokładnie scharakteryzowała właściwości AmB, czyli makrolidowego antybiotyku polienowego, który chociaż został wyizolowany w 1955 r. z *Streptomyces nodosus* to wciąż uważany jest za jeden z najskuteczniejszych leków o silnym działaniu przeciwwgrzybiczym. Doktorantka bardzo trafnie podkreśla, że jednak mechanizm działania AmB nie został jak dotąd w pełni wyjaśniony. Najczęściej przyjmuje się, że antybiotyk ten tworzy w błonie komórek grzybowych kompleksy z ergosterolem, prowadząc do powstania porów jonowych. Efektem w tym przypadku jest zaburzenie integralności błony komórkowej, a w konsekwencji działanie grzybobójcze lub rzadziej grzybostatyczne. Inne hipotezy obejmują model adsorpcyjny, obejmujący destabilizację membrany poprzez sekwestrację ergosterolu oraz model „gąbki sterolowej”, który wskazuje na tworzenie zewnątrzkomórkowych agregatów AmB, które „wyciągają” ergosterol z błony komórek grzybowych. AmB wywołuje również stres oksydacyjny i może modyfikować receptory LDL. Z tej części dowiadujemy się również, że mimo skuteczności działania AmB, ograniczeniem terapii są silne działania niepożądane, przede wszystkim nefrotoksyczność. Dotychczas przez dekady w leczeniu ciężkich zakażeń grzybiczych stosowany był klasyczny preparat o nazwie handlowej Fungizon (mieszanina AmB i deoksycholanu sodu). Został on jednak wyparty przez bezpieczniejsze formy leku. Doktorantka podkreśla, że rozwój nowych formuляcji znacznie poprawił profil bezpieczeństwa AmB, umożliwiając jej szersze zastosowanie kliniczne pomimo toksyczności formy konwencjonalnej.

W ramach tej części dysertacji, podrozdział 2.1.3 pt. „Interakcje AmB z innymi lekami”, budzi moje szczególne zainteresowanie, ponieważ Pani mgr Katarzyna Mitura w sposób bardzo klarowny i wyczerpujący opisuje mechanizmy interakcji AmB z innymi lekami, ze szczególnym uwzględnieniem zjawiska synergizmu. Autorka omawia różne typy interakcji – synergistyczne, addytywne i antagonistyczne oraz przedstawia ich konsekwencje kliniczne, podkreślając fakt, że synergizm

hiperaddycyjny przynosi szczególnie korzystne efekty terapeutyczne. Autorka zwraca uwagę na trudności występujące podczas łączenia AmB z azolami i echinokandynami, ze względu na powszechnie występujący efekt antagonistyczny. Niezmiennie wartościowe są także przedstawione badania nad nowymi formami AmB i innowacyjnymi metodami ograniczania jej toksyczności. Praca ukazuje szeroką wiedzę Doktorantki i umiejętność krytycznej analizy danych.

Druga część tego rozdziału została natomiast poświęcona pochodnym 1,3,4-tiadiazolu. Autorka przedstawia tu szeroką i wnikliwą charakterystykę tej grupy heterocyklicznych związków, podkreślając ich znaczenie we współczesnej chemii medycznej. Doktorantka w sposób przystępny omawia zarówno historię odkrycia tiadiazoli, ich budowę chemiczną, metody syntezy, jak i wyjątkowe właściwości farmakologiczne. Uważam, że niezwykle istotna jest część dotycząca aktywności biologicznej, w której zaprezentowano bogaty przegląd piśmiennictwa naukowego, potwierdzający działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwnowotworowe, przeciwdrgawkowe, przeciwzapalne oraz przeciwbólowe pochodnych 1,3,4-tiadiazoli. Dużym atutem tej części dysertacji jest również uwzględnienie konkretnych przykładów związków o potwierdzonej aktywności biologicznej (np. acetazolamid), a także odniesienia do wyników badań *in vitro* z wykorzystaniem różnych linii komórkowych i patogenów. Pani magister Katarzyna Mitura wyraźnie zaznaczyła również związki strukturalne pomiędzy modyfikacjami chemicznymi a obserwowanym działaniem farmakologicznym tej grupy analogów. Podkreślić należy, że rozdział ten prezentuje się jako dobrze opracowany i merytorycznie ciekawy przegląd, potwierdzający kompetencje Autorki w zakresie chemii organicznej, jak i chemii leków.

W rozdziale drugim (jak i w pozostałej części pracy) Doktorantce nie udało się jednak ustrzec kilku mało znaczącym błędom, które powinny zostać dostrzeżone na etapie przygotowywania dysertacji, takim jak np.:

„...w medycynie pod ponad 60 lat mechanizm...”, „...co wiąże się (z) powstawaniem efektów...”, raz Doktorantka pisze fungizon a raz fuzgizon, „...Abelcet Działania... (w wielu miejscach pracy brak znaków interpunkcyjnych)”, raz podaje stosunek molowy lipidów 1:1, by w kolejnym zdaniu można było przeczytać, że jest 3:7, „... leków Wyróżnia... (ponownie to co wyżej)”, w jednym miejscu jest formatowanie: 1,3,4 – tiadiazolowy, a w innym 1,3,4- tiadiazolowy i kilkanaście innych drobnych błędów. Pragnę jednak podkreślić, że przedstawione uwagi nie podważają w żaden sposób wysokiej wartości merytorycznej przedstawionej dysertacji.

W rozdziale trzecim Autorka niniejszej rozprawy podaje jej główny cel. Dowiadujemy się z niego, że Pani mgr Katarzyna Mitura skoncentrowała swoją pracę na ocenie aktywności przeciwgrzybiczej oraz badaniu mechanizmu działania kompozycji AmB z wybranymi pochodnymi 1,3,4-tiadiazoli. Ideą pracy było znalezienie takiego połączenia, które umożliwi kilkukrotne obniżenie skutecznej dawki AmB i jednocześnie zredukowanie jej toksyczności. W ramach badań przeprowadzono: testy przesiewowe aktywności przeciwgrzybowej i cytotoksycznej pochodnych tiadiazoli, analizę interakcji z AmB, identyfikację optymalnej kompozycji wobec patogenów grzybowych oraz ocenę jej mechanizmu działania z wykorzystaniem badań cytologicznych, cytochemicznych i spektroskopii ATR-FTIR.

Następnie, w rozdziale czwartym dysertacji Doktorantka zawarła bardzo obszerny i szczegółowy opis metodyki pracy oraz materiałów użytych do pomiarów. Zamieszczone tu zostały m.in. informacje na temat badań z wykorzystaniem szczepów grzybowych, wykorzystywanych odczynników oraz aparatury, metodyki badań biologicznych, sposobów oceny aktywności przeciwgrzybiczej badanych związków (MIC, MFC czy FIC), oceny morfologii, liczby i wielkości komórek grzybowych na podstawie obserwacji z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej, wykonywanych barwień różnymi metodami czy obserwacji zmian ultrastruktury komórek *C. albicans* przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Opisane zostały także badania z wykorzystaniem spektroskopii w podczerwieni FTIR, badanie cytotoksyczności wybranych związków

itd.. Moje uznanie zyskała duża staranność w przygotowaniu tej części dysertacji, umożliwiającą powtarzalność wyników.

Kolejny, bardzo obszerny rozdział dotyczy prezentacji wyników badań, uzyskanych przez Doktorantkę w niniejszej dysertacji. Pierwsza część tego rozdziału przedstawia głównie rezultaty badań biologicznych. Stanowi ona kompleksowy i szczegółowy opis badań przesiewowych dotyczących aktywności przeciwgrzybiczej AmB oraz wybranych pochodnych z grupy 1,3,4-tiadiazoli. Autorka przeprowadziła ocenę skuteczności działania testowanych substancji wobec czterech standardowych szczepów grzybów: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa* i *Aspergillus niger*. Zastosowano wiarygodne metody oznaczania MIC i MFC, co pozwoliło na rzetelną ocenę potencjału grzybobójczego badanych związków. AmB wykazała wysoką aktywność wobec *C. albicans* już przy stężeniu 0,5 µg/ml, co potwierdzają zarówno dane MIC/MFC₄₈, jak i analiza metabolicznej żywotności komórek. Podobną wrażliwość odnotowano dla *R. mucilaginosa*, natomiast *A. niger* okazał się zdecydowanie bardziej oporny (MFC > 32 µg/ml).

Wśród testowanych pochodnych 1,3,4-tiadiazoli, największą aktywność przeciwko komórkom grzybowym wykazał związek C1 – skuteczny wobec wszystkich szczepów, również w zakresie działania grzybobójczego (MFC/MIC₄₈ ≤ 2). Inne związki, takie jak 235, FABT czy 301, wykazały ograniczoną skuteczność – najczęściej wobec *C. albicans* i *C. parapsilosis*, natomiast większość pochodnych była nieskuteczna wobec *A. niger*. Zauważalna była również obniżona aktywność po 48 godz. inkubacji.

Ważnym elementem badań przesiewowych było także określenie typu interakcji pomiędzy AmB a tiadiazolami na przykładzie wybranego szczepu grzybowego, tj. *C. albicans*. Autorka zastosowała obliczenia ΣFIC, wykazując synergizm dla wybranych połączeń, szczególnie związków C1, 235, FABT i 301, co wskazuje na potencjalną możliwość zmniejszenia dawki AmB w terapii skojarzonej. Następnie, Doktorantka oceniła także aktywność cytotoksyczną pochodnych 1,3,4-tiadiazoli względem trzech linii komórkowych: NHDF (ludzkie prawidłowe fibroblasty skóry), CHO-K1 (prawidłowe komórki nabłonkowe pochodzące z jajnika chomika chińskiego *Cricetulus griseus*) oraz COS-7 (prawidłowe fibroblasty pochodzące z nerki afrykańskiej małpy zielonej *Cercopithecus aethiops*). Co ciekawe, najniższą aktywność cytotoksyczną wobec wszystkich badanych linii komórkowych wykazał związek C1.

Analizując rezultaty badań przesiewowych, trochę zdziwił mnie fakt, że Autorka niniejszej dysertacji raz oznacza związki z grupy tiadiazoli jako np. C1 lub FABT, a innym razem posługuje się numerami takimi jak, np. 301, 235 itd. Zalecał bym ujednolicenie oznaczeń w celu poprawy przejrzystości otrzymanych wyników.

Podsumowując tę część bardzo obszernego opisu wyników badań, należy zaznaczyć raz jeszcze, że rozdział prezentuje wysoki poziom merytoryczny i metodyczny. Wyniki są logicznie uporządkowane, dobrze udokumentowane, a wstępnie wyciągane wnioski są jasno sformułowane. Autorka wykazała się dużą rzetelnością badawczą i właściwym doбором metod. Rozdział ten stanowi silny fundament dalszych etapów pracy.

W drugiej części opisu wyników, Doktorantka kontynuując powyższe badania, oceniła aktywność i mechanizm działania kompozycji złożonej z AmB oraz związku C1, stosując przy tym różne techniki badawcze, również metody spektroskopowe, z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej oraz spektroskopii w podczerwieni FTIR, co wzbudziło moje szczególne zainteresowanie.

Warto podkreślić, że na początku Pani mgr K. Mitura oceniła aktywność przeciwgrzybiczą (MIC, MFC, stosunek wartości MFC/MIC oraz współczynnik ΣFIC) związku C1 stosowanego pojedynczo i w skojarzeniu z AmB wobec izolatów klinicznych wrażliwych na AmB ale opornych na azole (*C. albicans* oporna na itraconazol; *C. crusei* oporna na flukonazol i itraconazol; *C. dubliniensis* oporna na itraconazol; *C. glabrata* umiarkowanie wrażliwa na flukonazol i itraconazol i *C. tropicalis*

oporna na flukoazol, itraconazol i worykonazol). Do badań przeznaczono także szczep referencyjny *T. rubrum*. Autorka wykazała, że związek C1 działa synergistycznie z AmB wobec większości wymienionych szczepów, zmniejszając stężenie antybiotyku niezbędne do zahamowania wzrostu komórek grzybowych od 4 do aż 16,67 razy. Ponadto badania przeprowadzone w warunkach hodowli komórkowych *in vitro* pozwoliły wykazać Autorce, że połączenie związku C1 z AmB nie zwiększa efektu cytotoksycznego w komórkach NHDF, CHO-K1 i COS-7. W dalszej części tego rozdziału, Doktorantka opisała mechanizmy działania związku C1, AmB oraz ich kombinacji wobec wybranego szczepu grzybowego, tj. *C. albicans*. Początkowo Pani mgr. K. Mitura oceniła morfologię tych komórek przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej. Już niskie dawki badanych związków powodowały istotne zmiany strukturalne. Barwienie oranżem akrydyny ujawniło rozszerzone wakuole, deformacje ściany komórkowej i wypływ protoplastów, szczególnie po zastosowaniu C1 i kombinacji C1 + AmB. W badaniu z użyciem barwników PI/SYTO 9 wykazano z kolei, że C1 powoduje uszkodzenia błony komórkowej prowadzące do śmierci komórek, czego nie obserwowano w takim stopniu przy zastosowaniu samej AmB. Kombinacja związków potęgowała te efekty. Barwienie kalkofluorem uwidocznilo zaburzenia w dystrybucji chityny – komórki traktowane C1 zmieniały kształt, wykazywały intensywną, nieregularną fluorescencję lub całkowity jej brak. W analizie intensywności fluorescencji (barwienie kalkofluorem i błękitem aniliny) odnotowano znaczny wzrost sygnału w komórkach traktowanych C1 oraz kombinacją C1 + AmB, wskazujący na zaburzenia w strukturze i rozmieszczeniu chityny i glukanów. Wnioski te potwierdzają synergistyczne działanie obu związków na strukturę ściany i błony komórkowej *C. albicans*.

Następnie w badaniach z wykorzystaniem mikroskopii SEM i TEM, Doktorantka oceniła wpływ związku C1, AmB oraz ich kombinacji na strukturę komórek *C. albicans*. Obserwacje SEM wykazały, że komórki kontrolne miały regularną strukturę, natomiast po zastosowaniu C1 uwidoczniono nieregularności ściany komórkowej, pęknięcia oraz agregację komórek poprzez amorficzny materiał ze zdegradowanych ścian. Komórki traktowane AmB wykazywały zmniejszoną liczbę strzępek i uszkodzenia ściany. Po terapii skojarzonej obserwowano znaczne uszkodzenia komórek, w tym wyciek protoplastu i powstanie komórek olbrzymich. Analiza TEM potwierdziła zmiany w strukturze komórek po zastosowaniu C1 i AmB, w tym pogrubienie i deformację ścian, obecność licznych pęcherzyków, uszkodzenia organelli oraz wyciek cytoplazmy. Szczególnie silne zmiany morfologiczne i destrukcję struktur wewnętrznych odnotowano po zastosowaniu terapii skojarzonej.

W ostatniej części opisu mechanizmów działania, Autorka niniejszej rozprawy doktorskiej, Pani Katarzyna Mitura przedstawiła wyniki badań z wykorzystaniem spektroskopii FTIR, które potwierdziły wpływ związków C1 i AmB na strukturę ściany komórkowej *C. albicans*. Analizując widma IR izolowanych ścian komórkowych, Doktorantka zaobserwowała zmiany w pasmach odpowiadających strukturalom lipidowym, białkowym i polisacharydowym. Najistotniejsze przesunięcia dotyczyły pasm CH_2 i CH_3 (2924 i 2854 cm^{-1}) oraz pojawienia się nowego pasma przy 2887 cm^{-1} w próbkach traktowanych mieszaniną związków. W paśmie amidowym II (1543 cm^{-1}) i III (1245 cm^{-1}) stwierdzono przesunięcia w stronę wyższych częstotliwości. Podobne zmiany zaobserwowano w obszarze $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$, co sugeruje modyfikacje glukanów $\beta(1\rightarrow3)$ i $\beta(1\rightarrow6)$, mannanów i glikogenu. Efekty te mogą wskazywać na zaburzenia oddziaływań międzycząsteczkowych w ścianie komórkowej, co odzwierciedla skuteczność działania badanych związków, zwłaszcza ich kompozycji synergistycznej.

W jednym z ostatnich rozdziałów dysertacji, Doktorantka zawarła bardzo ciekawą dyskusję wcześniej przedstawionych wyników badań. Przypomniła, że Amfoterycyna B to antybiotyk polienowy stosowany od ponad 60 lat w leczeniu ciężkich zakażeń grzybiczych. Mimo swojej skuteczności, jej zastosowanie ograniczają poważne działania niepożądane, takie jak nefrotoksyczność i hepatotoksyczność, które mogą nawet prowadzić do śmierci pacjenta. Doustne podanie AmB jest utrudnione z powodu jej niskiej rozpuszczalności w wodzie i słabej biodostępności. Dodatkowo, wiele leków przeciwgrzybiczych działa antagonistycznie względem AmB, szczególnie azole, które

zmniejszając syntezę ergosterolu – głównego celu działania AmB – co może prowadzić do oporności patogenów.

Konwencjonalny preparat Fungizone zawiera sól sodową kwasu dezoksycholowego poprawiającą rozpuszczalność, ale zwiększającą cytotoksyczność. Lipidowe formułacje AmB wykazują lepszy profil toksyczności, lecz przy wyższych dawkach nadal powodują uszkodzenia wątroby i nerek. W tej sytuacji atrakcyjną strategią wydaje się terapia skojarzona – stosowanie AmB z substancjami wzmacniającymi jej działanie i pozwalającymi na zmniejszenie dawek.

W pracy oceniano 8 syntetycznych pochodnych 1,3,4-tiadiazolu – grupy związków znanych z działania przeciwdrobnoustrojowego i niskiej toksyczności – w połączeniu z AmB. Przebadano ich aktywność wobec szczepów grzybów i cytotoksyczność wobec trzech linii komórkowych (NHDF, COS-7, CHO-K1). W badaniach przesiewowych szczególnie wyróżnił się związek C1, który wykazał silne działanie przeciwgrzybowe (MIC: 8–64 µg/ml; MFC: 64–128 µg/ml), skutecznie hamując wzrost wszystkich badanych szczepów. Stosunek MFC/MIC ≤ 4 kwalifikował go jako związek o działaniu grzybobójczym. Za najistotniejszy fakt uważam stwierdzenie, że C1 działał synergistycznie z AmB, umożliwiając obniżenie potrzebnej dawki antybiotyku.

W analizach cytotoksyczności, C1 okazał się najbezpieczniejszy spośród badanych pochodnych – nie wpływał negatywnie na metabolizm komórek, nawet w wysokich stężeniach (do 192 µg/ml), a w linii COS-7 wręcz stymulował żywotność. Największą wrażliwość wykazały komórki CHO-K1, ale również tutaj cytotoksyczność była na akceptowalnym poziomie. Pozostałe pochodne były cytotoksyczne przy dawkach zbliżonych lub niższych niż ich MIC, co wykluczało ich zastosowanie terapeutyczne. Związek C1 zawiera prosty układ strukturalny – pierścień 1,3,4-tiadiazolu z podstawnikiem benzeno-1,3-diolu i grupą metylową. Wydaje się, że właśnie ta struktura odpowiada za jego wysoką aktywność przeciwgrzybiczą i niską cytotoksyczność. Uzyskane wyniki sugerują, że C1 może znaleźć zastosowanie zarówno jako samodzielny środek przeciwgrzybiczy w leczeniu powierzchownych zakażeń, jak i składnik terapii skojarzonej z AmB, zwiększając skuteczność leczenia przy jednoczesnym zmniejszeniu toksyczności.

Ostatnia część pracy to podsumowanie i wnioski wymienione w punktach, które uważam za trafne i celowe. Doktorantka podkreśliła, że testy przesiewowe syntetycznych pochodnych 2-(2,4-dihydroksyfenylo)-1,3,4-tiadiazoli wykazały, że większość związków jest nieodpowiednia do terapii skojarzonej z AmB ze względu na niską aktywność przeciwgrzybiczą, wysoką cytotoksyczność lub brak interakcji synergistycznych. Spośród nich wyłoniono jeden związek C1 – który charakteryzuje się wysoką skutecznością przeciwko *Candida spp.*, pleśniami (*Aspergillus*, *Trichophyton*), w tym szczepom opornym na azole. Związek ten działa synergistycznie z AmB, zmniejszając jej MIC od 4 do 16,67 razy, co może ograniczyć działania niepożądane antybiotyku. Pochodna C1 wykazuje niską cytotoksyczność wobec linii NHDF i COS-7 w stężeniach terapeutycznych, bez nasilenia toksyczności AmB. Analizy mechanizmów działania (na poziomie morfologicznym i spektroskopowym z użyciem FTIR) potwierdziły odmienne i komplementarne mechanizmy działania C1 i AmB, co może wyjaśniać efekt synergii. Doktorantka podkreśliła, że uzyskane wyniki sugerują, że terapia skojarzona AmB-C1 ma wysoki potencjał jako nowy, skuteczniejszy i bezpieczniejszy sposób leczenia grzybic, które stanowią współcześnie coraz większe wyzwanie dla ludzkości.

Podsumowując przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską, od strony jej opisu w liczbach, należy zaznaczyć, że dysertacja wykonana została na podstawie dwóch publikacji naukowych, które wydane zostały w okresie od 2018 roku do 2019 w czasopismach Scientific Reports oraz Plos One i jednej publikacji w monografiach krajowych. Dodatkowo Doktorantka zaznacza, że część wyników została również zaprezentowana w siedmiu komunikatach krajowych, co uważam za dość znaczące i godne podkreślenia osiągnięcie. Zauważyć należy, że Współautorka w/w publikacji oraz Autorka niniejszej rozprawy doktorskiej nie obawia się wyzwań związanych z publikowaniem w czasopismach z różnych wydań i związanej z tym procedury redakcyjnej. Publikacje, a przede wszystkim dysertacja

doskonale ilustrują interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań, które łączą elementy biologii, fizyki, chemii oraz medycyny, ukazując kompleksowe podejście do analizy właściwości molekularnych i biologicznych wybranych molekuł.

Biorąc pod uwagę również wskazane przez Doktorantkę publikacje nie mam więc żadnych wątpliwości co do znaczącego wkładu Doktorantki w proces powstania prac wchodzących w zakres niniejszej rozprawy doktorskiej. Autorka wykazała bardzo dużą dojrzałość naukową i w pełni, w moim odczuciu, spełnia wymagania stawiane Kandydatom do uzyskania stopnia naukowego doktora.

Jednakże, w toku analizy przedłożonej mi rozprawy doktorskiej wyłoniły się pewne kwestie wymagające doprecyzowania, jak i przede wszystkim budzące moje zainteresowanie. Proszę, aby Doktorantka szczegółowo odniosła się do nich podczas publicznej obrony pracy doktorskiej.

1. W pracy omówiono kilka hipotez dotyczących mechanizmu działania amfoterycyny B (AmB), w tym klasyczny model „baryłkowych porów”, model adsorpcyjny oraz model „gąbki sterolowej”. Biorąc pod uwagę selektywność działania AmB względem ergosterolu i cholesterolu oraz obserwowaną toksyczność wobec komórek ssaczyh:

Jakie czynniki molekularne mogą warunkować relatywnie niewielką różnicę w oddziaływaniu AmB z ergosterolem i cholesterolem, mimo ich różnic strukturalnych, i co mogłoby to oznaczać dla projektowania przyszłych, mniej toksycznych analogów AmB?

2. W jaki sposób wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie doktorskiej mogą przyczynić się do rozwoju nowych leków o działaniu przeciwgrzybiczym? Czy Doktorantka widzi szanse na wprowadzenie na rynek kompozycji synergistycznej, która w niniejszej dysertacji wykazała najskuteczniejszy efekt działania?

3. Na jakiej podstawie zostały wybrane do badań akurat dane związki z grupy 1,3,4-tiadiazoli? Czy były robione wcześniej badania przesiewowe jakiegś zdecydowanie większej grupy analogów?

4. Jakie mechanizmy komórkowe mogą tłumaczyć obserwowane różnice w dystrybucji i intensywności fluorescencji chityny oraz $\beta(1\rightarrow3)$ -glukanów w komórkach *C. albicans* traktowanych pojedynczo związkiem C1, AmB oraz ich kombinacją? Czy obserwowane zmiany sugerują odmienny punkt uchwytu działania tych substancji, czy raczej ich synergistyczne działanie na wspólne szlaki strukturalne?

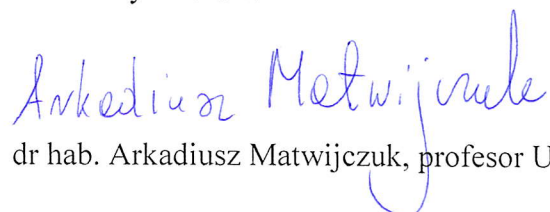
5. Czy zaobserwowane przesunięcia pasm w zakresie $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$, przypisane do $\beta(1\rightarrow3)$ - i $\beta(1\rightarrow6)$ -glukanów, wynikają jedynie z osłabienia interakcji międzycząsteczkowych w strukturze ściany komórkowej, czy też mogą być związane ze zmianami w stopniu usieciowania, degradacją lub modyfikacją chemiczną tych polisacharydów (np. oksydacją, hydrolizą)? Czy Autorka niniejszej dysertacji rozważyła wykonanie dodatkowych analiz (np. enzymatycznych, chromatograficznych lub NMR) w celu potwierdzenia natury tych zmian?

Odwołując się więc do przepisów art. 187 pkt. 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 roku, poz. 1571), Doktorantka Pani mgr Katarzyna Mitura w pełni spełnia kryteria wymagane przy przyznawaniu stopnia naukowego doktora. Analizując dorobek naukowy Doktorantki, należy podkreślić, że Kandydatka spełnia wszystkie formalne wymagania stawiane osobom ubiegającym się o uzyskanie stopnia doktora w dziedzinie nauk biologicznych.

Podsumowując ostatecznie swoją recenzję niniejszej rozprawy doktorskiej, z całą stanowczością potwierdzam, że przedłożona mi dysertacja mgr Katarzyny Mitury pod tytułem: *”Aktywność przeciwgrzybicza kompozycji złożonych z antybiotyku amfoterycyny B i wybranych pochodnych 1,3,4-tiadiazoli”* w pełni spełnia wymogi stawiane przed rozprawami doktorskimi zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 roku, poz. 1571), w związku z czym zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne

Uniwersytetu Marii-Curie Skłodowskiej z wnioskiem o nadanie mgr Katarzynie Miturze stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Dodatkowo, ze względu na wyjątkowo wysokie walory poznawcze oraz niezwykle staranną jakość prowadzonych badań naukowych i analizę uzyskanych wyników przedstawionych w niniejszej dysertacji, wnoszę do Rady Naukowej, Dyscypliny Nauki Biologiczne UMCS o jej wyróżnienie. Rozprawa ta stanowi znaczący wkład w rozwój nauki, dostarczając nowatorskich i wartościowych danych dotyczących biologii, spektroskopii molekularnej oraz potencjalnych zastosowań w kontekście rozwoju nowych dróg leczenia grzybic oraz projektowania nowych leków.



dr hab. Arkadiusz Matwiczuk, profesor UPL