



UNIWERSYTECKIE CENTRUM KLINICZNE
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Laboratorium Mikrobiologii UCML
Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej WUM



Warszawa 04.06.2025

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Mitury

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

wykonanej na Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

promotor: prof. dr hab. Mariusz Gagoś

Narastająca w ostatnich dziesięcioleciach oporność grzybów na leki przeciwgrzybicze i zagrażająca medycynie era postantybiotykowa jest konsekwencją nadużywania leków przeciwdrobnoustrojowych nie tylko w leczeniu zakażeń, ale również w weterynarii i przemyśle spożywczym. Nadmierne stosowanie leków przeciwgrzybiczych, zwłaszcza w profilaktyce infekcji grzybiczych w grupach ryzyka znacząco zwiększa presję selekcyjną i prowadzi do pojawiania się opornych szczepów wśród grzybów drożdżopodobnych i pleśniowych. Z drugiej strony, w ostatnim czasie nie zwiększyła się znacząco liczba preparatów przeciwgrzybiczych. Taka sytuacja powoduje, że każde badania, które potencjalnie mogą się przyczynić do odkrycia nowych związków o działaniu przeciwgrzybiczym lub preparatów mogących mieć znaczenie dla korzystnych modyfikacji terapii przeciwgrzybiczych są niezwykle cenne i pożądane. Tą aktualną problematykę podejmuje recenzowana rozprawa Pani mgr Katarzyny Mitury. Przedstawiona praca ma w mojej opinii istotne znaczenie dla badań dotyczących poszukiwania nowych strategii leczenia infekcji przeciwgrzybiczych. Uzyskane wyniki – zwłaszcza jeśli zostaną opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym – poprzez kompleksową i szeroką analizę nowego preparatu o aktywności przeciwgrzybiczej i jego synergizmu z amfoterycyną B (AmB) mogą stanowić podstawę do prowadzenia dalszych badań nad jego wykorzystaniem w monoterapii lub w preparatach skojarzonych. Amfoterycyna B jest podstawowym preparatem z grupy polienów stosowanym w terapii zakażeń grzybiczych, niestety jej stosowanie jest obciążone wieloma działaniami niepożądanymi i wysoką toksycznością w stosunku do komórek ludzkich stąd poszukiwanie alternatyw. Uzyskane przez Doktoranta wyniki należy uznać za wartościowy wkład w rozwój dziedziny nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Przedstawiona praca ma typowy układ rozpraw na stopień doktora nauk medycznych. Maszynopis liczy 147 stron, jest monografią opartą na własnym oryginalnym badaniu. Składa się z zasadniczych rozdziałów, typowych dla prac o charakterze eksperymentalnym jak: wstęp, cel pracy, materiały, metody, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo. Doktorantka zamieściła również wykaz stosowanych skrótów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Na końcu pracy zamieszczono spis tabel i rycin. Piśmiennictwo obejmuje 270 pozycji. Literatura naukowa jest odpowiednio dobrana i właściwie wykorzystana w tekście rozprawy. Znaczący odsetek stanowią publikacje z ostatnich 10 lat.

We wstępie Doktorantka przedstawiła szczegółową charakterystykę preparatów stanowiących przedmiot rozprawy: amfoterycyny B oraz 1,3,4 -tiadiazoli. Wstęp świadczy o szerokiej i ugruntowanej wiedzy Doktorantki w zakresie przedstawianej tematyki oraz umiejętności interpretacji literatury. Rozdział napisany jest rzetelnie i wyczerpująco, dobrze uzasadnia genezę pracy doktorskiej.

Doktorantka przedstawiła zasadnicze cele pracy, którymi było określenie aktywności przeciwgrzybiczej oraz poznanie mechanizmów działania kompozycji złożonych z amfoterycyny B i pochodnych z grupy 1,3,4 -tiadiazoli z zamiarem wybrania optymalnego układu o wysokim synergizmie. Najczęściej celem takich synergistycznie działających preparatów jest przełamanie mechanizmów oporności na jeden z preparatów lub zwiększenie jego aktywności. Natomiast celem badań Doktorantki było opracowanie preparatu, który pozwoliłby na znaczące zmniejszenie dawki toksynotwórczej amfoterycyny przy zachowaniu skuteczności dawki terapeutycznej.

W wykonanych licznych eksperymentach, które prowadziły do osiągnięcia celu badawczego autorka wykorzystwała bardzo szeroki panel metodyczny. Rozpoczynając od badań aktywności przeciwgrzybiczej ośmiu związków z grupy 1,3,4-tiadiazoli wobec wybranych szczepów grzybów drożdżopodobnych oraz pleśni przez określenie minimalnego stężenia hamującego (MIC), minimalnego stężenia grzybobójczego (MFC). Zbadano rodzaj oddziaływania między AmB a wybranymi pochodnymi z grupy 1,3,4-tiadiazoli przez wyznaczenie wartości współczynnika sumy frakcyjnych stężeń hamujących FIC zgodnie z zaleceniami American Society for Microbiology. Następnie określono aktywność cytotoksyczną tej grupy związków z wykorzystaniem trzech linii komórkowych i mikropłytkowej metody spektrofotometrycznej. Wyniki przeprowadzonego porównania preparatów z grupy 1,3,4-tiadiazoli pokazały, że związek o nazwie 4-(5-methyl-1,3,4-thiadiazole-2-yl) benzene-1,3-diol określany jako C1, miał najwyższy potencjał grzybobójczy, charakteryzował się najniższymi wartościami MIC, MFC przy zachowaniu niskiej cytotoksycznością dla komórek ludzkich. Związek C1 wykazywał reakcje synergistyczne z AmB w najszerszym zakresie stężeń (1-16 µg/ml). W dalszym etapie realizacji celu badawczego Doktorantka badała aktywność i mechanizm działania związku C1 i kompozycji złożonej z AmB i związku C1. Badania te obejmowały:

- określenie aktywności przeciwgrzybiczej związku C1 oraz kompozycji AmB + C1 wobec drożdży o różnym stopniu oporności na azole i grzyba pleśniowego
- określenie aktywności cytotoksycznej związku C1 i AmB + C1 wobec komórek ssaczyc
- określenie zmian morfologicznych występujących w komórce *C. albicans* pod wpływem związku C1 i kompleksu AmB + C1 przy zastosowaniu mikroskopii fluorescencyjnej, skaningowej mikroskopii elektronowej, transmisyjnej mikroskopii elektronowej
- sprawdzenie poziomu stresu oksydacyjnego w komórkach *C. albicans* po zastosowaniu związku C1 i kompleksu AmB + C1
- wpływ związku C1 i kompleksu AmB + C1 na wielkość komórek *C. albicans*
- analizę widm z frakcjonowanych ścian komórek *C. albicans* traktowanych związkiem C1 i kompleksem AmB + C1z zastosowaniem spektroskopii w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR)

Na podstawie przeprowadzonych badań dotyczących oddziaływań między AmB i związkiem C1 Doktorantka potwierdziła występowanie reakcji synergistycznych obu preparatów, które spowodowały zmniejszenie MIC AmB od 4 do 16,67 razy. Wykazała doświadczalnie na liniach komórkowych, że związek C1 nie powoduje wzrostu aktywności cytotoksycznej AmB, co potwierdzałoby możliwość wykorzystania tego dwuskładnikowego leku w terapiach przeciwgrzybiczych. Oba związki w skojarzeniu powodowały indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach *Candida albicans* aczkolwiek uzyskane wartości były 4-krotnie niższe niż po zadziałaniu wyłącznie związku C1 i nieco wyższe niż dla samej AmB. Badania przeprowadzone przy użyciu skaningowej mikroskopii elektronowej oraz transmisyjnej mikroskopii elektronowej pokazały, że działanie związku C1 i kompozycji AmB+C1 wywołuje nieprawidłowości w syntezie składników ściany komórkowej *C. albicans*. Tą hipotezę potwierdzono w doświadczeniu z zastosowaniem spektroskopii w podczerwieni, które pokazało, że główny mechanizm aktywności przeciwgrzybiczej AmB+C1 jest związany z zaburzeniem integralności ściany komórkowej. Jak Doktorantka zauważyła w przedstawionych wnioskach mechanizm synergistycznego działania C1 i AmB może opierać się na ułatwieniu wniknięcia AmB do komórki przez wywoływane przez C1 zaburzenia integralności ściany komórkowej. Częsteczką docelową dla AmB ergosterol znajduje się na błonie komórkowej taki mechanizm znacząco zwiększałby podatność komórek grzyba na ten lek przeciwgrzybiczy z grupy polienów, czyli teoretycznie mógłby on wykazywać aktywność w mniejszym stężeniu.

Autorka uzyskane wyniki zaprezentowała w kilku podrozdziałach, dodatkowo ilustrowanych 37 rycinami i 12 tabelami.

Przeprowadzona analiza statystyczna, dobór technik badawczych i testów nie budzi zastrzeżeń. Doktorantka zastosowała szeroki wachlarz metod pokazując dużą wiedzę teoretyczną i biegłość w prowadzeniu eksperymentów. Świadczy o tym m.in. zastosowane podejście metodologiczne do sprawdzenia aktywności przeciwgrzybiczej związku C1 i jego interakcji z AmB oraz fakt, że wszystkie eksperymenty zostały wykonane przez Doktorantkę a nie wyspecjalizowane jednostki zewnętrzne. Potwierdza to dużą swobodę w poruszaniu się w zakresie badanej tematyki pod względem dostępnych narzędzi badawczych i ich trafnego doboru. Na uwagę i podkreślenie zasługuje również fakt bardzo starannej i rzetelnej analizy tak dużej liczby wyników.

Zaletą prowadzonych badań jest dobór wykorzystanych w eksperymentach szczepów grzybów, na które składały się zarówno szczepy z uznanej kolekcji ATCC jak i szczepy kliniczne z różnymi wzorami lekowrażliwości.

W rozdziale dyskusja Autorka ustosunkowała się do otrzymanych wyników w świetle doniesień innych autorów. Autorka konfrontuje wyniki badań własnych z danymi literaturowymi, pokazując źródła swoich decyzji badawczych. W rozdziale dyskusja brakuje wskazania oryginalnych elementów prowadzonych badań.

Poniżej sformułowano kilka uwag, mających charakter otwartych pytań i komentarzy do dyskusji.

1. Dlaczego w doświadczeniach obserwacji TEM i SEM których celem było poznanie mechanizmu synergistycznego działania związku C1+AmB nie zastosowano w protokole badawczym jednoczesnego oddziaływania obu związków na komórki? Po dobie inkubacji z C1 (w różnych stężeniach) komórki ekspozowano na AmB przez 4 h. Zasada działania w synergii lub terapii skojarzonej zawsze wynika z jednoczesowej obecności obu związków w układzie badawczym lub organizmie.
2. Naturalna oporność *Pichia kudriavzevii* (*C. krusei*) na flukonazol i itrakonazol jest faktem, natomiast zaskoczyło mnie stwierdzenie Doktorantki wskazujące na znaczną oporność szczepów tego gatunku na AmB? Nie wynika to z załączonych pozycji literatury. Podobny komentarz dotyczy opisywanej w dyskusji naturalnej oporności na AmB w różnych gatunkach *Candida*?
3. W dyskusji Doktorantka pisze, że przedstawione w pracy wyniki wskazują, że związek C1 wykazuje oddziaływanie synergistyczne z AmB wobec wszystkich badanych szczepów w tym szczepów o obniżonej wrażliwości na AmB – MIC AmB organizmów testowych nie wskazywał na takie izolaty?

4. Autorka w sformułowanych wnioskach w pkt. 4 wysuwa hipotezę, że zmniejszenie dawki AmB w związku ze zmniejszeniem MIC o 4-16 razy przez wykorzystanie synergistycznego wpływu związku C1 znacznie obniży skutki uboczne leczenia polienem. Czy Doktorantka próbowała oszacować na modelu matematycznym jak to zmniejszenie MIC faktycznie przełoży się na dawkę amfoterycyny zastosowaną w terapii pacjenta np. z inwazyjną kandydozą, gdzie wysokie dawki leku są szczególnie istotne? Czy w takim razie lek w przyszłości mógłby być stosowany w terapii empirycznej? Jak będą kształtować się dawki terapeutyczne związku C1 przy tak wysokich jego wyjściowych MIC? Wykonanie takich estymacji mogłoby wartościowe dla założonego celu badawczego i przyszłości prowadzonych badań.
5. Czy w związku z tym, że proponowany lek przeciwgrzybiczy będzie składał się z komponenty azolowej i komponenty polienowej ma szansę na rozszerzenie zakresu przeciwdrobnoustrojowego działania w stosunku do każdego z tych składników. Jakie znaczenie dla tego zjawiska może mieć hipoteza o zwiększaniu biodostępności celów molekularnych przez związek C1 dla AmB? Jaki jest hipotetyczny zakres aktywności tego leku? Odpowiedź na to pytanie prawdopodobnie będzie konieczna w planowaniu dalszych badań i związanych z tym doborem gatunków badanych szczepów.

Praca napisana jest poprawnym językiem. Doktorant nie ustrzegł się jednak błędów, z których najważniejsze przytaczam poniżej z recenzenckiego obowiązku. Błędów o charakterze stylistycznym, gramatycznym oraz drobnych błędów pisarskich nie wymieniam. Uwagi mają charakter edycyjny i powinny być uwzględnione przy przygotowywaniu wyników do publikacji.

1. Uwaga generalna do całej pracy – stosowanie termin „antybiotyk” dla preparatów przeciwgrzybiczych nie w pełni odpowiada definicji tych preparatów
2. Doktorantka opisuje wielolekooporność szczepów grzybiczych, natomiast podaje odnośnik do publikacji nr 8 wg spisu. Publikacja dotyczy wielolekoopornych szczepów gronkowców. Z jakiego źródła Doktorantka korzystała do pozyskania informacji na temat szczepów grzybiczych: MDR, XDR oraz PDR? - str. 12.
3. Doktorantka opisując zakres aktywności echinokandyn wymieniła gatunki grzybów, wobec których ten lek wykazuje aktywność grzybobójczą, w przypadku *Pneumocystis jirovecii* została podana nieobowiązująca już nazwa *Pneumocistis carini* - str. 13
4. Sformułowanie dotyczące izolatu nr 124 *Nakaseomyces glabrata* (syn. *C. glabrata*) umiarkowanie wrażliwy nie jest zgodne z aktualnie stosowaną terminologią „Wrażliwy zwiększona ekspozycja” - str. 76

5. Doktorantka pisze, że dotychczas pochodna C1 została opisana w wielu publikacjach, gdzie wykazano, że hamuje wzrost różnych gatunków drożdży oraz pleśni opornych na azole – nie zostały do tego stwierdzenia dodane żadne odnośniki do literatury ani nie uwzględniono tego faktu w dyskusji - Str.101

Te drobne niedociągnięcia nie zmniejszają wartości merytorycznej recenzowanej pracy i nie wpływają na jej ogólną, bardzo wysoką ocenę.

Podsumowując, przedstawioną mi do recenzji pracę doktorską oceniam pozytywnie. Oceniana dysertacja spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zarówno pod względem formalnym jaki i merytorycznym. Wartościowym osiągnięciem przeprowadzonych prac eksperymentalnych jest wskazanie synergistycznego działania nowego preparatu będącą kombinacją nowego związku 4-(5-methyl-1,3,4-thiadiazole-2-yl ze starym amfoterycyną B. Wynik ten poparty jest dużą liczbą oryginalnych badań eksperymentalnych i analizami statystycznymi. Przeprowadzone badania stanowią doskonały punkt wyjścia dla dalszych prac mających na celu doprowadzenie do zastosowania nowych preparatów w terapiach zakażeń grzybiczych. Badania zostały właściwie zaplanowane i przeprowadzone, reprezentują wysoki poziom naukowy i powinny jak najszybciej zostać opublikowane w czasopiśmie ze współczynnikiem oddziaływania (ang. impact factor, IF).

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa mgr Katarzyny Mitury spełnia warunki określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.2018 poz.1668). Z pełnym przekonaniem zwracam się z wnioskiem do Wysockiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie mgr Katarzyny Mitury do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n med. Edyta Podsiadły

Kierownik Laboratorium Mikrobiologii UCML
Kierownik Zakładu Mikrobiologii Stomatologicznej WUM