



**KATEDRA I ZAKŁAD BIOCHEMII  
I BIOLOGII MOLEKULARNEJ  
UNIwersytet Medyczny w Lublinie**

20-093 Lublin, ul. dr W. Chodźki 1  
tel./ fax +48 814486350

---

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Mitura  
pt. „Aktywność przeciwgrzybicza kompozycji złożonych z antybiotyku amfoterycyny B  
i wybranych pochodnych 1,3,4-tiadiazoli”

---

Ciężkie, zagrażające życiu grzybice, szczególnie grzybice układowe, są wyzwaniem współczesnej medycyny. Mimo ciągłego postępu w odkrywaniu i stosowaniu nowych leków w tym zakresie, amfoterycyna B (AmB) pozostaje lekiem z wyboru w leczeniu wielu opornych na inne terapeutyki kandydoz, szczególnie u pacjentów z obniżoną odpornością. Zastosowanie AmB wiąże się jednak z występowaniem wielu działań niepożądanych tego leku, szczególnie hepatotoksycznością i nefrotoksycznością, które mogą prowadzić do częściowej niewydolności tych narządów, co w połączeniu z ciężką chorobą zasadniczą może powodować zagrożenie życia, a na pewno znaczące obniżenie jego komfortu. Dlatego też z jednej strony prowadzone są próby odkrycia nowych leków przeciwgrzybiczych, z drugiej strony usiłuje się stosować leczenie skojarzone z zastosowaniem AmB oraz innych substancji, co powinno umożliwić zmniejszenie dawki AmB poprzez synergistyczne działanie dodatkowego leku, lub przynajmniej zmniejszenie toksycznych właściwości AmB.

W ten nurt badań wpisuje się przedłożona do oceny rozprawa Pani Katarzyny Mitura. Stanowi ona raport z badań Autorki dotyczących ustalenia wpływu zastosowania pochodnych 1,3,4-tiadiazoli zastosowanych wspólnie z AmB w badaniach *in vitro*.

W celu realizacji założonych badań Doktorantka wykazała, że użycie związku C1 o nazwie 4-(5-metylo- 1,3,4-tiadiazol-2-ylo)benzeno-1,3-diol z AmB powodowało silne działanie synergistyczne tych dwóch substancji, przy jednoczesnym utrzymaniu właściwości przeciwgrzybiczych oraz stosunkowo niskiej, nie wzmożonej toksyczności tego typu kombinacji leków w stosunku do cytotoksyczności powodowanej przez AmB.

Rozprawa doktorska o typowym układzie dla prac doświadczalnych liczy 147 stron i została podzielona na 8 rozdziałów, zawiera również streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. Tekst uzupełniony został 12 tabelami i 37 rycinami. Praca została wzbogacona o wykaz używanych skrótów i symboli oraz spis tabel i rycin stanowiące użyteczny dla czytelnika odnośnik do tekstu.

Obszerny **Wstęp** zawarty na stronach 11-31 zawiera aktualne dane piśmiennictwa dotyczące tematu rozprawy. Został podzielony na szereg podrozdziałów zawartych w dwóch głównych częściach – tj. „Wstęp” i tzw. „Część teoretyczną”. Wg mnie powinien to być jeden rozdział, wstęp z samego założenia jest częścią teoretyczną pracy. Autorka we „Wstępie” omawia epidemiologię kandydoz, postaci kliniczne tej choroby, jak również czynniki etiologiczne, w tym nowe patogeny, które ją wywołują. Doktorantka zwraca uwagę na zjawisko lekooporności, definiując poznane mechanizmy jej powstawania na poziomie komórkowym i molekularnym, dokumentując je za pomocą rycin i tabel. Mimo, że nie jest lekarzem, szczegółowo charakteryzuje też grupy leków obecnie stosowanych w leczeniu grzybic, wskazując na ich niezadowalające działanie w leczeniu kandydoz.

W tym aspekcie szeroko i wyczerpująco omawia AmB wraz ze szczegółową charakterystyką tego związku, czym rozpoczyna „Część Teoretyczną” rozprawy. Wychodząc od budowy chemicznej AmB stara się wyjaśnić nie do końca poznane, potencjalne mechanizmy działania AmB na poziomie komórkowym i molekularnym. Przedstawia też interesujący rys historyczny wprowadzania do leczenia preparatów AmB, łącznie z ich działaniami niepożądanymi i wskazaniami medycznymi obowiązującymi obecnie. Co nie mniej ważne, charakteryzuje też interakcje AmB z innymi lekami w stosunku do poszczególnych szczepów grzybów na poziomie doświadczalnym w warunkach *in vivo* z użyciem różnych modeli zwierzęcych oraz próby modyfikacji chemicznych AmB przez tworzenie kompleksów z innymi substancjami, czy różnych formułacji farmaceutycznych leku.

W podobny sposób Doktorantka omawia grupę chemiczną związków jakimi są 1,3,4-tiadiazole, którymi zajęła się w części doświadczalnej rozprawy. Związki te, wykazują szereg potencjalnych właściwości o charakterze terapeutycznym – od przeciwnowotworowych, przeciwbólowych, czy wpływających na OUN, do przeciwbakteryjnych i przeciwgrzybiczych.

Na tej podstawie Pani Katarzyna Mitura dokonała też założeń swojej rozprawy doktorskiej, zawartej w rozdziale „Cel pracy”, którym było określenie aktywności przeciwgrzybiczej oraz poznanie rodzajów interakcji i mechanizmów działania kompozycji złożonych z AmB i wybranych pochodnych z grupy 1,3,4 – tiadiazoli. Cel ten został sformułowany prawidłowo, może zbyt ambitny w końcowej części dotyczącej mechanizmu działania badanych substancji. Wybór tematu badań i sposobów jego realizacji nie budzi jednak zastrzeżeń.

#### **Materiał i metody** stosowane w pracy zostały opisane w rozdziale 4.

W celu określenia toksyczności badanych związków na komórki prawidłowe Doktorantka posłużyła się standardowym testem MTT w modelu *in vitro* z wykorzystaniem 2 komercyjnych linii fibroblastów – prawidłowych fibroblastów ludzkiej skóry (NHDF) oraz

fibroblastów z nerki małpy (COS-7), jak również komórek typu nabłonkowego z jajnika chomika chińskiego *Cricetulus griseus* (linia CHO-K1). Eksperyment przeprowadzono trzykrotnie z dużą ilością prób badanych przy zastosowanych różnych stężeniach leków, z wyliczeniem wartości IC50.

Zasadniczą część pracy doktorskiej przeprowadzono w oparciu o standardowe szczepy grzybicze otrzymane komercyjnie, oraz co należy podkreślić, wykorzystując szczepy odporne na leczenie, uzyskane od pacjentów leczonych w I Klinice Intensywnej Terapii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie.

Hodowle, zarówno komórek ssaków, jak i grzybów prowadzono w standardowych warunkach dla poszczególnych linii komórkowych i szczepów grzybiczych, co Doktorantka opisuje bardzo szczegółowo. Moim zdaniem opis zamrażania i rozmrażania kultur komórkowych i grzybiczych jest zbędny, należy to rutynowych procedur laboratoryjnych i nie powinien mieć wpływu na prezentowane wyniki.

W celu oznaczenia wartości MIC i MFC dla poszczególnych stężeń tiadazoli i AmB, w pracy zastosowano standardowe przepisy metodyczne zalecane przez Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), co w konsekwencji umożliwiło określenie właściwości badanych substancji jako grzybobójcze lub grzybostatyczne. Autorka pracy określała również zmiany w morfologii komórek pod wpływem badanych substancji w mikroskopii fluorescencyjnej stosując barwienia oranżem akrydyny, oraz jodku propidyny i barwnika Syto 9 – w tym ostatnim przypadku wykorzystując zjawisko transferu energii rezonansu fluorescencji (FRET), jak również szereg innych barwień – kalkofluorem, czy błękitem aniliny. Wyniki tych barwień były finalnie weryfikowane na podstawie obserwacji w skaningowym mikroskopie elektronowym SEM, czy zmian ultrastruktury komórek przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego TEM. Jako że efektem działania testowanych substancji były zmiany w strukturze i przepuszczalności ścian komórkowych badanych komórek grzybów, Autorka rozprawy posłużyła się w końcowym etapie badań techniką spektroskopii w podczerwieni (FTIR) w celu detekcji zmian w zawartości m.in. cząsteczek białek i lipidów ściany komórkowej grzybów po procesie ekstrakcji i izolacji ścian komórkowych. Ten ostatni etap może prowadzić jednak do pewnych zmian w strukturze izolowanych ścian grzybów w porównaniu do struktury ściany w natywnych komórkach, co należy wziąć pod uwagę przy interpretacji wyników.

Tym niemniej, konstrukcja badania jest czytelna, należy podkreślić dobre planowanie eksperymentów przez Doktorantkę w celu eliminacji niespecyficznych czynników mogących mieć wpływ na otrzymane wyniki, m.in. poprzez zastosowanie wielu rodzajów barwień, czy różnych, zaawansowanych technik mikroskopowych, co uważam za bardzo wartościowy aspekt ocenianej pracy doktorskiej. Zastosowana metodyka jest więc adekwatna do wytyczonego celu i spełnia wymogi nowoczesności wymagane w badaniach z zakresu

mikrobiologii i farmakologii doświadczalnej. Analiza statystyczna nie budzi zastrzeżeń. Przyjęte testy statystyczne nie odbiegają od standardów światowych, a ich wybór należy uznać za odpowiedni.

**Wyniki** wykonanych pomiarów przedstawiono w sposób dość czytelny. Myślę jednak, że zaznaczenie istotności statystycznych bezpośrednio na wykresach w znacznym stopniu ułatwia czytelnikowi analizę wyników. Sugerowałbym też podanie w opisie każdej ryciny rodzaju testu statystycznego, którym wyniki doświadczeń były liczone.

Autorka pracy wykazała zróżnicowaną wrażliwość standardowych szczepów grzybów w inkubacji z AmB (Ryc 17). Moją uwagę zwrócił fakt, że średnią wyliczano z 8 badanych prób. Czy był to jeden, czy też więcej niezależnych eksperymentów?

Autorka rozprawy dokonała też analizy różnych pochodnych tiadazoli w aspekcie ich przeciwgrzybiczego działania. W przypadku *C. albicans* Najbardziej aktywnym związkiem okazał się ten oznaczony symbolem 235, podczas gdy związki 1013, 1154, i 1010 aktywności grzybobójczej nie posiadały. Podobnie, różne pochodne tiadazoli wykazywały zróżnicowaną aktywność w stosunku do poszczególnych szczepów, która malała wraz z wzrostem czasu inkubacji. Jedynie związek o symbolu C1 powodował hamowanie wzrostu wszystkich badanych szczepów standardowych, stąd też słuszna decyzja Doktorantki o zakwalifikowaniu tej właśnie pochodnej tiadazoli do dalszych szczegółowych badań. Tym bardziej, że w następnych eksperymentach tylko C1 posiadał działanie grzybobójcze w testach MFC. W przyszłości proponowałbym jednak kontynuację badań dotyczących innych pochodnych o wysokiej aktywności grzybobójczej w odniesieniu do poszczególnych szczepów.

Następnym krokiem milowym rozprawy było określenie oddziaływań zachodzących pomiędzy AmB a pochodnymi 1,3,4- tiadiazoli za pomocą oznaczenia współczynnika sumy frakcyjnych stężeń hamujących ( $\Sigma$ FIC). W zwalczaniu zakażeń *C. albicans* Doktorantka wykazała efekt zwiększonej aktywności grzybobójczej AmB w obecności nawet niskich stężeń tiadazoli, przy czym najbardziej efektywna okazała się kombinacja C1 z AmB – efekt synergii lub addycji w zależności od stężenia C1. Inne kombinacje tiadazoli z AmB były mniej efektywne, a niektóre – w przypadku pochodnych 1013, 1010, 1546 i 1154 – wręcz antagonistyczne. Dodatkowo, w badaniach przeżywalności (test MTT) na komórkach ssaków Autorka stwierdziła, że większość z badanych pochodnych tiadazoli wykazywała mniejszą lub większą toksyczność w stosunku do linii NHDF, CHO-K1, COS-7. Stosunkowo najmniej nasilony efekt cytotoksyczny obserwowano ponownie w przypadku pochodnej C1, co jeszcze raz potwierdza wytypowanie C1 jako najbardziej obiecującej do dalszych, bardziej zaawansowanych eksperymentów.

Szczególnie wartościowa wydaje mi się część wyników dotycząca określenia aktywności przeciwgrzybiczej związku C1 wobec szczepów z izolatów klinicznych opornych

na azole stosowanej pojedynczo i synergistyczne lub addytywne w skojarzeniu z AmB, w tym wobec gatunków *Candida* nie należących do *albicans* oraz przeciwko pleśniam, takim jak *Aspergillus* i *Trichophyton*. Pozwoliło to, w zależności od szczepu, na kilkukrotne zmniejszenie stężenia AmB w celu osiągnięcia podobnego efektu terapeutycznego. Co istotne, działanie związku C1 w połączeniu z AmB nie wpływało na zwiększenie cytotoksyczności antybiotyku w każdej z badanych kombinacji związków w stosunku do linii ludzkich fibroblastów (NHDF) *in vitro*. Na uwagę zasługuje też fakt, że w badaniach z użyciem technik mikroskopowych Doktorantka obserwowała zaburzenia morfologiczne komórek grzybów przy zastosowaniu stężeń dużo niższych od wyznaczonych wartości MIC. W tej części pracy nie znalazłem jednak szczegółowych danych określających ilość wykonanych eksperymentów, jak również ilości analizowanych komórek (obszarów) w poszczególnych eksperymentach z użyciem mikroskopii, co stało się podstawą analiz statystycznych. W badaniach z wykorzystaniem FTIR Autorka rozprawy obserwowała przesunięcia widmowe w stronę wyższych liczb falowych po zastosowaniu poszczególnych substancji oraz ich kombinacji, potwierdzając tym samym zmiany w strukturze ścian komórkowych szczególnie dotyczących frakcji polisacharydów, w mniejszym stopniu lipidów. Reasumując, wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez mgr Katarzynę Mitura stanowią cenne uzupełnienie wiedzy o wpływie wybranych triadiazoli oraz AmB i ich kombinacji na przeciwgrzybicze właściwości w stosunku do standardowych i klinicznych izolatów szczepów w warunkach *in vitro*. Stanowią też podbudowę pod ewentualne dalsze badania w tym zakresie w innych modelach doświadczalnych.

**Dyskusja** przedstawionej do recenzji dysertacji świadczy o swobodnym poruszaniu się Autorki w zagadnieniu będącym przedmiotem rozprawy doktorskiej. Zawarte w dyskusji informacje w sposób rzeczowy i wiarygodny porównują uzyskanie wyniki z danymi zaczerpniętymi z piśmiennictwa. Z obowiązku recenzenta wyrażę opinię, że miejscami rozdział ten wydaje się być zbyt rozbudowany, niektóre dość długie fragmenty mają charakter typowo opisowy, bez odniesienia się do otrzymanych wyników, dlatego też mogłyby być przeniesione do „**Wstępu**”. Zbędne wydaje się też ponowne opisywanie wyników wraz ze stężeniami badanych substancji w tej części rozprawy. Mogłoby być to uzasadnione, o ile Autorka odnosiłaby je do stężeń zastosowanych w innych publikacjach, dyskutując znaczenie uzyskanych przez Nią danych.

Doktorantka porusza również zagadnienie wyjaśnienia potencjalnego mechanizmu działania zarówno C1, jak i kombinacji C1/AmB. Opiera się przy tym głównie na badaniach morfologicznych komórek grzybów, uwidocznionych za pomocą złożonych technik mikroskopowych. Pewnym rozwinięciem tych badań na poziomie molekularnym jest zastosowanie techniki FTIR, które rzuca światło na możliwe zmiany w strukturach molekuł ścian komórkowych, jednak bez określenia związków przyczynowo-skutkowych wpływu C1,

AmB, czy ich kombinacji na zaburzenia szlaków metabolicznych/syntezy poszczególnych molekuł. Dlatego też cel pracy dotyczący rozwikłania mechanizmu działania tych badanych leków wydał mi się zbyt ambitny. Wymagałby przeprowadzenia dodatkowych zaawansowanych analiz lipidomicznych czy metabolomicznych, co wykracza poza zakres rozprawy. Może być natomiast wskazówką na przyszłość.

Generalnie jednak, rozdział ten jest napisany prawidłowo. Doktorantka stawia odpowiednie hipotezy badawcze, próbując je uzasadnić na podstawie badań własnych i danych zaczerpniętych z piśmiennictwa.

**Wnioski** są moim zdaniem zbyt rozbudowane. Nie jest potrzebne ponowne streszczenie wyników określane jako podsumowanie. Wnioski nr 1, 2, 3 i 5 są informacją o uzyskanym wyniku, a nie typowym wnioskiem. Wg mojej opinii typowymi wnioskami są: drugie zdanie wniosku nr 4, wniosek 6c oraz ostatnie zdanie wniosku nr 6, jak również wniosek nr 7. Wynikają one z konstrukcji badania oraz znajdują uzasadnienie w wynikach i nie budzą zastrzeżeń.

Obszerne **Piśmiennictwo** zawierające 270 pozycji jest adekwatne i świadczy o umiejętności selekcjonowania istotnych informacji związanych z podjętym tematem badań. Umieszczone pozycje piśmiennictwa są aktualne i znajdują się w bazach danych czasopism naukowych. 93 pozycje pochodzą z ostatnich dziesięciu lat, pozostałe posiadają kluczowe znaczenie dla redakcji wstępu lub zawierają oryginalne opisy stosowanych metod badawczych.

Przedstawione uwagi w niczym nie umniejszają jednak wartości recenzowanej rozprawy doktorskiej, którą oceniam wysoko.

Konkludując stwierdzam, że przedmiot prowadzonych badań, dobór metod, prezentacja wyników, rzeczowość dyskusji oraz uzyskane wnioski odpowiadają kryteriom stawianym pracom doktorskim. Na szczególne podkreślenie zasługuje podjęta tematyka badań oraz biegłość Doktorantki w wykorzystaniu przedstawionych metod oraz dojrzała analiza uzyskanych wyników. Rozprawa doktorska Katarzyny Mitura spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668)

W związku z powyższym przedkładam Radzie Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych UMCS wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Mitura do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnoszę o **wyróżnienie rozprawy**.

Andrzej Stepulak  
Lublin, 07.06.2025

Kierownik  
Zakładu Biochemii i Biologii Molekularnej  
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie  
prof. dr hab. n. med. Andrzej Stepulak