

Gdańsk, 30.06.2023 r.

Recenzja
rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Czechowicz
wykonanej w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu
pod kierunkiem Promotor - Pani prof. dr hab. Grażyny Gościńskiak
oraz promotor pomocniczej - Pani dr n. med. Joanny Nowickiej

pt. „Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych na szczepy *Candida spp.*”

Przedłożona do oceny praca doktorska zatytułowana „Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych na szczepy *Candida spp.*” stanowi cykl trzech połączonych tematycznie artykułów naukowych - jednego przeglądowego i dwóch oryginalnych, które dotyczą istotnego problemu jakim są grzybicze zakażenia ginekologiczne. Wszystkie artykuły opublikowano w czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Łączny współczynnik oddziaływania IF cyklu wynosi 18,941 a suma punktów MEiN wynosi 380. We wszystkich trzech artykułach Doktorantka jest pierwszą autorką. Zamieszczone w pracy oświadczenia Współautorów określające indywidualny wkład w powstanie publikacji, jak również deklaracje - tzw. Authors' contribution w samych publikacjach, wskazują, że udział Doktorantki jest wiodący, co świadczy o jej dużym zaangażowaniu w prowadzone badania.

Układ redakcyjny pracy jest prawidłowy. Praca liczy 108 stron i zawiera kolejno: spis treści, wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu, wstęp, w którym Doktorantka wprowadza czytelnika w problematykę kandydozy pochwy i sromu (*Vulvovaginal candidiasis*, VVC), prezentując dane epidemiologiczne oraz hipotezy określające najbardziej prawdopodobny mechanizm rozwoju zakażenia, jasno sprecyzowany cel naukowy i założenia pracy, opis wykorzystanych materiałów i metod, podsumowanie wyników, wnioski, literaturę, streszczenie oraz streszczenie w języku angielskim. Wszystkie części pracy opisano starannie, zrozumiale, poprawnym językiem. W rozprawie zacytowano 36 pozycji piśmiennictwa. Wszystkie cytowane źródła to literatura światowa z ostatnich lat.

Za główny cel pracy Doktorantka postawiła sobie określenie przeciwdrobnoustrojowego i przeciwbiofilmowego potencjału czterech nowo zsyntetyzowanych kationowych lipopeptydów wobec klinicznych szczepów *Candida spp.* Cel ten jest nie tylko ambitny z naukowego punktu widzenia, ale też, z powodu narastającej lekooporności drobnoustrojów i zapotrzebowania na nowe substancje wykazujące aktywność przeciwdrobnoustrojową, bardzo istotny społecznie.

Szeroki przegląd literatury przedmiotu, którego efektem jest artykuł nr 1. (Czechowicz et al. International Journal of Molecular Science 2022; 23:11:5895), pozwolił Doktorance szczegółowo przedstawić główne czynniki patogenności *Candida spp.*, wśród których wymienia zdolność do adhezji oraz wytwarzania enzymów hydrolitycznych, duże zdolności przystosowawcze do zmieniających się warunków środowiskowych, występowania dimorfizmu i przełączania fenotypowego oraz zdolność do formowania biofilmu odpornego na warunki środowiskowe oraz działanie środków przeciwdrobnoustrojowych. Ponadto Pani mgr Paulina Czechowicz przedstawia, uznawaną powszechnie za najbardziej prawdopodobną, trzyczęściową hipotezę odnośnie procesów potencjalnie inicjujących zakażenie w postaci pełnoobjawowej kandydozy. Praca jest doskonałym kompendium wiedzy z przedmiotu i z pewnością będzie użyteczną dla naukowców, lekarzy klinicystów czy studentów.

W drugiej zaprezentowanej w dysertacji publikacji naukowej (Czechowicz et al. Pharmaceutics 2021; 13:10:1589) Doktorantka za cel postawiła sobie określenie wpływu czterech syntetycznych lipopeptydów, dwóch liniowych (L1 i L2) i dwóch cyklicznych (C1 i C2), wobec klinicznych szczepów *Candida spp.* w formie planktonowej, wyznaczając minimalne stężenie hamujące wzrost (MIC) oraz biofilmu, wyznaczając minimalne stężenie eradykujące biofilm (MBEC). Lipopeptydy przebadano także pod kątem ich wzajemnych interakcji z flukonazolem, wyznaczając frakcyjne stężenie hamujące (FIC). Przeprowadzone badania wykazały, że wszystkie badane związki wykazywały aktywność przeciwgrzybiczą, jednak dla związków cyklicznych obserwowano znacznie niższe wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) niż dla lipopeptydów liniowych. Przewagę związków cyklicznych nad liniowymi Doktorantka pokazała obliczając współczynnik selektywności (SI), odnosząc uzyskane wartości MIC do wyznaczonego stężenia toksycznego (IC50) wobec keratynocytów (HaCaT). W tym miejscu poproszę Doktorantkę o komentarz do stwierdzenia „Wysokie wartości dla analogów cyklicznych (5.50 dla C1 i 8.83 dla C2) wskazują, że niestety wraz ze zwiększeniem aktywności tych związków wobec grzybów, narasta także ich toksyczność” - (str. 18 dysertacji). Jaki wzrost toksyczności Doktorantka miała na myśli?

Przecież z badań Doktorantki wynika, że bardziej aktywne przeciwgrzybiczo analogi cykliczne (C1 i C2) są mniej toksyczne od liniowych (L1 i L2). Ponadto związek C2, dla którego zaobserwowano wyższą aktywność wobec *Candida spp.* w porównaniu do związku C1, jest również mniej od niego toksyczny.

Przeprowadzone przez mgr Czechowicz badania właściwości przeciwbiofilmowych wykazały, że wartości minimalnych stężeń eradykujących biofilm (MBEC) były kilkukrotnie wyższe od wyznaczonych wartości MIC, co Doktorantka słusznie powiązała ze znaczną heterogennością i wyspecjalizowaniem komórek tworzących biofilm oraz z ich nieprzepuszczalną macierzą pozakomórkową. Stwierdzono większą aktywność lipopeptydów cyklicznych C1 i C2, wyrażoną jako MBEC, w porównaniu do liniowych L1 i L2.

Badania wzajemnych interakcji lipopeptydów z flukonazolem przeprowadzono dwuetapowo. W pierwszej kolejności badania przeprowadzono na 24 wybranych szczepach *Candida spp.* i stwierdzono, że najkorzystniejsze działanie w połączeniu z flukonazolem wykazywał związek L1. Dla tej kombinacji najczęściej obserwowano efekt addycji. Z kolei kombinacje lipopeptydów cyklicznych z flukonazolem najczęściej wykazywały indyferentny efekt. Na podstawie otrzymanych wyników Doktorantka słusznie zdecydowała o konieczności dodatkowej weryfikacji wzajemnych interakcji dla kombinacji związek L1-flukonazol, tym razem wobec wszystkich izolatów *Candida spp.* Rezultaty tej weryfikacji okazały się szczególnie interesujące, gdyż Doktorantce udało się znaleźć takie kombinacje stężeń związku L1 i flukonazolu, gdzie zaobserwowano działanie synergistyczne. Jest to bez wątpienia wynik niezwykle obiecujący, dający szansę na skuteczną terapię skojarzoną kandydozy pochwy.

Trzecia praca zaprezentowana w dysertacji (Czechowicz et al. International Journal of Molecular Science 2022; 23:22:14453) jest kontynuacją badań nad przeciwbiofilmową aktywnością lipopeptydów L1 i C1 oraz ich kombinacji z flukonazolem. Jej celem była weryfikacja rezultatów uzyskanych poprzednio metodami *in vitro*, poprzez zastosowanie modelu biofilmu *ex vivo* oraz w warunkach mikroprzepływowych. W modelu *ex vivo* uzyskano strukturę dojrzałego biofilmu na powierzchni błony śluzowej fragmentów pochwy mysiej, którą następnie traktowano badanymi substancjami. Model mikroprzepływowy wymagał wyhodowania biofilmu w mikrokanalich aparatu BioFlux. Zaplanowany przez Doktorantkę eksperyment wykazał, że dojrzały biofilm grzybiczy utworzony na powierzchni epithelium oraz w mikrokanalich nie był skutecznie eradykowany przez lipopeptydy ani ich kombinacje z flukonazolem.

Reasumując, praca doktorska mgr Pauliny Czechowicz ma walory oryginalności naukowej. Jest połączeniem wiedzy i umiejętności z zakresu mikrobiologii i chemii farmaceutycznej. Autorka wykazała się doskonałym opanowaniem różnorodnych technik i procedur, także wymagających specjalistycznego oprzyrządowania. Mimo tego, że publikacje wchodzące w skład ocenianej pracy doktorskiej Pani mgr Pauliny Czechowicz zostały już recenzowane przez niezależnych ekspertów, to jako recenzentka dysertacji mam kilka uwag i pytań, choć te ostatecznie nie wpływają na wysoką wartość merytoryczną przedstawianych wyników:

1. Czy Doktorantka dysponuje chromatogramami i widmami masowymi potwierdzającymi czystość i tożsamość otrzymanych lipopeptydów? Czy reakcja cyklizacji związków C1 i C2 była monitorowana?
2. Dlaczego do badań toksyczności zamiast keratynocytów HaCaT nie wykorzystano komórek śluzówki pochwy VK2-E6/E7?
3. Proszę o komentarz do wniosku nr 4 (str. 23 dysertacji), którego fragment brzmi: „Badane lipopeptydy o strukturze cyklicznej wykazują korzystniejszy efekt hamujący i eradykujący wobec *Candida* niż ich liniowe odpowiedniki, jednak cechują się one znacznie wyższą toksycznością i niską selektywnością.” W świetle danych przedstawionych w publikacji 2. w tabeli 1. jest zgoła odwrotnie. To dla związków liniowych zarejestrowano niższe wartości IC50, co świadczy o ich większej toksyczności w porównaniu do związków cyklicznych. Jeśli zaś chodzi o indeksy selektywności związków cyklicznych to w pracy brakuje informacji do czego Doktorantka je porównuje i na jakiej podstawie ocenia ich selektywność jako niską?
4. Czy Doktorantka badała toksyczność flukonazolu wobec wykorzystanych w badaniach toksyczności komórek eukariotycznych i czy w związku z tym zna jego wartość współczynnika selektywności? Jaki w ocenie Doktorantki może być wpływ kombinacji lipopeptydów z flukonazolem na komórki eukariotyczne?
5. Czy Doktorantka wie jaki jest wpływ badanych lipopeptydów oraz ich kombinacji z flukonazolem na naturalną florę bakteryjną pochwy?
6. W pracy pojawiają się drobne błędy redakcyjne, np.:
 - liczba atomów węgla w kwasie heksadekanowym raz zapisywana jest w indeksie dolnym a raz jako zwykły tekst,
 - łacińskie wyrażenia nie są konsekwentnie zapisywane kursywą,

- na stronie 62 i 64 dysertacji powtarza się błędne odwołanie do ryciny, która w rzeczywistości znajduje się „powyżej” a nie „poniżej”.

Podsumowując stwierdzam, że przedłożona do oceny praca doktorska mgr Pauliny Czechowicz pt.: „Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych na szczepy *Candida spp.*” spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Pauliny Czechowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. M. Skłodowskiej-Curie 3a
80-210 Gdańsk

dr hab. n. farm. Katarzyna Greber


Adiunkt