



Prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska
Zakład Mikrobiologii
Uniwersytet Wrocławski

14.06.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej
pt. „ **Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych na szczepy *Candida* spp.**”
Pani **mgr Pauliny Czechowicz**.

Praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.
Promotor: prof. dr hab. Grażyna Gościńskiak
Promotor pomocniczy: dr n.med. Joanna Nowicka

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi cykl trzech publikacji naukowych o łącznym IF= 18,941 oraz liczbie punktów MEiN 380,00. Dwie prace zostały opublikowane w *International Journal of Molecular Sciences* (jedna praca przeglądowa, jedna oryginalna) oraz jedna w *Pharmaceutics* (praca oryginalna). We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszą autorką. W tekście wszystkich prac zaznaczono udział i wkład Doktorantki w badania. Do rozprawy doktorskiej dołączono oświadczenia współautorów prac, stanowiących cykl, dotyczące opisu udziału zarówno w eksperymentach jak i przygotowaniu manuskryptów. Warto zaznaczyć, iż prace opublikowane zostały w latach 2021-2022, a obecnie praca przeglądowa jest już cytowana 12 razy, natomiast prace oryginalne odpowiednio 4 oraz 1 raz.

Tematyka podjęta przez Doktorantkę w pracy doktorskiej jest ważna i aktualna. Mimo nieustannie pogłębianej przez naukowców wiedzy dotyczącej mykobiomu kobiecej pochwy, wiele pytań i problemów badawczych pozostaje ciągle bez odpowiedzi i stają się one kolejnymi wyzwaniem badawczymi. Takich nowych wyzwań podjęła się Doktorantka w swojej pracy doktorskiej. Biorąc pod uwagę złożony mikrobiologicznie problem interakcji w biofilmach niezwykle istotnym jest szukanie odpowiedzi dotyczących możliwych mechanizmów molekularnych prowadzących do nawracających kandydoz pochwy i sromu (VVC, ang. *Vulvovaginal candidiasis*), a z drugiej strony poszukiwanie skutecznych terapii. W tym ujęciu uważam, iż Doktorantka podjęła się bardzo aktualnej tematyki badawczej.

Układ formalny pracy nie budzi zastrzeżeń i jest bardzo czytelny. W pracy wyróżniono wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu, wstęp, cel i założenia pracy,



materiały i metody, podsumowanie wyników (w którym streszczone zostały publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej), wnioski, bibliografię, streszczenie pracy w języku polskim oraz angielskim, kopie publikacji, oświadczenia współautorów oraz opinię Komisji Bioetycznej.

Głównym celem pracy było określenie przeciwdrobnoustrojowego i przeciwbiofilmowego wpływu ultrakrótkich kationowych lipopeptydów (USCLs) wobec grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* izolowanych z kandydozy pochwy i sromu. W pracy badano także skojarzony wpływ lipopeptydów z flukonazolem na *Candida* spp. Osiągnięcie wyznaczonych celów było możliwe dzięki wyznaczeniu minimalnych stężeń hamujących kationowych lipopeptydów (MIC, ang. *Minimum Inhibitory Concentration*) oraz flukonazolu, minimalnych stężeń eradykujących biofilm (MBEC, ang. *Minimum Biofilm Eradication Concentration*) badanych substancji wobec biofilmu wytworzonego przez *Candida*, ocenę synergistycznego działania lipopeptydów z flukonazolem, zastosowanie modelu tkankowego wykorzystującego epitelium pochwy mysiej oraz zastosowanie technologii BioFlux do badań nad biofilmem *Candida* w kontekście weryfikacji skuteczności działania badanych substancji.

We wstępie do rozprawy doktorskiej Autorka przedstawia wiadomości dotyczące zakażeń ginekologicznych kandydozy pochwy i sromu wskazując na udział w tych zakażeniach grzybów z rodzaju *Candida*. Omawiając to zagadnienie Autorka wskazuje na znaczenie biofilmów w patogenezie oraz peptydów przeciwdrobnoustrojowych w terapii. Celem podjęcia dyskusji z Doktorantką poproszę o udzielenie odpowiedzi na następujące pytania dotyczące teoretycznej części pracy :

- Czy grzyby z rodzaju *Candida* mogą tworzyć biofilmy mieszane? Proszę o wskazanie z jakimi drobnoustrojami oraz czy różnice w składzie biofilmów mieszanych mogą mieć wpływ na przebieg i rokowanie w leczeniu kandydozy VVC?
- Jaki wpływ na przebieg kandydozy ma obecność w środowisku pochwy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*? Czy w kontekście tworzenia biofilmów przez *Candida* obserwuje się wpływ *Lactobacillus* na ten proces?
- Autorka wspomina o obecności na powierzchni komórek *Candida* kwasu sjałowego. Jaką biologiczną rolę pełni kwas sjałowy obecny w osłonach komórkowych *Candida* spp. i jak jego obecność w osłonach może wpływać na przebieg zakażenia powodowanego przez *Candida*?
- Autorka na stronie 9 pracy pisze, iż ultrakrótkie lipopeptydy kationowe są bójcze wobec komórek gospodarza i że stanowi to problem w badaniach nad potencjałem



przeciwdrobnoustrojowym tych związków. Jak należy to rozumieć w kontekście możliwej terapii tymi związkami?

Materiały i Metody

W pracy eksperymentalnej Doktorantka wykorzystwała zarówno klasyczne metody mikrobiologiczne jak i zaawansowane metody dotyczące badań nad biofilmem, w tym model tkankowy *ex vivo* oraz badania biofilmu w warunkach przepływowych z wykorzystaniem BioFlux. W pracy zastosowano także analizy statystyczne. Badania przeprowadzono na 62 szczepach klinicznych *Candida*. Doktorantka planując metodykę badawczą, bardzo trafnie dobrała metody porównawcze, polegające na analizie działania różnych substancji wobec *Candida* zarówno w formie planktonowej jak i biofilmowej. Na szczególne wyróżnienie zasługuje zastosowanie modelu badania biofilmu w warunkach przepływowych z wykorzystaniem BioFlux. Dzięki zastosowaniu tej metody możliwe było obserwowanie zmian w komórkach oraz tworzenie biofilmów w czasie rzeczywistym.

Pytania do tej części pracy:

- W celach pracy Doktorantka pisze, iż jednym z celów jest: "Opracowanie i zastosowanie modelu tkankowego *ex vivo* wykorzystującego fragmenty epitelium pochwy mysiej do weryfikacji skuteczności działania badanych substancji w stężeniach MBEC wyznaczonych *in vitro*". Czy Doktorantka samodzielnie opracowała model badawczy, specjalnie dla badań nad *Candida*, czy zmodyfikowała metodykę cytowaną w literaturze?
- Jakimi metodami identyfikowano wykorzystane w badaniach szczepy kliniczne? - tych informacji nie odnajduję w rozdziale Materiały i Metody.
- Dlaczego przy wyznaczaniu wartości MIC posługiwano się rekomendacjami CLSI, natomiast przy ocenie działania synergistycznego badanych związków kierowano się wytycznymi EUCAST?

Wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej opublikowane zostały w przedstawionym do recenzji cyklu prac.

Artykuł pierwszy jest opracowaniem przeglądowym dotyczącym aktualnego stanu wiedzy o rodzaju *Candida*. Praca przeglądowa jest obszerna, oparta na analizie aktualnej literatury i jest potwierdzeniem bardzo dobrej znajomości tematyki ujętej w niniejszej rozprawie doktorskiej. W pracy umieszczono czytelne schematy. Za niezwykle ciekawą, w niniejszym opracowaniu, uważam hipotezę dotyczącą procesów potencjalnie inicjujących zakażenie VVC. Za cenne w tym opracowaniu, uważam także zwrócenie uwagi



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63

51-148 Wrocław

tel. +48 71 375 63 23

zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

na inny gatunek *Candida*, jakże istotny obecnie z punktu widzenia epidemiologicznego tj. *Candida auris*. Czy zatem, *Candida auris*, biorąc pod uwagę wirulencję, zdolność do biofilmowania i oporność na leki przeciwgrzybicze, może być także zagrożeniem w kontekście rozwoju VVC? We wspomnianej pracy przeglądowej, Doktorantka skupia się na czynnikach wirulencji *Candida*, infekcjach przez nie powodowanych, ze szczególnym uwzględnieniem zakażeń VVC. Opisując proces adhezji w przebiegu VVC, Doktorantka wskazuje na ważną rolę białkowych adhezyn, które mają zdolność do wiązania m.in. białek dopełniacza. Jak ten proces może przebiegać na wspomnianych powierzchniach komórek gospodarza w odniesieniu do białek komplementu, zawartych w surowicy krwi?

Artykuł drugi, dotyczył określenia wpływu czterech USCLs wobec izolowanych z VVC różnych gatunków *Candida*. Zastosowano metodykę badań wobec komórek *Candida* w formie planktonowej oraz biofilmowej. W pracy przedstawiono także wyniki dotyczące wrażliwości szczepów na flukonazol oraz określono interakcje flukonazolu z liopeptydami. Analiza wyników wskazała m.in. różnice we wrażliwości na flukonazol izolatów *C. lusitanae*, jak Doktorantka może wytłumaczyć ten wynik? Cennym wynikiem było wykazanie, iż najkorzystniejsze oddziaływanie wobec *Candida* wykazuje połączenie flukonazolu ze związkami L1. Za ważne uważam analizy dotyczące przewidywanych możliwości terapii z wykorzystaniem terapii skojarzonych, czy peptydów cyklicznych w porównaniu do peptydów liniowych.

Szczególnie chciałabym docenić aspekt naukowy i poznawczy trzeciego artykułu, dotyczącego porównania dwóch modeli badawczych do badań nad biofilmem: wykorzystania tkanek pochwy mysiej oraz modelu badań biofilmu w warunkach mikroprzepływowych technologii BioFlux i porównania do wcześniej otrzymanych wyników badań biofilmu na płytkach polistyrenowych.

We wszystkich pracach stanowiących cykl rozprawy doktorskiej, magister P. Czechowicz wykazała się bardzo dobrym opanowaniem szeregu technik z zakresu mikrobiologii tj. testów MIC, MBEC, badań biofilmu na modelu tkankowym, badań biofilmu w warunkach przepływowych BioFlux, badań z wykorzystaniem mikroskopii oraz analiz statystycznych. Doktorantka przeprowadziła prawidłowe wnioskowania oraz w sposób dojrzały dyskutowała otrzymane wyniki z innymi autorami. Bardzo dobrze przemyślana została także sekwencja zaplanowanych eksperymentów, prowadząca finalnie do uzyskanych wniosków. Doktorantka przedstawia 7 wniosków ze swojej pracy badawczej. Ważnymi wnioskami z pracy są te wskazujące, że liopeptydy wykazują przewagę w zwalczaniu biofilmu *Candida* w porównaniu do powszechnie stosowanego



ZAKŁAD MIKROBIOLOGII

ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

flukonazolu. Za niezwykle ważne wśród wniosków pracy, uważam wskazanie iż występują istotne różnice między wynikami uzyskanymi klasycznymi metodami badania biofilmu *in vitro* oraz metodą badania w warunkach przepływowych i wykorzystania modelu tkankowego, a uzyskane wyniki w tym zakresie wskazują na potrzebę ujednoczenia metod badawczych. Jako Recenzentka, skłaniam się ku opinii, iż uzyskane wyniki mogą służyć jako przykład, na konieczność wykorzystywania kilku metod badawczych dotyczących badań nad biofilmem grzybiczym, aby móc z całą pewnością potwierdzić skuteczność działania wybranych związków wobec struktury biofilmu czy jego eradykacji.

Na koniec recenzji chciałabym zapytać jakie perspektywy badawcze i terapeutyczne widzi Doktorantka dla badanych w pracy związków?

Podsumowując stwierdzam, iż rozprawa doktorska **mgr Pauliny Czechowicz** stanowiąca zbiór trzech powiązanych tematycznie artykułów naukowych, wykonana w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pt. „Wpływ peptydów przeciwdrobnoustrojowych na szczepy *Candida spp*” została dobrze zaplanowana i wykonana. **Mgr Paulina Czechowicz** wykazała się umiejętnościami w zakresie planowania, wykonywania eksperymentów mikrobiologicznych, właściwego wnioskowania oraz szczegółowego dyskusowania otrzymanych wyników, a także wykazała się umiejętnościami przygotowywania naukowych manuskryptów.

Biorąc pod uwagę powyższe, stwierdzam, iż rozprawa doktorska **mgr Pauliny Czechowicz** spełnia warunki określone w art.13 ust.1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz.595, z późn.zm.). Zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z uprzejmą prośbą o dopuszczenie **mgr Pauliny Czechowicz** do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Zakład Mikrobiologii
KIEROWNIK
prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska