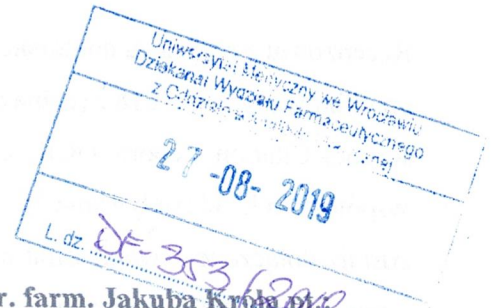


Lublin, 23.07.2019 r.

Katedra i Zakład
Mikrobiologii Farmaceutycznej
z Pracownią Diagnostyki Mikrobiologicznej
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Ul. W. Chodźki 1
20-093 Lublin



**Ocena rozprawy doktorskiej wykonanej przez mgr. farm. Jakuba Kroka pt.
„Aktywność wybranych leków niebędących lekami przeciwgrzybiczymi wobec grzybów
z rodzaju *Candida*”**

Promotor: dr hab. n. med. Marzenna Bartoszewicz, prof. nadzw.,
Promotor pomocniczy: dr n. med. Urszula Nawrot

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy aktywności wybranych leków przeciwbólowych oraz przeciwnowotworowych wobec występujących w formie komórek planktonowych i biofilmu grzybów z rodzaju *Candida* oraz potencjalnej możliwości wykorzystywania tych leków, w tym w formie politerapii, w zwalczaniu zakażeń grzybiczych. Badania wykonane przez Doktoranta wpisują się zatem w aktualną tematykę związaną z poszukiwaniem opcji terapeutycznych skutecznych w leczeniu zakażeń grzybiczych i nietoksycznych dla pacjenta.

Będące modelem badawczym drożdżaki stanowią składnik mikrobioty przewodu pokarmowego, układu moczowo-płciowego, oddechowego i skóry. Gdy spada odporność organizmu, są one częstym czynnikiem etiologicznym grzybic, zarówno powierzchownych jak i układowych, mogą odpowiadać także za przypadki sepsy szpitalnej. Problem pogłębia się, gdy drożdżaki z rodzaju *Candida*, tworzą biofilm. Struktura ta znacznie ułatwia adaptację mikroorganizmów do warunków kolonizowanego miejsca i zwiększa oporność na czynniki przeciwdrobnoustrojowe. Z tego względu efektywne leczenie zakażeń oportunistycznych wymaga poszukiwania nowych substancji przeciwdrobnoustrojowych, w tym przeciwgrzybiczych, i aktualizowania lub opracowywania nowych procedur terapeutycznych, pomocnych w eradykacji mikroorganizmów. Istotną pomocą w takich przypadkach jest wiedza na temat możliwości wykorzystywania różnych substancji i/lub procedur w profilaktyce lub zwalczaniu zakażeń w czasie terapii empirycznej lub celowanej.

Recenzowana rozprawa doktorska została oparta na trzech spójnych tematycznie publikacjach opublikowanych w 2018 r (jedna praca) i w 2019 r. (dwie prace) w jednym, indeksowanym w Journal Citation Reports (JCR) czasopiśmie Journal de Mycologie Medicale, posiadającym współczynnik oddziaływania $IF = 1.606$ (MNiSW – 15 pkt.). Jakkolwiek do rozprawy nie zostały dołączone oświadczenia współautorów na temat ich wkładu w opublikowane prace, co ogranicza możliwość określenia udziału Autora w ich powstawaniu, należy przypuszczać, że są one w posiadaniu Doktoranta. Ponieważ we wszystkich tych publikacjach mgr Jakub Król jest pierwszym autorem, uważam, że przedstawiony cykl publikacji, pomimo opracowania wieloautorskiego, stanowi oryginalny i własny wkład Doktoranta w rozwój naukowy dziedziny, której postępowanie doktorskie dotyczy. Przedstawiony do oceny cykl publikacji stanowi kontynuację zainteresowań Doktoranta, które kształtowały się wcześniej, o czym świadczy opublikowana w 2016 w tym samym składzie autorskim, podobna tematycznie praca przeglądowa pt. „Aktywność przeciwgrzybicza wybranych leków przeciwnowotworowych” (Forum Zakażeń 2016;7:85–91). Bazuje ona na analizie opracowań literaturowych dotyczących aktywności przeciwgrzybiczej leków używanych w chorobach nowotworowych bez i w połączeniu z chemioterapeutykami oraz zawiera informacje na temat potencjalnych mechanizmów ich działania.

Rozprawę doktorską stanowi zwarte opracowanie liczące łącznie 49 stron maszynopisu, składające się z siedmiu części. Są to: streszczenie w języku polskim (str. 4-5) i angielskim (str. 6-7), wstęp (str. 8-10), cel pracy (str. 10), materiał i metody (str. 10-14), wyniki (str. 15-17), dyskusja (str. 17-19), wnioski (str. 19-20) i bibliografia (str. 20-22) zawierająca 25 pozycji. W części 8 Autor umieścił pełne teksty trzech prac, tworzących cykl publikacji opatrzonych wspólnym tytułem.

We Wstępie mgr Jakub Król omówił problemy związane z dostępnością i praktycznym wykorzystaniem substancji o udowodnionej aktywności przeciwgrzybiczej. Zwrócił uwagę, że wśród dostępnych leków przeciwgrzybiczych najczęściej stosowane są związki z grupy triazoli, polieny (amfoterycyna B) oraz echinokandyny (anidulafungina, kaspofungina, mikafungina) i rzadziej - flucytozyna. Stanowi to bardzo ograniczony arsenał dostępnych leków, zwłaszcza w przypadku grzybic układowych. Niemalże znaczenie mają również negatywne oddziaływania tych leków na pacjenta (np. toksyczność amfoterycyny), wpływ na możliwości adaptacyjne drobnoustrojów (rozwijająca się oporność na azole i flucytozynę) i inne ich wady, takie jak np. wysoka cena echinokandyn. Z tego względu ciągle aktualnym problemem jest poszukiwanie nowych możliwości terapeutycznych, w tym nowych leków o aktywności przeciwgrzybiczej,

lub zbadanie pod kątem aktywności przeciwgrzybiczej już zarejestrowanych substancji przeznaczonych do leczenia innych chorób, możliwych do zastosowania w zakażeniach grzybiczych w formie mono- lub politerapii.

Doktorant jasno sformułował cele badawcze, które koncentrowały się na weryfikacji doniesień literaturowych i hipotez związanych z aktywnością przeciwgrzybiczą wybranych leków przeciwbólowych i przeciwnowotworowych w zakresie aktywności przeciwgrzybiczej wobec drożdżaków *Candida* spp., oraz określeniu wpływu obecności intronu w jednostce 25S rDNA na podatność *C. albicans* na bleomycynę i flucytozynę, a także na inne wybrane leki przeciwnowotworowe.

W oparciu o przedstawione w publikacjach dane, uzyskane z użyciem aktualnie obowiązujących metod i w oparciu o obowiązujące rekomendacje, mgr Jakub Król ocenił wpływ wybranych leków przeciwbólowych i przeciwnowotworowych na grzyby z rodzaju *Candida*. Zbadane zostały również interakcje tych leków z tradycyjnymi lekami przeciwgrzybiczymi. Analizie został poddany także wpływ obecności w materiale genetycznym *C. albicans* intronu 25S rDNA na podatność patogenu na leki przeciwnowotworowe. Bardzo cennym elementem podejmowanych badań była ocena zdolności eradykacji szczepów opornych oraz dojrzałego biofilmu *Candida* spp. z użyciem wybranych leków, np. 5-fluorouracylu czy z flucytozyny, w tym w połączeniach z kwasem folinowym, który zwiększał ich aktywność bez stymulowania cytotoksyczności wobec komórek eukariotycznych. Otwartym zagadnieniem pozostaje oddziaływanie tych leków na linie pochodzące z komórek ludzkich, ponieważ badania tego typu były wykonywane przez Doktoranta tylko na linii komórkowej fibroblastów mysich.

Wśród badanych leków przeciwbólowych Doktorant zaobserwował zależną od szczepu *Candida* spp. aktywność przeciwgrzybiczą ibuprofenu, który działał synergistycznie, indyferencyjnie lub antagonistycznie z używanymi w badaniach lekami przeciwgrzybiczymi, zwłaszcza z grupy triazoli. W przeciwieństwie do leków przeciwbólowych, aktywność przeciwgrzybiczą wykazywały wszystkie badane leki przeciwnowotworowe, zwłaszcza 5-fluorouracyl. Mgr Król zauważył również, że działanie przeciwgrzybicze 5-fluorouracylu było znacząco wyższe wobec szczepów grzybów posiadających intron 25S rDNA. Do cennych efektów pracy badawczej można zaliczyć także informację, że od lat używana w onkologii kombinacja 5-fluorouracylu i kwasu foliowego charakteryzuje się wysoką aktywnością w stosunku do drożdżaków, w tym wobec szczepów opornych lub z obniżoną wrażliwością na leki przeciwgrzybicze. Rezultaty te mają znaczenie praktyczne, szczególnie w odniesieniu do

procedur terapeutycznych stosowanych u osób z obniżoną odpornością, zwłaszcza u pacjentów nowotworowych.

Z obowiązku Recenzenta pragnę zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia i uchybienia, których nie ustrzegł się Doktorant w czasie przygotowywania dysertacji doktorskiej. W większości dotyczą one uściślenia niektórych użytych określeń lub są natury stylistyczno-korektorskiej, i nie pomniejszają merytorycznej oceny pracy. Przykładowo:

- w opracowaniu Autor nie wskazał na fakt opublikowania prac w indeksowanym czasopiśmie posiadającym współczynnik oddziaływania Impact Factor
- w odniesieniu do *Candida* spp. Autor często używa termin „drożdże”. W tym przypadku bardziej właściwe jest określanie „drożdżaki” lub „grzyby drożdżopodobne”. Termin „drożdże” przynależy jest grzybom o znaczeniu gospodarczym i przemysłowym, do których należą tzw. drożdże szlachetne, czyli odmiany i szczepy hodowlane z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* (drożdże piwowskie, winiarskie, gorzelnicze i piekarniane), oraz niektóre gatunki grzybów niedoskonałych
- na stronie 4-5 (Streszczenie) Doktorant użył określenia: „Synergistyczne działanie ibuprofenu było obserwowane z każdym z użytych w doświadczeniu leków przeciwgrzybiczych (flukonazolu, worikonazolu, itraconazolu, posakonazolu oraz izawukonazolu)”, a powinno być „Synergistyczne działanie ibuprofenu było obserwowane z każdym z użytych w doświadczeniu leków przeciwgrzybiczych (flukonazolem, worikonazolem, itraconazolem, posakonazolem oraz izawukonazolem)”. Ponadto, w opisie synergistycznego lub antagonistycznego działania ibuprofenu w połączeniu z lekami przeciwgrzybiczymi sugeruję zwrócić uwagę, że jest to cecha zależna od szczepu. Umieszczenie w jednym akapicie w powiązaniu z tym lekiem obydwu typów oddziaływań na *Candida* spp. bez dodatkowego wyjaśnienia jest niezrozumiałe
- standardem w czasie pisania różnych opracowań jest wyjaśnienie używanych skrótów po ich pierwszym użyciu (np. MIC, 5-FU, 5-FC, FOL), chyba że są one powszechnie znane i używane (np. DNA)
- definicja biofilmu (s. 8) powinna zostać doprecyzowana, określenie „wspólna” struktura jest mało zrozumiałe
- sugeruję nanieść poprawki w zdaniu na str. 8 „Pozostałe leki, nawet i osiągną w komórce drożdży stężenie fungostatyczne wobec komórek planktonowych, nie wywołują żadnej reakcji na ...”, gdzie powinny być użyte moim zdaniem terminy: „drożdżaków”, „fungostatyczne” i „nie wywierają żadnego wpływu”

- s. 9, ostatni akapit, chyba bardziej słuszne byłoby użycie terminu „terapii przeciwgrzybiczej” zamiast „terapii grzybiczej”
- proszę o zwrócenie uwagi na Rys. 1 i określenie stężeń flukonazolu w opisie mikro płytki 96-dółkowej. Jeżeli jest to metoda podwójnych rozcieńczeń, prawdopodobnie do opisu stężeń w dółkach od 8 do 11 wkradł się błąd,
- s. 14, wydaje się, że w opisie testu cytotoksyczności bardziej słuszne byłoby określenie „po inkubacji i utworzeniu pojedynczej warstwy komórek” w miejsce „linii komórek” oraz „przygotowane w podłożu DMEM” w miejsce „w roztworze DMEM”
- s. 20 (Wnioski), należy rozważyć użycie bardziej precyzyjnych określeń we wniosku „Wzrost aktywności przeciwgrzybiczej 5-FC nie wpływa na szkodliwość leku w stosunku do komórek ssaków”, gdzie bardziej słusznym byłoby określenie „...na cytotoksyczność ...” ze względu na brak wiedzy na temat innych, nie badanych przez Autora, działań szkodliwych.

Podsumowując pragnę podkreślić, że recenzowana rozprawa doktorska wnosi nowe, istotne dane do nauki i w sposób znaczący pogłębia wiedzę na temat możliwości zwalczania zakażeń grzybiczych u osób z obniżoną odpornością, w tym u pacjentów onkologicznych. Jest to ważne z punktu widzenia praktycznego, ponieważ może znaleźć również zastosowanie w opracowaniu procedur terapeutycznych opartych na aktualnej wiedzy i leczeniu pacjentów z zakażeniami wywołwanymi przez *Candida* spp.

Stwierdzam zatem, że oparta na cyklu publikacji rozprawa doktorska mgr. Jakuba Króla pod tytułem „Aktywność wybranych leków niebędących lekami przeciwgrzybiczymi wobec grzybów z rodzaju *Candida*” odpowiada warunkom określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 15 września 2017 r., poz. 1789 z późn. zm.). Wobec powyższego zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie pana mgr. farm. Jakuba Króla do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

02525 Dr hab. n. farm. Urszula Kosikowska
Urszula Kosikowska
DIAGNOSTA LABORATORYJNY
Specjalista mikrobiolog