

Wrocław 02.08.2019 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej p.t. Aktywność wybranych leków niebędących lekami przeciwgrzybiczymi wobec grzybów z rodzaju Candida.**

**Pracę wykonał mgr farm. Jakub Król pod kierownictwem dr hab. n. med. Marzeny Bartoszewicz, prof. nadzw. Promotor pomocniczy dr n. med. Urszula Nawrot**

Rozprawa doktorska przedstawiona przez mgr. Jakuba Króla oparta jest na trzech publikacjach stanowiących logiczną całość badań nad testowaniem działania przeciwgrzybiczego wybranych leków przeciwbólowych i przeciwnowotworowych. Publikacje te ukazały się: jedna w 2018 roku i dwie w 2019 roku w Journal de Mycologie Medicale, czasopiśmie indeksowanym i uzyskały w sumie ponad cztery IF (współczynnik oddziaływania). Doktorant jest pierwszym autorem w publikacjach, które stanowią oryginalny, nowatorski wkład w problem leczenia grzybic. Przedstawione w pracy doktorskiej mgr J.Króla badania ich wyniki i analiza mają jeden wspólny mianownik poszukiwanie wśród leków przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych preparatów o aktywności przeciwgrzybiczej w stosunku do drożdżopodobnych grzybów z rodzaju Candida. Uzasadnieniem wyboru tematu jest fakt skąpego arsenału leków do leczenia grzybic układowych, toksyczność wielu z nich, a także rozwijająca się oporność Candida na azole i flucytozynę. Na całość badań zawartych w rozprawie doktorskiej składa się kilka tematów: a/testowanie wybranych leków w kierunku aktywności przeciwgrzybiczej

b/badanie interakcji preparatów testowanych ze stosowanymi w leczeniu grzybic lekami

c/określanie aktywności działających na grzyby testowanych leków wobec szczepów Candida zawierających intron 25 S rDNA

d/ działanie kwasu folinowego jako stymulatora aktywności przeciwgrzybiczej

e/ aktywność 5-fluorouracylu i 5- flucytozyny w połączeniu z kwasem folinowym w stosunku do komórek z hodowli planktonicznej i komórek z biofilmu.

Struktura pracy jest zgodna z ogólnie przyjętymi zasadami. Składa się z ośmiu rozdziałów. Ostatni z nich to pełne teksty trzech publikacji na których opiera się praca.

**We wstępie** autor wymienia w skrócie występowanie i przyczyny zakażeń grzybami z grupy drożdżopodobnych (*Candida*), opisuje wrażliwość tej grupy patogenów na leki przeciwgrzybicze z uwzględnieniem lekooporności związanej ze zdolnością do tworzenia biofilmu. Treść **wstępu** wprowadza w tematykę pracy i uzasadnia potrzebę przeprowadzenia przedstawionych badań. Jest dobrym wprowadzeniem, choć informacje są podane są w dużym skrócie.

W następnym, drugim rozdziale „**Cel pracy**” autor jasno i szczegółowo przedstawił plan zamierzonych badań, a więc oceny aktywności przeciwgrzybiczej wybranych substancji stosowanych w leczeniu jako leki przeciwbólowe i przeciwnowotworowe. Cele szczegółowe to:

- a/ interakcja badanych leków z lekami przeciwgrzybiczymi
- b/ określenie wpływu kwasu folinowego na aktywność przeciwgrzybiczą i działanie cytotoksyczne 5-fluorouracylu oraz flucytozyny
- c/ wpływ obecności intronu w jednostce 25 S rDNA *C. albicans* na podatność na leki przeciwnowotworowe
- d/ stymulacja aktywności badanych leków przez kwas folinowy
- e/ badanie zdolności eradykacji biofilmu przez najbardziej aktywny preparat wśród badanych leków.

Metody zastosowane dla realizacji zamierzeń opisane zostały w rozdziale „**Materiał i Metody**”. Opisana została prawidłowo dobrana kolekcja zastosowanych w badaniach szczepów *Candida* oraz przedstawione podstawy wyboru leków których aktywność przeciwgrzybicza będzie badana. Wrażliwość na leki oceniana była metodą oznaczania minimalnych stężeń hamujących zgodnie z zaleceniami EUCAST, dla badania jednoczesnego działania dwu środków stosowano test szachownicy i wyliczono Fractional Inhibitory Concentration Index – index FIC wyznaczający typ interakcji. Testy cytotoksyczności wykonywane były na linii komórkowej mysich fibroblastów. Eradykację biofilmu tworzonego przez grzyby *Candida* określano barwieniem fioletem krystalicznym biomasy biofilmu i oznaczaniem absorbancji tego barwnika oraz równoległe testem żywotności komórek biofilmu, testem



rezazurynowym. Wartości parametrów statystycznych wyliczone zostały w programie Statistica 13 firmy StatSoft.

W rozdziale „**Wyniki**” rozprawy doktorskiej uzyskane najważniejsze rezultaty badań przedstawione zostały w skrótowej formie, wybrane z trzech artykułów, których pełne teksty zawarte są w publikacjach. Wyniki przedstawione są w formie opisu tekstowego, tabel i wykresów. Temat pierwszy obejmuje badania nad skojarzonym działaniem leków przeciwbólowych z lekami przeciwgrzybiczymi z grupy triazoli. Wykazana została aktywność przeciwgrzybicza ibuprofenu i jego synergistyczne działanie z triazolami, metamizolu w stosunku do trzech szczepów i meloksykamu w stosunku do dwu szczepów Candida. Temat artykułu drugiego to wrażliwość szczepów Candida zawierających intron 25 S r DNA na preparaty przeciwnowotworowe i flucytozynę. Badania wykazały, że najwyższą aktywność w stosunku do szczepów z intronem miała bleomycyna i 5-fluorouracyl. Mniej aktywne były: mitomycyna i daktynomycyna-Aktywność pozostałych testowanych leków nie zależała od obecności intronu w DNA szczepów Candida. Zależność od obecności intronu autor wykazał dla stymulującego wpływ na aktywność grzybobójczą a kojarzonego z 5-flucytozyną kwasu folinowego, zwiększył on czterokrotnie aktywność 5-FU w stosunku do szczepów bezintronowych. W trzeciej prezentowanej pracy autor przedstawił wyniki badań aktywności przeciwgrzybiczej 5-fluorouracylu i 5-fluorocytozyny w skojarzeniu tych preparatów z kwasem folinowym. Kwas folinowy podwyższył znacząco działanie flucytozyny w stosunku do C, tropicalis, fabiani i glabrata. Połączenie 5-fluorouracylu i flucytozyny z kwasem folinowym wykazały nie tylko silniejsze działanie grzybobójcze ale też eradykację dojrzałego biofilmu. Ważne, że preparaty kojarzone nie działały toksycznie na komórki eukariotyczne co wykazały testy na liniach komórkowych fibroblastów mysich.

„**Dyskusja**” - Doktorant poddał dyskusji wszystkie uzyskane i opisane wyniki z trzech opublikowanych artykułów. Uznał że tylko jeden z badanych preparatów przeciwzapalnych/przeciwbólowych - ibuprofen mógłby być wykorzystany w leczeniu zakażeń drożdżopodobnymi grzybami, jednak po szczegółowej analizie jego interakcji z azolami wskazał że interakcje te mogą zależeć od różnych mechanizmów oporności szczepów Candida na leki przeciwgrzybicze i mogą być dla leczenia korzystne i niekorzystne. Aktywniejsze właściwości przeciwgrzybicze wykazały testowane leki przeciwnowotworowe, choć 5-fluorouracyl działał w zależności od obecności intronu u szczepów Candida. Istotnym dla praktycznego aspektu przeprowadzonych badań jest



udokumentowanie korzystnego wpływu kwasu folinowego na przeciwgrzybiczą aktywność 5-flucytozyny i 5-fluorouracylu. Autor udowodnił w doświadczeniach in vitro na biofilmie wytworzonym przez komórki Candida działanie preparatów 5-FU i 5-FC skojarzonych z kwasem folinowym eradykację dojrzałego biofilmu utworzonego przez szczepy i brak toksyczności takich preparatów w stosunku do komórek eukariotycznych co wykazał na liniach komórkowych fibroblastów mysich.

Przedstawiona do recenzji praca jest prawidłowo i starannie zredagowana, podzielona na osiem rozdziałów, w ósmym umieszczone są trzy artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, ponadto streszczenie w języku polskim i angielskim. Piśmiennictwo w liczbie 25 pozycji aktualne i dobrze dobrane. Bibliografia umieszczona w każdym z artykułów tłumaczy małą liczbę pozycji cytowanych w samej pracy, pozwoliło to na uniknięcie powtórzeń. Treść wstępu odpowiada tematycznie części doświadczalnej i jest dobrym wprowadzeniem do tematyki badawczej choć zbyt skąpym. Metody badań opisane wyczerpująco i jasno. Wyniki badań streszczone w pracy i szeroko opisane w publikacjach na których praca się opiera dokumentowane rycinami (4) i starannie graficznie wykonanymi 14-stoma tabelami są przedstawione jasno i przekonująco. Dyskusję nad wynikami autor przeprowadził opierając się na aktualnym piśmiennictwie, logicznie wykorzystanym i trafnie cytowanym. Praca jest zakończona dobrze uzasadnionymi wnioskami.

### **Uwagi krytyczne**

- biofilm jako ważny czynnik chorobotwórczości powinien być szerzej opisany we wprowadzeniu, był bowiem przedmiotem badań w części doświadczalnej moim zdaniem brak także we wprowadzeniu opisu podstawowych mechanizmów działania preparatów przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych wybranych do badań w części doświadczalnej pracy.
- wniosek 3 i 5 wymaga innego sformułowania, aby wyeliminować powtórzenia
- nie jest dobrym określeniem „sepsa szpitalna”. Jest to sepsa u chorych hospitalizowanych
- nazwa drożdżaki w stosunku do szczepów rodzaju Candida jest niepoprawna

Podsumowując uważam pracę za wartościową z celnie zaadresowanym aktualnym problemem badawczym, prezentującą solidnie wykonane badania realizujące podjęty temat. Wyniki mają zarówno duże znaczenie praktyczne, jak i znaczenie poznawcze. Przedstawiona rozprawa doktorska świadczy o dużym

zaangażowaniu autora w problemy badawcze, umiejętności posługiwania się metodami badawczymi i praktycznym ich wykorzystaniem. Na podkreślenie zasługują wyniki badań z kwasem folinowym rokujące wymierne znaczenie praktyczne, szczegółowo i dobrze przeprowadzona dyskusja, łatwo czytelna, staranna redakcja. Badania, na których opiera się praca są opublikowane w dobrym piśmie, uzyskały IF ponad cztery i nie wymagają dodatkowego komentarza.

Rozprawa doktorska mgr. Jakuba Króla odpowiada warunkom określonym w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki - Dz.U z 15 września 2017r poz.1789 Zwracam się więc do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego im Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie mgr. farm J. Króla do dalszych etapów przewodu doktorskiego

Prof. dr hab. Anna Przondo Mordarska

