



Prof. dr hab. n. biol. Barbara Kot
barbara.kot@uph.edu.pl

Siedlce, 25. 04. 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Marty Dąbrowskiej pt. „Analiza lekooporności i wrażliwości na wybrane związki pochodzenia naturalnego drożdżaków z rodzaju *Candida*”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma postać 4 spójnych tematycznie, wieloautorskich prac naukowych opublikowanych w latach 2018-2023 w 3 czasopismach: *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonica*, Sectio C (2018), *Chemistry & Biodiversity* (2021) i *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* (2023). Łączna wartość wskaźników bibliometrycznych tych prac to $IF=4,348$ i 188 pkt. zgodnie z listą czasopism punktowanych ujętych w Załączniku do komunikatu Ministra Edukacji i Nauki z dnia 9 lutego 2021 r. Dwie z tych prac to oryginalne artykuły naukowe, pozostałe to prace przeglądowe (*Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin – Polonica*). Lekarka Marta Dąbrowska jest pierwszym autorem wszystkich prac, co wskazuje na wiodącą rolę Doktorantki w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, analizie i dyskusji wyników oraz w przygotowaniu prac do druku. Promotor pracy doktorskiej dr hab. n. med. Monika Sienkiewicz, prof. uczelni, jako autor korespondencyjny, nadzorowała proces wydawniczy.

Przedmiotem pracy były drożdżaki z rodzaju *Candida* pochodzące z przypadków chorobowych, tj. z zakażeń pochwy oraz skóry pacjentów, leczonych z powodu kandydozy. Obserwowany wzrost oporności drobnoustrojów na dostępne środki przeciwdrobnoustrojowe, w tym drożdżaków z rodzaju *Candida*, wywołały konieczność poszukiwania środków alternatywnych dla leków przeciwdrobnoustrojowych lub je wspomagających, które będą skutecznie eliminowały zakażenia wywoływane przez ten rodzaj drobnoustrojów. Podjęcie powyższego tematu badań przez Doktorantkę wpisuje się w aktualny problem, jakim jest narastająca oporność drobnoustrojów na dostępne środki przeciwdrobnoustrojowe.

Drożdżaki z rodzaju *Candida* występują powszechnie na całym świecie i są najczęstszą przyczyną grzybic. Wywołują choroby zwane kandydozami, które są zazwyczaj zakażeniami endogennymi, ponieważ drobnoustroje te występują w obrębie naturalnej mikroflory jamy ustnej,



jelita grubego, skóry i pochwy. *C. albicans* należy do drożdżaków najczęściej izolowanych z materiałów klinicznych, chociaż w ostatnich latach odnotowuje się wzrost częstości występowania innych gatunków z tego rodzaju, co w konsekwencji zwiększa ich udział jako czynników etiologicznych grzybic. Grzyby z rodzaju *Candida* mogą powodować kandydozy zlokalizowane: skóry, paznokci, błon śluzowych jamy ustnej, przewodu pokarmowego, pochwy i układu moczowego oraz grzybice inwazyjne, np.: płuc, opon mózgowo-rdzeniowych, trzustki, kręgosłupa czy szpiku kostnego. Mogą też być przyczyną kandydozy uogólnionej (kandydemii), co może prowadzić do rozwoju sepsy. Wraz ze wzrostem możliwości terapeutycznych obejmujących leczenie immunosupresyjne, intensywne leczenie przeciwnowotworowe, leczenie antybiotykami

o szerokim spektrum działania oraz zwiększaniem się liczby pacjentów z różnymi chorobami układowymi upośledzającymi odporność komórkową (np. cukrzyca), rośnie częstość grzybic inwazyjnych.

W leczeniu kandydoz stosuje się cztery grupy leków, w tym polieny, echinokandyny oraz chemioterapeutyki (azole i pochodne fluoropirymidyny). W terapii kandydoz powierzchniowych stosuje się najczęściej leczenie miejscowe, w niektórych przypadkach konieczne jest podawanie zarówno preparatów o działaniu miejscowym, jak i ogólnym. W terapii kandydoz inwazyjnych konieczne jest stosowanie leków o działaniu ogólnym. Trudności w efektywnej terapii zakażeń wywoływanych przez rodzaj *Candida* wynikają ze zróżnicowanej morfologii tych grzybów; przydatny terapeutycznie preparat musi wykazywać skuteczność wobec wszystkich form drożdżopodobnych (blastospory, pseudostrzępki, strzępki). Dodatkowym utrudnieniem w terapii jest zjawisko narastającej oporności nabytej. Wyniki badań wskazują, że kilka mechanizmów oporności może funkcjonować u jednego izolatu, co oznacza, że są izolaty wielolekooporne, wykazujące oporność np. na pochodne azolowe, amfoterycynę B czy echinokandyny. Kolejnym utrudnieniem w leczeniu kandydoz jest zróżnicowana wrażliwość poszczególnych gatunków z rodzaju *Candida*, co wskazuje na konieczność identyfikacji gatunkowej, a nie tylko rodzajowej.

W związku z trudnościami w uzyskaniu pozytywnych efektów terapii zakażeń powodowanych przez rodzaj *Candida*, Doktorantka postawiła sobie za cel ustalenie, czy izolaty *Candida* są podatne na działanie wybranych związków pochodzenia roślinnego oraz czy te związki mogą współdziałać z lekami przeciwgrzybiczymi, co mogłoby obniżyć dawkę leku

o8-110 Siedlce, ul. B. Prusa 14, 25 643 12 01, e-mail: biologia@uph.edu.pl

i w ten sposób chronić pacjenta przed jego niepożądanym, toksycznym działaniem; jednocześnie stosowanie leków przeciwdrobnoustrojowych w niskich dawkach wpisuje się w strategię ochrony dostępnych leków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

W dwóch pracach przeglądowych, które powstały w oparciu o najnowsze artykuły naukowe i stanowią dobre wprowadzenie do podjętych badań, Doktorantka omówiła zakażenia inwazyjne oraz zakażenia błony śluzowej powodowane przez rodzaj *Candida*, podając metody identyfikacji tych drożdżaków oraz schematy leczenia poszczególnych rodzajów infekcji. Dwie kolejne publikacje, będące oryginalnymi pracami badawczymi, dotyczą oceny aktywności przeciwgrzybiczej wybranych fitozwiązków. Leczenie infekcji metabolitami roślinnymi jest praktyką odwieczną, a aktualny powrót do stosowania związków pochodzenia roślinnego jest wynikiem oporności patogenów na leki przeciwdrobnoustrojowe, które są stosowane nadmiernie lub niewłaściwie. Wykazane przez wielu badaczy niskie poziomy oporności mikroorganizmów na metabolity roślinne mogą być związane z faktem, że substancje te nie atakują jednego konkretnego celu, ale mają wiele sposobów działania przeciwdrobnoustrojowego.

W pierwszej pracy oryginalnej “Inhibitory effect of eugenol and *trans*-anethole alone and in combination with antifungal medicines on *Candida albicans* clinical isolates” przedmiotem badań było 5 izolatów *C. albicans*, które pochodziły z nawracającej kandydozy pochwy oraz szczep referencyjny *C. albicans* ATCC 10231. Badania aktywności eugenolu oraz *trans*-anetolu, poprzez ocenę MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*) i MFC (ang. *minimal fungicidal concentration*) oraz ustalenie wartości stosunku MFC/MIC wykazały, że eugenol działał grzybobójczo wobec badanych izolatów, natomiast *trans*-anetol, w zależności od izolatu, wykazywał działanie grzybobójcze lub hamował wzrost tych izolatów. Doktorantka ustaliła także minimalne stężenia hamujące wzrost oraz minimalne stężenia powodujące śmierć komórek *C. albicans* wybranych leków przeciwgrzybiczych, takich jak mikonazol, ekonazol, klotrimazol i nystatyna, wykazując, że wszystkie leki działały grzybobójczo. W kolejnym etapie badań Doktorantka, stosując metodę szachownicy, ustaliła cząstkowe stężenia hamujące (FIC, ang. *fractional inhibitory concentration*) fitozwiązków i leków, co było podstawą do określenia oddziaływania pomiędzy fitozwiązkiem a zastosowanym lekiem. Wykazała synergistyczne działanie eugenolu i mikonazolu wobec klinicznych izolatów *C. albicans*, również eugenol z ekonazolem wykazywały synergistyczne lub addytywne działanie w stosunku do tych izolatów.



Przeprowadzone badanie było niezmiernie pracowite, ale bardzo zasadne, ponieważ połączenie kilku substancji aktywnych o różnym mechanizmie działania na komórki drobnoustrojów może podnosić ogólną aktywność biologiczną mieszaniny, a jednocześnie aktywność przeciwdrobnoustrojowa uzyskiwana jest przy znacząco obniżonych stężeniach poszczególnych składników tej mieszaniny. Jedną z możliwości przezwyciężenia lekooporności to synergiczne kombinacje środków przeciwdrobnoustrojowych, ponieważ stosowanie wysokich dawek leków, przedłużona terapia i konieczność podania dawki przypominającej może generować nie tylko problemy zdrowotne u pacjentów, ale prowadzić do narastania oporności drobnoustrojów.

Wykazując konsekwencję w prowadzonych badaniach, Doktorantka w drugiej pracy oryginalnej „Improved efficacy of eugenol and *trans*-anethole in combination with octenidine dihydrochloride against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*” dokonała oceny aktywności przeciwgrzybiczej wybranych składników olejków eterycznych (tymol, mentol, eugenol, karwakrol, *trans*-anetol) w stosunku do referencyjnych szczepów *C. albicans* ATCC 1023 i *C. parapsilosis* ATCC 22019 oraz 2 szczepów: *C. albicans* i *C. parapsilosis* wyizolowanych z ran. Aktywność wybranych fitozwiązków została także oceniona w mieszaninie z dichlorowodorkiem oktenidyny, który stosowany jest w procesie leczenia ran. Szczepy użyte w badaniach zostały wcześniej ocenione pod względem wrażliwości na rekomendowane leki o aktywności przeciwgrzybiczej. Wykazano, że były one odporne na flukonazol oraz worykonazol. Doktorantka stwierdziła, że *trans*-anetol i eugenol w mieszaninie z dichlorowodorkiem oktenidyny wykazują, odpowiednio, synergistyczne i addytywne działanie. Należy podkreślić, że Doktorantka w swoich badaniach wykazała się wnikliwością i podjęła próbę oceny mechanizmu działania użytych związków na komórki drożdży. Wykazała, że kombinacje substancji czynnych: *trans*-anetol - dichlorowodorek oktenidyny i eugenol - dichlorowodorek oktenidyny zwiększają przepuszczalność błony komórkowej *C. albicans* i *C. parapsilosis*, co powoduje jej destabilizację i w konsekwencji może prowadzić do śmierci komórki. Ponadto, oceniła szybkość eliminacji komórek drożdży w obecności badanych substancji, wykazując, że kombinacja eugenol - dichlorowodorek oktenidyny charakteryzowała się najlepszą skutecznością przeciwgrzybiczą wobec wszystkich badanych szczepów, gdyż już w ciągu pierwszej godziny ekspozycji wzrost komórek w obecności tych związków został całkowicie zahamowany.


Przedstawione do oceny prace są spójne tematycznie i stanowią dobrze przemyślaną całość, mają nie tylko wartość poznawczą, ale także wskazują na możliwość praktycznego wykorzystania fitozwiązków o potwierdzonej przez Doktorantkę wysokiej aktywności przeciwgrzybiczej jako substancji wzmagających aktywność leków przeciwgrzybiczych. W sytuacji narastającej oporności na leki przeciwdrobnoustrojowe, podjęcie badań mających na celu poszukiwanie związków alternatywnych w stosunku do klasycznych leków jest cenne i wpisuje się w badania prowadzące do rozwiązania globalnego problemu, jakim jest lekooporność drobnoustrojów. Mieszanki środków przeciwdrobnoustrojowych mogą zapobiegać lub opóźnić pojawianie się *in vivo* lekoopornych subpopulacji mikroorganizmów chorobotwórczych. Dodatkowo, stosowanie niektórych leków przeciwdrobnoustrojowych jest ograniczone ze względu na ich toksyczne działanie w skutecznych dawkach. Dlatego też kombinacje leków z innymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi, m.in. fitozwiązkami mogą stanowić skuteczną opcję leczenia przy użyciu niższych dawek oraz mogą zapewnić efekt terapeutyczny o szerokim spektrum.

Badania zostały przeprowadzone w oparciu o wiarygodne metody badawcze, które zostały dobrze opisane w przedstawionych pracach. Forma pracy doktorskiej lek. Marty Dąbrowskiej w postaci 4 prac opublikowanych w renomowanych czasopismach naukowych, a więc już zrecenzowanych prac naukowych, nie pozostawia recenzentowi wiele miejsca na uwagi krytyczne. Jednak chciałabym się odnieść do zakresu przeprowadzonych badań, w których, w mojej opinii, należałoby dodatkowo ocenić zdolność badanych izolatów z rodzaju *Candida* do tworzenia biofilmu oraz ocenić wrażliwość komórek będących w biofilmie na badane fitozwiązki, szczególnie, że Autorzy w dyskusji w jednej z przedstawionej do oceny prac podkreślają trudności w leczeniu zakażeń powodowanych przez *Candida*, wynikające z tworzenia biofilmu przez te grzyby na powierzchni tkanek. Ponadto, forma autoreferatu, w którym brakuje rozdziału opisującego uzyskane wyniki nie pozwoliła Doktorantce na ich omówienie w sposób syntetyczny. Kompleksowy sposób prezentowania wyników jest istotny, ponieważ pozwala ocenić orientację osoby ubiegającej się o stopień naukowy doktora w badanej problematyce oraz jej dojrzałość naukową.



Wniosek końcowy

Reasumując, uważam, że rozprawa doktorska lek. Marty Dąbrowskiej, w której wykazano, że fitozwiązki mogą być brane pod uwagę jako czynniki przeciwdrobnoustrojowe w terapii infekcji skóry i błon śluzowych powodowanych przez rodzaj *Candida* oraz jako czynniki wspomagające aktywność leków przeciwgrzybiczych, stanowi oryginalne i wartościowe rozwiązanie problemu naukowego. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pokazuje, że lek. Marta Dąbrowska posiada ogólną wiedzę teoretyczną w dyscyplinie nauki medycznej i umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) i art. 179 ust. 1 Ustawy prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 3 lipca 2018 (Dz.U. Z 2018 r. poz. 1669). Zwracam się więc do Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z wnioskiem o dopuszczenie lek. Marty Dąbrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


Prof. dr hab. n. biol. Barbara Kot