

Dr hab. Anna Krasowska  
Zakład Biotransformacji  
Wydział Biotechnologii  
ul. F. Joliot-Curie 14a  
50-383 Wrocław

Wrocław, 24.06.2017

## Recenzja

### Rozprawy doktorskiej mgr Moniki Caban

pt.: „Przewidywanie przynależności gatunkowej grzybów patogennych i fenotypu lekooporności oraz badanie mechanizmów jego modulacji w gatunkach *Candida albicans* i *non-albicans*”

wykonanej pod kierunkiem prof. dr. hab. Grzegorza Bartosza

i dr Agnieszki Grzelak

w Zakładzie Biofizyki Błon,

Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska

Katedry Biofizyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego

Rozprawa doktorska pani Moniki Caban dotyczy przynależności gatunkowej grzybów patogennych, typowania lekooporności oraz jej modulacji. Autorka pracy skupiła się w większości badań na gatunkach *Candida albicans* oraz innych gatunkach *Candida*, określanych mianem *non-albicans*. W pracy opisane są też doświadczenia na sześciu gatunkach grzybów dermatofitycznych z rodzaju *Microsporium*, *Trichophyton* i *Chrysosporium*. W pierwszej części pracy Autorka wykazała przydatność metody HRM (analizy topnienia produktów o wysokiej rozdzielczości) w typowaniu gatunkowym na podstawie sekwencji ITS2 grzybów patogennych jak również wskazała na możliwość zastosowania tej metody do predykcji oporności *Candida albicans* na leki. Metoda HRM zwalidowana przez Autorkę pracy może służyć do szybkiej selekcji próbek przeznaczonych do sekwencjonowania podczas diagnostyki infekcji drożdżowej. W kolejnej części pracy Autorka podjęła się próby zastosowania cytometrycznego badania akumulacji diocjanu fluoresceiny w przewidywaniu lekooporności grzybów, a także wykazała, że leki azolowe w dawkach subtoksycznych wywołują stres oksydacyjny w komórkach *Candida* i, że odpowiedź tych grzybów na stres oksydacyjny różni się między gatunkami i szczepami jednego gatunku.

Otrzymane przez Autorkę wyniki mogą przysłużyć się do szybszej diagnostyki grzybów patogennych oraz w bardziej celnym doborze leków przeciwgrzybiczych co jest istotne, gdyż obserwuje się narastanie występowania zakażeń grzybiczych, łącznie ze wzrostem lekooporności.

### **Ocena poprawności struktury pracy**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska liczy 139 stron i ma układ typowy dla prac eksperymentalnych. Rozprawa rozpoczyna się wykazem stosowanych skrótów, po nich następuje *Wstęp* liczący 20 stron, który wprowadza czytelnika w zakres badań opisanych w rozprawie. Po *Wstępie* Doktorantka zamieściła *Cele pracy*, opis *Materiałów i Metod* (15 stron), *Wyniki* (41 stron), *Dyskusję* (26 stron), *Wnioski*, *Streszczenia* (po polsku i po angielsku) oraz *Bibliografię* (230 pozycji). Praca ilustrowana jest 11 rysunkami, 7 wykresami i 13 tabelami.

### **Ocena merytoryczna rozprawy**

We **Wstępie teoretycznym** omówione zostały zagadnienia konieczne do zrozumienia celów rozprawy oraz logiki wykonywanych badań. W przystępny i komunikatywny sposób opisano znane do tej pory metody identyfikacji gatunkowej grzybów *Candida* i dermatofitycznych, zagadnienia związane z lekoopornością, klasyczne i molekularne metody określania profilu oporności grzybów *Candida* oraz potencjał antyoksydacyjny *C. albicans* i *C. glabrata*. Lektura Wstępu dokumentuje dużą wiedzę Autorki w przedmiocie rozprawy.

**Cele pracy** zostały przedstawione w 4 punktach, są one jasno sprecyzowane i zgodne z tematem rozprawy, choć zabrakło w nich wzmianki o badaniach na grzybach dermatofitycznych, które są opisane w pracy.

**Materiały i metody** zostały opisane w dwóch podrozdziałach. W **Materiałach** został opisany jedynie materiał biologiczny użyty w badaniach, autorka nie zamieściła spisu odczynników, leków przeciwgrzybiczych czy sekwencji starterów. Wymienione są one dopiero w poszczególnych metodach, co trochę utrudnia otrzymanie klarownego pojęcia o zastosowanych materiałach.

W metodzie opisującej badanie aktywności transporterowej białek przez błonowych metodą cytometryczną, użyto diocetan fluoresceiny, który wybrano na podstawie wyników uzyskanych przez Kołaczekowskiego i współpracowników, i opisanych w czasopiśmie *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Należy jednak wziąć pod uwagę to, że zespół Kołaczekowskiego pracował na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* z wklonowanymi genami kodującymi transportery Cdr1 i Cdr2 z *Candida albicans*. Jak później wykazano nie jest to dobry model badawczy, gdyż drożdże piekarskie znacznie różnią się od drożdżaków patogennych choćby w procesach uzyskiwania energii, co ma wpływ na pracę transporterów ABC. W Tabeli 4, która jest pokazana w wyżej wymienionej metodzie brakuje informacji na jakich konkretnie szczepach zostały przebadane leki użyte potem do badania transportu przez błonę. Są wymienione tylko gatunki *Candida*. W tej samej metodzie niektóre stężenia IC50 leków zostały wybrane na

podstawie danych literaturowych. Czy w literaturze zastosowano dokładnie te same szczepy, których potem używała Autorka pracy?

Recenzentka jest również ciekawa dlaczego aktywność przeciwgrzybową leków oceniano dwiema metodami? Autorka stwierdziła, że wyniki uzyskane w obu metodach tylko w niewielkim stopniu się pokrywały, a do dalszych testów wybrała wyniki uzyskane metodą mikrorozcieńczeń lub z danych literaturowych.

Rozdział **Wyniki** to bardzo dobrze oceniane przez mnie doświadczenia jak i poprawne obserwacje i wnioski. Autorka udowodniła, że metodą HRM, uzyskując i analizując znormalizowane krzywe topnienia i piki krzywych topnienia można określić przynależność gatunkową grzybów w sposób tani i szybki. Ponadto metodą HRM Autorka zbadała polimorfizmy w genie ERG11 i wykazała istnienie stałych wariantów genu mogących świadczyć o oporności lub wrażliwości danego szczepu na antymykotyki. Tą część pracy uważam za bardzo cenną, mogącą się przyczynić do rozwoju danej dziedziny nauki.

Moje wątpliwości wzbudza natomiast słuszność zastosowania metody do pomiaru aktywności transporterów ABC u *Candida*, gdyż najwyraźniej metoda ta nie zadziałała tak jak się spodziewano. Werapamil, który jak Autorka pracy twierdzi, jest uznanym w literaturze inhibitorem transporterów Cdr1 i Cdr2 nie zadziałał, podobnie jak to było przedstawione w cytowanej w pracy publikacji Maesaki i współpracowników. Rozsądne by było w takiej sytuacji zastosować inny inhibitor, np. enniatynę A, żeby sprawdzić prawidłowość zastosowanej metody.

**Dyskusja** jest omówieniem znaczenia uzyskanych wyników. Autorka umiejętnie konfrontuje uzyskane wyniki z rezultatami przedstawionymi w literaturze naukowej. Rozdział ten jest podsumowaniem całości prac doświadczalnych i Autorka odwołuje się do efektów doświadczeń opisanych w rozdziale Wyniki, uzupełnia je o analizę i komentarze.

Zwracam jednak uwagę, że w pracy Szczepaniak i współpracowników opisano metodę pomiaru aktywności transporterów ABC w czasie rzeczywistym, w której używano fluorymetru, a nie (jak Doktorantka napisała) mikroskopu konfokalnego.

Ponadto wniosek jaki można przeczytać na stronie 104 dysertacji: „oporność badanych na leki azolowe szczepów opiera się prawdopodobnie na innych mechanizmach niż aktywność transporterów” jest wnioskiem nieprawdziwym, gdyż wielokrotnie już udowodniono i opisano w literaturze, że jednym z mechanizmów oporności na leki azolowe jest wypompowywanie ich z komórek grzyba.

Czytając rozdział **Wnioski** można się zorientować, że odpowiadają one na wyznaczone cele i znajdują pokrycie w przeprowadzonych eksperymentach i uzyskanych wynikach.

**Bibliografia** zawiera pozycje przedstawiające zagadnienia związane z tematem pracy. Recenzent nie ma większych zastrzeżeń związanych z doбором cytowanych prac. Jednak w spisie literatury zdarzyły się pewne niekonsekwencje:

- w pozycjach 2, 16, 26 są wymienione całe imiona autorów, w odróżnieniu od reszty cytowanych pozycji, gdzie stosowane są inicjały imion.
- w pozycji 33 pierwsza litera imienia jest przed nazwiskiem również inaczej niż jest to w pozostałych pracach
- w pozycji 139 brak jest autorów
- w pozycji 149 tytuł publikacji jest przytoczony dużymi literami.

### **Ocena strony edytorskiej rozprawy**

Rozprawa została napisana poprawnym językiem polskim. Nielicznie występują błędy, które potocznie nazywa się literówkami. Na przykład na str. 42 w tytule podrozdziału powinno być „homogenatów” jest „homogonetaów”, Na stronie 26 jest mowa o genie czynnika transkrypcyjnego. Mimo cytowania odpowiedniej literatury, warto byłoby w tekście napisać jakiego czynnika transkrypcyjnego. Rysunek 7 jest cytowany na stronie 53, podczas gdy sam rysunek znajduje się na stronie 52, znacznie ułatwia czytanie jeśli rysunki, wykresy i tabele są w tekście zaznaczone przed nimi. Na stronie 74 białka Cdr1 i Cdr2 są napisane dużymi literami, a tak się opisuje u drożdży geny a nie białka.

### **Podsumowanie recenzji**

Rozprawa doktorska mgr Moniki Caban pt.: *„Przewidywanie przynależności gatunkowej grzybów patogennych i fenotypu lekooporności oraz badanie mechanizmów jego modulacji w gatunkach Candida albicans i non-albicans”* stanowi oryginalne rozwiązanie problemów naukowych. Doktorantka w rozprawie wykazała się znajomością swojej tematyki badawczej, umiejętnością interpretacji i wyciągania wniosków z uzyskanych rezultatów. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę otwierają dalsze perspektywy badawcze i aplikacyjne, a przedłożona praca doktorska potwierdza umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Przedstawione przeze mnie uwagi i wątpliwości mają charakter polemiczny i nie umniejszają wartości naukowej rozprawy. Moja recenzja jest jak najbardziej pozytywna.

**W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi ustawowe stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Moniki Caban do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Dr hab. Anna Krasowska