



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Prof. dr hab. Krystyna Michalak
Katedra i Zakład Biofizyki
Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Caban „Przewidywanie przynależności gatunkowej grzybów patogennych i fenotypu lekooporności oraz badanie mechanizmów jego modulacji w gatunkach *Candida albicans* i *non albicans*”

Rozprawa doktorska dotyczy niezwykle ważnego zagadnienia lekooporności patogennych grzybów powodujących często zakażenia ogólnoustrojowe u ludzi, przede wszystkim drożdży z gatunku *Candida*. Rozwój lekooporności wśród patogennych mikroorganizmów (grzyby, bakterie) stanowi nadal bardzo poważny problem kliniczny. Ogólnoustrojowe infekcje grzybicze prowadzą niekiedy do śmierci pacjentów, w szczególności z osłabioną odpornością, np. po przeszczepach, chorych na AIDS, a także osób po długotrwałej antybiotykoterapii lub po terapii lekami cytostatycznymi stosowanymi w onkologii. Obserwowany w praktyce klinicznej wzrost lekooporności drożdży gatunku *Candida* można wiązać ze znacznym wzrostem częstości stosowania leków azolowych w terapii infekcji grzybiczych w ostatnich latach.

Niezwykle ważne są zatem metody szybkiej i precyzyjnej identyfikacji gatunkowej drożdży *Candida*, a także grzybów dermatoficznych. Znane i powszechnie stosowane w praktyce klinicznej są zazwyczaj czaso- lub kosztochłonne, a często też nieprecyzyjne, pomimo, że wykorzystuje się przy tym zazwyczaj metody standaryzowane. Również opracowanie nowych lepszych metod oceny lekooporności tych patogenów jest wysoce pożądane, gdyż pozwoliłoby zwiększyć skuteczność terapii stosowanych w leczeniu zakażeń grzybiczych, w szczególności tych najgroźniejszych czyli ogólnoustrojowych.

W opinii recenzenta, w związku z istniejącymi nadal problemami dotyczącymi szybkiej identyfikacji gatunkowej grzybów obecnych w materiale biologicznym pobranym od pacjentów, a także z koniecznością lepszego poznania molekularnych podstaw procesów prowadzących do oporności wielolekowej drożdży gatunków *Candida albicans* i *non albicans* oraz sposobów jej modulacji, temat pracy doktorskiej przedstawionej do recenzji należy uznać za bardzo ciekawy i ważny, zarówno z naukowego punktu widzenia, jak i dla praktyki klinicznej.

Praca doktorska wykonana została w Zakładzie Biofizyki Błon Katedry Biofizyki Molekularnej na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem Pana Profesora Grzegorza Bartosza. Zespół Pana Profesora od wielu lat zajmuje się problematyką oporności wielolekowej, a także rolą wolnych rodników i reaktywnych form tlenu w różnych procesach komórkowych. Należy pokreślić wiodącą rolę tego zespołu w ramach tej tematyki w kraju. Promotorem pomocniczym w przewodzie doktorskim była dr Agnieszka Grzelak, a praca powstała w ramach projektu „Rola transporterów oporności wielolekowej w farmakokinetyce i toksykologii - testy *In vitro* w praktyce farmaceutycznej i klinicznej” (Program POIG).

Cel badań został jasno sformułowany i dotyczył kilku ważnych problemów związanych z identyfikacją gatunkową oraz oznaczaniem lekooporności szczepów drożdży gatunku *Candida albicans* i *non-albicans* pochodzenia klinicznego. W celach porównawczych analizowano też pod tym kątem próbki pobrane od zdrowych dawców i korzystano ze szczepów pochodzących z odpowiednich kolekcji - krajowych i zagranicznych. W niektórych eksperymentach uwzględniano również szczepy grzybów dermatofitycznych.

Jednym z najważniejszych celów badań była ocena możliwości zastosowania w celu identyfikacji gatunkowej szczepów pochodzenia klinicznego analizy HRM (high resolution melting) czyli analizy wysokiej rozdzielczości przebiegu krzywych topnienia produktu reakcji PCR, w tym przypadku fragmentu ITS2 rybosomalnego DNA (rDNA). Kolejnym zadaniem było wykorzystanie tej samej metody do analizy produktu reakcji PCR, amplifikującej gen ERG11 drożdży *Candida albicans* w celu oznaczenia oporności szczepów na leki z grupy azoli. Doktorantka podjęła się też zbadania czy test oparty na zastosowaniu znacznika fluorescencyjnego, dioctanu fluoresceiny, jako substratu transporterów wielolekowych drożdży może być zastosowany do oceny oporności szczepów *Candida (albicans i non albicans)* na leki przeciwgrzybiczne. Kolejnym celem pracy było również określenie niektórych mechanizmów molekularnych zaangażowanych w odpowiedź na stres oksydacyjny wywołany w komórkach drożdży *Candida* przez leki azolowe.

Rozprawa doktorska napisana jest zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami i posiada układ typowy dla prac doktorskich. Liczy 139 stron, zawiera 11 rysunków i 7 wykresów oraz 13

tabel, a bibliografia obejmuje 230 pozycji. Z ostatnich pięciu lat pochodzi 24% cytowanych pozycji literatury.

W teoretycznej części rozprawy Doktorantka wyczerpująco omówiła stosowane dotychczas metody identyfikacji gatunkowej drożdży *Candida* i grzybów dermatofitycznych, w tym także zastosowaną przy realizacji pracy doktorskiej metodę HRM. Omówiony też został wyczerpująco problem lekooporności oraz metody oznaczania profilu lekooporności drożdży gatunku *Candida*. Jak wiadomo za rozwój lekooporności mogą u drożdży odpowiadać różne mechanizmy molekularne, różne też są metody jej oznaczania. Autorka rozprawy przedstawiła m.in. metodę oceny lekooporności w oparciu o zmiany w sekwencji genu ERG11, a także na podstawie obserwacji zmian w aktywności transporterów wielolekowych z nadrodziny białek ABC. Aktywny transport leków przeciwgrzybiczych przez błonę w kierunku odkomórkowym redukuje ich akumulację w komórkach, tym samym powodując występowanie oporności na leki. W testach transportowych wykorzystuje się niekiedy znaczniki fluorescencyjne będące substratami transporterów wielolekowych (jak np. dioctan fluoresceiny). W ostatnim rozdziale części teoretycznej rozprawy autorka przedstawiła zagadnienia związane z odpowiedzią komórek drożdży na stres oksydacyjny, prowadzącą do uruchomienia reakcji chroniącej komórki przed działaniem wolnych rodników i reaktywnych form tlenu. Reakcja taka może występować pod wpływem zastosowania leków azolowych nawet w stężeniach sub-toksycznych.

Powyżej wymienione zagadnienia autorka rozprawy przedstawiła na ogół bardzo wyczerpująco, korzystając z bogatego piśmiennictwa. Ze sposobu ich omówienia można wnosić, że posiada ona dużą wiedzę na temat tych złożonych problemów.

W swoich badaniach doktorantka zastosowała bardzo wiele różnorodnych metod eksperymentalnych, które zostały szczegółowo przedstawione w rozdziale **Metody**. Należały do nich. metody hodowli drożdży, sposoby oznaczania lekooporności szczepów, m.in. metodą mikrorozcieńczeń, cytometrii przepływowej oraz z zastosowaniem metod biologii molekularnej, takich jak analiza HRM produktu genu ERG11. Omówiona też została analiza HRM fragmentu ITS2 genomu drożdży zastosowana w pracy do identyfikacji gatunkowej. Autorka przedstawiła też metody biochemiczne zastosowane w badaniach procesów molekularnych odpowiedzialnych za reakcję komórek drożdży na stres oksydacyjny. Wiązało się to m.in. z oznaczaniem aktywności enzymatycznej takich białek, jak: S-transferaza glutationowa, katalaza, reduktaza glutationowa. Zwrócić należy uwagę na bardzo dużą różnorodność zastosowanych w badaniach technik eksperymentalnych.

Do szczególnie ważnych wyników należy zaliczyć identyfikację różnic w sekwencji fragmentu ITS2 rybosomalnego DNA, której dokonano metodą HRM w oparciu o analizę

krzywych topnienia produktów reakcji PCR. Na tej podstawie można było, dysponując szczepami referencyjnymi, dokonać identyfikacji 10 szczepów klinicznych pod kątem ich przynależności gatunkowej. Co ważne, wyniki otrzymane tą metodą potwierdzono za pomocą sekwencjonowania fragmentu ITS2 badanych szczepów. Analizę HRM doktorantka zastosowała następnie do identyfikacji gatunkowej drożdży *Candida* wśród 38 szczepów wyizolowanych ze śliny zdrowych ochotników. Utworzone zostało drzewo filogenetyczne na podstawie oznaczenia sekwencji nukleotydowej fragmentu ITS2 wszystkich przebadanych szczepów. Należy podkreślić, że analiza BLAST potwierdziła 100% prawidłowość oznaczenia gatunku *Candida albicans* przy zastosowaniu metody HRM. Uzyskane wyniki mają potencjalnie duże znaczenie dla diagnostyki klinicznej. Zastosowana w pracy analiza HRM krzywych topnienia wydaje się pod tym kątem bardzo obiecującą techniką.

Kolejne badania Doktorantki dotyczyły wykorzystania metody HRM do oceny lekooporności szczepów gatunku *Candida* na leki azolowe. Badaniu poddano materiał genetyczny pochodzący ze szczepów referencyjnych oraz szczepów wyizolowanych z dróg rodnych pacjentek. Zastosowana metoda wykazała różnice występujące w sekwencji genu ERG11, co potwierdzono metodą sekwencjonowania. Przeprowadzone też zostało sekwencjonowanie całego genu ERG11 dla szczepów wyizolowanych ze śliny zdrowych ochotników, zidentyfikowano 21 mutacji punktowych, przy czym dwie z nich korelowały z opornością na leki przeciwgrzybicze. Jak doktorantka jednak przyznaje, zastosowane w pracy badanie genu ERG11 przy pomocy analizy HRM nie może być jedyną podstawą oceny oporności drożdży *C. albicans* na leki azolowe. Przeprowadzone badania stanowią jednak dobrą bazę do rozwoju tej metody i jej klinicznych zastosowań.

Doktorantka podjęła też próbę oceny aktywności transportowej białek oporności wielolekowej za pomocą cytometrii przepływowej, przy zastosowaniu znacznika fluorescencyjnego, dioctanu fluoresceiny. Znacznik ten jest substratem transporterów wielolekowych CDR1 i CDR2 drożdży gatunku *Candida (albicans, glabrata, krusei i tropicalis)*. Oznaczanie akumulacji znacznika w komórkach drożdży poprzedziła wstępna 2 godz. inkubacja badanych drożdży z lekami o działaniu przeciwgrzybiczym. Należy zgodzić się z wnioskiem Doktorantki, że w wyniki tych doświadczeń nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. W większości przypadków, różnica w natężeniu fluorescencji po wstępnej inkubacji z lekami i bez takiej inkubacji nie była istotna statystycznie. Ponadto werapamil - inhibitor transporterów CDR1 i CDR2 nie wpływał na natężenie fluorescencji badanych komórek drożdży.

W tym miejscu należy zwrócić uwagę, że w przeprowadzonym eksperymencie zastosowane zostały dwa substraty transporterów wielolekowych - znacznik fluorescencyjny, dioctan fluoresceiny (FDA) i lek przeciwgrzybiczy. Co prawda nie podawano ich jednocześnie,

gdyż najpierw zastosowano inkubację z lekiem, a następnie pobierano komórki do badań cytometrycznych, jednak obecność w błonie dwóch substratów może skutkować pojawieniem się złożonych zależności związanych np. z ich powinowactwem do białka i występowaniem zjawiska konkurencyjności. Poza tym, przy ocenie aktywności transporterów wielolekowych należałoby obserwować przyrost natężenia fluorescencji znacznika FDA w czasie. Nachylenie wykresu przedstawiającego zmianę natężenia emisji w funkcji czasu zależy od szybkości akumulacji znacznika w komórce, a więc pozwala ocenić aktywność transporterów wielolekowych (dla których znacznik jest substratem). Wyższa aktywność tych transporterów oznacza w tym przypadku słabszy przyrost natężenia fluorescencji w czasie (znacznik emituje fluorescencję dopiero po akumulacji w cytoplazmie). Zastosowanie znanych inhibitorów, o zróżnicowanym wpływie na aktywność poszczególnych transporterów, mogłoby przynieść informacje na temat ekspresji tych białek w błonie komórek badanych szczepów drożdży. Możliwość zastosowania znacznika FDA do oceny lekooporności drożdży wymaga dalszych bardziej szczegółowych badań. Należy wspomnieć, że w pracy, na którą autorka się powołuje (Kołaczkowski i wsp., 2009) wprowadzono ten test do oznaczenia aktywności określonych transporterów, posługując się szczepami z delecją genów kodujących inne, poza badanym, transportery. W badaniach nad inhibicją transportu tego fluorescencyjnego substratu zastosowano w tej pracy m.in. pochodne fenotiazyny. Byłoby bardzo cenne, gdyby doktorantka jaśniej przedstawiła swój wybór procedury zastosowanej w badaniach nad aktywnością transporterów wielolekowych drożdży *Candida* metodą cytometryczną z wykorzystaniem znacznika FDA.

W ramach badań nad odpowiedzią na stres oksydacyjny indukowany w komórkach drożdży *Candida* po zastosowaniu leków azolowych w stężeniach subtoksycznych wykonane zostały testy metodą cytometrii przy użyciu dwóch znaczników fluorescencyjnych - DHR123 (dihydroxyrodamina - do oznaczenia zmian w ilości nadtlenu wodoru) oraz DHE (dihydroxyetydyna - do oceny zmian w stężeniu anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach. Określony został również wpływ leków azolowych na enzymy związane z odpowiedzią komórkową na stres oksydacyjny: S-transferazę glutationową, katalazę i reduktazę glutationową. Wykazano zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej drożdży *C. albicans* i *C. glabrata* na stres oksydacyjny, a odpowiedź ta zależała od zastosowanego leku azolowego. Mechanizmy molekularne związane z tymi procesami nie są dobrze poznane i zagadnienie to wymaga dalszych badań. Tematykę tych badań należy uznać za ważną i bardzo ciekawą.

Autorka rozprawy przeprowadziła też bardzo wnikliwą **dyskusję** uzyskanych wyników w oparciu o najnowsze doniesienia literaturowe na temat molekularnych podstaw lekooporności drożdży z gatunku *Candida* oraz postępów w zakresie nowych sposobów identyfikacji gatunkowej.

Z obowiązku recenzenta muszę przedstawić pewne uwagi, z których większość dotyczy redakcyjnej strony pracy.

Akapit poświęcony wykorzystaniu fluorescencyjnego znacznika jako substratu transporterów wielolekowych i zastosowaniu metody cytometrii przepływowej w badaniach lekooporności jest napisany zbyt lakonicznie. M.in. brak jest podkreślenia faktu, że emisja fluorescencji znacznika FDA następuje się dopiero w wyniku akumulacji znacznika w cytoplazmie. Pojawia się tam też błędne z punktu widzenia fizycznego określenie „wartość fluorescencji”. Fluorescencja to zjawisko fizyczne, które definiują takie parametry, jak: nateżenie emisji, wydajność kwantowa, czy długość fali odpowiadająca maksimum emisji λ_{\max} . Określenie „wartość fluorescencji” nie ma sensu fizycznego i nie może być stosowane.

Na str. 17. można przeczytać, że w jednym z testów następowało nałożenie paska nasączonego gradientem stężeń. Gradient stężenia to z definicji liniowa zmiana stężenia w funkcji odległości x czyli $\Delta c/\Delta x$ (a dokładniej pochodna dc/dx). Ponieważ nie można paska „nasączyć gradientem”, prawidłowa konstrukcja zdania brzmi: nałożenie paska nasączonego lekiem o rosnącym stężeniu (np. rosnącym liniowo wzdłuż określonego kierunku, tu - wzdłuż paska).

Na str. 18. Doktorantka wspomina o „większym potencjale przewidywania oporności” (zamiast prościej - dokładniejszych metodach oznaczania oporności), a w innym miejscu na tej samej stronie o „odporności błony komórek na stres” (jak można się domyślać chodzi o stres oksydacyjny). Na str. 38. autorka używa określenia „topienie produktów reakcji”, ale już na kolejnej stronie jest to „topnienie” produktów. Określenie nazwy metody powinno być ujednoczone. Na str. 42. jest mowa o „zawieszaniu osadu”, zamiast o sporządzaniu zawiesiny.

Z niejasnej dla recenzenta przyczyny w pierwszej połowie części doświadczalnej rozprawy zamieszczone wykresy czy schematy określane są jako *rysunki*, w drugiej połowie tej samej części rozprawy kolejne prezentacje graficzne wyników podpisane są jako *wykresy* i są od nowa ponumerowane. Sprawia to wrażenie jakby sklejenia ze sobą dwóch opracowań. Wszystkie rysunki i tabele powinny być ponumerowane w całej rozprawie doktorskiej według kolejności ich zamieszczania.

Sposób rozmieszczenia przynajmniej niektórych rysunków w części doświadczalnej rozprawy nie jest optymalny. Wykresy ilustrujące wyniki serii eksperymentów nad konkretnym zjawiskiem (np. nad opornością na leki oznaczaną metodą cytometrii czy nad reakcją komórek na stres oksydacyjny) rozmieszczone są na dwóch kolejnych stronach. Z powodzeniem rysunki nieco mniejszych rozmiarów zmieściłyby się na jednej stronie bez obniżenia ich czytelności. Natomiast zastosowany układ rysunków, z zamieszczonym podpisem dla całej serii na końcu pod ostatnim rysunkiem, powoduje konieczność czytania pracy „wstecz” od kolejnej strony do strony

poprzedzającej. Utrudnia to porównywanie zaobserwowanych zmian i ocenę prezentowanych wyników.

Szczególnie w rozdziale *Dyskusja*, ale również w wielu innych miejscach rozprawy, zwracają uwagę sformułowania wynikające z zapożyczeń z języka angielskiego, które mogą być używane w slangu laboratoryjnym, natomiast nie powinny pojawić się w rozprawie naukowej (przykładowo stale stosowane określenie „traktowanie komórek” np. np. inhibitorem, flukonazolem i innymi czynnikami). Inny przykład to „używanie dedykowanych do tego celu próbek”. W rozprawie można też znaleźć sporo błędów literowych (nawet w tytule podrozdziału - str. 44.)

Powyższe uwagi dotyczą głównie redakcyjnej i edytorskiej strony rozprawy i nie rzutują na moją końcową bardzo wysoką ocenę wielokierunkowych badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej oraz uzyskanych wyników. Doktorantka musiała opanować szeroki zakres technik eksperymentalnych, począwszy od metod hodowli komórkowych i prostych testów związanych z obserwacją wzrostu drożdży, przez metodę cytometrii i biochemiczne metody oznaczania aktywności enzymatycznej, aż po trudne metody biologii molekularnej z wykorzystaniem techniki PCR.

Cele pracy były bardzo ambitne, a badania trudne i skomplikowane w realizacji. Chociaż nie wszystkie eksperymenty przyniosły oczekiwane rezultaty, należy uznać, że postawione cele badawcze zostały zrealizowane. Na podkreślenie zasługuje wielość wątków podjętych w badaniach nad metodami identyfikacji gatunkowej i opornością wielolekową drożdży gatunku *Candida*. Wyniki badań nad identyfikacją gatunkową drożdży metodą HRM mogą stanowić podstawę opracowania nowych, szybszych i dokładniejszych testów do tych oznaczeń o możliwych zastosowaniach w praktyce klinicznej. Ważnym osiągnięciem jest też uzyskanie nowych danych dotyczących mutacji w genie ERG11 mających związek z opornością wielolekową drożdży. Wyniki tych badań stanowią ważny wkład w poznanie molekularnych podstaw oporności patogenów grzybiczych na leki azolowe.

Reasumując, pracę doktorską Pani mgr Moniki Caban oceniam bardzo wysoko. Stwierdzam też, że przedstawiona mi do oceny rozprawa spełnia kryteria i warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w obowiązującej Ustawie o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym i przedkładam Radzie Wydziału wnioski o dopuszczenie mgr Moniki Caban do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wrocław, 5.08.2017

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA BIOFIZYKI
ZAKŁAD BIOFIZYKI
kierownik

prof. dr hab. Krystyna Michalak