



## SPOŁECZNA AKADEMIA NAUK ŁÓDŹ

**Prof. dr hab. Adam Jaworski**.....Łódź, 15. 05. 2015

Emerytowany profesor zw.

Zakład Genetyki Drobnoustrojów,

Uniwersytet Łódzki

obecnie

Prof zw., Społeczna Akademia Nauk w Łodzi

90-113 Łódź, ul. Sienkiewicza 9

tel: 42-664-6666

tel. komórkowy: 607-356-577

e-mail: [adam@biol.uni.lodz.pl](mailto:adam@biol.uni.lodz.pl)

**Ocena pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Taraszkiewicz zatytułowanej:  
„Analiza mechanizmu inaktywacji *Candida albicans*  
z zastosowaniem pochodnych imidazoakrydyny jako związków fotouczulających”**

### 1. Formalna ocena pracy.

Decyzję Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku - o powierzeniu mi obowiązków recenzenta kolejnej pracy doktorskiej odbieram jako szczególne wyróżnienie. Co więcej, o idei. możliwości stosowania terapii fotodynamicznej w leczeniu nowotworowych oraz infekcyjnych chorób człowieka - usłyszałem po raz pierwszy, wówczas z dużym niedowierzaniem, w drugiej połowie lat 90-tych ubiegłego wieku, w czasie dyskusji naukowej, która prowadziłem w Uniwersytecie Gdańskim z ś.p. Prof. dr hab. Jagodą Podhajską i prof. dr hab. Alfredą Graczykową z Wojskowej Akademii Technicznej w Warszawie. Upłynęło wiele lat od tamtego czasu. Stąd, dzisiaj z ogromną naukową przyjemnością, bardzo uważnie przestudiowałem wyniki pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Taraszkiewicz, zrealizowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Bielawskiego, studenta, doktoranta i wychowanka prof. dr hab. Jagody Podhajskiej.

Praca doktorska mgr Aleksandry Taraszkiewicz została zrealizowana na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Bielawskiego jako Promotora oraz dr Joanny Nakoniecznej, wypełniającej w tym przewodzie doktorskim funkcje promotora pomocniczego. Praca ma postać monografii (110 stron wydruku komputerowego), opracowanej zgodnie z formalnymi wymogami przyjętymi dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych. Pracę otwiera zwięzłe 2- stronicowe *Streszczenie*. Treści zawarte w części teoretycznej pracy (*Wstęp*) dobrze wprowadzają czytelnika w temat pracy i nakreślone cele badawcze. Wszystkie użyte materiały, metody oraz techniki badawcze „wprzęgnięte” w realizacji celów pracy zostały wystarczająco dokładnie opisane w rozdziale *Materiały i Metody*. W obszernym rozdziale *Wyniki* (42 strony) Doktorantka bardzo skrupulatnie, krok po kroku, w umiejętny sposób przedstawiła wszystkie uzyskane rezultaty, dokumentując kolejne wyniki w postaci zdjęć i starannie opracowanych

13 tabel oraz 23 rycin, a ich podsumowaniem jest 6 wniosków końcowych. Interesująco napisana *Dyskusja* i bogato cytowane pozycje literatury światowej (151 pozycji) zamykają tę bardzo starannie opracowaną pracę doktorską. Dodam w tym miejscu, że cała praca została napisana ładną polszczyzną i poprawnym językiem naukowym.

W dostarczonych mi materiałach odnalazłem, obok monografii doktorskiej mgr Aleksandry Taraszkiewicz, kopie dwóch prac doświadczalnych opublikowanych w latach 2013 i 2015 w specjalistycznych czasopismach naukowych: *Appl. and Environmental Microbiology* oraz *Appl. Microbial. Biotechnol.*, w których jest, odpowiednio, pierwszym i czwartym współautorem. Z zainteresowaniem przeczytałem także załączony do materiałów zespołowy artykuł przeglądowy opublikowany w czasopiśmie *BioMed Research Internatinal*, (2013), w którym jest również pierwszym autorem. Mgr Aleksandra Taraszkiewicz jest także pierwszym autorem zespołowej pracy doświadczalnej przesłanej do czasopisma PLOS ONE; pracy która zgodnie z załączonym pismem Edytora Michael'a Hamblin'a, po małych korektach (*Minor Revision*), zostanie z pewnością przyjęta do druku w 2015 roku. Ponadto, Doktorantka jest współautorem patentu (*Kompozycja farmaceutyczna oraz dezynfekująca zawierająca pochodną imidiazookrydyny jako środek fotouczulający oraz ich zastosowanie*), przyznanego przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej w grudniu 2014 roku. Komentowane wyżej 3 prace doświadczalne oraz patent są ściśle związane z tematem, celami i wynikami pracy doktorskiej mgr Aleksandry Taraszkiewicz, zaś artykuł przeglądowy jest świetnym podsumowaniem światowej wiedzy na temat nowych strategii terapeutycznych, w tym terapii fotodynamicznej, i jej zastosowania przeciwko nowotworom oraz zakażeniom bakteryjnym i grzybiczym, w tym szczególnie związanych z tworzeniem groźnych biofilmów. Komentowane prace oraz patent mogłyby być z powodzeniem wykorzystane przez mgr Aleksandrę Taraszkiewicz do przygotowania pracy doktorskiej w formie monotematycznego zbioru z autorskim podsumowaniem/autoreferatem, bez konieczności opracowywania obszernej monografii doktorskiej. Podzielać jednak decyzje wielu Rad Naukowych Uczelni oraz Instytutów PAN o konieczności opracowywania przez Doktorantów monografii doktorskich, niezależnie od zgromadzonego dorobku publikacyjnego, bowiem nabywanie umiejętności pisania prac naukowych w języku polskim i angielskim są bardzo ważną częścią Ich edukacji.

*Na koniec formalnej oceny monografii doktorskiej mgr Aleksandr Taraszkiewicz chciałbym wyrazić uznanie dla prof. dr hab. Krzysztofa Bielawskiego oraz Jego Zespołu naukowego. Upowszechnione w międzynarodowym obiegu naukowym wyniki Ich badań stanowią istotny wkład do wiedzy na temat możliwości stosowania techniki fotochemicznej w terapii infekcyjnych chorób człowieka; terapii, która w obecnych czasach przestała być traktowana jako idea „since fiction”, ale staje się z czasem wspomagającą metodą leczenia schorzeń człowieka, w tym zakażeń grzybiczych i bakteryjnych.*

### **Ocena wyników.**

Jako recenzent pracy doktorskiej mgr Aleksandry Taraszkiewicz mam bardzo ułatwione zadanie, bowiem większość wyników opisanych w monografii doktorskiej została upowszechniona w międzynarodowym obiegu naukowym w postaci wcześniej wymienionych, zespołowych prac doświadczalnych, opublikowanych w latach 2013-2015 w czasopismach z listy JCR i artykułu przeglądowego w międzynarodowym czasopiśmie naukowym, a także przyznanego patentu przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej. Stąd, jako recenzent nie mam nic szczególnie ważnego do dodania na temat wyników opisanych w monografii doktorskiej. Pierwszymi recenzentami byli przecież uznani specjaliści w tej dziedzinie wiedzy, jakimi są promotorzy ocenianej pracy doktorskiej, a równocześnie współautorzy wyżej wymienionych publikacji: prof. dr hab. Krzysztof

Bielawski, prof. dr. hab Tadeusz Sarna, jak również inni współautorzy tych prac (dr Mariusz Grinholc, dr Joanna Nakonieczna, dr Grzegorz Szewczyk). Co więcej, wartość naukowa tych wyników została doceniona przez edytorów i wymagających recenzentów specjalistycznych czasopism, w których zostały opublikowane: *Appl. Microbial Biotechnol*, *Appl. and Environmental Microbiology*, a ostatnio są pozytywnie procesowane przez edytorów i recenzentów „rankingowego” czasopisma PLOS ONE. Po drugie, nie jestem specjalistą chemikiem, nie jestem też biofizykiem, a stąd nie mogę merytorycznie oceniać wyników tych badań, które dotyczą właściwości chemicznych, fotochemicznych i spektralnych imidazoakrydyny i pochodnych - jako proponowanych, dobrych fotouczulaczy. **W moim rozumieniu, to właśnie te badania, były jednym z najważniejszych celów pracy doktorskiej Pani mgr Aleksandry Taraszkiewicz.**

Stąd, mogę skomentować jedynie niektóre wyniki, a zwłaszcza te, które dotyczą antybakteryjnej i antygrzybiczej aktywności oraz mechanizmu działania fotochemicznej metody na komórki klinicznych szczepów drożdży *Candida albicans* oraz wybranych gatunków klinicznych, chorobotwórczych szczepów bakterii. Po pierwsze, bardzo wysoko oceniam sposób zaplanowania i przeprowadzenia badań, a zwłaszcza dobór reprezentatywnej kolekcji nie tylko referencyjnych, dobrze scharakteryzowanych szczepów *Candida albicans* oraz szczepów kilku gatunków chorobotwórczych bakterii gram-dodatnich i gram-ujemnych, ale także bardzo dużej liczby klinicznych szczepów drożdży i bakterii, wyizolowanych od pacjentów, w tym szczepów opornych, odpowiednio, na antymikotyki i antybiotyki. Dla tej dużej kolekcji szczepów drożdży i bakterii Doktorantka przeprowadziła badania ich wrażliwości/oporności na stosowane obecnie, odpowiednio, antymikotyki i antybiotyki, a co ważne z określeniem dla wszystkich szczepów wielkości MIC. Wyniki tych analiz stworzyły bazę danych, ważne odniesienie do oceny uzyskanych w pracy wyników dotyczącej kierunkowego celu, jakim było zbadanie skuteczności fotodynamicznej inaktywacji patogennych grzybów i bakterii, z wykorzystaniem proponowanego fotouczulacza, jakim jest imidazoakrydyna i jej pochodne.

Uważana analiza metod zastosowanych przez Doktorantkę do oceny antygrzybiczej skuteczności metody inaktywacji fotodynamicznej na modelu *Candida albicans* pozwala mi stwierdzić, że dwa wnioski końcowe sformułowane na stronie 96 monografii są uprawnione. Po pierwsze, pochodna imidazoakrydyny C1330 efektywnie akumuluje się w komórkach *Candida albicans* i charakteryzuje się najwyższą aktywnością grzybobójczą wywołaną po naświetleniu. Wyniki przedstawione w tabeli 9 dla *Candida albicans* oraz w tabeli 10 dla bakterii dowodzą, że bardzo dobre wyniki uzyskano dla drożdży i bakterii gram-dodatnich (spadek przeżywalności populacji komórek był większy niż 3 jednostki  $\log_{10}$ ), ale znacznie gorsze wyniki uzyskano dla bakterii gram-ujemnych. Co niezwykle interesujące, wrażliwość poszczególnych szczepów standardowych oraz klinicznych *Candida albicans*, jak też bakterii (np. szczepów bakterii *Staphylococcus aureus*) jest bardzo zróżnicowana, bowiem redukcja przeżywalności populacji komórek wynosi od 2 do ponad 5 jednostek  $\log_{10}$ .

Co więcej, wyniki opisane w podrozdziale 7,5 monografii wskazują, że związki chemiczne wyciszające poszczególne reaktywne formy tlenu (glicerol, azydek sodu) nie znoszą, co prawda, silnego bójkowego efektu inaktywacji fotodynamicznej dla populacji komórek *Candida albicans*, ale go osłabiają o około 0,5 jednostki  $\log_{10}$ , czyli o 50%. Za interesujące uznaję wyniki opisane w rozdziale 7.13, wskazujące na możliwość indukcji apoptozy w komórkach *Candida albicans*, traktowanych inaktywacją fotodynamiczną. Istotnie, wyniki z zastosowaniem fluorescencyjnego znacznika, łączącego się kowalencyjnie z kaspazami, wskazują pośrednio na możliwość aktywacji procesu apoptozy, w stopniu proporcjonalnym do stężenia fotouczulacza C1330. Istotne informacje przyniosły również wyniki opisane w rozdziale 7.10., w którym przedstawiono dane na temat możliwej roli biologicznej pomp typu ABC w obserwowanym zjawisku zróżnicowanej wrażliwości

standardowych i klinicznych szczepów *C. albicans* na inaktywację fotodynamiczną. Uzyskane wyniki, wskazujące pośrednio, że znany inhibitor pomp typu ABC - werapamil, obniża znacząco poziom akumulacji w komórkach badanych fotouczulaczy, wskazują pośrednio na możliwą rolę tego systemu w obserwowanej, zróżnicowanej wrażliwości komórek poszczególnych szczepów na fotodynamiczną inaktywację. Dodam jednak w tym miejscu, że obok pomp typu ABC w komórkach grzybów funkcjonują odmienne, bardzo wydajne pompy innych typów, zwane ogólnie „ang. *efflux pumps*”, które mogą mieć bardzo istotny udział w kontroli wewnątrz - komórkowego stężenia różnych leków i związków chemicznych. Myślę, że udział tych systemów warto sprawdzić w przypadku badanych fotouczulaczy?

Pozytywnie oceniam *Dyskusję* pracy i zawarte w niej treści. Ten ważny rozdział monografii doktorskiej mgr Aleksandra Taraszkiewicz napisała wartkim, poprawnym językiem naukowym i ładną polszczyzną, z należnym podkreśleniem wartości własnych wyników oraz autorskich przemyśleń związanych z ich nie zawsze łatwą interpretacją.

Nie mogę jednak zgodzić się w pełni z jednym z końcowych wniosków sformułowanych przez Doktorantkę, cyt. „*Inaktywacja fotodynamiczna z wykorzystaniem pochodnych imidazoakrydyny nie generuje powstawania form opornych*”. Wyniki dobrze zaplanowanych doświadczeń, opisane w podrozdziale 7.14, nie upoważniają jednak, moim zdaniem, do sformułowania tak jednoznacznego wniosku. Skoro strategia fotodynamicznej inaktywacji, z wykorzystaniem imidazoakrydyny jako fotouczulacza, generuje reaktywne formy tlenu, to bez wątpienia jest „zabiegiem” genotoksycznym i mutagennym. Może warto byłoby sprawdzić, na dogodnych reporterowych genach drożdży, częstość i rodzaj generowanych mutacji. Ponadto, rodniki tlenowe generują pęknięcia nici DNA, a te są sygnałem do indukcji mało wiernych, a więc mutagennych systemów naprawy DNA. Stąd nawet pojedyncze komórki, które przeżyją fotodynamiczną inaktywację - mogą w warunkach presji selekcyjnej i w długich przedziałach czasu - wygenerować oporną, lub mniej wrażliwą populację komórek na określony związek chemiczny, czy inny stresogeny czynnik zewnętrzny.

*Nie odnalazłem w Części teoretycznej pracy, a także w Dyskusji danych na temat molekularnych przyczyn bardzo zróżnicowanej wrażliwości badanych szczepów Candida albicans oraz bakterii na fotodynamiczną inaktywację. Stad mam pytanie, czy są znane jakieś czynniki, mechanizmy obrony komórek drożdży lub bakterii przed inaktywacją fotodynamiczną? Czy różnice te mogą wynikać np. z różnego poziomu reaktywnych form tlenu (ROS) generowanych in vivo w różnych szczepach w reakcjach PDI typu I i I? A może, różnice te są wynikiem zróżnicowanej sprawności systemów naprawy uszkodzeń genomowego DNA, generowanych różnymi reaktywnymi formami tlenu? Zatem, czy pomiary in vivo poziomu reaktywnych form tlenu oraz poziomu uszkodzeń DNA, szczególnie pęknięć DNA, mogłyby dostarczyć jakiś nowych informacji na ten temat? Na taką możliwość wskazują, moim zdaniem, wyniki opisane w podrozdziale 7.13. Przeprowadzone przez Doktorantkę doświadczenia z wykorzystaniem znacznika fluorescencyjnego, łączącego się kowalencyjnie z kaspazami, wskazują, że reakcja fotodynamiczna w komórkach Candida albicans istotnie może indukować proces apoptozy, a więc cały bardzo złożony szlak śmierci uszkodzonych komórek, ale także szlaki naprawy genomowego DNA, pozwalające na przeżycie chociażby nielicznym komórkom w danej populacji. Należałoby jednak przeprowadzić znacznie głębsze badania poznawcze by jednoznacznie potwierdzić taką sugestie.*

*Recenzent jest biologiem molekularnym, ale nie jest lekarzem, a stąd ma pytanie o praktyczny sposób wdrażania inaktywacji fotodynamicznej, z użyciem proponowanego fotouczulacza, do terapii grzybic powierzchniowych (bo chyba nie układowych?), po drugie, czy dostrzega byłaby możliwość zastosowania tej metody np. w leczeniu uciążliwych grzybic paznokci, skór gładkiej i owłosionej - jako terapii wspomagającej?*

## **Wnioski końcowe**

W świetle wyżej przedstawionej bardzo pozytywnej oceny całej monografii doktorskiej Pani mgr Aleksandry Taraszkiewicz, w tym szczególnie uzyskanych oryginalnych wyników, z których większość została opublikowana we wspomnianych wcześniej czasopismach z listy JCR - wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o :

- 1. Dopuszczenie Pani mgr Aleksandry Taraszkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.*
- 2. Rozważenie możliwości stosownego wyróżnienia tej pracy doktorskiej ze względu na jej wartość naukową, popartą znaczącymi publikacjami w międzynarodowych specjalistycznych czasopismach naukowych oraz przyznanym patentem.*

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'H. Olsz', is written on a light blue grid background.