



SZKOŁA GŁÓWNA GOSPODARSTWA WIEJSKIEGO W
WARSZAWIE
WYDZIAŁ NAUK O ŻYWNOSCI
KATEDRA BIOTECHNOLOGII, MIKROBIOLOGII I OCENY
ŻYWNOSCI

Warszawa, 27.04.2017r.

Prof. dr hab. Małgorzata Gniewosz
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności
Wydział Nauk o Żywności SGGW w Warszawie

Pani
Dziekan prof. dr hab. Maria Koziolkiewicz
i Rada Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechniki Łódzkiej w Łodzi

OCENA
rozprawy doktorskiej mgr inż. Marty Targalskiej

pt. „Właściwości adhezyjne drożdży *Candida sp.* w obecności cytostatyków”.

Promotor: dr hab. inż. Alina Kunicka-Styczyńska

Ocena formalnej strony pracy

W przedstawionej do oceny pracy doktorskiej Doktorantka zastosowała układ charakterystyczny dla prac naukowych. W rozprawie doktorskiej składającej się z 295 numerowanych stron maszynopisu zawarto treści w poszczególnych typowych rozdziałach. *Część teoretyczną* dotyczącą przeglądu literatury opracowano na 48 stronach, *Genezę i Cel Pracy* oraz *Materiał i Metody badań* zamieszczono na 23 stronach, *Wyniki* przedstawiono na 103 stronach wraz z 57 rysunkami i 23 tabelami. *Dyskusję* wyników opracowano na kolejnych 39 stronach, a *Wnioski* przedstawiono na 3 stronach. Następnie zamieszczono *Streszczenie* w języku polskim i angielskim (*Abstract*) oraz *Spis Tabel* i *Spis Rysunków*. *Literatura* liczy 19 stron, obejmujących 365 pozycji literatury w języku polskim i angielskim. W *Załączniku* zamieszczono 44 tabele ze szczegółowymi wynikami badań oraz *Spis Tabel*

Załącznika. Przedstawiony przez Autorkę układ pracy jest logiczny i bardzo przejrzysty. Najbardziej obszerną częścią pracy jest rozdział *Wyniki*, w którym zaprezentowano i omówiono wyniki poszczególnych etapów pracy i powiązано ze sobą w logiczną całość na tle szeroko przedstawionej dyskusji.

Jako **cel pracy** Autorka przyjęła zbadanie wpływu cytostatyków na hydrofobowość komórek drożdży oraz na tworzenie przez nie biofilmów na powierzchni abiotycznej i biotycznej. Cel pracy został jasno sformułowany, a obiektem badań były szczepy drożdży z rodzaju *Candida*.

Zakres pracy został w całości zrealizowany w sześciu logicznie następujących po sobie etapach. Pierwszy etap obejmujący ocenę cech szczepów drożdży *Candida* był ściśle powiązany z dwoma następnymi, w których badano wpływ wybranych antybiotyków i olejków eterycznych na zmiany wcześniej opisanych cech drożdży. W kolejnych trzech etapach skupiono się na ocenie wpływu cytostatyków na adhezję drożdży do powierzchni polistyrenu i komórek HeLa oraz na zdolność drożdży do tworzenia biofilmu. Realizacja tak zaplanowanych obszernych badań wymagała od Autorki dużej sprawności w przygotowaniu próbek materiału badawczego, wykonywaniu licznych analiz, jak również prawidłowej organizacji badań.

Drożdże z rodzaju *Candida* są obiektem zainteresowania od wielu lat. Dzięki coraz lepiej poznanemu potencjałowi biochemicznemu tych drożdży, stało się możliwe większe ich zastosowanie w gospodarce człowieka. Z drugiej strony obserwuje się wzrost zakażeń grzybiczych u ludzi spowodowanych drożdżami *Candida*, w szczególności w środowisku szpitalnym i narastające zjawisko lekooporności szczepów chorobotwórczych. Omawiana rozprawa doktorska mieści się w nurcie opracowań poświęconych postępowi w badaniach cytostatyków pochodzenia naturalnego, których użycie może wspomóc działanie chemioterapeutyków w walce z drożdżami *Candida*, w szczególności powodujących zakażenia odcewnikowe. Z tego względu problematyka badawcza podjęta przez mgr inż. Martę Targalską w rozprawie doktorskiej jest nie tylko wysoce aktualna, ale i nowatorska. Wiąże się ona z jednej strony z charakterystyką fenotypową różnego pochodzenia drożdży *Candida* w obecności cytostatyków, a z drugiej z propozycją zastosowania eterycznych olejków roślinnych ograniczających wirulencję szczepów *Candida*, w tym adhezję i tworzenie biofilmu. Dlatego uważam, że dokonany przez Doktorantkę wybór wyżej wymienionych badań należy uznać za uzasadniony.

Tytuł pracy dokładnie odzwierciedla jej treść. Stwierdzam, że praca spełnia wymagania formalne stawiane rozprawom dysercyjnym na stopień doktora.

Ocena szczegółowa

Przegląd literatury został wykonany na podstawie zgromadzonej bogatej literatury w liczbie 365 pozycji w języku polskim i angielskim, obejmującej w dużej części publikacje światowe z ostatnich 10 lat (ponad 74% cytowanych publikacji).

W *Części Teoretycznej* najpierw scharakteryzowano drożdże z rodzaju *Candida*. Przedstawiono klasyfikację taksonomiczną tych drożdży, a następnie morfologię, sposoby rozmnażania oraz tworzenie chlamydospor przez drożdże. Następnie Autorka przedstawiła zastosowanie drożdży *Candida* w różnych gałęziach gospodarki człowieka m.in. w produkcji bioproduktów tj. enzymów lipolitycznych, alkoholi (ksylitolu, D-arabinitolu) i witamin (ryboflawiny). Dość obszerną część tego rozdziału Doktorantka poświęciła znaczeniu klinicznemu drożdży *Candida*, omawiając skalę zakażeń grzybiczych u ludzi w ostatnich latach oraz sprzyjające warunki do wystąpienia tego typu zakażenia u człowieka. Następnie szczegółowo omówiła rolę, budowę i etapy tworzenia biofilmu w zakażeniach grzybiczych. Przedstawiono także adhezję komórek jako ważny czynnik w tworzeniu biofilmu przez drożdże *Candida*. W dalszej części przedstawiono antybiotykooporność gatunku *Candida albicans* oraz działanie antybiotyków przeciwgrzybiczych. W ostatnim podrozdziale omówiono trzy olejki eteryczne (stosowane w badaniach) w kontekście ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej, z uwzględnieniem działania wobec drożdży *Candida sp.* Uważam, że zawarte w części teoretycznej treści pracy świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu Autorki do podjęcia badań. Zakres przeglądu, jak i dobór treści jest właściwy i dobrze wprowadza czytelnika w tematykę badawczą rozprawy.

W *Części doświadczalnej* Autorka przedstawiła materiały i metodykę badań mikrobiologicznych i fizykochemicznych wraz z dokładnymi opisami metod analitycznych, obliczeń i opracowania statystycznego wyników. 45 szczepów drożdży *Candida sp.* stanowiło materiał biologiczny pracy, wśród których większość to izolaty kliniczne (z kału), a pozostałe szczepy to izolaty z żywności i środowiska roślinnego. Pozostały materiał biologiczny: szczep referencyjny *Candida albicans* oraz ssące komórki HeLa pochodził z American Type Culture Collection. Następnie przedstawiono używane w pracy antybiotyki, olejki eteryczne i pożywki hodowlane wraz z ich pochodzeniem.

Najpierw opisano metody stosowane w badaniach morfologicznych drożdży w obecności (lub bez) cytostatyków służące do poznania zdolności drożdży do produkcji egzopolisacharydów, filamentacji i tworzenia chlamydospor. Metody te zostały zaczerpnięte z literatury i Doktorantka powołuje się na materiały źródłowe. Do ustalenia wrażliwości

szczepów na antybiotyki i olejki eteryczne Doktorantka zastosowała standardowe metody pochodzące z dokumentów *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Pozostałe metody oceny hydrofobowości komórek, adhezji do polistyrenu i komórek ssących oraz tworzenia biofilmu zostały szczegółowo opisane, z podaniem źródła literaturowego wraz z ewentualnymi modyfikacjami metod. Opisano też jedną metodę analityczną opierającą się na technikach chromatograficznych z detekcją spektrometrii jonizacyjnej oraz spektrometrią mas.

Bardzo wysoko oceniam oryginalność metod badawczych i trud włożony w ich wykonanie.

Omówienie wyników Autorka podzieliła na sześć podrozdziałów. Kolejność doświadczeń tworzy logiczny ciąg od określenia cech morfologicznych i fizjologicznych drożdży do oceny hydrofobowości, adhezji i tworzenia biofilmu w obecności wybranych cytostatyków. Do ustalenia podobieństw między opisywanymi cechami drożdży w pracy wykorzystano hierarchiczną analizę skupień i analizę składowych głównych (PCA). Przedstawienie wyników potwierdza opanowanie przez Autorkę warsztatu naukowego niezbędnego do realizacji założonych w pracy doktorskiej badań.

W pierwszym etapie pracy badane były cechy morfologiczne szczepów *Candida* tj. kształt komórek, zdolności do filamentacji, wytwarzanie egzopolisacharydów i chlamydospor oraz cechy fizjologiczne na podstawie asymilacji różnych źródeł węgla. Stwierdzono, że wszystkie izolaty kliniczne tworzyły chlamydospory, większość była zdolna do filamentacji, ale słabo wytwarzała egzopolisacharydy. Z kolei większość szczepów pochodzących ze środowiska żywnościowego i roślinnego wytwarzała chlamydospory i słabo lub średnio wytwarzała egzopolisacharydy. Szczepy różniły się także wykorzystywaniem różnych źródeł węgla i ze względu na profil biochemiczny podzielono je na trzy klastry, z liczebną przewagą klastra pierwszego, skupiającego większość klinicznych izolatów.

Następnie zbadano wpływ antybiotyków (kaspofunginy i nystatyny) i olejków eterycznych (drzewa herbacianego, goździkowego, tymiankowego) na zmiany morfologiczne i fizjologiczne drożdży *Candida*. Stwierdzono, że kaspofungina u większości szczepów klinicznych i części izolatów ze środowiska żywności nie wpływała na zmiany filamentacji izolatów, ale w znacznym stopniu ograniczała tworzenie chlamydospor. Podobne zmiany obserwowano w obecności nystatyny: brak wpływu na filamentację u wszystkich szczepów i hamowanie tworzenia chlamydospor przez szczepy kliniczne. Następnie oceniono wpływ olejków eterycznych na cechy morfologiczne i fizjologiczne szczepów. Z przedstawionej analizy składu chemicznego wynika, że dominującymi składnikami olejku drzewa herbacianego były terpinen-4-ol i γ -terpinen, olejku goździkowego eugenol, a olejku

tymiankowego tymol i *p*-cymen. Olejki w środowisku nie wpływały na filamentację szczepów, ale z reguły powodowały zmiany wielkości indeksu morfologicznego szczepów. Stwierdzono, że większy wpływ na te zmiany miał olejek goździkowy, następnie olejek tymiankowy i olejek drzewa herbacianego. Olejki eteryczne, zwłaszcza olejek drzewa herbacianego, bardziej zwiększały wytwarzanie egzopolisacharydów przez ponad połowę szczepów klinicznych i niektóre ze środowiska żywnościowego w stosunku do antybiotyków. Z kolei olejek tymiankowy wyróżniał się większą skutecznością w hamowaniu wytwarzania chlamydospor przez szczepy w stosunku do dwóch pozostałych badanych olejków eterycznych.

W dalszej części pracy stwierdzono dużą skuteczność niszczenia komórek izolatów *Candida* przez cztery przeciwgrzybicze antybiotyki, wśród których silniej działała kaspofungina, a w następnej kolejności nystatyna, worykonazol i flukonazol. Stwierdzono także, że olejki eteryczne działały hamująco na wzrost wszystkich izolatów *Candida*, przy czym większą wrażliwość miały na olejek tymiankowy, następnie olejek goździkowy, a najsłabiej działał olejek drzewa herbacianego.

Na bazie uzyskanych wyników do kolejnego etapu pracy Doktorantka wybrała grupę 8 reprezentatywnych szczepów. Dokonano oceny zmian hydrofobowości powierzchni komórek szczepów *Candida* pod wpływem cytotatyków. Stwierdzono, że oba antybiotyki (kaspofungina i nystatyna) oraz olejek drzewa herbacianego powodowały obniżenie hydrofobowości zarówno większości szczepów klinicznych, jak i izolowanych z żywności i pasz, przy czym nystatyna działała silniej. Działanie dwóch pozostałych olejków eterycznych było niejednakowe; olejek tymiankowy powodował obniżenie hydrofobowości tylko szczepów klinicznych, a goździkowy wzrost hydrofobowości większości badanych szczepów. Równocześnie stwierdzono lepsze działanie dwuskładnikowych mieszanin olejków eterycznych, zwłaszcza mieszaniny olejku goździkowego z olejkiem tymiankowym.

Następnie Doktorantka badała adhezję komórek drożdży do polistyrenu i komórek ssaczycy linii HeLa. Wyniki badań wykazały duże podobieństwo działania cytotatyków, które silniej wpływały na obniżenie adhezji do polistyrenu niż do komórek ssaczycy, choć w różnym stopniu. Olejek goździkowy i tymiankowy wpływały na obniżenie adhezji wszystkich szczepów do polistyrenu, podczas gdy olejek drzewa herbacianego obniżał indeks adhezji 80% izolatów klinicznych i wszystkich pochodzący z żywności i pasz. Obserwowano obojętne lub antagonistyczne działanie mieszanin olejków eterycznych na adhezję większości szczepów do polistyrenu. Adhezja komórek większości szczepów *Candida* do komórek HeLa była obniżona w obecności antybiotyków (kaspofunginy i nystatyny) oraz olejków i ich

mieszanin. Stwierdzono, że działanie większości mieszanin olejków eterycznych na obniżenie adhezji do komórek HeLa miało charakter synergistyczny lub addytywny.

W ostatnim etapie pracy Doktorantka badała wpływ cytostatyków na tworzenie biofilmu na powierzchni polistyrenu. Wszystkie badane szczepy *Candida* były dobrymi producentami biofilmu. Stwierdzono intensyfikację wytwarzania biofilmu przez większość szczepów zarówno w obecności antybiotyków, jak i olejków eterycznych, co Doktorantka tłumaczy odpowiedzią drożdży na obecność substancji o działaniu cytostatycznym w środowisku. Działanie ograniczające wytwarzanie biofilmu przez szczepy miało miejsce tylko pod wpływem mieszaniny olejku tymiankowego z olejkiem goździkowym, dzięki synergistycznemu działaniu ich składników na komórki.

Wyniki badań w pracy Doktorantka opracowała graficznie i zinterpretowała prawidłowo oraz bardzo ciekawie i szczegółowo przedyskutowała z wynikami innych autorów.

Dużym sukcesem przedstawionych badań jest wykazanie celowości praktycznego zastosowania roślinnych olejków eterycznych w mieszaninach do ograniczenia hydrofobowości komórek oraz ich adhezji do polistyrenu i komórek ssaczych, większości badanych szczepów *Candida*. Mieszaniny te mogą być zastosowane do wspomagania antybiotykoterapii i jest to znaczący praktyczny aspekt niniejszej rozprawy.

W ostatnim rozdziale Autorka sformułowała dwadzieścia wniosków, które dodatkowo zostały rozbudowane o najważniejsze wyniki pracy. W mojej opinii wnioski są prawidłowe, zawierają najważniejsze konkluzje wynikające z pracy. Całość pracy została zrealizowana w sposób interesujący i w wielu elementach oryginalny.

Podsumowanie

Recenzowana praca doktorska mgr inż. Marty Targalskiej pt. „Właściwości adhezyjne drożdży *Candida* sp. w obecności cytostatyków” stanowi istotny wkład w poszerzenie wiedzy na temat nowych, skuteczniejszych strategii terapeutycznych z zastosowaniem preparatów pochodzenia roślinnego. W sposób szczególny podkreślam szeroki zakres pracy doświadczalnej wykonanej na dużej liczbie szczepów, co niewątpliwie wymagało bardzo dobrego opanowania warsztatu badawczego i przygotowania teoretycznego Doktorantki w zakresie mikrobiologii.

Praca doktorska spełnia wymogi zawarte w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach naukowych i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, art.13.1 z późn. zm.), w związku z tym stawiam wniosek o dopuszczenie Doktorantki do publicznej obrony i dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Nowatorskie podejście do postawionego celu badań oraz zastosowanie szerokiej gamy nowoczesnych metod badania zachowań komórek drożdży w obecności wybranych substancji ograniczających ich wzrost i kolonizację powierzchni, wymagało od Doktorantki umiejętności prowadzenia badań na wysokim poziomie, a uzyskane wyniki mogą stanowić podstawę do projektowania nowych leków i nowoczesnych terapii. Z tego względu uważam, że niniejsza rozprawa doktorska zasługuje na wyróżnienie.

M. Bekas