

Kraków, 22.09.2022

Recenzja pracy doktorskiej Pani Mgr Patrycji Ogonowskiej pt. „Metoda fotodynamiczna jako potencjalne narzędzie eradykacji *Staphylococcus aureus* kolonizującego chorych z atopowym zapaleniem skóry”

W związku z pojawianiem się nowych, trudnych do leczenia szczepów bakteryjnych opornych na większość stosowanych leków, znaleźliśmy się u schyłku ery antybiotyków. Problem wzrastającej oporności wielolekowej (MDR) prowadzi do intensyfikacji poszukiwań alternatywnych terapii bakteriobójczych, w tym metod zwalczania infekcji wywołanych przez wielolekooporne mikroorganizmy. Obecny stan wiedzy na temat infekcji bakteryjnych pozwala przypuszczać, że do osiągnięcia całkowitego sukcesu terapeutycznego konieczne jest zastosowanie strategii medycznych działających wielokierunkowo, poprzez zróżnicowane mechanizmy molekularne, ukierunkowane na zniszczenie patogenów chorobotwórczych.

Do takich rozwiązań należy omówiona w recenzowanej pracy doktorskiej przeciwbakteryjna terapia fotodynamiczna (aPDT), znana też jako fotodynamiczna inaktywacja (PDI) czy fotodynamiczna sterylizacja (PDS). Czynniki aktywne w aPDT są reaktywne formy tlenu (ROS), będące produktami fotoindukowanego przeniesienia elektronu lub/i przekazania energii z cząsteczki fotosensybilizatora znajdującej się we wzbudzonym stanie trypletowym na cząsteczkę tlenu w jego podstawowym stanie elektronowym. Możliwość kontrolowanego generowania ROS zależy w dużej mierze od właściwości zastosowanych fotosensybilizatorów. Prowadzone są intensywne badania zarówno nad optymalizacją protokołów PDT przy użyciu komercyjnych preparatów jak też nad nowymi związkami charakteryzującymi się zwiększoną selektywnością wobec komórek bakteryjnych, efektywnością w generowaniu ROS oraz odpowiednią skutecznością terapeutyczną.

Tą ważną i aktualną tematyką badawczą zajmowała się mgr Patrycja Ogonowska w ramach przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej. Praca powstała w Zakładzie Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr hab. Joanny Nakoniecznej, prof. UG. Tematyka badań podjętych przez Doktorantkę jest kontynuacją wieloletnich prac nad PDI, czyli nad zagadnieniami, w



których Prof. Nakoneczna oraz wspomniany w podziękowaniach Prof. Mariusz Grinholc są niekwestionowanymi autorytetami w środowisku naukowym na świecie. Swoistym novum jest natomiast poszerzenie tej problematyki badawczej o badania *ex vivo* na modelu świńskiej skóry oraz *in vivo* na modelu myszy Balb C.

Przedstawiona do recenzji praca liczy 187 stron i została napisana w języku polskim, a jej układ nie budzi zastrzeżeń. Składa się z 15 rozdziałów, przy czym pięć ostatnich rozdziałów to spis cytowanej literatury (309 pozycji), rycin, tabel, suplement oraz spis publikacji i osiągnięć związanych bezpośrednio z doktoratem. Zasadnicza część pracy ma standardowy dla tego typu opracowań format i zawiera odpowiednio: i) wstęp literaturowy; ii) rozdział, w którym Doktorantka definiuje cele badań; iii) materiały wykorzystane w pracy iv) opis metod badawczych v) rozdział poświęcony omówieniu wyników badań; vi) dyskusji; vi) zwięźle sformułowane wnioski.

Główną koncepcją niniejszej pracy doktorskiej jest charakterystyka genotypowa bakterii gronkowca złocistego izolowanych od pacjentów chorych na atopowe zapalenie skóry, a następnie zbadanie efektywności fotodynamicznej zarówno wobec klinicznych jak i referencyjnych izolatów na różnym poziomie organizacji: począwszy od testów *in vitro*, poprzez *badania ex vivo* z wykorzystaniem modelu świńskiej skóry, a na testach *in vivo* (myszy Balb C) kończąc. Ponadto, zbadano wpływ fotogenerowanych reaktywnych form tlenu na poziom toksyn kluczowych dla patogenności *Staphylococcus aureus*.

W pierwszej części niespełna trzydziestostronicowego wstępu literaturowego Autorka przedstawiła podstawowe informacje dotyczące atopowego zapalenia skóry, omówiła problem kolonizacji skóry przez bakterie gronkowca u pacjentów obarczonych tą jednostką chorobową oraz wymieniła i scharakteryzowała czynniki sprzyjające kolonizacji *S. aureus* oraz czynniki wirulencji *S. aureus* prowadzące do zaostrzenia przebiegu choroby. W kolejnych podrozdziałach Autorka zajęła się problematyką regulacji toksyn, genotypowaniem izolatów *S. aureus* oraz dekolonizacją skóry u pacjentów z AZS. Na pochwałę zasługuje skrupulatny przegląd dotychczasowych doniesień literaturowych w zakresie omawianej tematyki.

W kolejnym podrozdziale Autorka omówiła podstawowe informacje dotyczących terapii fotodynamicznej, a jej schemat działania zilustrowała na Rycinie 4. Przedstawiony na niej diagram Jabłońskiego w mojej ocenie jest zbyt uproszczony, co w konsekwencji skutkuje lakonicznym wyjaśnieniem kluczowych procesów fotofizycznych i reakcji fotochemicznych warunkujących skuteczność PDT. Uważam, że należałoby tu raczej zacytować prace fotochemików, które z pewnością



pozwołyby Autorce lepiej zrozumieć istotę mechanizmów PDT. Po lekturze tego opracowania, czuję pewien niedosyt i nie jestem w pełni przekonany czy Autorka rozumie czym są de facto przejścia elektronowe (pominięto stany oscylacyjne na diagramie energetycznym), jakie są inne ścieżki dezaktywacji stanów wzbudzonych cząsteczek i wreszcie co to znaczy, że cząsteczki fotosensybilizatora znajdują się we wzbudzonym stanie singletowym czy trypletowym. Jednocześnie jestem przekonany, że podczas obrony Doktorantka rozwieje wszelkie moje wątpliwości.

Następnie zostają omówione mechanizmy fotochemiczne PDT prowadzące do generowania reaktywnych form tlenu. Chciałbym poznać opinię Doktorantki na temat praktycznego znaczenia obu mechanizmów (przekazania energii i przeniesienia elektronu) w PDT/aPDT? Czy przewaga jednego z tych mechanizmów może skutkować odpowiednio korzystniejszym efektem przeciwnowotworowym i przeciwbakteryjnym? W związku z tym, że cytowane są tu prace Prof. Michaela Hamblina, jestem ciekaw, co sądzi Pani o zaproponowanym przez Niego Mechanizmie typu III. Na koniec w sposób zwięzły i zrozumiały została omówiona terapia fotodynamiczna w praktyce klinicznej. Tu z kolei nasuwa się pytanie, jakie są różnice w kryteriach doboru fotosensybilizatorów do terapii fotodynamicznej nowotworów, a jakie do fotodynamicznej inaktywacji mikroorganizmów. Podczas obrony chciałbym usłyszeć zarówno o właściwościach chemicznych fotosensybilizatorów jak również o protokołach stosowanych w obu strategiach terapeutycznych. Mimo przedstawionych zastrzeżeń, rozdział ten spełnia swoją rolę, gdyż umożliwia czytelnikowi rozprawy doktorskiej zrozumienie istoty podjętych przez Doktorantkę badań i stanowi odpowiednie wprowadzenie w złożoną tematykę.

W rozdziale Materiały znajduje się krótki opis warunków hodowli komórkowych, spis stosowanych odczynników, materiałów i aparatury badawczej, charakterystyka użytych fotosensybilizatorów, opis źródeł światła wraz z ich elektronowymi widmami emisyjnymi, oraz krótki opis analizy statystycznej pozyskanych danych eksperymentalnych. W dalszej części pracy Doktorantka opisuje metodykę badań, w tym m. in. opis warunków w jakich przeprowadzała izolację genomowego DNA bakteryjnego, izolację całkowitego RNA bakteryjnego, amplifikację genów toksyn, inaktywację fotodynamiczną bakterii *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*, badanie cytotoksyczności oraz efektu fotodynamicznego komórek eukariotycznych itd. Uważam, że opis stosowanych materiałów i metod spełnia swoją zasadniczą rolę, ponieważ zawiera niezbędne informacje umożliwiające odtworzenie warunków badań przez niezależnych badaczy. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na niefortunne sformułowania i drobne błędy, które pojawiły się w tej części opracowania, a wynikały zapewne z pośpiechu Doktorantki w przygotowaniu rozprawy doktorskiej. Autorka powinna wykazać się



większą konsekwencją w stosowaniu polskich sformułowań, a mniej adoptować angielskie odpowiedniki takie jak np. primer forward, blank, tape-stripping, oraz unikać żargonów, np. „umieszczono pod zieloną lampą”. Na koniec tego rozdziału Autorka pisze o ocenie parametrów z uzyskanych obrazach histologicznych i zalicza tu m. in. stan zapalny. Bez wątplenia nie jest to parametr, tylko nieswoista, humoralna, komórkowa i metaboliczna odpowiedź tkanek na działanie czynnika zewnętrznego (fizycznego, chemicznego, biologicznego) lub wewnętrznego (własne antygeny). Ocenie można natomiast poddać poziom mediatorów stanu zapalnego, np. prozapalnych cytokin (IL1, IL2, IL6, TNF). Na pochwałę natomiast zasługuje umiejętne zastosowanie w pracy doktorskiej wielu, często skomplikowanych technik badawczych.

Wyniki badań zostały zilustrowane za pomocą 24 rycin oraz 14 tabel i obejmują: i) analizę wybranych czynników wirulencji *S. aureus*, takich jak enterotoksyny gronkowcowe i toksyna TSST-1; ii) analizę molekularną metodę typowania genu *spa* i/lub MLST w celu poznania struktury klonalnej badanej populacji *S. aureus*; iii) analizę efektu fotodynamicznego *in vitro* wobec bakterii gronkowca wyizolowanych od pacjentów z AZS (n=139) oraz szczepów referencyjnych (n=14) przy zastosowaniu 2 protokołów (róż bengalski wzbudzany światłem z zakresu zielonego oraz pochodna błękitu metylenowego wzbudzana światłem z zakresu czerwonego); iv) analizę cytotoksyczności i fototoksyczności komórek eukariotycznych dwoma metodami (test aktywności metabolicznej MTT oraz monitorowanie wzrostu i żywotności komórek w czasie rzeczywistym xCELLigence); v) analizę stabilności genów referencyjnych w warunkach PDI; vi) analizę wpływu efektu fotodynamicznego w warunkach subletalnych na aktywność genów kodujących wybrane toksyny *S. aureus*; vii) analizę wpływu PDI na proliferację komórek krwi obwodowej oraz aktywność wybranych białek toksyn gronkowcowych; viii) analizę skuteczności fotodynamicznej wobec *S. aureus in vivo* (skóra myszy Balb C) po zastosowania światła z zakresu zielonego oraz różu bengalskiego jako fotosensybilizatora.

Kolejny rozdział to dyskusja otrzymanych wyników, w którym Autorka nie tylko rzetelnie poddaje po raz kolejny analizie uzyskane przez siebie wyniki eksperymentalne, ale przede wszystkim konfrontuje je z danymi dostępnymi w literaturze. Część merytoryczną kończy rozdział zatytułowany Wnioski. Odnoszę wrażenie, że Doktorantka podeszła do tej części pracy z dużą ostrożnością (5 krótkich punktów). Z jednej strony należy pochwalić taki umiarkowany sceptycyzm u młodych adeptów nauki, z drugiej zaś strony ta część pozostawia poczucie pewnego niedosytu.

Do najważniejszych osiągnięć uzyskanych przez mgr Patrycję Ogonowską ramach recenzowanej pracy doktorskiej zaliczam:

1. Wykazanie, iż mimo dużego zróżnicowania genetycznego bakterii *S. aureus* pochodzących od pacjentów chorych na atopowe zapalenie skóry, ich skuteczna inaktywacja fotodynamiczna nie zależy od wirulencji związanej z toksynami gronkowcowymi.
2. Optymalizację warunków eksperymentalnych PDI *in vitro* (dobór odpowiednich stężeń fotosensybilizatorów, mocy i dawek światła) oraz określenie selektywności badanych związków wobec komórek bakteryjnych w porównaniu do komórkach prawidłowych (HaCaT).
3. Wykazanie, iż PDI powoduje utratę aktywności toksyn gronkowcowych.
4. Rozszerzenie badań z klasycznych testów *in vitro* na zaawansowane modele zwierzęce *ex vivo* i *in vivo*.
5. Zaprojektowanie bezpiecznego i skutecznego protokołu przedklinicznego na modelu skórnej infekcji u myszy DBA 2 *in vivo*, a w szczególności wykazanie, że aktywacja różu bengalskiego światłem z zakresu zielonego powoduje zarówno spadek przeżywalności *S. aureus* jak też obniżenie poziomu toksyn gronkowcowych.

Na wyróżnienie zasługuje fakt, iż wyniki badań wchodzących w zakres rozprawy opublikowano w postaci sześciu oryginalnych artykułów w bardzo dobrych specjalistycznych czasopismach naukowych oraz trzech publikacji w materiałach pokonferencyjnych. Należy również zaznaczyć, iż Autorka kierowała projektem badawczym pt. „*Wpływ stresu fotooksydacyjnego na poziom ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji produkowane przez Staphylococcus aureus*”, którego wyniki również zostały zamieszczone w ocenianej rozprawie. Ponadto była wykonawcą projektu przez Narodowe Centrum Nauki pt. „*Wpływ przeciwdrobnoustrojowej fotoinaktywacji na wirulencję szczepów Staphylococcus aureus kolonizujących chorych z atopowym zapaleniem skóry: badania in vitro oraz in vivo*”.

Doktorantka systematycznie rozszerza zakres swoich zainteresowań naukowych i z powodzeniem prezentuje wyniki badań na konferencjach naukowych (11 wystąpień). Za swoją działalność otrzymała stypendium Rektora UG dla najlepszych doktorantów, stypendium konferencyjne Europejskiego Towarzystwa Fotobiologicznego oraz stypendium z dotacji projakościowej dla najlepszych doktorantów MWB UG i GUMed.



UNIwersytet JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Dr hab. Janusz M. Dąbrowski, prof. UJ
Wydział Chemii
Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
✉ jdabrows@chemia.uj.edu.pl
☎ (+48)126862464, 602348234

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa jest dobrze przemyślana i przygotowana, zawiera elementy nowości naukowej i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Na wyróżnienie zasługuje umiejętność rozwiązywania skomplikowanych problemów naukowych w zakresie interdyscyplinarnej tematyki. Doktorantka wykazała się znajomością licznych technik badawczych. Praca od strony językowej i redakcyjnej jest również bardzo dobrze przygotowana. Przedstawione przeze mnie uwagi krytyczne są zaproszeniem do dyskusji podczas obrony, nie zaś wytknięciem błędów merytorycznych wpływających na końcową bardzo dobrą ocenę pracy. Ponadto część z postawionych przeze mnie pytań można potraktować jako sugestię do podjęcia dalszych badań w celu głębszego zrozumienia opisanych procesów i wyjaśnienia mechanizmów fotochemicznych i biologicznych.

Mając na uwadze powyższe stwierdzam, że recenzowana praca w pełni spełnia kryteria stawiane kandydatom w Ustawie - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020r poz.85 z późn. zm.). Wnoszę więc do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o kontynuowanie postępowania o nadanie stopnia doktora nauk biologicznych i dopuszczenie Pani mgr Patrycji Ogonowskiej do publicznej obrony.

Dr hab. Janusz M. Dąbrowski, prof. UJ



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Dr hab. Janusz M. Dąbrowski, prof. UJ
Wydział Chemii
Gronostajowa 2, 30-387 Kraków
✉ jdabrows@chemia.uj.edu.pl
☎ (+48)126862464, 602348234

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Po dokładnym przestudiowaniu rozprawy doktorskiej, stwierdzam, że Autorka przygotowała wartościową pracę o niewątpliwych walorach naukowych. Doktorantka podjęła się trudnej tematyki z zakresu mikrobiologii, chemii medycznej i fotomedycyny. Stwierdzam, że Doktorantka spełnia warunek opublikowania części wyników doktoratu w prestiżowych recenzowanych czasopismach naukowych t. j. *Scientific Reports*, *Future Medicinal Chemistry*, *Frontiers in Microbiology*, *Lighting Research & Technology*, *Frontiers in Medicine*. Czasopisma te specjalizują się w publikowaniu interdyscyplinarnych wyników badań. Ponadto uważam, że przedstawione wyniki mają charakter rozwojowy w aspekcie planowania protokołów terapeutycznych w badaniach przedklinicznych, a w przyszłości również klinicznych.

Biorąc pod uwagę nowatorski charakter pracy, jej interdyscyplinarność, niekwestionowaną wartość naukową oraz oryginalność potwierdzoną publikacjami w bardzo dobrych czasopismach naukowych, z pełnym przekonaniem wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Ogonowskiej.

Dr hab. Janusz M. Dąbrowski, prof. UJ