



UNIwersytet Jagielloński  
w Krakowie

KRAKÓW, 19. 01. 2024

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII  
KIEROWNIK ZAKŁADU IMMUNOLOGII

PROF. DR HAB. JOANNA CICHY

**Ocena pracy doktorskiej mgr Klaudii Szymczak**

**pt. „Fotodynamiczna inaktywacja wielolekoopornego *Staphylococcus aureus* i redukcja jego wirulencji z wykorzystaniem nowych porfiryn koordynowanych jonami galu (III)”**

Gronkowiec złocisty to jedno z najbardziej antybiotyko-opornych bakterii, odpowiedzialnych za zakażenia szpitalne i poza szpitalne, oraz zaostrzenia chronicznych zapalnych chorób skóry, przede wszystkim atopowego zapalenia skóry (AZS). Jest to co najmniej kilka powodów uzasadniających intensywne zainteresowanie środowiska naukowego patofizjologią i wybiórczym hamowaniem wzrostu tych bakterii. Po pierwsze, nasilające się zakażenia bakteriami *S. aureus* w populacji człowieka. Po drugie, coraz większe trudności w leczeniu zakażeń gronkowcem złocistym, ze względu na brak efektywnych antybiotyków względem metycylino-opornych szczepów *S. aureus* (MRSA). Po trzecie, możliwość bytowania tych bakterii wewnątrz komórek gospodarza i trudną eradykację takich form za pomocą dostępnych metod leczenia. Ponadto, niepełne zrozumienie wpływu *S. aureus* na barierę skórną i patologię AZS. Dlatego dokładne poznanie mechanizmów wykorzystywanych przez gronkowce do przeżycia w środowisku komórek skóry, a także propozycje nowych strategii kontroli wzrostu tych bakterii mogą otworzyć drogę do aktywnego zapobiegania czy leczenia schorzeń związanych z *S. aureus*. Z tych powodów, tematykę pracy doktorskiej Pani Klaudii Szymczak oceniam jako aktualną i ważną, zarówno w aspekcie poznawczym jak i terapeutycznym.

Praca doktorska została wykonana w Zakładzie Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG i GUM pod opieką dr hab. Joanny Nakoniecznej, prof. UG. Rozprawa ma formę spójnego tematycznie zestawu dwóch publikacji eksperymentalnych (opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym-Molecular Pharmaceutics), oraz jednej publikacji eksperymentalnej przygotowywanej do druku. We wszystkich tych opracowaniach doktorantka jest pierwszym autorem, a Jej wiodący udział w

UL. GRONOSTAJOWA 7  
30-387 KRAKÓW  
TEL. +48 12-664-6127  
EMAIL: JOANNA.CICHY@UJ.EDU.PL

powstaniu tych prac potwierdzają opisy „udziału współwykonawców” zamieszczone w obu publikacjach autorki, oraz oświadczenia współautorów będące częścią pracy doktorskiej.

Pozostałe rozdziały zamieszczone w pracy doktorskiej, które dotyczą prac badawczych autorki, zostały przygotowane podobnie jak publikacje oryginalne w j. angielskim. Wyjątek stanowi jednostronicowe streszczenie w j. polskim uzupełnione wersją anglojęzyczną. Na pracę doktorską składają się ponadto; wstęp, a także krótkie „wprowadzenie” poprzedzające każdą z trzech publikacji. Praca doktorska zawiera także rozdział „Podsumowanie wyników, z wypunktowanymi wnioskami z pracy. Uzupełnieniem opisu osiągnięć badawczych doktorantki jest lista innych dokonań autorki, oraz oświadczenia współautorów prac oryginalnych, będących podstawą osiągnięcia naukowego w ramach doktoratu. W dorobku doktorantki znajduje się łącznie pięć publikacji (włączając w to dwie publikacje przedstawione do oceny w ramach rozprawy doktorskiej) i dwa manuskrypty, które nie zostały jeszcze opublikowane (w tym jeden włączony do doktoratu).

### **Ocena merytoryczna.**

W kilkunastostronicowym wstępie, doktorantka opisuje narastający problem zakażeń *S. aureus*. Prezentuje cykl życiowy tych bakterii skupiając się na ich wewnątrzkomórkowej strategii przetrwania w komórkach gospodarza. Uzasadnia konieczność poszukiwania nowych terapii leczenia zakażeń i kolonizacji skóry atopowej przez szczepy *S. aureus*. Wskazuje na zalety stosowania w tym celu terapii fotodynamicznej opartej na reakcji fototoksycznej, z użyciem substancji fotouczulającej wzbudzonej światłem o odpowiedniej długości fali. Rozwijając ten aspekt, opisuje możliwość użycia światła widzialnego (głównie w pasmie niebieskim i czerwonym), do wzbudzania fotouczulacza. Opisuje także mechanizmy działania takiej strategii terapeutycznej, opartej na powstawaniu reaktywnych form tlenu (ROS). Choć terapia fotodynamiczna jest najczęściej stosowana w przypadku nowotworów, to również istnieją doniesienia wskazujące na jej skuteczność w zwalczaniu drobnoustrojów, w tym bakterii.

W przypadku badań doktorantki do testów przeciwbakteryjnych wybrano metaloporfiryny, o zwiększonej rozpuszczalności w roztworach wodnych i możliwości wzbudzania światłem zielonym, co stanowiło jeden z głównych aspektów nowości zaprezentowanych badań. Autorka zwraca uwagę, że światło zielone wykazuje mniejsze efekty fototoksyczne względem komórek skóry, w porównaniu do światła niebieskiego. Z kolei w stosunku do światła czerwonego, zaletą zastosowania światła zielonego jest generowanie mniejszego bólu u pacjentów poddanych terapii fotodynamicznej, ze względu na penetrację światła zielonego na mniejszą głębokość skóry.

Drugi ważny aspekt strategii walki z gronkowcem złocistym za pomocą zastosowanych metaloporfiryn, to podwójna funkcjonalność tych związków. Oprócz efektu fotodynamicznej inaktywacji bakterii, metaloporfiryny mogą działać naśladując strukturę hemu, i blokować na drodze niezależnej od światła metabolizm, w którym uczestniczą jony żelaza. Autorka

opisuje mechanizmy pozyskiwania  $Fe^{3+}$  z hemu przez bakterie. Z sukcesem argumentuje, że wykorzystanie takiej samej strategii dostarczania przeciwbakteryjnych metaloporfiryn do komórek bakteryjnych z ich środowiska zewnętrznego, co pobieranie i metabolizowanie hemu, stanowi efektywny sposób ingerencji w wewnątrzkomórkowe procesy życiowe bakterii. Ponadto, w odróżnieniu od hemu, którego nadmiar jest wydalany przez komórki bakteryjne ze względu na możliwą cytotoksyczność, metaloporfiryny wydają się być znacznie mniej podatne na wydzielenie z komórek bakteryjnych, pomimo podobieństwa strukturalnego do hemu. Biorąc pod uwagę wymienione właściwości fizykochemiczne metaloporfiryn i ich mechanizm podwójnego działania przeciwbakteryjnego, te związki wydają się bardzo dobrymi kandydatami do dalszych badań w kontekście kontroli schorzeń wywoływanych przez *S. aureus*.

### **Cel pracy.**

Głównym celem badań była charakterystyka modyfikowanych porfiryn koordynowanych przez jony galu III i wzbudzanych światłem zielonym (522 nm), pod kątem ich skuteczności do hamowania wzrostu *S. aureus* w różnych fazach zakażeń komórek gospodarza, i redukcji aktywności wybranych elementów wirulencji gronkowca złocistego w modelach *in vitro* i/lub *ex vivo*.

### **Wyniki i dyskusja.**

W pracy badawczej, doktorantka zastosowała kilka dostępnych komercyjnie lub udostępnionych w ramach współpracy z badaczami z Chin, pochodnych porfiryn koordynowanych jonami  $Ga^{3+}$ . Celem modyfikacji związków na bazie porfiryny (uprzednio badanych w kontekście efektów przeciwbakteryjnych), było uzyskanie pochodnych o zmienionym spektrum absorpcji, pozwalającym na wykorzystanie światła zielonego w antygronkowcowej terapii fotodynamicznej. Ponadto, modyfikacje miały na celu osiągnięcie lepszej rozpuszczalności porfiryn koordynowanych jonami galu w roztworach wodnych, i poprawę aktywności przeciwbakteryjnej względem *S. aureus*. Równolegle badano cytotoksyczność wybranych metaloporfiryn względem ludzkich nieśmiertelnych keratynocytów naskórka (linia HaCAT), które często stanowią „pierwszy cel” tych bakterii w przypadku kolonizacji i zakażeń skóry. W tym przypadku testowano również keratynocyty, w których gen filagryny (o obniżonej ekspresji/dysfunkcji u niektórych pacjentów z AZS), wyciszono w keratynocytach za pomocą shRNA.

Analizowano efektywność przeciwbakteryjną porfiryn koordynowanych  $Ga^{3+}$  względem *S. aureus* rosnącego w zawieszynie oraz tworzącego biofilm, stosując w tym drugim przypadku model *ex vivo* zakażenia świńskiej skóry. Badano także przyczyny różnej skuteczności pochodnych porfiryny względem gronkowca złocistego. Miedzy innymi przy użyciu mutantów *S. aureus* z upośledzonym systemem wydalania substancji szkodliwych, testowano tezę, że najbardziej efektywne pochodne porfiryny w hamowaniu wzrostu *S. aureus* są najlepiej akumulowane w komórkach gronkowca.

Przedmiotem badań autorki, był także wpływ porfiryn koordynowanych jonami galu na różne fazy zakażenia keratynocytów przez *S. aureus*, takie jak; zakażenia keratynocytów za pomocą gronkowca uwolnionego z wewnątrzkomórkowych rezerwuarów tych komórek; adhezja i internalizacja gronkowca przez keratynocyty, czy też wpływ tych związków na „ukrytą” wewnątrz komórek pulę tych bakterii.

Do najważniejszych wyników pracy można zaliczyć;

-wykazanie efektywności światła zielonego do wzbudzania nowej generacji opartych na jonach galu III porfiryn. Wynikiem wzbudzenia jest produkcja ROS (głównie tlenu singletowego i anionorodnika ponadtlenkowego) prowadząca do obniżenia żywotności szczepów *S. aureus* w tym izolatów klinicznych tych bakterii pochodzących od pacjentów z AZS.

-wykazanie podwójnej, tj. zależnej od efektu fototoksycznego i niezależnego od światła efektu przeciwbakteryjnego testowanych pochodnych porfiryny względem pozakomórkowej puli *S. aureus*, przy jednoczesnym braku b. znaczących efektów cytotoksycznych tych związków względem keratynocytów.

-opis akumulacji i lokalizacji nowych porfiryn koordynowanych jonami galu w komórkach keratynocytów zakażonych *S. aureus* i wykazanie częściowej skuteczności tych związków wobec wewnątrzkomórkowych rezerwuarów tych bakterii w keratynocytach.

### **Wnioski ogólne**

Pozytywnym, zasługującym na podkreślenie aspektem pracy jest ciekawe i przekonujące przedstawienie problemu badawczego, a także wysoka wartość warstwy językowej. Autorka porusza różne aspekty zakażeń gronkowcowych i dyskutuje wyniki swojej pracy w sposób dojrzały, wykazując przy tym dobrą znajomość przedmiotu badań. Ponadto zwraca uwagę starannie zaprojektowanie i wykonanie doświadczeń.

W mojej opinii struktura pracy mogłaby jednak zyskać na spoistości i harmonijności, gdyby uniknięto powtórzeń niektórych treści, np. wielokrotnych odwołań do zalet użycia światła zielonego w terapii fotodynamicznej, czy ilustracji strategii badań różnych faz zakażenia komórek przez *S. aureus*. Nie uchroniono się także od pewnych powtórzeń linii badań w kilku pracach eksperymentalnych, np. tych dotyczących akumulacji tych samych modyfikowanych porfiryn w komórkach. Ponadto, w głównej prezentacji wyników zabrakło mi większej ilości danych obrazowych, np. dokumentujących akumulację gronkowca w komórkach bakterii czy w keratynocytach pozbawionych filagryny. Wydaje mi się że taka prezentacja przykładowych wyników wzbogaciłaby dane przedstawione przede wszystkim na wykresach.

W trakcie lektury pracy doktorskiej nasunęło mi się ponadto kilka pytań i wątpliwości.

1. Jak wygląda dostępność tlenu w naskórku i kompartmentach wewnątrzkomórkowych keratynocytów, w których akumulują się testowane porfiryny i *S. aureus*? Terapia fotodynamiczna zakłada dostępność tlenu do produkcji ROS, a keratynocyty uważa się za komórki funkcjonujące w środowisku „stosunkowo ubogim” w tlen i pozyskujące energię głównie w procesie glikolizy.
2. Zastosowane związki porfiryny okazały się efektywne w hamowaniu wzrostu *S. aureus*, ale nie eliminowały tych bakterii całkowicie. Jaka jest zdaniem autorki przyczyna braku pełnej eradykacji *S. aureus* mimo podwójnego (zależnego i niezależnego od światła) sposobu działania tych związków? Czy lub jak można „ulepszyć” antybakteryjną efektywność nowej generacji porfiryn?
3. Czy zdaniem autorki keratynocyty i profesjonalne fagocyty (np. makrofagi skórne) różnią się pod względem zdolności do „ukrywania” *S. aureus* w komórkach i podatności na anty-gronkowcowe działanie testowanych pochodnych porfiryn?
4. Dostępne dane metagenetyczne, wskazują, że ok. 30% *S. aureus* pozyskiwanego ze skóry pacjentów z atopią to szczepy MRSA. Na podstawie jakich danych eksperymentalnych autorka uważa że u pacjentów z AZS dochodzi do zwiększonej kolonizacji skóry akurat szczepami MRSA w stosunku do dawców zdrowych?
5. W mojej opinii określenie, że IL-2 jest cytokiną prozapalną, można uznać za kontrowersyjne. W tym kontekście prosiłabym o uzasadnienie wyboru IL-2 do testów funkcjonalnych czynników wirulencji *S. aureus*, do których wykorzystano PBMC.
6. Jak autorka oceniała tworzenie biofilmu przez *S. aureus*?

### Wnioski końcowe

Powyższe uwagi i sugestie nie umniejszają mojej pozytywnej oceny pracy, którą uważam za wartościową i wnoszącą wiele nowych danych do opracowania bardziej skutecznych terapii anty-gronkowcowych niezależnych od profilu lekooporności tych bakterii.

Przedstawiona do oceny dysertacja spełnia wymogi określone w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Zgłaszam zatem formalny wniosek do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani Klaudii Szymczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. Joanna Cichy

