



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Biofizyki

Prof. dr hab. Tadeusz Sarna

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Beaty Kruszewskiej-Naczk zatytułowanej „Genetic basis of bacterial responses to antibacterial blue light: implications for safety and resistance development”

Odkrycie penicyliny przez Alexandra Fleminga w 1928 roku, a następnie pierwsze celowe i udane zastosowanie tego antybiotyku do leczenia ciężkiego zakażenia krwi w 1941 roku w Oksfordzie, uznaje się za przełom w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Wydawało się, że penicylina oraz kolejne generacje antybiotyków, zarówno naturalnych jak i syntetycznych, to cudowne leki, które skutecznie leczą i zapobiegają różnym infekcjom bakteryjnym. Dość szybko okazało się jednak, że antybiotyki to nie panaceum na wszystkie choroby infekcyjne a ponadto ich nadmierne użycie doprowadziło do pojawienia się szczepów bakteryjnych opornych na większość znanych antybiotyków. Raport O’Neilla z 2015 roku przewiduje, że wielolekooporność, o ile nie znajdzie się skuteczne antidotum, może doprowadzić w 2050 roku do 10 milionów dodatkowych zgonów i kosztować gospodarkę światową biliony dolarów. Nie dziwi więc poszukiwania nowych terapii przeciwbakteryjnych, które nie powinny prowadzić do wytworzenia oporności a ponadto wykazywać efektywność przeciwko patogenom wielolekoopornym. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie promieniowania elektromagnetycznego o odpowiedniej długości fali jako alternatywnej terapii przeciwbakteryjnej. Za ojca nowoczesnej fototerapii uważa się lekarza duńskiego Nielsa Rydberga Finsena, który w 1903 roku otrzymał nagrodę Nobla za leczenie gruźlicy skóry przy pomocy tzw. sztucznego słońca czyli skonstruowanej przez siebie lampy łukowej. Chociaż emitowany przez to urządzenie tzw. ultrafiolet C jest bardzo skuteczny w zabijaniu drobnoustrojów i ciągle używa się go w zwalczaniu zakażeń szpitalnych poprzez odkażanie powietrza i powierzchni, sterylizacji narzędzi i dezynfekcji wody, ze względu na niepożądane efekty uboczne raczej nie stosuje się tego promieniowania bezpośrednio w leczeniu.

Obiecującą alternatywą w leczeniu zakażeń bakteryjnych wydaje się tzw. przeciwdrobnoustrojowe światło niebieskie (aBL). W ostatnich kilkunastu latach pojawiło się wiele prac opisujących skuteczność i zalety tego nowego podejścia metodycznego, w którym wykorzystuje się bakteriobójcze działania światła z zakresu 400 - 470 nm. W przeciwieństwie do pokrewnej metody – tzw. antymikrobowej fotodynamicznej inaktywacji (aPDI), przeciwdrobnoustrojowe światło niebieskie nie wymaga egzogennych fotosensybilizatorów, ponieważ w procesie tym foto-aktywowane są chromofory endogenne, działające jak fotosensybilizatory. Warto podkreślić, że terapeutyczne efekty aBL przeciwko bakteriom zdecydowanie przeważają nad szkodliwym działaniem w stosunku do komórek gospodarza. Pomimo wielu badań nad aBL, w których istotną rolę odegrali również naukowcy z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUmed, niektóre aspekty aBL wymagają dalszych badań. Dotyczy to zwłaszcza szczegółowych mechanizmów działania tej terapii przeciwbakteryjnej oraz pełnego zrozumienia podstaw genetycznych odpowiedzi bakteryjnej na

aBL. Tym ważnym i aktualnym aspektem terapii przeciwbakteryjnej z wykorzystaniem światła niebieskiego poświęcona jest recenzowana praca doktorska mgr Beaty Kruszewskiej-Naczk, zatytułowana „Genetic basis of bacterial responses to antibacterial blue light: implications for safety and resistance development”. Praca ta została wykonana na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem pracy jest dr hab. Mariusz Grinholc profesor UG, a promotorem pomocniczym dr Aleksandra Rapacka-Zdończyk z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i MUG. Rozprawa mgr Beaty Kruszewskiej-Naczk ma format doktoratu artykułowego i zawiera zbiór pięciu ściśle powiązanych artykułów naukowych opublikowanych w latach 2024-2026 w prestiżowych czasopismach naukowych, których sumaryczny współczynnik przebiccia, tzw. impact factor, wynosi 42. Są to prace współautorskie przy czym mgr B. Kruszewska-Naczk jest pierwszym autorem wszystkich tych publikacji. Recenzowana rozprawa doktorska napisana jest po angielsku i składa się z siedmiu krótkich rozdziałów, zawierających streszczenie po polsku i po angielsku, wykaz używanych skrótów, wprowadzenie, hipoteza i cele pracy, przegląd publikacji oraz podsumowanie i wnioski. W załączniku znajduje się pięć kompletnych publikacji, które stanowią podstawę pracy doktorskiej mgr Kruszewskiej-Naczk. Rozprawa zawiera oświadczenia wszystkich współautorów publikacji o własnym wkładzie w powstanie tych publikacji i kończy się wykazem 35 najważniejszych odnośników do literatury, które cytowane były przez doktorantkę we wprowadzeniu. W tym zwięzłym trzy-stronicowym rozdziale rozprawy doktorskiej, doktorantka krótko przedstawiła wyzwania stojące przed lecnictwem i przemysłem spożywczym związane ze wzrastającą antybakteryjną opornością oraz scharakteryzowała istotę toksycznego działania światła niebieskiego, polegającego na wytworzeniu w komórkach bakteryjnych stresu oksydacyjnego w wyniku fotosensybilizowanego generowania reaktywnych form tlenu, przy udziale endogennych porfiryn i flawin. Doktorantka podkreśla, iż chociaż nie stwierdzono oporności bakterii na aBL, bakterie mogą wytworzyć tolerancję w stosunku do tej terapii, dlatego niezmiernie ważnym jest wyjaśnienie genetycznego podłoża odpowiedzi bakteryjnej na aBL. To krótkie wprowadzenie nie jest przeglądem literatury, jaki zwykle znajduje się w monograficznych doktoratach. Nie jest to jednak konieczne, ponieważ jedną z publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej mgr B. Kruszewskiej-Naczk jest obszerny artykuł przeglądowy, zatytułowany „Mechanisms and determinants of bacterial susceptibility to antibacterial Blue Light: from chromophores to transcriptomes”, który w 2026 roku został opublikowany w wysoko-impaktowym czasopiśmie *Drug Resistance Updates*. W krótkim dwustronicowym komentarzu do tego artykułu doktorantka podsumowuje najważniejsze fizykochemiczne i biologiczne aspekty odpowiedzi na antybakteryjnej światło niebieskie, podkreślając, że efektywność aBL zależy od złożonych oddziaływań, w których istotną rolę odgrywa dostępność endogennych chromoforów, działających jako fotosensybilizatory, genetyczne podłoże bakterii, stan fizjologiczny komórek oraz warunki zewnętrzne. Ten przeglądowy artykuł to rodzaj kompendium współczesnej wiedzy o przeciwbakteryjnym działaniu światła niebieskiego. Autorzy tej publikacji podkreślają wielotargetowe działanie aBL, w którym reaktywne formy tlenu, fotogenerowane przez endogenne porfiryny, flawiny i ewentualne inne pigmenty bakteryjne w procesach fotodynamicznych, działają toksycznie. B. Kruszewska-Naczk i współautorzy odnoszą się do nowych badań zwracających uwagę na alternatywny mechanizm komórkowego działania reaktywnych form tlenu: w działaniu tym wytworzony stres oksydacyjny komórek może wywoływać ich specyficzną odpowiedź i przeprogramowanie metaboliczne. Chociaż powszechnie uważa się, że tzw. Typ I i Typ II fotosensybilizowanego utleniania odpowiedzialny jest za fizykochemiczne mechanizmy aBL, możliwa jest fotoinaktywacja bakterii niezależna od tlenu. W tzw. Typie III reakcji fotochemicznej

toksycznym produktem jest fotomodyfikowany fotosensybilizator. Można się zgodzić z B. Kruszewską-Naczek i współautorami, że proces ten w przypadku aBL, gdzie fotoaktywowane są endogenne chromofory, wydaje się mało prawdopodobny. W drugim i trzecim rozdziale artykułu przeglądowego omawiane są kluczowe właściwości endogennych porfiryn, flawin oraz barwniki syntetyzowane przez *S. aureus* i *S. agalactiae*. Autorzy pracy podkreślają że chociaż porfiryne ze względu na swoje fotofizyczne i fotochemiczne właściwości wydają się być odpowiedzialne za dominującą rolę w aBL, w niektórych przypadkach nie można wykluczyć flawin jako pomocniczych, czy nawet głównych chromoforów aBL. Natomiast rola stafyloksantyny i granadyny w aBL nie jest całkowicie wyjaśniona ponieważ barwniki te mogą wykazywać zarówno ochronne jak i fotosensybilizujące właściwości. Rola alternatywnych barwników bakteryjnych w stosunku do porfiryn w aBL wydaje się szczególnie istotna w przypadku streptokoków i enterokoków, które pozbawione są zdolności biochemicznej syntezy porfiryn. Wrażliwości na aBL tych bakterii poświęcony jest rozdział czwarty pracy przeglądowej. W rozdziale piątym autorzy publikacji omawiają molekularne targety i letalne mechanizmy aBL, koncentrując się na procesach peroksydacji lipidów i związanych z tym uszkodzeniem struktury i funkcji błon, oksydacyjnych uszkodzeń DNA i wynikających z nich niestabilności genetycznych oraz utlenienie białek i utracie ich aktywności enzymatycznej. Rozdział szósty przedstawia najważniejsze aspekty genetycznej odpowiedzi bakterii na aBL, koncentrując się na genach związanych z otoczką komórkową, genach zaangażowanych w uszkodzeniu i naprawie DNA oraz genach odpowiedzi na stres oksydacyjny. Chociaż geny te wydają się pełnić kluczową rolę w podatności bakterii na aBL, autorzy omawianej publikacji przewidują, iż inne niezidentyfikowane jeszcze geny również mogą determinować wrażliwość bakterii na aBL. Kolejny rozdział poświęcony jest omówieniu odpowiedzi transkryptomicznej na stres oksydacyjny indukowany przez aBL. Istotną rolę może tu odgrywać hamowanie ruchliwości bakterii, przeprogramowanie metabolizmu energii, przebudowa otoczki komórkowej, przebudowa błony komórkowej, regulacja biosyntezy ściany komórkowej i otoczki, regulacja jonów metali w bakteriach oraz modulacja wirulencji i aktywacji pro-fagowej. W rozdziale ósmym autorzy pracy przeglądowej omawiają mikrobiologiczne determinanty podatności na aBL, zwracając szczególną uwagę na różnice pomiędzy gatunkami i szczepami bakterii, wpływ filogenezy, oporność na antybiotyki oraz czynniki wirulencji. Rozdział dziewiąty opisuje wpływ czynników środowiskowych i fizjologicznych na efektywność aBL, w tym fazy wzrostu bakterii, temperatury, gęstości zaszczepu i pożywki bakteryjnej, oraz długości fali promieniowania i natężenia napromieniania użytego w aBL. Artykuł kończy się kilkoma najważniejszymi wnioskami, przy czym autorzy zwracają uwagę na szereg czynników zarówno biologicznych i technicznych jak i względy regulacyjne, które dotychczas ograniczają translacyjne zastosowania aBL. W przekonaniu autorów, pokonanie tych przeszkód wymagać będzie dalszych intensywnych badań prowadzących do optymalizacji gatunkowo-zależnych parametrów aBL, dokładniejszego poznania dynamiki reaktywnych form tlenu generowanych w warunkach biologicznych oraz skrupulatnej oceny powtarzalności wyników otrzymywanych w różnych platformach doświadczalnych.

Praca doktorska mgr B. Kruszewskiej-Naczek opiera się na hipotezie, iż odpowiedź bakteryjna na aBL jest złożonym procesem zależnym od wielu genów biorących udział w naprawie DNA, odpowiedzi na stres oksydacyjny i utrzymanie otoczki komórkowej. Głównym celem badań była więc identyfikacja genów zaangażowanych w odpowiedzi bakteryjnej na aBL oraz charakteryzacja roli tych genów w komórkowym mechanizmie protekcji i ocena ryzyka potencjalnego rozwoju oporności na aBL. Dla osiągnięcia głównego celu pracy, doktorantka

zaplanowała realizację pięciu szczegółowych celów, polegających: na identyfikacji genów zaangażowanych w odpowiedzi na aBL kolekcji mutantów Keio w pojedynczych genach E. coli BW25113, ocenie roli ochronnych genów na aBL w odpowiedzi na pojedynczy stresor, jaki może być generowany przez aBL, ustalenie zmian w ekspresji poziomu wybranych genów po ekspozycji aBL przy pomocy analizy qPCR, oszacowanie, który z genów może być zaangażowany w potencjalnym ryzyku wytworzenia oporności E. coli na aBL, ocenie potencjalnego ryzyka wytworzenia tolerancji krzyżowej na aBL i ciepło w aplikacjach związanych z bezpieczeństwem żywności.

W pierwszej doświadczalnej pracy cyklu artykułów zatytułowanej „Can antibacterial blue light contribute to resistance development ? Genome-wide analysis revealed aBL protective genes in Escherichia coli”, opublikowanej w 2024 w *Microbiology Spectrum*, opisane są badania przesiewowe z użyciem 3985 mutantów E. coli BW25113 z nokautem pojedynczego genu z tzw. kolekcji Keio. Prawdopodobnie są to pierwsze badania, w których przeprowadzono analizę całego genomu mutantów E. coli w odpowiedzi na aBL. Napromienianie światłem o długości fali 415 nm umożliwiło wyznaczyć subletalne dawki promieniowania dla szczepu dzikiego oraz letalne dawki dla 64 mutantów superwrażliwych na aBL. Okazało się, że usunięte geny odpowiedzialne za obserwowaną wrażliwość na aBL zaangażowane są w licznych procesach komórkowych takich jak metabolizm, biosynteza, regulacja, naprawa DNA, odpowiedź na stres i inne. Niemal połowa produktów tych genów zlokalizowana jest w błonie plazmatycznej, liposacharydach i zewnętrznej błonie. Ustalenie to wspiera ogólnie akceptowany pogląd, że otoczka bakteryjna jest głównym targetem aBL. Komplementacja usuniętych genów w przypadku wybranych mutantów doprowadziła do przywrócenia dzikiego typu bakterii, które charakteryzowały się podobną lub nawet wyższą tolerancją na aBL. Badania B. Kruszewskiej-Naczk i współpracowników wskazują na wieloczynnikową odpowiedź bakterii na aBL, co zmniejsza ryzyko wytworzenia oporności bakterii na ten rodzaj leczenia.

Druga doświadczalna praca cyklu artykułów stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej B. Kruszewskiej-Naczk, zatytułowana „Mimicking the effect of antimicrobial blue light: exploring single stressors and their impact on microbial growth”, została opublikowana w 2024 roku w *Antioxidants*. Badania opisane w tej pracy miały wyjaśnić rolę ochronnych genów w aBL, poprzez analizę odpowiedzi na działanie wybranych pojedynczych czynników stresogennych, jakie mogą być zaangażowane w aBL. Autorzy omawianej pracy porównali fotowrażliwość 64 mutantów E. coli z nokautem pojedynczego genu z wrażliwością na działanie pojedynczego stresora. Czynnikiem stresogennym były reaktywne formy tlenu – tlenek azotu, generowany w kulturze bakteryjnej przez nitroprusydek sodu, anionorodnik nadadtlenkowy generowany przez parakawat, rodnik hydroksylowy generowany przez CuCl_2 i H_2O_2 , sam nadadtlenek wodoru, środowisko kwasowe wytworzone przez dodatek HCl oraz stres błonowy w wyniku dodatku Tritonu X. Uzyskane wyniki zostały poddane wyszukanej analizie statystycznej, która wskazuje na największą rolę rodnika hydroksylowego i anionorodnika nadadtlenkowego w odpowiedzi badanych bakterii na aBL. Wzrost bakterii był również hamowany w wyniku działania tlenu azotu, nadadtlenku wodoru i stresu błonowego. Autorzy pracy nie stwierdzili dodatniej korelacji pomiędzy wrażliwością mutantów na pojedynczy stresor i aBL, co sugeruje, iż bakteriobójczy efekt aBL raczej wynika ze wspólnego działania wielu czynników stresogennych generowanych w tej procedurze. Zastosowane analizy głównych składowych umożliwiło autorom artykułu pogrupowanie badanych mutantów w trzech odrębnych klastrach różniących się profilem wrażliwości. Klaster 1 zawierał geny zaangażowane głównie w fundamentalnych procesach komórkowych. Klaster 2 zawierał geny związane z produkcją energii, adaptacją środowiskową,

odpowiedzią na stres, detoksyfikacją i biosyntezą kwasów tłuszczowych. Natomiast klaster 3 zawierał geny odpowiedzialne za kontrolę jakości białek oraz syntezę nukleotydów. W pełni doceniając znaczenie uzyskanych przez doktorantkę i jej współpracowników wyników, dziwię się, że wśród analizowanych oksydacyjnych stresorów pominięty został tlen singletowy, który bez wątpienia należy do najważniejszych ROS generowanych procesach aBL. Jaka była przyczyna tej decyzji, czy rola tlenu singletowego analizowana była w niezależnych badaniach?

Kolejna praca cyklu artykułów, zatytułowana jest „Identification and validation of reference genes for quantitative gene expression analysis under 409 and 415 nm antibacterial blue light treatment”. Praca ta została opublikowana w 2025 roku w *Frontiers in Molecular Sciences*. Głównym celem badań opisanych w tej pracy było porównanie ekspresji poziomu wybranych genów zaangażowanych w ochronie bakterii przed aBL oraz porównanie profilu ekspresji genów po aBL przy zastosowaniu promieniowania o długości fali 409 nm oraz 415 nm. Aby osiągnąć ten cel należało najpierw ustanowić gen referencyjny, który wykazywałby stabilną ekspresję po aBL. Z 10 rozważanych genów ostatecznie wybrano gen *ihfB*, kodujący podjednostkę beta czynnika integracyjnego gospodarza w bakteriiach *E. coli*, który okazał się najbardziej stabilny po aBL zarówno przy użyciu promieniowania 409 nm jak i 415 nm. Największą stabilność po aBL wykazały ponadto geny *cysG-gyrA*, które można traktować jako kombinację genów referencyjnych. W podsumowaniu pracy Kruszewska-Naczka i współautorzy stwierdzają, że nie ma uniwersalnych genów referencyjnych ze stałą ekspresją, które można by wykorzystać przy analizie skutków indukowanych dowolnym czynnikiem stresogennym. Oznacza to konieczność ewaluacji genów referencyjnych dla każdego testowanego stresora.

Ostatnia doświadczalna praca z cyklu artykułów wykorzystanych w rozprawie doktorskiej Beaty Kruszewskiej-Naczka zatytułowana jest „Antibacterial blue light is a promising tool for inactivating *Escherichia coli* in the food sector due to its low risk of cross-stress tolerance”, która została opublikowana w 2024 roku w *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. Praca opisuje i analizuje wyniki badań przeprowadzonych na 64 mutantach *E. coli* BW25113 wrażliwych na aBL, które poddane były działaniu promieniowania o długości fali 415 nm oraz podwyższonej temperaturze. Ekspozycja bakterii na działanie tych stresorów prowadziła do wytworzenia fenotypowo stabilnej tolerancji na aBL i ciepło. Stwierdzono, że populacje ze zwiększoną tolerancją na aBL również wykazywały zwiększoną tolerancję na podwyższoną temperaturę, podczas gdy wrażliwość populacji z tolerancją na temperaturę nie ulegała zmianie w stosunku do aBL. Badania te doprowadziły do identyfikacji 11 genów, które mogą być zaangażowane w rozwoju tolerancji krzyżowej. Ważną obserwacją wynikającą z tych badań jest brak istotnych zmian wrażliwości na antybiotyki szczepów bakterii z wytworzoną tolerancją na aBL oraz ciepło. W konkluzji autorzy omawianej publikacji stwierdzają, że wyniki przedstawionych badań potwierdzają stosowalność aBL jako uzupełniającej metody inaktywacji drobnoustrojów w przemyśle spożywczym.

W siódmym rozdziale rozprawy doktorantka zwięźle podsumowała kluczowe wyniki osiągnięte w badaniach i sformułowała najważniejsze wnioski jakie z nich wynikają. Można się zgodzić z doktorantką, że przedstawione wyniki badań potwierdzają przyjętą hipotezę rozprawy, iż odpowiedź bakteryjna na aBL jest złożonym procesem, w którym pośredniczy wiele genów zaangażowanych w naprawie DNA, odpowiedzi na stres oksydacyjny, oraz utrzymanie otoczki komórkowej. Geny te determinują wrażliwość bakterii na aBL i mogą wpływać na potencjalne ryzyko wytworzenia oporności na ten rodzaj terapii. Uważam, że główny cel rozprawy doktorskiej jak i cele szczegółowe zostały pomyślnie zrealizowane.

Na ile mogę sam ocenić, język angielski w jakim została zredagowana rozprawa doktorska jest klarowny i poprawny. Nie zauważyłem wyraźnych błędów typograficznych z wyjątkiem paru literówek, które powtarzają się w kilku miejscach. Zwłaszcza chodzi o chemiczny symbol anionorodnika nadotlenkowego, który na stronach 10, 19, 24, 25 i 33 przedstawiony jest jako O_2^- lub O_2^- , każdy bez kropki zaznaczającej rodnikowy charakter tej reaktywnej formy tlenu. Jest to o tyle niezrozumiałe, że tlenek azotu i rodnik hydroksylowy zostały poprawnie oznaczone przez doktorantkę.

Uważam, że rozprawa doktorska mgr Beaty Kruszewskiej-Naczk zawiera rozwiązania ważnych i aktualnych problemów naukowych wnosząc istotny wkład do nauki światowej z zakresu biotechnologii i fotobiologii. Tym samym rozprawa ta spełnia wymagania stawiane w postępowaniach doktorskich, czyniąc zadość warunkom określonym w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dz. Ustaw z 2003 r.; Nr 65 poz. 595; z 2005 r. Nr 164 poz. 1365; z 2010 r., Nr 96, poz. 620, Nr.182 poz. 1228; z 2011 r. Nr 84, poz. 455). W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Beaty Kruszewskiej-Naczk do kolejnych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie biotechnologia.

Z uwagi na wyjątkowe osiągnięcia naukowe przedstawione w ocenianej rozprawie doktorskiej, zwłaszcza dotyczące identyfikacji genów odpowiedzialnych za ochronę bakterii *E. coli* przed aBL oraz ocenę bezpieczeństwa aBL jako metody inaktywacji drobnoustrojów w przemyśle spożywczym, które zostały potwierdzone publikacjami współautorstwa doktorantki w czołowych specjalistycznych czasopismach naukowych, wnioskuję o wyróżnienie Beaty Kruszewskiej-Naczk stosowną nagrodą.



/Tadeusz Sarna/