



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 22 wrzesień 2022 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Krystyny Ogonowskiej pt.
**„Metoda fotodynamiczna jako potencjalne narzędzie eradykacji
Staphylococcus aureus kolonizującego chorych z atopowym
zapaleniem skóry”.**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Patrycji Krystyny Ogonowskiej przygotowana pod kierunkiem Promotora, profesora Uniwersytetu Gdańskiego, Pani dr hab. Joanny Nakoniecznej lokuje się w nurcie bardzo ważnych naukowo i pożądanym przez praktykę medyczną badań mających na celu opracowanie i wprowadzenie do praktyki leczniczej nowatorskiej metody zwalczania patogennych drobnoustrojów szczególnie uciążliwych w nadkażeniach ran pacjentów cierpiących na *atopic dermatitis* - atopowe zapalenie skóry, AZS.

Atopowe zapalenie skóry to jedna z najczęstszych chorób alergicznych skóry, rejestrowanych po katarze siennym i astmie oskrzelowej, dotycząca niemal 30% dzieci i ok. 4% dorosłych. Choroba wykazuje systematyczny coroczny wzrost na poziomie 4% w skali globalnej. Jest to choroba przewlekła, nawracająca, wieloczynnikowa, w której genezę i patofizjologię zaangażowane są interakcje pomiędzy genetycznie uwarunkowanymi zaburzeniami struktury i funkcji bariery naskórkowej, odpowiedzi immunologicznej i zapalnej oraz czynnikami środowiskowymi i zakażającymi. U osób nią dotkniętych często dochodzi do rozwoju wtórnych zakażeń bakteryjnych zmian skórnych przez drobnoustroje, wśród których zdecydowanie dominuje gatunek *Staphylococcus aureus*, zaliczany do patogenów oportunistycznych. Praktyka terapeutyczna wprowadziła standardy leczenia, które z powodów wskazanych powyżej – wieloczynnikowych uwarunkowań i zmienności wpływu elementów środowiska, ze szczególnym uwzględnieniem zmienności bakterii – statystycznie nie dają satysfakcjonujących wyników. Praktyka pokazuje, że terapie z użyciem antybiotyków, chemioterapeutyków a nawet sterydów nie przynoszą trwałej poprawy u pacjentów, co więcej, dodatkowo generują niepożądane zjawiska.

*Z tych powodów projekt doktorantki Pani Patrycji K. Ogonowskiej polegający na opracowaniu alternatywnego podejścia terapeutycznego, oryginalnej metody fotodynamicznej do eradykacji bakterii zakażających zmiany skórne w AZS ma bardzo dużą wartość naukową z perspektywą aplikacji w praktyce klinicznej. Podkreślić należy, że projekt dotyczy bakterii komensalnego gatunku *S. aureus*, charakteryzującego się złożonymi mechanizmami regulacji genetycznych i wynikającą z tego plastycznością fenotypową. Recenzent bardzo wysoko ocenia koncepcję, odwagę naukową i podejście badawcze Autorki.*

Prof. dr hab. farm.

Jacek Międzobrodzki

Mikrobiolog,
Diagnosta laboratoryjny,
Specjalista zdrowia publicznego

Zakład Mikrobiologii

Wydział

Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

PL 30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 7

tel. +48(12) 664 63 71

tel. +48(12) 664 63 83

fax. +48(12) 664 69 02

jacek.miedzobrodzki@uj.edu.pl

Rozprawa doktorska została przygotowana w Zakładzie Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod opieką naukową profesora UG Pani dr hab. Joanny Nakoniecznej. Promotor, jak i kierowany przez Panią Profesor zespół, mają ugruntowaną wysoką pozycję naukową dzięki bardzo dobrym publikacjom z dziedziny mikrobiologii molekularnej dotyczących mechanizmów wrażliwości bakterii na związki fotouczulające i oryginalnych metod zwalczania patogennych drobnoustrojów metodami alternatywnymi do powszechnych antybiotykoterapii i chemioterapii. Tradycja tych badań prowadzonych przez promotora jest zdaniem recenzenta ważna dla doktorantów w tego typu projektach, a w przypadku zespołu gdańskiego wyniki badań są bardzo rzetelnie opracowywane i ogłaszane w wysoko punktowanych periodykach indeksowanych w międzynarodowych bazach danych, jak Scientific Reports, Frontiers in Medicine, Frontiers in Microbiology, Future Medical Chemistry i in.

Rozprawa doktorska mgr P. K. Ogonowskiej została przygotowana w formie dysertacji napisanej w języku polskim zgodnie z kanonem przyjętym na uniwersytetach. Praca ma logiczny układ i czyta się ją ze zrozumieniem poszczególnych wątków badawczych. Składa się z konwencjonalnych części; wyjątkiem jest załączony w końcowej części „12 Supplement” na stronach od 154 do 187 (25 strony), zawierający spisy izolatów bakteryjnych z metryczkami, dzikich i szczepów referencyjnych oraz wyniki genotypowania szczepów z podaniem typu genetycznego i kompleksu klonalnego oraz tabele z wynikami badania efektywności przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej wobec drobnoustrojów; dalej następuje w tej części „13 Wykaz rycin” w liczbie 24 (2 strony), „14 Wykaz tabel” w liczbie 17 (1 strona), „15 Dorobek naukowy”(4 strony) obejmujący publikacje naukowe w liczbie 6, gdzie w 3 nazwisko Autorki figuruje na pierwszym miejscu, wystąpienia konferencyjne (11), dwa wyszczególnione granty, w jednym Autorka jest kierownikiem (grant dla młodych naukowców), w drugim głównym wykonawcą; w dalszym ciągu wykaz 3 nagród (stypendium konferencyjne z Eur. Soc. Photobiol., 2 stypendia dla najlepszych doktorantów UG i GUMed i JM Rektora). Tę część kończy wykaz 3 publikacji w materiałach pokonferencyjnych (we wszystkich doktorantka jest pierwszym autorem). Objętość dysertacji jest spora, gdyż liczy 187 stron.

Wyodrębnienie zestawu dokumentacji w Suplemencie było bardzo dobrą decyzją ułatwiającą czytanie, jak również poważna objętość pracy są usprawiedliwione i akceptowane biorąc pod uwagę złożoną tematykę projektu, pokazny zestaw metod badawczych i bardzo liczne wyniki, które wymagały precyzyjnego i systematycznego opracowania.

Maszynopis na 187 stronach zaczyna się „Spisem treści. Całość obejmuje kolejno następujące części: „Streszczenie” (1 strona) i „Abstract” (1 strona), „Wstęp” (20 stron), sformułowanie celów pracy (1 strona), specyfikacja użytych materiałów (16 stron), przedstawienie stosowanych metod badawczych (21 stron), opis uzyskanych wyników i ich omówienie (37 stron), „Dyskusja” (17 stron), „Wnioski” (1 strona) i „Literatura” (309 pozycji na 31 stronach). Ryciny to bardzo dobrej jakości fotografie oraz rysunki ilustrujące wybrane badania eksperymentalne.

Na tym etapie recenzent gratuluje doktorantce, autorce rozprawy, sprawnego rozdysonowania bogatym oryginalnym materiałem badawczym, posiadaną wiedzę, i zorganizowania redakcji rozprawy.

Dysertację otwiera rozdział „Wstęp”. Autorka w akademicki sposób wprowadza w złożony proces patogenezy i mechanizmy AZS, kolonizację zmian skórnych przez *Staphylococcus aureus*, czynniki zjadliwości generujące mechanizmy zjawisk wtórnych w skórze, głównie przez metabolity bakteryjne (też bakterii towarzyszących) i białek naskórkowych, w rolę enzymów i toksyn gronkowcowych, wśród nich mających cechy superantygenów. Ważny akapit mówi o złożonych systemach regulacji genetycznej ekspresji toksyn gronkowcowych i szlakach sygnałowych nakładających się na siebie co komplikuje rozpoznanie całkowitej regulacji genów z konkluzją o potrzebie badania klinicznych izolatów *S. aureus* od pacjentów z AZS, zaawansowanymi metodami molekularnymi, gdyż lepsze rozpoznanie tych szczepów rokuje efektywne poszukiwanie innych, alternatywnych metod leczenia zakażeń. Logiczną kontynuacją tej myśli jest kolejny rozdział 4.8 pt. „Terapia fotodynamiczna jako skuteczna metoda eradykacji *S. aureus*”, która teoretycznie rokuje pozytywnie, zważywszy na ograniczone możliwości terapeutyczne tradycyjnej antybiotykoterapii wynikające z aktywności toksyn gronkowcowych posiadających właściwości superantygenów indukujących oporność limfocytów T na kortykosteroidy. Z tego właśnie powodu w obszarze zainteresowania znajduje się alternatywna forma leczenia przeciwdrobnoustrojowego jaką jest terapia fotodynamiczna określana w piśmiennictwie także nazwą przeciwbakteryjnej inaktywacji fotouczuleniowej, która w przeciwieństwie do leczenia miejscowego samym światłem – fototerapii, nie niesie skutków ubocznych jak fototerapia. Kolejne podrozdziały opisują szczegółowo mechanizm terapii fotodynamicznej i jej zastosowanie w praktyce klinicznej. Uwagę recenzenta zwraca szczegółowo opisany mechanizm zjawiska, z wyborem fotouczulacza i źródła światła niezbędnego do jego wzbudzenia. Cytowane są nieliczne „młode” publikacje autorów polskich i obcych, z podkreśleniem udziału rodzimych badaczy, w tym zespołu pracowników GUMedu. Reasumując, pierwszorzędą potrzebą jest poszukiwanie metod eradykacji *S. aureus*, a metoda fotodynamiczna otwiera szanse wyleczenia nią przez skuteczne wyeliminowanie bakterii, co więcej, przez inaktywację czynników wirulencji odgrywających ważną rolę w przebiegu AZS. Właśnie tym Autorka uzasadnia podjętą w badaniach analizę efektywności metody fotouczuleniowej/fotodynamicznej i ocenę jej potencjału w eradykacji *S. aureus* oraz inaktywacji wybranych toksyn.

Rozdział ten jest bardzo dobrym wprowadzeniem do kolejnych rozdziałów pracy, integrującym obszary badawcze przedstawione w kolejnych etapach projektu. Uwagę zwraca rzetelne wprowadzenie w złożoną problematykę choroby AZS z etapami kolonizacji drobnoustrojami – gronkowcem złocistym, z jego charakterystykami genetyczną i biochemiczną determinującymi wirulencję, a potem problemami terapeutycznymi z eradykacją bakterii i choroby ze szczególnym uwzględnieniem metody fotodynamicznej eradykacji drobnoustrojów. Doktorantka ze znanostwem i interesująco przytacza wiedzę na ten temat.

*Cele pracy sformułowane w kolejnym rozdziale są racjonalne, logiczne i nie budzą wątpliwości pod względem przesłanek. Zostały określone jednoznacznie; są oryginalnym i wartościowym wkładem do nauki. Objęły one: i) genotypową charakterystykę klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus* pochodzących od pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (AZS); ii) oceny efektywności metody fotodynamicznej wobec szczepów klinicznych i referencyjnych *S. aureus*; iii) zbadanie wpływu metody fotodynamicznej na ekspresję genów zapisujących ważne gronkowcowe toksyny na poziomie transkryptu i białka; iv) weryfikacje efektywności metody fotodynamicznej na dwóch modelach eksperymentalnych: *ex vivo* z użyciem hodowli skóry świni domowej oraz *in vivo* z użyciem skóry mysiej.*

*Następny rozdział to „Materiały” i kolejny „Metody”. Zarówno materiały jak i metody badawcze opisano właściwie i w sposób wystarczający aby czytelnik mógł ocenić prawidłowość eksperymentów i wypracować własny pogląd na temat wartości naukowej przedstawionych wyników. Badania zostały rozłożone racjonalnie na kilka etapów w sposób logiczny, po czym je konsekwentnie zrealizowano. Recenzent wysoko ocenia wiedzę i umiejętności autorki w zakresie doboru szczepów bakteryjnych, umiejętności wykorzystania typowania genetycznego spa i zbadania kompleksów klonalnych uzyskanych szczepów, preparatykę RNA, opanowanie nieodzownych technik molekularnych, badań przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej oraz cyto- i fototoksyczności związków fotouczulających z użyciem testu MTT. Wysokie uznanie recenzenta wzbudzają metody weryfikacji efektywności przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej aPDI z zastosowaniem modelu *ex vivo* skóry świni domowej oraz drugiego modelu - *in vivo*, kolonizacji przez *S. aureus* skóry mysiej. Warsztat badawczy do rozwiązania postawionych zadań został wybrany prawidłowo. Badania wykonywane nawet najbardziej zaawansowanymi metodami *in vitro* nie dają tak wiarygodnych i cennych wyników jak badania z użyciem eksperymentalnego zwierzęcego modelu *in vivo*. Są to poważne osiągnięcia naukowe. Recenzent zwraca uwagę na ich wysokie wartości poznawcze i aplikacyjne dla klinicyстів.*

W czasie obrony recenzent będzie oczekiwał na wyjaśnienia i komentarze Doktorantki dotyczące dwóch aspektów. 1) Szczepy referencyjne użyte w badaniach: jakie kryteria zastosowano w ich wyborze? 2) Jaki skład i właściwości miała maść użyta do depilacji skóry myszy? Czy stosowanie maści nie wpływało na zmianę środowiska chemicznego skóry i pośrednio na wyniki badań? Czy wykonywano odpowiednie próby kontrolne „ślepe” w testach na modelu skóry myszy?

Najobszerniejszy w całej rozprawie rozdział „Wyniki” liczy 37 stron. Autorka uzyskała obfitość oryginalnych wyników, które sprawnie zaprezentowała dzieląc ten rozdział na szereg podrozdziałów, dodatkowo ilustrowanych 24 rycinami (w tym fotografie) i 17 tabelami. Do najważniejszych osiągnięć mgr P. K. Ogonowskiej należą: i) charakterystyka genetyczna szczepów gatunku *Staphylococcus aureus* pochodzących od pacjentów z atopowym zapaleniem skóry i wykazanie dużego zróżnicowania tej populacji; ii) wykazanie, że efektywność wobec tych szczepów fotodynamicznej inaktywacji nie zależy od zjadliwości wynikającej z ich toksyn; iii) wykazanie, że w czasie inaktywacji fotodynamicznej następuje spadek ekspresji genów enterotoksyn A, B, C i D, natomiast wzrost ekspresji genu toksyny-1 zespołu wstrząsu toksycznego (TSST-1); iv) stwierdzenie utraty aktywności toksyn

gronkowcowych w czasie inaktywacji fotodynamicznej; v) rozpoznanie właściwości fotouczulacza rózu bengalskiego ze światłem zielonym polegających na spadku przeżywalności komórek *S. aureus* i obniżeniu poziomu toksyn gronkowcowych w modelach *ex vivo* oraz *in vivo*, stanowiących skuteczną możliwość terapeutyczną w zwalczaniu tego gatunku w skórze.

Wyniki uzyskane przez doktorantkę mają wysoką wartość naukową, wnoszą cenne informacje o badanym zjawisku fotodynamicznej inaktywacji bakterii jako potencjalnej metodzie terapeutycznej do eradykacji bakterii Staphylococcus aureus w leczeniu chorych z atopowym zapaleniem skóry. Doktorantka wykazała determinację badacza decydując się na badania in vivo oraz ex vivo z wykorzystaniem dwóch zwierzęcych modeli eksperymentalnych, co było nader wskazaną częścią projektu i przysporzyło bardzo wartościowych wyników. Wykonane w pierwszej fazie projektu analizy molekularne izolatów S. aureus mają dodatkowo bardzo wysoką wartość, niezależnie od głównego tematu projektu, gdyż jako cechy oportunistycznych patogenów, mogą dać podstawy do przyszłej genetycznej terapii opartej na wykorzystaniu zjawisk regulacji genetycznych (supresji genów wirulencji i lekooporności) tego gatunku.

Uwagę czytelnika zwraca wysoka liczba uzyskanych przez doktorantkę wyników o dużej wartości poznawczej, stąd kolejny rozdział „Dyskusja” wymagał dużej dyscypliny i logiki. Doktorantka wywiązała się sprawnie z tego wyzwania. Wprowadziła podrozdziały z tytułami, porządkującymi i ułatwiającymi czytanie tego długiego rozdziału. W sposób dojrzały krytycznie skomentowała swoje osiągnięcia odnosząc się do wiedzy i wyników innych autorów.

Kolejny rozdział „Wnioski”, str. 122, zawiera treść, która nie jest w całości adekwatna do jego tytułu, gdyż zawiera zarówno wyniki jak i wnioski, przedstawione zwięźle w 5 punktach. Recenzent sugerowałby albo poprawić i konsekwentnie przedstawić tylko wnioski (konkluzje) albo inny tytuł tego rozdziału, jak „Podsumowanie i wnioski”, ze wskazaniem drugiego.

Kolejny rozdział to „Literatura” obejmujący 309 pozycji (na 30 stronach). Czy była potrzeba cytowania aż tak imponującej liczby publikacji? Autorka może tłumaczyć się interdyscyplinarnym tematem projektu i licznymi metodami badawczymi, co może być do zaakceptowania. Recenzent zauważył brak konsekwencji wyrażający się niejednorodnym cytowaniem publikacji autorstwa wyższej niż trzy nazwiska, w pewnych pozycjach występuje 7 i więcej autorów, a w pewnych troje pierwszych i informacja „i in.”. *W większości są to publikacje z ostatniej dekady, co dowodzi bardzo dobrego przygotowania doktorantki do przeprowadzania badań, a cytowania klasyków, takich autorów jak Hanifin, Ring, Rajka, Abeck, Mempel, ale też autorów rodzimych, wskazuje na dużą rzetelność autorki.* Całość pracy zwięźcza rozdział 12 „Suplement”, opisany powyżej.

Strony edytorska i językowa. Oceniana praca doktorska została przygotowana bardzo starannie. Tekst jest napisany zwięzłym, przejrzystym językiem, zdania są pełne i zrównoważone. Zamieszczone ryciny są pokazane w atrakcyjnych formach przyciągających uwagę. Czytanie pracy budzi zainteresowanie czytelnika. Jednak doktorantka nie ustrzegła się pewnych uchybień natury redakcyjnej, które z obowiązku recenzenta są wymienione: i) nowe

zdania nie mogą zaczynać się od skrótów (str. 8, 11x3, 26,115x2), ani od łacińskiej nazwy (str.11); ii) użycie żargonowych określeń, cyt. „enzym tnie”, powinno być „trawi” (str. 21x2) oraz pojęcia „ta bakteria”, powinno być „bakterie” lub „gatunek”, gdyż w języku angielskim „bacteria” oznacza liczbę mnogą i nie używa się słowa „bacterium” - w liczbie pojedynczej (str.11, 20, 29); iii) do określenia zjawisk policzalnych powinno być użyte słowo „liczba” a nie „ilość” (str.117); v) użyta forma osobowa (str. 10); vi) charakterystyka warunków wirowania z podaniem rpm jest niewystarczająca gdyż rozdzielanie frakcji zależy od siły odśrodkowej, a ta zależy nie tylko od prędkości rpm ale też od promienia rotora; dlatego należy podać typ i model wirówki, albo zamiast wartości rpm i cech wirówki podać wartość g (str.32,47,57); vii) interpunkcja: oznaczenie skrótów pełnych nazw wymaga użycia kropki.

W podsumowaniu opisu tej części dysertacji recenzent stwierdza, że wykazane drobne uchybienia redakcyjne absolutnie nie wpływają na wartość merytoryczną dysertacji, ani na całościową wysoką ocenę recenzenta.

Podsumowanie. Mając na uwadze przedstawiony w dysertacji dorobek naukowy Pani mgr Patrycji K. Ogonowskiej recenzent stwierdza, że jest to dorobek solidny, opiera się na bardzo dobrej koncepcji, zawiera oryginalne bardzo wartościowe wyniki, wyznacza nowe kierunki badań i aplikacji, co więcej jednoznacznie wskazuje na wysokie kwalifikacje Doktorantki. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana i zredagowana zgodnie z przyjętym kanonem uniwersyteckim i spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stypendiach i tytule w zakresie sztuk (tekst. jedn. DZ. U. z 2017 r., poz.1789), zgodnie z art.179 ust.1 ustawy z dnia 3.07.2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym (DZ.U. z 2018 r. poz.1669). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego o **dopuszczenie Pani mgr Patrycji Krystyny Ogonowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie rozprawy doktorskiej.**

Kraków, 22 wrzesień 2022 r.



Uzasadnienie wniosku

o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr Patrycji Krystyny Ogonowskiej

pt. „Metoda fotodynamiczna jako potencjalne narzędzie eradykacji *Staphylococcus aureus* kolonizującego chorych z atopowym zapalenie skóry”.

Podstawą wniosku o wyróżnienie ocenionej rozprawy doktorskiej są następujące jej szczególne cechy:

1. Zaobserwowane i wybrane interdyscyplinarne zjawisko kliniczne i mikrobiologiczne, określony temat projektu.
2. Organizacja realizacji projektu badawczego, wybór materiału biologicznego, metod badawczych rutynowych i zaawansowanych molekularnych technik genetycznych i biochemicznych oraz logiczny rozdział na poszczególne etapy badań.
3. Doświadczenie diagnostyczne i eksperymentalne.
4. Dorobek naukowy w postaci bardzo dobrych publikacji oryginalnych ogłoszonych w międzynarodowych periodykach indeksowanych w bazach danych i wysoko punktowanych (impact factor).
5. Całościowe opracowanie mikrobiologiczne i terapeutyczne ważnego wyzwania klinicznego z perspektywą rozwijania badań i aplikacji w praktyce leczniczej.

