

Prof. dr hab. n. med. Aleksandra Kawczyk-Krupka
Katedra i Oddziału Kliniczny Chorób Wewnętrznych,
Angiologii, Medycyny Fizykalnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
ul. Batorego 15, 41-902 Bytom
tel/fax: +48 32 7861630
akawczyk@sum.edu.pl

Bytom, 22.08.2022r

Recenzja pracy doktorskiej na stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne mgr Patrycji Krystyny Ogonowskiej

pod tytułem:

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

wykonana pod kierunkiem Pani Promotor dr hab. Joanny Nakoniecznej, profesora UG Zakład Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej

Tematem pracy doktorskiej jest ocena skuteczności metody fotodynamicznej w eradykacji bakterii ***Staphylococcus aureus*, kolonizujących chorych z atopowym zapaleniem skóry.**

Praca powyższa powstała dzięki finansowaniu ze środków Grantu NCN OPUS „Wpływ przeciwdrobnoustrojowej fotoinaktywacji na wirulencję szczepów *Staphylococcus aureus* kolonizujących chorych z atopowym zapaleniem skóry: badania *in vitro* oraz *in vivo*.”

Grant nr 2017/27/B/NZ7/02323

Rozprawa doktorska **mgr Patrycji Krystyny Ogonowskiej** została przygotowana w oparciu o wyniki własnych badań i napisana w sposób typowy dla rozpraw doktorskich z podziałem na następujące rozdziały: wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim. wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, literatura, suplement, wykaz rycin i tabel, dorobek naukowy.

Całość rozprawy liczy 187 stron i obejmuje 17 tabel oraz 24 ryciny.

Rozprawę rozpoczyna spis treści, z wykazem stosowanych skrótów, tabel oraz rycin. Wstęp liczy 27 stron, na których Doktorantka opisuje atopowe zapalenie skóry, kolonizację skóry przez *S. aureus* u pacjentów z AZS, czynniki sprzyjające kolonizacji *S. aureus* oraz czynniki wirulencji *S. aureus* mające wpływ na zaostrzenie przebiegu AZS, systemy regulacji toksyn, genotypowanie szczepów *S. aureus* wyizolowanych od pacjentów z AZS, dekolonizację skóry

u pacjentów z AZS, terapię fotodynamiczną jako skuteczną metodę eradykacji *S. aureus* oraz terapię fotodynamiczną w praktyce klinicznej.

Kolejnym rozdziałem są cele pracy. Doktorantka skupiła się na charakterystyce genotypowej klinicznych izolatów *Staphylococcus aureus* pozyskanych od pacjentów z atopowym zapaleniem skóry w populacji polskiej, analizie efektywności metody fotodynamicznej wobec izolatów klinicznych i szczepów referencyjnych *Staphylococcus aureus*, ocenie wpływu metody fotodynamicznej na ekspresję genów kodujących kluczowe toksyny gronkowcowe na poziomie transkryptu i białka oraz weryfikacji efektywności metody fotodynamicznej w układzie *ex vivo* na modelu świńskiej skóry oraz *in vivo* na modelu kolonizacji mysiej skóry przez bakterie *Staphylococcus aureus*.

W dalszych rozdziałach Autorka przedstawia wykorzystane materiały oraz metody badawcze. Doktorantka do badań użyła grupy szczepów *Staphylococcus aureus*, były to izolaty pozyskane od pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (n=139, 88 dorosłych i 51 dzieci), z Katedry i Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Grupą kontrolną były izolaty pozyskane od pacjentów bez cech atopii (n=39), stanowiące kolekcję Zakładu Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej, Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed. Doktorantka opisała warunki hodowli, roztwory i bufony, odczynniki do izolacji DNA, startery do amplifikacji DNA w reakcji PCR, odczynniki do amplifikacji DNA w reakcji PCR, odczynniki do elektroforezy agarozowej kwasów nukleinowych, Odczynniki do prowadzenia hodowli komórek eukariotycznych, odczynniki do badania foto- i cytotoksyczności związków fotouczulających, odczynniki do monitorowania wzrostu i żywotności komórek eukariotycznych –system xCEL Ligence, odczynniki do izolacji i doczyszczania RNA, odczynniki do syntezy cDNA, startery do amplifikacji cDNA w reakcji qPCR, odczynniki do reakcji qPCR, do izolacji i rozdziału białek, odczynniki do testu pomiaru aktywności toksyn (test proliferacji) oraz do testu ELISA (IL-2), Odczynniki do modelu *ex vivo* świńskiej skóry, Odczynniki do mysiego modelu kolonizacji skóry przez *S. aureus*, fotouczulacze, w tym róż bengalski i błękit metylenu, które stosowała w doświadczeniach. Eksperymenty naświetlania Doktorantka przeprowadziła przy użyciu diod emitujących światło (LED), przygotowanych na zamówienie dla Zakładu Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej przez firmę EMD Technology (Warszawa, Polska) oraz Cezos LED modules (Gdynia, Polska). W badaniach wykorzystano trzy źródła światła: światło zielone o maksimum emisji 515 nm (badania *in vitro*), światło zielone o maksimum emisji 530-535 nm (badania *ex vivo* i *in vivo*)

oraz światło czerwone o maksimum emisji 632 nm (Ryc. 5). W przypadku światła zielonego ($\lambda_{\max}=515$ nm) stosowano 50% mocy maksymalnej (35 mW/cm²), światła zielonego ($\lambda_{\max}=530-535$ nm) stosowano 100% mocy (10,6 mW/cm²), a w przypadku światła czerwonego – 100% mocy (20 mW/cm²). Pełną charakterystykę lamp Doktorantka opisała we wcześniejszej publikacji (Lighting Research & Technology ,2019).

Obliczenia statystyczne Doktorantka wykonała przy użyciu pakietu STATISTICA 12 (StatSoft Inc., 2014) oraz GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA, 2015). Dla wszystkich testów statystycznych wartość $p < 0,05$ określano jako istotną statystycznie.

Izolację genomowego DNA bakteryjnego Autorka przeprowadziła z użyciem zestawu Genomic Mini (Materiały, 6.4., A&A Biotechnology, Polska).

Doświadczenie Doktorantki opierało się na analizie czterech grup badawczych:

- (1) L(-) PS(-) – komórki nietraktowane, przechowywane w ciemności
- (2) L(+) – komórki traktowane światłem
- (3) PS(+) – komórki traktowane fotouczulaczem i przechowywane w ciemności
- (4) aPDI – komórki traktowane fotouczulaczem i światłem

Do komórek bakteryjnych traktowanych fotouczulaczem, Doktorantka dodawała fotouczulacz w określonych stężeniach, a następnie komórki bakteryjne naświetlała rosnącymi dawkami światła w zakresie 10-40 J/cm² dla światła zielonego oraz 35-45 J/cm² dla światła czerwonego.

Badanie cyto- i fototoksyczności związków fotouczulających wykonała testem MTT.

Izolację całkowitego RNA bakteryjnego wykonała przy użyciu zestawu Syngen Blood/Cell RNA Mini Kit (Materiały, 6.11., Syngen, Polska)

W punkcie 7 Doktorantka opisała metodykę, w tym izolację genomowego DNA bakteryjnego, amplifikację genów toksyn oraz regionu VNTR genu spa S. aureus, przeciwbakteryjną inaktywację fotodynamiczną (aPDI) badanie cyto- i fototoksyczności związków fotouczulających (test MTT), monitorowanie wzrostu i żywotności komórek eukariotycznych w systemie CELLigence, przeciwbakteryjną inaktywację fotodynamiczną (aPDI) w warunkach subletalnych (badanie ekspresji genów toksyn, izolację całkowitego RNA bakteryjnego, doczyszczanie, odwrotną transkrypcję, wybór stabilnego genu referencyjnego, reakcją qPCR przeciwbakteryjną inaktywację fotodynamiczną (aPDI) w warunkach subletalnych (badanie produkcji toksyn na poziomie białka) i przygotowanie bakteryjnych lizatów białkowych, Western Blot, pomiar stężenia całkowitego białka w lizatach białkowych, rozdział białek metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących (SDS-PAGE, ang. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), transfer i

wykrywanie białka na membranie, pomiar aktywności toksyn (test proliferacji komórek PBMC oraz test ELISA na obecność IL-2), weryfikację efektywności aPDI – model *ex vivo* świńskiej skóry oraz efektywności aPDI na mysim modelu kolonizacji skóry przez *S. aureus*.

W rozdziale 8 Autorka przedstawiła wyniki pod postacią 24 rycin oraz 14 tabel, wykazując, iż większość *S. aureus* wyizolowanych od pacjentów z AZS posiada geny badanych toksyn oraz że aPDI wykazuje wysoką skuteczność przeciw *S. aureus in vitro*, niezależnie od obecności genów toksyn, aPDI z użyciem RB ze światłem zielonym nie wpływa na żywotność komórek eukariotycznych oraz że subletalne warunki aPDI powodują zmianę ekspresji genów kodujących toksyny, ale nie powodują zmian ilości białek toksyn.

Warto podkreślić, że Doktorantka bardzo dokładnie przedstawiła w formie graficznej praktycznie wszystkie uzyskane wyniki, co w dużym stopniu ułatwia czytelnikowi odbiór tej pracy. Doskonała szata graficzna- własny projekt i staranne, przejrzyste wykonanie rysunków i schematów, świetna jakość i dokładność wykonanych zdjęć z monitorowania sygnału bioluminescencyjnego w procesie kolonizacji mysiej skóry bakteriami *S. aureus* oraz obrazu histologicznego mysiej skóry poddanej procedurze *tape-stripping* i skolonizowanej bakteriami *S. aureus*.

Kolejnym rozdziałem dysertacji jest Dyskusja, przedstawiona na kolejnych 17 stronach rozprawy, zawierająca analizę własnych wyników i ich brawurowe zestawienie z dostępnymi danymi literaturowymi, omawianiem ich płynnie w tezie bądź antytezie w stosunku do wyników innych autorów, za co należy Doktorantkę pochwalić, ponieważ zwykle ten rozdział sprawia młodym autorom prac naukowych wiele kłopotów. Spis literatury imponuje ich liczbą- Autorka zebrała 309 pozycji piśmiennictwa, pochodzących głównie z ostatnich 10-20 lat.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawia wnioski, które korespondują i odpowiadają na postawione cele pracy. Autorka na podstawie przeprowadzonych eksperymentów i po analizie wyników konkluduje, że izolaty *S. aureus* pochodzące od pacjentów z AZS stanowią wysoce zróżnicowaną pod kątem genetycznym populację, że efektywność aPDI wobec szczepów *S. aureus* od pacjentów z AZS nie zależy od wirulencji związanej z toksynami gronkowcowymi, że subletalne warunki aPDI powodują spadek ekspresji genów enterotoksyn A, B, C, D i wzrost ekspresji genu toksyny TSST-1, natomiast nie wpływają na poziom analizowanych białek toksyn gronkowcowych w warunkach *in vitro*. Ponadto Autorka udowadnia, że aPDI powoduje utratę aktywności toksyn gronkowcowych, a róż bengalski ze światłem zielonym powoduje spadek przeżywalności *S. aureus* i obniża poziom toksyn gronkowcowych w modelu *ex vivo* i *in vivo*, co potencjalnie stanowi skuteczną opcję terapeutyczną w zwalczaniu *S. aureus* bytującego na skórze.

Autorka dość powściągliwie przedstawiła powyższe wnioski, nie ustrzegła się jednak wrażeniu, że bardziej stanowią one podsumowanie wyników. Z drugiej jednak strony, można to usprawiedliwić ostrożnością i rozsądkiem Doktorantki w wyciąganiu wniosków klinicznych, których byśmy oczekiwali chcąc rozwinąć metodę fotodynamicznej dezaktywacji bakterii na badania kliniczne i możliwość jej zastosowania u chorych z atopowym zapaleniem skóry, które stanowi niezwykle trudną jednostkę chorobową, często nie poddającą się leczeniu konwencjonalnemu, wymagającą leczenia immunosupresyjnego lub biologicznego, niepozbawionego efektów ubocznych.

Całość pracy doktorskiej mgr **Patrycji Krystyny Ogonowskiej** oceniam bardzo wysoko. Doktorantka przedstawiła ciekawe wyniki badań w oparciu o dobrze dobrany model eksperymentalny z wykorzystaniem wysokiej klasy aparatury naukowo-badawczej. Autorka pracy dowiodła tym samym, że potrafi przeprowadzić wzorowo eksperyment naukowy a następnie opracować uzyskane wyniki badań i w sposób przejrzysty przedstawić je czytelnikowi.

Z obowiązku recenzenta rozprawy doktorskiej muszę jednakże zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia zauważone przeze mnie w trakcie lektury manuskryptu.

Poniżej wymieniam nieliczne uwagi, które nie umniejszają wysokiej oceny, jaką wystawiam Doktorantce:

1. W spisie treści, konsekwentnie autorka powinna stosować nazewnictwo w języku polskim, tak więc, moim zdaniem, zamiast słowa „Abstract” powinno być: „streszczenie w języku angielskim”. Ponadto dość niekonwencjonalnie, ale interesująco przedstawiony jest spis treści wyników- tytuły podrozdziałów to ich podsumowanie,
2. Streszczenie pomimo wszystko powinno zawierać przede wszystkim cel pracy, krótkie omówienie metodyki, wyników i wnioski, podczas gdy Autorka skupia się przede wszystkim na wstępie, natomiast całkowicie pomija metodykę,
3. W pracy pojawiają się drobne błędy stylistyczne, interpunkcyjne, gramatyczne i edytorskie,
4. Autorka nie ustrzegła się powtarzania skrótów wraz z ich pełnym tytułem lub objaśnieniem, choć powinno to wystąpić tylko podczas pierwszego przytaczania danego terminu, a potem konsekwentnie już używać skrótu, lub dla podkreślenia istoty sprawy sięgnięcie po formę rozbudowaną, bez skrótu

5. Brak informacji dotyczących zgody Komisji Bioetycznej na wykonanie powyższych badań

Warte podkreślenia są wartości naukowe i poznawcze powyższej dysertacji, do których zaliczam:

1. Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność oraz ciągłość logicznego wywodu,
2. Duże znaczenie uzyskanych rezultatów dla nauki i praktyki, w tym możliwości ich bezpośredniego przełożenia na badania kliniczne i bezpośrednie zastosowanie praktyczne,
3. Sumienność, rzetelność naukową, doskonały warsztat metodyczny, nowoczesne techniki badawcze
4. Poprawność formalno-językową, stylistyczną i interpunkcyjną- doktorantka posługuje się poprawnym słownictwem, charakterystycznym dla prac naukowych, medyczny język angielski jest prawidłowy,
5. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętności ich zastosowania
6. Poprawność układu pracy, struktury podziału treści,
7. Umiejętność formułowania celów pracy oraz w odpowiedzi na nie wniosków
8. Doskonała szata graficzna- własny projekt i staranne, przejrzyste wykonanie rysunków i schematów, świetna jakość i dokładność wykonanych zdjęć z monitorowania sygnału bioluminescencyjnego w procesie kolonizacji mysiej skóry bakteriami *S. aureus* oraz obrazu histologicznego mysiej skóry poddanej procedurze tape-stripping i skolonizowanej bakteriami *S. aureus*.
9. Właściwy dobór literatury i umiejętność wykorzystania źródeł bibliograficznych w dyskusji ,
10. Nowatorski i aktualny w aspekcie chorób cywilizacyjnych charakter badań,
11. Rozwojowy charakter pracy, zwłaszcza w aspekcie wykorzystania powyższych wyników w badaniach klinicznych

Wniosek końcowy

Szczegółowa i wnikliwa ocena osiągnięć naukowo-badawczych mgr **Patrycji Krystyny Ogonowskiej** upoważnia mnie do wyrażenia wysoce pozytywnej opinii. Dojrzałość naukowa Doktorantki poparta jest zdolnością do analitycznego myślenia i trafnego wyciągania

wniosków. Rozprawa doktorska udowadnia, że mgr **Patrycja Krystyna Ogonowska** jest dojrzałym pracownikiem naukowym, w pełni zdolnym do realizowania samodzielnych, twórczych koncepcji naukowych zasługujących na stopień naukowy doktora medycyny.

Na podstawie wymienionych przeze mnie wysokich aspektów naukowych i poznawczych powyższej dysertacji uważam, że rozprawa mgr **Patrycji Krystyny Ogonowskiej** spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami). W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o kontynuowanie postępowania o nadanie mgr **Patrycji Krystyny Ogonowskiej** stopnia doktora **w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki biologiczne.**

Wniosek o wyróżnienie

Na podstawie wymienionych wyżej wartości naukowych i poznawczych powyższej dysertacji, składam wniosek o jej wyróżnienie, motywując swoją decyzję trafnym wyborem problematyki badawczej przez Doktorantkę, oryginalnym tematem, trudnym i nowatorskim warsztatem metodycznym, z którym świetnie sobie poradziła, wysoką wartością naukową i istotnym wkładem uzyskanych wyników w rozwój fotobiologii, mikrobiologii oraz medycyny.

Z poważaniem

Bytom, 20.08.2022r

Aleksandra Kawczyk-Krupka