

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, 20.12.2023r

**Recenzja pracy doktorskiej na stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie naukowej biotechnologia, mgr Klaudii Szymczyk**

pod tytułem:

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

(„Photodynamic inactivation of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and reduction of its virulence using novel gallium(III)-coordinated porphyrins”).

Praca została przedstawiona Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego i wykonana pod kierunkiem Pani Promotor dr hab. Joanny Nakoniecznej, profesora UG Zakład Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej

Praca doktorska została oparta o trzy publikacje, dwie opublikowane o łącznym IF 9,8, i MNiSW: 280 oraz jedną w trakcie przygotowania do druku:

1/ „Gallium Mesoporphyrin IX-Mediated Photodestruction: A Pharmacological Trojan Horse Strategy To Eliminate Multidrug- Resistant *Staphylococcus aureus*”,

Klaudia Michalska, Michał Rychłowski, Martyna Krupińska, Grzegorz Szewczyk, Tadeusz Sarna, and Joanna Nakonieczna *Molecular Pharmaceutics* 2022, 19, 5, 1434–1448, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00993>, IF= 4.9, Q1, MNiSW = 140

2/ „Photoactivated Gallium Porphyrin Reduces *Staphylococcus aureus* Colonization on the Skin and Suppresses Its Ability to Produce Enterotoxin C and TSST-1”

Klaudia Szymczak, Grzegorz Szewczyk, Michał Rychłowski, Tadeusz Sarna, Lei Zhang, Mariusz Grinholc, and Joanna Nakonieczna, *Molecular Pharmaceutics* 2023, 20,10,5108– 5124, <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00399>

IF= 4.9, Q1, MNiSW = 140

3/przygotowana do druku pt: „Harnessing light-activated gallium porphyrins to combat intracellular *Staphylococcus aureus* in dermatitis: insights from a simplified model”

Klaudia Szymczak, Michał Rychłowski, Lei Zhang, and Joanna Nakonieczna

Rękopis został przedstawiony w postaci spójnego tematycznie zbioru artykułów.

Tematem pracy doktorskiej mgr Klaudii Szymczyk jest ocena skuteczności metody fotodynamicznej w eradykacji bakterii *Staphylococcus aureus*, która jest Gram-dodatnim patogenem, odpowiedzialnym za ponad 80% wszystkich skórnych infekcji, na którego wirulencję składa się produkcja toksyn, tworzenie biofilmu oraz zdolność do internalizacji do komórek gospodarza, bakterii należącej do patogenów grupy ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i gatunki *Enterobacter*), będących główną przyczyną infekcji na całym świecie opornych na środki przeciwdrobnoustrojowe

Istotnym problemem związanym z infekcjami bakteryjnymi, zwłaszcza gronkowcowymi jest duża częstotliwość ich nawrotów. Z cytowanego przez Doktorantkę piśmiennictwa wynika, że u 39% pacjentów z zakażeniami skóry (SSTI) dochodzi do nawrotu infekcji w ciągu trzech miesięcy. U podstaw nawracających infekcji jest *S. aureus* należy zjadliwość bakterii i ich przeżycie wewnątrzkomórkowe w komórkach gospodarza. W czasach współczesnych, ze względu na rosnącą antybiotykooporność, poszukuje się alternatywnych metod przeciwdrobnoustrojowych, a jedną z opcji terapeutycznych jest terapia fotodynamiczna (ang. antimicrobial photodynamic inactivation, aPDI), opierająca się na współdziałaniu fotouczulacza, światła i tlenu, prowadząc do reakcji fotobiochemicznych w efekcie których generowane są reaktywne formy tlenu, które przyczyniają się do śmierci bakterii poprzez ich destrukcję.

Recenzowana praca doktorska liczy wraz z bibliografią 153 strony. Autorka podzieliła pracę na 9 rozdziałów, w tym wstęp, cele pracy, kolejne rozdziały to publikacja 1, publikacja 2, publikacja 3-w trakcie przygotowania do druku, streszczenie, materiały uzupełniające, piśmiennictwo i załączniki. Ponadto w pracy Doktorantka zamieściła wykaz skrótów, tabele i ryciny.

We wstępie Autorka opisuje porfiryny koordynowane jonami galu (III) ( $Ga^{3+}$ MPs), które są związkami o podwójnej funkcjonalności, czyli wykazują właściwości związków fotosensybilizujących w ścieżce zależnej od światła, natomiast w ścieżce niezależnej od światła blokują metabolizm zależny od jonów żelaza, naśladując strukturę naturalnego liganda – hemu.

Wychwył Ga<sup>3</sup>+MPs opiera się na błonowych receptorach przechwytyjących hem, które rozpoznają te związki jako naturalny ligand – hem 96.

Kolejnym rozdziałem są cele pracy. Doktorantka skupiła się na badaniu właściwości przeciwdrobnoustrojowych aPDI, celem zmniejszenia zjadliwości i przeżycia wielolekoopornych bakterii- *Staphylococcus aureus*.

W przeprowadzonych eksperymentach Doktorantka zbadała dwie modyfikowane metaloporfiryny galu: gal mezoporfiryna IX (Ga<sup>3</sup>+MPIX) i kationową porfiryne galu (Ga<sup>3</sup>+CHP). W pierwszej części pracy Autorka porównała skuteczność tych dwóch związków przeciwko kilku szczepom *S. aureus* w zawiesinach kulturach i w biofilmie. W kolejnej części Doktorantka oceniła wpływ aPDI na enterotoksyny gronkowcowe, a w trzeciej skoncentrowała się na strategiach aPDI i ocenie ich skuteczności na modelu wewnątrzkomórkowego zakażenia *S. aureus* w ludzkich keratynocytach (HaCaT).

Aby osiągnąć cel główny Doktorantka obrała cele cząstkowe, do których zaliczyła:

1. Badanie skuteczności aPDI z Ga<sup>3</sup>+MPIX i Ga<sup>3</sup>+CHP przeciwko *S. aureus* w kulturach zawiesinowych i modelu biofilmu,
2. Analizę wpływu pozyskiwania hemu (Isd, Hts) i detoksykacji (HrtAB) na aPDI z metaloporfirynami galu: Ga<sup>3</sup>+MPIX i Ga<sup>3</sup>+CHP,
3. Określenie wpływu aPDI z metaloporfirynami galu na wybrane czynniki zjadliwości produkowane przez *S. aureus*,
4. Ocenę wpływu aPDI z metaloporfirynami galu na organizm przyleganie, internalizacja i wewnątrzkomórkowa trwałość *S. aureus* w modelu infekcji nawracającej.

Wyniki badań Doktorantka opublikowała w czasopiśmie *Molecular Pharmaceutics* (wyd. American Chemical Society).

W następnej części rozprawy doktorskiej Doktorantka zamieściła dwie publikacje.

W mojej opinii, brakuje w tej rozprawie zamieszczenia opisu metodyki, wyników, wniosków i dyskusji. Jednak nie ma też ścisłych redakcyjnych wytycznych Uniwersytetu Gdańskiego, dotyczących kryteriów przygotowania rozprawy doktorskiej realizowanej w formie cyklu publikacji, stąd trudno mi w sposób jednoznaczny i arbitralny krytykować formę redakcyjną rozprawy doktorskiej przygotowanej przez Doktorantkę.

Publikacja 1. Jednym z czynników decydujących o skutecznej inaktywacji fotodynamicznej środków przeciwdrobnoustrojowych (aPDI) jest akumulacja związku aktywowanego światłem, a mianowicie fotosensybilizatora (PS). W tej publikacji Doktorantka wykazała, że mezoporfiryna galu IX (Ga<sup>3</sup>+MPIX) zapewnia podwójną funkcjonalność – zaburzenie metabolizmu żelaza i skuteczność tego fotouczulacza w aPDI. Autorka wykazała, że

Ga<sup>3</sup>+MPIX indukuje skuteczną (>5log<sub>10</sub> redukcja CFU/ml) fotodestrukcyjną bakterii ze wzbudzeniem w obszarze absorpcji pasma Q przy stosunkowo niskiej cytotoksyczności i fototoksyczności eukariotycznej. Mgr Klaudia Szymczyk wykazała, że zmiany w strukturze metaloporfiryny (grupy winylowe vs etylowe) nie zmieniły znacząco właściwości rozpoznawania związku, ale wpłynęły na jego właściwości biofizyczne.

Przedstawiona w publikacji metodyka jest jak najbardziej prawidłowa. Do naświetlań PDT Doktorantka wykorzystwała diodę elektroluminescencyjną (LED), emitującą światło zielone ( $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$ , natężenie promieniowania = 10,6 mW/cm<sup>2</sup>, FWHM = 34 nm).

Hodowle drobnoustrojów Doktorantka prowadziła w sposób standardowy. Próbkę aPDI były „fotouczulane” Ga<sup>3</sup>+MPIX, inkubowane w temperaturze 37°C w ciemności przez 10 minut i naświetlane różnymi dawkami zielonego światła do 31,8 J/cm<sup>2</sup>. Liczbę jednostek tworzących kolonie (CFU/ml) Doktorantka określiła poprzez seryjne rozcieńczenia porcji po 10  $\mu\text{l}$  i wysianie komórek bakteryjnych na płytki TSA. Warunki letalne i subletalne aPDI Autorka zdefiniowała w publikacji powołując się na poprzednie doniesienia. Każde doświadczenie przeprowadzała w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych.

Analizę krzywej wzrostu Doktorantka przeprowadziła czytnikiem płytek EnVision Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, USA), mierząc gęstość optyczną ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) co 30 minut przez 16 godzin, inkubując w temperaturze 37°C z wytrząsaniem (150 obr/min).

Następnie przeprowadziła czasowo rozdzielczą detekcję fosforescencji tlenu singletowego przy długości fali 1270nm, spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego, zwaną również elektronowym rezonansem spinowym, żywotność testem MTT, analizę dynamiki wzrostu komórek w czasie rzeczywistym, kumulację fotouczulacza oraz obrazowanie za pomocą mikroskopu konfokalnego

Analizę statystyczną Doktorantka przeprowadziła przy użyciu GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., Kalifornia, USA). Zmienne ilościowe scharakteryzowała za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego średniej. Dane analizowała za pomocą dwuczynnikowej analizy ANOVA i testu wielokrotnych porównań Tukeya. Wartość  $p < 0,05$  wskazywała na istotną różnicę.

Następnie przedstawiła obszernie otrzymane wyniki, przeprowadziła nienagannie i perfekcyjnie dyskusję, konkludując, że Ga<sup>3</sup>+MPIX działa dwojako: niezależnie od światła (blokując metabolizm żelaza) lub w zależności od światła (działanie fotodynamiczne). Potwierdziła w swoich eksperymentach, że ten typ dwukierunkowego mechanizmu działania zapewnia bardzo dobrą ochronę przed selekcją mutantów *S. aureus* odpornych na fotodestrukcyjną. Wzbudzenie Ga<sup>3</sup>+MPIX zielonym światłem w obszarze absorpcji pasma Q

spowodowało w eksperymentach Doktorantki eradykację bakterii (redukcja  $> 5\log_{10}$  CFU/ml) przy jednoczesnym zachowaniu względnego bezpieczeństwa dla badanych komórek eukariotycznych. Ponadto Autorka wykazała, że aPDI za pośrednictwem  $Ga^{3+}$ MPIX wykazuje skuteczność zależną od Fe, a hem ma działanie ochronne, co wskazuje na znaczenie specyficznych systemów transportu hemu w badanym systemie aPDI. Doktorantka wykazała, że pomimo zmian strukturalnych wokół pierścienia porfiryнового,  $Ga^{3+}$ MPIX był w stanie utrzymać swoją podwójną funkcjonalność, co może dawać implikacje na wyższą efektywność działania fotodynamicznego.

W drugiej publikacji stanowiącej wkład do rozprawy doktorskiej, Doktorantka kontynuowała badania i rozważania nad kationową hemmimetyczną porfiryną galu ( $Ga^{3+}$ CHP), jako środkiem mającym działanie toksyczne na gronkowca, działającym poprzez podwójny mechanizm: zależny od światła (antybakteryjna inaktywacja fotodynamiczna, aPDI) i światło - niezależny (hamujący metabolizm żelaza).

Doktorantka przeprowadziła eksperyment aPDI na modelu skóry świńskiej *ex vivo*. Analizę mutagenności przeprowadziła przy użyciu zestawu Ames Penta 2 (Xenometrix, Allschwil, Szwajcaria), a wszystkie etapy przeprowadziła zgodnie z protokołem producenta.

Doktorantka zbadała komórki skóry HaCat z wyciszoną ekspresją FLG (FLG sh) i prawidłową ekspresją genu FLG (FLG ctrl) pod kątem foto- i cytotoksyczności za pomocą testu MTT i dynamiki wzrostu komórek przy użyciu analizatora komórek w czasie rzeczywistym xCELLigence (RTCA) (ACEA Biosciences) Inc., USA).

Do analizy dynamiki wzrostu komórek w czasie rzeczywistym każdą linię komórkową Doktorantka hodowała na dzień przed terapią, a eksperymenty przeprowadzała w siedmiu powtórzeniach

Następnie Doktorantka dokonała analizy ekspresji genów qRT-PCR, przeprowadzając izolację i oczyszczanie RNA, odwrotną transkrypcję i qPCR zgodnie z wcześniej opublikowanymi danymi. W kolejnym etapie eksperymentu Autorka przeprowadziła immunodetekcję Western Blot. *S. aureus* 5 N hodowała w TSB aż do osiągnięcia logarytmicznej fazy wzrostu ( $OD_{600} = 1,5$ ), a następnie traktowała subletalnymi dawkami aPDI przy użyciu każdego testowanego związku. Stężenie białka całkowitego w badanych próbkach oznaczała przy użyciu zestawu RC DC Protein Assay Kit I (Bio-Rad, USA) w oparciu o krzywą standardową sporządzoną na podstawie wzorca białka  $\gamma$ -globuliny (Bio-Rad, USA). Standardowe białka i lizaty SEC lub TSST-1 (Toxin Technology, Inc., USA) rozdzielała metodą SDS-PAGE przy 180 V przez 1 godzinę, i dokonywała kolejnych oznaczeń zgodnie z przyjętymi standardami metodyki.

W przeprowadzonym eksperymencie wykazała, że Ga<sup>3</sup>+CHP aktywowany zielonym światłem skutecznie zmniejszał przeżycie klinicznych izolatów *S. aureus*, pochodzących od pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (AD) (>5 log<sub>10</sub> CFU/ml), jednocześnie wpływając na ekspresję ich genu enterotoksyny. Doktorantka nie wykazała wyraźnej toksyczności aPDI w keratynocytach HaCaT zarówno przy prawidłowej, jak i stłumionej ekspresji genu filagryny, występującego u około 50% pacjentów z AD. Dodatkowo Doktorantka nie zaobserwowała działania mutagennego. Konkludując stwierdziła, że metaloporfiryny galu aktywowane światłem zielonym mogą być obiecującym środkiem chemioterapeutycznym ograniczającym kolonizację *S. aureus* na skórze pacjentów z AD.

W trzeciej dołączonej publikacji, będącej kontynuacją myśli poprzednich dwóch manuskryptów, Doktorantka scharakteryzowała i wykorzystała model keratynocytów (zarówno typu dzikiego, jak i mutantów z zmniejszona ekspresja filagryny) zakażonych opornymi na metycylinę *S. aureus* (MRSA), w celu sprawdzenia możliwości zastosowania związków aktywowanych światłem, na przykładzie hemumimetycznego galu (III) porfiryna (Ga<sup>3</sup>+CHP) i światłem widzialnym (aPDI) oraz w celu wyeliminowania wewnątrzkomórkowego MRSA. Autorka zaobserwowała, że Ga<sup>3</sup>+CHP gromadził się w wyższym stężeniu w zakażonych komórkach, w porównaniu z komórkami niezainfekowanymi. W metodach badawczych opisała i zastosowała cytometrię przepływową i mikroskopię fluorescencyjną. Doktorantka wykazała, że zastosowanie aktywowanego światłem Ga<sup>3</sup>+CHP spowodowało znaczący spadek liczby bakterii zewnątrzkomórkowych w układzie infekcyjnym, obniżając potencjał do dalszej infekcji komórek gospodarza. Ponadto Doktorantka potwierdziła, że zaproponowane podejście skutecznie ogranicza infekcję keratynocytów opornymi na metycylinę *S. aureus*, a także jego adhezję do komórek gospodarza, przy jednoczesnym poświadczeniu, że pozostają bezpieczne dla komórek gospodarza, nie wykazując na nie działania foto- i cytotoksycznego.

Także w tej publikacji Doktorantka perfekcyjnie przedstawiła wyniki, brawurowo przeprowadziła dyskusję i wysnuła celne wnioski z perspektywą wykorzystania wyników w badaniach klinicznych.

#### Podsumowanie

Całość pracy doktorskiej mgr **Klaudii Szymczyk** oceniam bardzo wysoko. Publikacje zostały sumiennie przygotowane, a otrzymane wyniki są ważne z punktu widzenia przyszłych badań podstawowych i klinicznych. Doktorantka rozwiązała rozważany w pracy problem naukowy, stosując przy tym poprawny warsztat badawczy.

Mając zatem na uwadze osiągnięte wyniki oraz obowiązujące przepisy o stopniach i tytułach naukowych, wnoszę do o dopuszczenie mgr **Klaudii Szymczyk** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. 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 fakt braku w rozprawie zebrania w całość wszystkich wyników z załączonych trzech manuskryptów, podania celu pracy wspólnego i wynikającego z wszystkich załączonych publikacji, opisu metodyki, wyników, wniosków i dyskusji. Doktorantka rozprawę skróciła do wstępu i załączenia publikacji. Oczywiście wszystko jest zawarte w manuskrytach i tam perfekcyjnie przedstawione, co potwierdzili wcześniej znakomici recenzenci dopuszczając pracę do druku w tak poczytnych i wysoko punktowanych czasopismach, niemniej jednak wydaje się celowym udokumentowanie i scalenie tych informacji aby z tych trzech publikacji wyłonić autorską dysertację mgr Klaudii Szymczyk, co nie wyklucza faktu udziału i współautorstwa Doktorantki w publikacjach.

Ponadto, moim zdaniem, streszczenie powinno zawierać przede wszystkim cel pracy, krótkie omówienie metodyki, wyników i wnioski, podczas gdy Autorka skupia się przede wszystkim na wstępie, natomiast niemal całkowicie pomija metodykę.

Pomimo tych uwag głównie o charakterze redakcyjnym, bardzo wysoko oceniam temat dysertacji, pracowitą i opartą na współczesnych standardach metodykę, świetne, w aspekcie wykorzystania metody fotodynamicznej do leczenia zakażeń wyniki, znakomite konkluzje z przeprowadzonych eksperymentów, jak też, co powtarzam, brawurowo przeprowadzoną dyskusję w publikacjach, co często doktorantom sprawia ogromną trudność.

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

1. Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność,
2. Duże znaczenie uzyskanych rezultatów, opisanych w publikacjach, 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. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętności ich zastosowania

5. Doskonała szata graficzna w publikacjach
6. Właściwy dobór literatury i umiejętność wykorzystania źródeł bibliograficznych w dyskusjach przedstawionych w publikacjach;
7. Nowatorski i aktualny w aspekcie chorób cywilizacyjnych charakter badań,
8. Rozwojowy charakter pracy, zwłaszcza w aspekcie wykorzystania powyższych wyników w badaniach klinicznych

### **Wniosek końcowy**

Publikacje zostały sumiennie przygotowane, a otrzymane wyniki są ważne z punktu widzenia przyszłych badań podstawowych i klinicznych. Doktorantka rozwiązała rozważany w każdej z załączonych prac problem naukowy, stosując przy tym poprawny warsztat badawczy. Na podstawie wymienionych przeze mnie wysokich aspektów naukowych i poznawczych powyższej dysertacji przedstawionej w postaci załączonych publikacji uważam, że rozprawa mgr **Klaudii Szymczyk** spełnia wymogi ustawowe (art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r.; Dz.U. z 2018 r. poz.1668 – prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o kontynuowanie postępowania o nadanie mgr **Klaudii Szymczyk** stopnia doktora **w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie naukowej biotechnologia.**

### **Wniosek o wyróżnienie**

Wyniki bezpośrednio związane z badaniami realizowanymi przez mgr Klaudię Szymczyk w ramach przygotowania rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w prestiżowych recenzowanych czasopismach naukowych. Publikacje powyższe przedstawiają wysokie wartości naukowe i poznawcze, stąd składam wniosek o wyróżnienie dysertacji, 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 biotechnologii oraz medycyny.

Z poważaniem

Bytom, 20.12.2023r

Aleksandra Kawczyk-Krupka