



Wrocław, 24.01.2024

### RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PANI MGR KLAUDII SZYMCZAK

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

Przedmiotem niniejszej recenzji jest praca doktorska Pani mgr Klaudii Szymczak pt. „Fotodynamiczna inaktywacja wielolekoopornego *Staphylococcus aureus* i redukcja jego wirulencji z wykorzystaniem nowych porfiryn koordynowanych jonami galu (III)”, w której przedstawione zostały wyniki badań związanych z otrzymywaniem i charakterystyką nowych materiałów do fotodynamicznej inaktywacji mikroorganizmów (PDI) oraz wyjaśnieniem mechanizmów fotochemicznych i biologicznych leżących u podstaw PDI z wykorzystaniem zakupionych a także zmodyfikowanych związków fotouczulających. Omawiane zagadnienia są ściśle związane z obszarem zainteresowań naukowych realizowanych przez Panią promotor pracy, dr hab. Joannę Nakonieczną, prof. UG w zakresie badań nad nowymi lekami oraz fotouczulaczami o właściwościach przeciwnowotworowych i przeciwbakteryjnych.

Tematyka badań objęta doktoratem jest aktualna, o czym świadczą liczne publikacje dotyczące praktycznego zastosowania metody fotodynamicznej zarówno pod kątem badań nad leczeniem nowotworów jak i zakażeń grzybiczych, wirusowych czy też bakteryjnych, zwłaszcza tych antybioopornych. Biorąc pod uwagę powyższe należy uznać, że wybrana przez Panią mgr Klaudię Szymczak tematyka badań naukowych, która stała się podstawą jej rozprawy doktorskiej, ma także istotne znaczenie praktyczne.

Opisane w pracy doktorskiej wyniki badań zostały zrealizowane w ramach projektu badawczego kierowanego przez dr hab. Joannę Nakonieczną, prof. UG finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki grant OPUS 2017/27/B/NZ7/02323: „Wpływ przeciwdrobnoustrojowej fotoinaktywacji na wirulencję szczepów *Staphylococcus aureus* kolonizujących chorych z atopowym zapaleniem skóry: badania *in vitro* oraz *in vivo*”.

Przygotowana przez mgr Klaudię Szymczak rozprawa doktorska napisana jest w języku angielskim i składa się ze wstępu teoretycznego obejmującego około 20 stron, streszczenia prac wchodzących w skład rozprawy a także samych publikacji (w tym jednego draftu) oraz jednostronicowego podsumowania.

Praca zawiera również oświadczenia współautorów prezentowanych publikacji.

Główną część rozprawy stanowi cykl trzech powiązanych tematycznie artykułów naukowych o łącznym współczynniku oddziaływania prac IF 9,8 oraz 240 pkt MNiSW:

P1 - Klaudia Michalska, Michał Rychłowski, Martyna Krupińska, Grzegorz Szewczyk, Tadeusz Sarna, Joanna Nakonieczna, „Gallium Mesoporphyrin IX-Mediated Photodestruction: A Pharmacological Trojan Horse Strategy To Eliminate Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*”, *Molecular Pharmaceutics*, 2022, 19, 5, 1434–1448

<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00993>

IF= 4.9, Q1, MNiSW = 140

P2 - Klaudia Szymczak, Grzegorz Szewczyk, Michał Rychłowski, Tadeusz Sarna, Lei Zhang, Mariusz Grinholc, Joanna Nakonieczna, „Photoactivated Gallium Porphyrin Reduces *Staphylococcus aureus* Colonization on the Skin and Suppresses Its Ability to Produce Enterotoxin C and TSST-1”, *Molecular Pharmaceutics*, 2023, 20, 10, 5108–5124

<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00399>

IF= 4.9, Q1, MNiSW = 140

P3 – (szkic publikacji) Klaudia Szymczak, Michał Rychłowski, Lei Zhang, Joanna Nakonieczna, „Harnessing light-activated gallium porphyrins to combat intracellular *Staphylococcus aureus* in dermatitis: insights from a simplified model”.

Należy podkreślić, że we wszystkich pracach oryginalnych Pani mgr Klaudia Szymczak jest pierwszym autorem, a na podstawie dołączonych do rozprawy oświadczeń współautorów jej wkład w powstanie tych prac można ocenić jako wiodący (oszacowany na 40%). Nie mam zatem wątpliwości, iż wymienione publikacje mogą być podstawą pracy doktorskiej Pani mgr Klaudii Szymczak, choć budzi zastrzeżenie brak publikacji ostatniej zawartej w cyklu pracy, to umieszczenie jej w repozytorium BioRxiv w dniu 15.12.23 i przyznanie nr DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.12.13.571407> nadaje jej charakter przedpublikacyjny.

Głównym celem recenzowanej dysertacji było zbadanie efektywności antybakteryjnej terapii fotodynamicznej (aPDI) w kontekście zastosowania nowych fotouczulaczy, konkretnie porfiryn koordynowanych jonami galu (III), wobec bakterii *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Celem badań jest ocena, czy zastosowanie światła zielonego do wzbudzenia Ga<sup>3+</sup>MPs (porfiryn z jonami galu) może prowadzić do istotnego zmniejszenia aktywności czynników wirulencji *S. aureus*, takich jak toksyny czy biofilm.

Badania efektywności aPDI przeprowadzono na kilku modelach, obejmujących:

1) Hodowlę zawiesinową: testowano działanie aPDI na bakteriach *S. aureus* w hodowli zawiesinowej, co może dostarczyć ogólnego obrazu o działaniu stosowanych fotouczulaczy na populację bakterii.

2) Badania biofilmu *in vitro*: Badania skupiły się także na wpływie aPDI na biofilm bakteryjny *in vitro*, co jest ważne, ponieważ biofilm stanowi ochronę dla bakterii przed działaniem wielu antybiotyków.

3) Biofilm *ex vivo* (kolonizacja świńskiej skóry): Przeprowadzono eksperymenty na biofilmie *ex vivo*, co oznacza, że badano jak wybrane fotouczulacze oddziałują z biofilmem bakterii na skórze świń.

4) Model infekcyjny ludzkich keratynocytów: Przeprowadzono badania na modelu infekcyjnym związanych z ludzkimi keratynocytami, co wskazuje na badania skuteczności aPDI w kontekście realnego zakażenia skórno.

W przypadku badań na modelu infekcyjnym przetestowano trzy strategie implementacji metody fotodynamicznej:

I. Możliwość eliminacji bakterii uwolnionych z komórek gospodarza: Przetestowano, czy aPDI może efektywnie eliminować bakterie *S. aureus*, które zostały uwolnione z zainfekowanych komórek gospodarza.

II. Wpływ aPDI na adhezję i internalizację: Badano, czy aPDI wpływa na zdolność *S. aureus* do przylegania i wnikania do komórek gospodarza.

III. Efektywność aPDI w eliminacji wewnątrzkomórkowego *S. aureus*: Zbadano skuteczność aPDI w eliminacji bakterii *S. aureus*, które przetrwały wewnątrz komórek gospodarza.

Podsumowując, badania te skupiają się na ocenie potencjalnej skuteczności aPDI w zwalczaniu *S. aureus*, zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i w bardziej realistycznych warunkach *ex vivo* oraz na modelu zakażenia skórno przy zastosowaniu Ga<sup>3+</sup>MPs (porfiryn z jonami galu) i absorbowanego przez te związki światła zielonego, które służy także do produkcji tlenu singletowego z wykorzystaniem wymienionych fotouczulaczy.

Jak w każdej pracy o podobnej objętości również tu znajdują się niestety pewne błędy językowe i niezręczności, o których chciałabym wspomnieć. Mimo, że słowo „fotosensibilizator” jest obecnie dopuszczoną formą uważam, że nie ma niczego złego w polskim słowie „fotouczulacz” i polecałabym jego użycie. Poniżej wymieniam kilka komentarzy. Proszę także o wyjaśnienie poniższych punktów:

Str. 9 – „Ze względu na niską penetrację, terapie antybiotykowe nie są wysoko skuteczne wobec wewnątrzkomórkowego *S. aureus*.” – warto zauważyć, że głównym problemem pozostaje jednak antybiotykooporność a nie penetracja.

Str. 9 – Niefortunne, dokładne tłumaczenie z jęz. angielskiego w postaci „przeciwdrobnoustrojowa metoda fotodynamiczna”. Po polsku aPDT to antybakteryjna terapia fotodynamiczna bądź przeciwdrobnoustrojowa inaktywacja fotodynamiczna.

Str. 9 – „[...] natomiast w ścieżce niezależnej od światła blokują metabolizm zależny od jonów żelaza [...]” – pytanie czy w ścieżce niezależnej od światła też są nietoksyczne? Czyli czy cechują się tzw. ciemną toksycznością co ma miejsce np. w przypadku błękitu metylenowego?

Str. 15 – “The action of aPDI is based on three components: light, oxygen, and a small molecular weight compound [...]” – nie zawsze, bywają też fotouczulacze na bazie fulerenów, które zdecydowanie mają dużą masę, jest to nieścisłość.

Str. 16 – “Due to the multitarget effect of aPDI, the microbial resistance to the aPDI has not yet been reported. However, there are findings of bacterial tolerance following repeated exposure to aPDI treatments [...]” – czy wykształcona po czasie tolerancja na fototerapię nie równa się oporności? Jaka jest różnica?

Str. 17 – “However, the pain effect of red light might be an obstacle to wide clinical application [...]” – to jest prawdą tylko w kontekście dużych natężeń światła pochodzącego np. z laserów dużej mocy lub lamp o dużej mocy. W cytowanej publikacji wykorzystywano dwa źródła światła: czerwonego i zielonego, przy czym czerwone światło jest doskonale absorbowane przez ALA, występujące tu jako fotouczulacz. Im lepsze dopasowanie widma absorpcji do długości fali wzbudzenia tym lepszy efekt fototerapii, ale jednocześnie tym większe prawdopodobieństwo generacji dodatkowych efektów fotofizycznych w tym cieplnych, zwłaszcza jeśli widmo źródła światła zawiera też pasma z podczerwieni. Przy zastosowaniu źródła światła zielonego będziemy mieć ograniczony efekt „grzania” stąd też ewentualnie mniejsze odczucia bólowe. Jak wynika z wielu badań krytyczne znaczenie mają źródła światła, ale raczej w aspekcie dozy dostarczonego promieniowania w czasie.

Str. 17 – “[...] while the red light causes pain.” – nie do końca się z tym zgadzam, wszystko zależy od intensywności naświetlania, jw.

Str. 17 – “The negatively charged outer membrane of bacteria might efficiently bind cationic PS.” – ta hipoteza nie znajduje potwierdzenia w literaturze. Według niej kationowe fotouczulacze powinny lepiej wiązać się z bakteriami Gram ujemnymi, a to zupełnie tak nie działa, choćby w przypadku błękitu metylenowego. Według najnowszych badań budowa ściany komórkowej nie warunkuje efektu fototerapii.

Str. 19 – “Previous study has shown that gallium protoporphyrin IX (Ga3+PPIX) showed a high, >6 log10 reduction in the number of *S. aureus* CFUs after blue light (405 nm) irradiation.” – należy pamiętać, że promieniowanie z zakresu światła niebieskiego ma właściwości bakteriobójcze ze względu na protoporfiryny naturalnie występujące w bakteriach.

Str. 26 – “The vinyl group in the Ga3+PPIX structure was changed to ethyl in Ga3+MPIX, resulting in noticeable differences in absorption spectra. The Ga3+MPIX absorption peaks at the Q-band were shifted toward shorter wavelengths ( $\lambda_{max}$  Ga3+MPIX = 532 nm and 570 nm vs.  $\lambda_{max}$  Ga3+PPIX = 541 and 580 nm). As a result, the Ga3+MPs absorption better matched to the emission spectrum of the green light emitting diode (LED) used. Additionally, the change improved the solubility in aqueous solutions and efficacy in light-dependent action against *S. aureus*.” – Świetne rozwiązanie!

W trakcie lektury przedstawionej dysertacji nasunęło mi się kilka pytań, które chciałabym zadać doktorantce:

- “[...] aPDI can reduce bacterial virulence by decreasing the production of multiple virulence factors or reducing their biological activity [...]” – na jakie czynniki wirulencji może mieć wpływ aPDI?

- “[...] was reflected only in sublethal reduction (0.3 – 1.8 log10 CFU/mL).” – to dość duży rozrzut wyników, z czego mógł on wynikać?

- “Both actions of Ga3+MPIX exhibited relative safety for human keratinocytes [...]” – w jakim sensie bezpieczny? Czy zaobserwowano redukcję keratynocytów?

- “Heme (iron(III) protoporphyrin IX, Fe3+PPIX) is a natural source of essential iron for both eukaryotic and bacterial cells.” – obecność jonów żelaza sprzyja reakcji Fentona, ważnej dla fototerapii. Proszę o wyjaśnienie mechanizmu tej reakcji.

- Czy jony galu mogą ulec bioakumulacji? Jakie mogą być potencjalne ścieżki metaboliczne dla tego związku?

Dodatkowo, mając na uwadze ogólną wiedzę doktorantki z zakresu terapii fotodynamicznej, chciałabym zadać poniższe pytania:


- Jakie może Pani wymienić mechanizmy zabijania bakterii z wykorzystaniem światła?

- Jakie, Pani zdaniem, są najefektywniejsze metody pomiaru tlenu singletowego i jakie błędy mogą powstać w wyniku wykorzystania sond fluorescencyjnych?

Przygotowana rozprawa oraz podejmowane w niej problemy badawcze nie tylko obejmują najnowsze trendy i osiągnięcia nauki, lecz również świadczą o znajomości współczesnej literatury z wybranej dyscypliny naukowej. Jakość przygotowanej rozprawy, zarówno pod kątem części eksperymentalnej jak również pracy z literaturą, zasługują na pozytywną ocenę.

Nadanie stopnia doktora oznacza, że badacz jest przygotowany do samodzielnego rozwiązania problemu naukowego. Mgr Klaudia Szymczak pokazała, że spełnia ten warunek, gdyż opanowała umiejętność korzystania z literatury, doboru materiałów i metod badawczych, poprawnego zaprojektowania i przeprowadzenia eksperymentu, logicznego sformułowania wniosków końcowych oraz przygotowania publikacji. Warto podkreślić, że dziś w obszarze badań doświadczalnych „samodzielnie” nie oznacza osobiście, gdyż umiejętność współpracy w zespole jest również przejawem dojrzałości naukowej.

Konkludując, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Klaudii Szymczak zatytułowana : „Fotodynamiczna inaktywacja wielolekoopornego *Staphylococcus aureus* i redukcja jego wirulencji z wykorzystaniem nowych porfiryn koordynowanych jonami galu (III)” spełnia wymogi stawiane w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w dziedzinie sztuki (Dz.U. z 2017r. poz. 1789 w związku z art. 179 ust.1 i ust. 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz 1669 z późn.zm.). W związku z powyższym wnioskuję o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie jej do publicznej obrony.



*Dr hab. inż. Katarzyna Matczyszyn, profesor PWr*