



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY

dr hab. Beata Krawczyk, prof. uczelni PG
e-mail: beakrawc@pg.edu.pl
tel. 583472302; 583472383
Politechnika Gdańska Wydział Chemiczny
Katedra Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii
80-233 Gdańsk, ul. G. Narutowicza 11/12

Gdańsk 31.10.2022

**OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
Mgr inż. Agaty Woźniak**

**pt. „Fotoinaktywacja światłem widzialnym jako narzędzie uwrażliwienia
wielolekoopornych patogenów na działanie antybiotyków”**

wykonanej w Zakładzie Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej na Międzyuczelnianym
Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
pod kierunkiem dr hab. Mariusza Grinholca, prof. UG

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Gdańskiego

1. Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agaty Woźniak, pt. „Fotoinaktywacja światłem widzialnym jako narzędzie uwrażliwienia wielolekoopornych patogenów na działanie antybiotyków” stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie 5 artykułów naukowych, jednej pracy przeglądowej opublikowanej w czasopiśmie *Frontiers in Microbiology* (wyd. Frontiers, rok 2018, IF 6,064) oraz 4 prac o charakterze eksperymentalnym opublikowanych w *Frontiers in Microbiology* (wyd. Frontiers, rok 2019; IF 6,064), *BioMolecules* (wyd. MDPI, rok 2021, IF 6,064), *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* (wyd. ELSEVIER, rok 2022, IF 6,814) i *Antioxidants* (wyd. MDPI, rok 2022, IF 7,675). Wszystkie czasopisma należą do czasopism z grupy Open Access Journals, znajdują się w grupie A na liście czasopism MNiSW. Czasopisma te zaliczane są do prestiżowych czasopism naukowych. W 2021 roku Frontiers było trzecim najczęściej cytowanym wydawcą, ELSEVIER piątym a MDPI siódmym. Sumaryczny współczynnik oddziaływania wszystkich prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wynosi 32,356. W pracach podano udział każdego ze współautorów, jednak uważam, że powinna znaleźć się informacja np. w *Acknowledgments* o tym, że wyniki badań stanowią element pracy doktorskiej prowadzonej w danej jednostce naukowej i notatka o promotorze, która

sugeruje osobę odpowiedzialną za całość artykułu. We wszystkich pracach Pani Agata Woźniak jest pierwszym autorem, ponadto w jednej pracy jest autorem korespondencyjnym.

Praca składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, pozostałe części składowe pracy są przedstawione w języku angielskim. Wstęp teoretyczny nakreśla istotę problemu narastania oporności na antybiotyki wśród szczepów istotnych klinicznie (grupa ESCAPE) z opornością MDR i XDR. Zostały scharakteryzowane gatunki bakterii *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter aerogenes*, które stanowią istotny problem w walce z narastaniem lekooporności. Opisano również alternatywne podejście - terapię fotodynamiczną, jako potencjalne narzędzie do eradykacji patogenów, opisując dodatnie i ujemne strony jej stosowania, podkreślając ograniczenia monoterapii i proponując kombinację leczenia światłem w połączeniu z antybiotykoterapią. Ta część wstępu jest bardzo skrótowo opisana, ale doskonałym uzupełnieniem wstępu jest praca **przeładowa nr 1** oparta o cytowania 75 publikacji. Konstrukcja pracy jest przemyślana i wprowadza czytelnika stopniowo w bardziej złożone zadania badawcze - od opisu metodologii badawczej stosowanej przez różne zespoły badawcze stosujące terapie fotodynamiczne, po opis zastosowania ich w testach synergistycznych, zastosowanie różnych rozwiązań dla hodowli planktonicznych, biofilmu czy badań *in vivo*.

Osobny rozdział stanowią tezy badawcze i cele pracy doktorskiej, które postawiono przed Doktorantką. Są one sformułowane w sposób zrozumiały i konkretny.

Wszystkie prace stanowiące trzon rozprawy doktorskiej są przygotowane starannie, bogate w tabele i wykresy oraz wzbogacone rysunkami. Widać duże zaangażowanie Doktorantki i pozostałych autorów w przygotowanie manuskryptów.

Na uwagę zasługuje bardzo dobrze opisana metodologia badawcza, pozwalająca na dokładne odtworzenie badań.

W pracy zostały osiągnięte wszystkie założone cele badawcze. Podsumowanie uważam jednak za zbyt ogólne.

Oświadczenia wszystkich współautorów określające indywidualny wkład w powstanie publikacji zostały umieszczone na końcu dysertacji, po podsumowaniu.

2. Ocena osiągnięcia naukowego rozprawy doktorskiej

Na dysertację składa się jedna praca przeglądowa oraz cztery prace o charakterze eksperymentalnym.

Publikacja nr 1 to praca przeglądowa (*Wozniak A, Grinholc M. Combined Antimicrobial Activity of Photodynamic Inactivation and Antimicrobials-State of the Art. Front Microbiol. 2018 May 8;9:930. doi: 10.3389/fmicb.2018.00930.*), która ukazała się w 2018 r. jako pierwsza z cyklu przedstawionego dorobku i stanowi kompendium wiedzy na temat najnowszych osiągnięć i metodologii badawczej stosowanej w badaniu synergistycznego efektu terapii fotodynamicznej (aPDI) i terapii antybiotykowej (aPDI/fotouczulacz - antybiotyk/i). W dobie problemów z eradykacją wielolekoopornych drobnoustrojów połączenie obu terapii może stać się ostatnią szansą dla niektórych pacjentów. Popieram rozpoczęcie pracy doktorskiej od przygotowania merytorycznego jako mocno dydaktyczne, ponieważ przegląd literatury daje możliwość wyrobienia opinii na temat tego co dzieje się w tematyce badawczej, którą Doktorantka ma realizować. Pod dyskusję zostały poddane metodologie

badawcze stosowane zarówno dla kultur planktonicznych, jak i biofilmów bakteryjnych, w obecności endogennych i egzogennych fotouczulaczy i w obecności różnych grup antybiotyków. W konkluzji podkreślono, że rozbieżność w wynikach różnych zespołów wynika z braku ujednoliconego podejścia metodologicznego.

Doktorantka ma 30% udział w koncepcji pracy przeglądowej, oraz 70% udział w pisaniu manuskryptu. Autorem korespondencyjnym jest promotor. Praca ukazała się w druku w 2018 r.

Pozostałe cztery publikacje (nr 2,3,4,5) to prace eksperymentalne, odnoszą się do badania interakcji między terapią fotodynamiczną (aPDI/aBL) i antybiotykami/chemoterapeutykami w różnych warunkach eksperymentalnych, tj. w obecności fotouczulaczy endo/egzogennych, w kulturach planktonicznych/biofilmach oraz w badaniach *in vivo*. W każdej pracy zastosowano ten sam dopracowany schemat badawczy - testy synergistyczne (metoda dyfuzyjno-krażkowa/E-testy, metoda szachownicy (metoda cząstkowego stężenia hamującego, checkerboard assay), oraz test „kill-time assay” w celu zbadania efektu post-antybiotycznego. Każda publikacja odnosi się do innej grupy drobnoustrojów i mechanizmu lekooporności, oraz próby wyjaśnienia mechanizmu/ów efektu synergistycznego. Schemat badawczy jest dobrze przemyślany.

Publikacja nr 2 ukazała się w roku 2019 (Wozniak A, Rapacka-Zdonczyk A, Mutters NT, Grinholc M. *Antimicrobials Are a Photodynamic Inactivation Adjuvant for the Eradication of Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2019 Feb 13;10:229. doi: 10.3389/fmicb.2019.00229.) Praca jest współautorska (4-ch autorów) z 50% udziałem Doktorantki i z pierwszym współautorstwem. Publikacja odnosi się do problemu wysoce lekoopornych (XDR) szczepów *Acinetobacter baumannii* i badania efektu synergistycznego rutynowo stosowanych antybiotyków i fototerapii aPDI (ang. antimicrobial photodynamic inactivation) z udziałem egzogennie podawanych cząsteczek fotouczulających - rózu bengalskiego oraz fototerapii z zastosowaniem światła niebieskiego (aBL - antimicrobial blue light).

Pierwszym etapem było zbadania efektywności terapii fotodynamicznej wobec danej grupy bakterii i dobranie dawek subletalnych i letalnych dla aPDI/aBL i rekomendowanych antybiotyków przypisanych do różnych grup chemicznych zgodnie z wytycznymi EUCAST. Uzyskując wyniki świadczące o synergizmie terapii fotodynamicznej (aBL/aPDI) i antybiotyków CST (kolistyna), DOX (doksycyklina) dla *A. baumannii*, Doktorantka podjęła się wyjaśnienia przypuszczalnego mechanizmu synergii. Podczas ekspozycji na światło (aBL/aPDI) i w obecności fotouczulaczy, i pod wpływem antybiotyków prawdopodobnie dochodzi do produkcji reaktywnych form tlenu, co skutkuje wzmocnieniem efektu terapeutycznego. **W konkluzji autorzy podkreślają nie tylko efekt synergistyczny, ale również tendencję w kierunku obniżenia stężenia stosowanych antybiotyków, co może mieć to istotny wpływ na ograniczenie rosnącej lekooporności.**

Publikacja nr 3. (Woźniak A, Kruszewska B, Pierański MK, Rychłowski M, Grinholc M. *Antimicrobial Photodynamic Inactivation Affects the Antibiotic Susceptibility of Enterococcus spp. Clinical Isolates in Biofilm and Planktonic Cultures*. *Biomolecules.* 2021 May 5;11(5):693. doi: 10.3390/biom11050693). Praca była finansowana z grantu NCN 2015/19/B/NZ7/02487.)

Praca jest pięcioautorska, z pierwszym autorstwem Doktorantki i 35% jej udziałem (w tym 35% to koncepcja badawcza, 40% wkład pracy eksperymentalnej i 40% udział w pisaniu manuskryptu). Zauważyłam jednak, że w przypisie publikacji „Author Contributions” za koncepcję pracy (Conceptualization) odpowiedzialny był wyłącznie promotor a nie jak podano w oświadczeniu. Powinna być zachowana spójność pomiędzy tym co deklaruje się w publikacji i rozprawie doktorskiej.

Problem zakażeń enterokokami w warunkach szpitalnych jest poważny ze względu na szybkie nabywanie antybiotykooporności przez te drobnoustroje. Również dla tej grupy drobnoustrojów zbadano wpływ terapii fotodynamicznej z zastosowaniem fotouczulaczy (rózu bengalskiego (RB) i fulerenu (FL)) wobec 10 rekomendowanych antybiotyków. Efekt synergistyczny był obserwowany w zależności od stosowanego fotouczulacza i antybiotyku oraz gatunku bakterii. Na przykład zaobserwowano synergię dla RB aPDI w połączeniu z gentamycyną, ciprofloksacyną i daptomycyną dla *E. faecalis*. W przypadku *E. faecium* zaobserwowano synergię między RB-aPDI i gentamycyną lub ciprofloksacyną, natomiast w przypadku RB-aPDI z wankomycyną lub daptomycyną zaobserwowano antagonizm. Dla fuleryny efekt synergiczny przeciwko *E. faecalis* był obserwowany tylko z imipenemem. Testy działania poantybiotykowego dla *E. faecium* wykazały, że ten izolat wystawiony na działanie aPDI w połączeniu z gentamycyną, streptomycyną, tigecykliną, doksycykliną lub daptomycyną wykazuje opóźniony wzrost w porównaniu z nieleczonymi bakteriami.

Poza tradycyjną metodologią badawczą stosowaną już w poprzedniej pracy, również i tutaj podjęto próbę wyjaśnienia mechanizmu (oznaczanie produkcji tlenu singletowego, określenie produkcji ROS/rodników, test integralności błony komórkowej).

Ponadto, koncepcja pracy została poszerzona o zbadanie wpływu terapii fotodynamicznej i antybiotyków wobec hodowli w dojrzałym biofilmie, co uważam za cenne doświadczenie, zważywszy, że to biofilmy bakteryjne stanowią problem medyczny.

Proszę wyjaśnić jaki był udział Doktorantki w tych badaniach, ponieważ stanowi on nowy element pracy i dowód tezy doktorskiej.

W abstrakcie publikacji nie odniesiono się do wyników badań w biofilmie, chociaż tytuł pracy to sugeruje. Uważam, że krótki opis wyników badań we wstępie dysertacji wnosi więcej cennych informacji niż sam abstrakt publikacji.

Publikacja 4 (Woźniak A, Burzyńska N, Zybała I, Empel J, Grinholc M. Priming effect with photoinactivation against extensively drug-resistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Photochem Photobiol B*. 2022 Oct;235:112554. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112554.)

Publikacja nr 4 dotyczy badania efektu synergistycznego terapii fotodynamicznej i antybiotyków wobec bakterii *Klebsiella pneumoniae* i *Enterobacter cloacae*. Udział Doktorantki w tej pracy ogranicza się do badań związanych z *K. pneumoniae* (wg. „Author contribution”) i stanowi 45% całej publikacji, w tym również udział w koncepcji badań.

K. pneumoniae jest istotnym czynnikiem zakaźnym ze względu na wzrost liczby ciężkich infekcji i brak skutecznych metod ich leczenia. Pojawienie się szczepów *K. pneumoniae*, które nabyły dodatkowe cechy genetyczne i stały się albo hiperwirulentne (HV), albo odporne na antybiotyki jest podstawą do poszukiwania nowych terapii. Do badania zostały wybrane cztery karbapenemo-oporne izolaty *K. pneumoniae* i *E. cloacae* testowane na przeżywalność wobec różnych antybiotyków po uprzednim naświetleniu światłem niebieski (aBL) lub

zielonym (aPDI) w obecności fotouczulacza (rózu bengalskiego). **Komórki były testowane w dwóch różnych środowiskach – buforze PBS i pożywce TSB.** Zaobserwowano, że odpowiedź komórek była zależna od środowiska (redukcja przeżywalności w TSB). **Co wnoszą takie badania, proszę uzasadnić ich celowość?**

Również i w tej pracy doszukiwano się wyjaśnienia mechanizmu działania (reaktywne formy tlenu, permeabilizacja błony komórkowej), np. dla jednego z izolatów stwierdzono wytwarzanie rodników ROS wobec chloramfenikolu po ekspozycji aBL. Udowodniono, również, że kolistyna i ceftazydym wpływają na produkcję rodników ROS u *K. pneumoniae* i mogą być odpowiedzialne za synergizm. Zaobserwowano, że dla kolistyny po uprzednim naświetleniu komórek światłem niebieskim aBL dochodzi do wzrostu przepuszczalności błony komórkowej. Autorka pracy podaje, że efekty uwrażliwienia są zależne od szczepu i stosowanych testów. W mojej opinii, tego typu badania powinny być przeprowadzone na większej grupie szczepów i również z uwzględnieniem fenotypu otoczkowego/śluzowego *K. pneumoniae* (np. szczepy hiperwirulentne o fenotypie śluzowym), ponieważ fenotyp bakterii odzwierciedla jej wirulencję i adaptację do środowiska a tym samym podatność na działanie różnego rodzaju promieniowania.

Publikacja 5 (Woźniak A, Grinholc M. *Combined Antimicrobial Blue Light and Antibiotics as a Tool for Eradication of Multidrug-Resistant Isolates of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus: In Vitro and In Vivo Studies. Antioxidants (Basel). 2022 Aug 26;11(9):1660. doi: 10.3390/antiox11091660. PMID: 36139734; PMCID: PMC9495928*).

Praca nr 5 jest pracą dwuautorską, z 65% udziałem Doktorantki. Pracę tę uważam za bardzo dojrzałą.

Doktorantka w swojej pracy zbadała wpływ synergistycznego oddziaływania światła niebieskiego (aBL) i antybiotyków na przeżywalność *S. aureus* i *P. aeruginosa* w układzie *in vitro* oraz *in vivo*. Drobnoustroje te biorą udział w zakażeniach ran chirurgicznych po zabiegach operacyjnych oraz po oparzeniach, również *S. aureus* jest izolowany od pacjentów z cukrzycą typu I i II u których występuje stopa cukrzycowa. Zasadne więc wydaje się poszukiwanie nowych rozwiązań zwłaszcza w sytuacji szczepów XDR i MDR. Doktorantka do swoich badań wybrała światło niebieskie aBL z długością fali 411nm, które posłużyło do pobudzenia endogennych chromoforów bakteryjnych. **Proszę o wyjaśnienie, w jaki sposób była prowadzona normalizacja spectrum emitowanego przez diody światła (Fig1.B/pkt 2.3).**

Czy Doktorantka może wyjaśnić rolę jaka pełnią w naturze endogenne flaviny/porfiryne w komórce bakteryjnej. Mechanizm działania aBL polegał na pobudzeniu bakterii do wewnątrzkomórkowego tworzenia reaktywnych form tlenu (ROS), np. w obecności chloramfenikolu. Doktorantka wnioskuje, że produkcja porfiryne przez *S. aureus* jest powiązana z „uczuleniem” na antybiotyk. W wyniku naświetlania aBL komórki bakterii wykazywały uwrażliwienie na antybiotyki, jednakże efekt był uzależniony od szczepu/gatunku bakterii oraz od rodzaju stosowanego testu. **Czy w związku z tym, że reakcja dla różnych szczepów tego samego gatunku jest różna, taka terapia ma szansę być stosowana?**

Zostały również wykonane eksperymenty w kierunku oszacowania efektu mutagenności i toksyczności niskich dawek aBL na komórki bakteryjne (zastosowano *E. coli* i *S.*

Typhimurium) oraz komórki eukariotyczne (linia komórkowa HaCaT keratynocytów człowieka). Nie stwierdzono efektów niepożądanych dla niskich dawek aBL.

Ciekawym podejściem było pokazanie synergii światła niebieskiego z chloramfenikolem na modelu mysim (badania *in vivo*) z wykorzystaniem szczepu *S. aureus* Xen31 stosowanego do zakażenia ran zwierząt. W wyniku stosowania złożonej terapii zaobserwowano obniżony sygnał bioluminescencji, co świadczyło o skuteczności terapii. Należy jednak pamiętać, że chloramfenikol u pacjentów jest stosowany wyjątkowo i nie powinien być powtarzany. Pożądane byłoby obniżenie dawki tego antybiotyku przy fototerapii światłem.

Dodatkowe komentarze i pytania

Dobrze dopracowane narzędzia badawcze są podstawą uzyskania wiarygodnych wyników badań. W pracy zastosowano różną metodologię badawczą dla potwierdzenia synergizmu terapii fotodynamicznej i antybiotykoterapii. Wyniki badań różnymi testami nie zawsze pokrywają się, które więc testy są najbardziej wiarygodne? Czy doktorantka w oparciu o wyniki swoich badań i dane literaturowe może wskazać i zarekomendować najbardziej wiarygodną metodologię?, czy warunkiem koniecznym jest stosowanie wszystkich testów w badaniu efektu synergizmu?

Mam również uwagę, co do E-testów w badaniu MIC. Należy pamiętać, że mogą pojawić się efekty związane z danym drobnoustrojem – mikrokolonie, pełzanie bakterii, wzrost mgławicowy, (np. dla enterokoków i *Acinetobacter*), efekty związane z badanym antybiotykiem (np. wzrost rozmyty) czy efekty związane z mechanizmem oporności (mieszane subpopulacje). Wyniki takie nie będą wiarygodne, jeżeli źle je odczytamy. Stąd takie testy powinny być analizowane przez doświadczonego mikrobiologa. **Czy Doktorantka doświadczyła wątpliwości przy odczycie MIC-ów?**

Może dla danej grupy drobnoustrojów warto przygotować **schemat postępowania badawczego**, tak jak rekomenduje się badania w kierunku antybiotykooporności. Czy w oparciu o wyniki swoich badań Doktorantka jest w stanie coś zaproponować?

Proszę, aby w podsumowaniu prezentacji, Doktorantka wskazała na przełomowe osiągnięcia, które mogą przyczynić się do postępu w terapii aBL/aPDI.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agaty Woźniak oparta jest o bogaty dorobek publikacyjny (5 publikacji), prace są wysokiej jakości i zostały docenione przez recenzentów i edytora w czasopismach naukowych. Każda z przedstawionych prac wnosi nowości naukowe, metodologia badawcza jest rzetelnie przedstawiona a wyniki udokumentowane. Udział Doktorantki w powstawaniu prac, zarówno koncepcyjny, wykonawczy oraz przy pisaniu pracy oceniam bardzo wysoko.

Wniosek końcowy

Przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska pani mgr inż. Agaty Woźniak spełnia wszystkie warunki zgodnie z artykułem 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. **Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego**

o dopuszczenie Pani mgr inż. Agaty Woźniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskowanie o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agaty Woźniak

Ze względu na jakość merytoryczną pracy, oraz liczbę publikacji które stanowią trzon dysertacji wnoszę do Rady Naukowej o wyróżnienie pracy. Rozprawa doktorska ma udokumentowane wybitne osiągnięcia naukowe w prestiżowych, recenzowanych czasopismach w których Pani mgr inż. Agata Woźniak jest pierwszym autorem, a w jednej z nich dodatkowo autorem korespondencyjnym.

dr hab. Beata Krawczyk, prof. PG

Katedra Biotechnologii Molekularnej
i Mikrobiologii
POLITECHNIKA GDAŃSKA

Podpis

dr hab. Beata Krawczyk, prof. uczelni PG