

Łódź, 16.10.2017

**Prof. dr hab. Adam Jaworski**

Emerytowany profesor zwyczajny  
Zakładu Genetyki Drobnoustrojów  
Uniwersytetu Łódzkiego  
email: adam.jaworski@biol.uni.lodz.pl

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Kossakowskiej-Zwierucho  
pt. „Analiza cech genotypowych i fenotypowych warunkujących odpowiedź  
*Staphylococcus aureus* na inaktywację fotodynamiczną”.**

**1. Formalna ocena pracy**

Praca doktorska mgr Moniki Kossakowskiej-Zwierucho została w pełni zrealizowana w laboratoriach Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, pod kierunkiem prof. dr hab. Krzysztofa Bielawskiego, wypełniającego w tym przewodzie funkcję promotora. Nie zamieszczono jednak w dostarczonych mi materiałach ani w monografii doktorskiej informacji - czy i kto wypełniał funkcję promotora pomocniczego. Praca doktorska ma postać zwartej monografii (100 stron wydruku komputerowego), starannie opracowanej, w zgodzie z formalnymi wymogami dla prac doświadczalnych w dziedzinie nauk biologicznych. Na pracę doktorską składa się 10 uporządkowanych rozdziałów, odpowiednio, *Wykaz skrótów, Streszczenie, Wstęp, Cele pracy, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Spis rycin i Tabel, Literatura*. Nie odnalazłem jednak w tej rozprawie doktorskiej streszczenia w języku angielskim, co stało się w Polsce dość powszechnie przyjętym zwyczajem. Pewnym odstępstwem jest także sposób przygotowania przez Doktorantkę rozdziału *Literatura*, w postaci nie alfabetycznego wykazu autorów cytowanych prac i artykułów. Moje pewne zdziwienie budzi także fakt, że w dostarczonej mi monografii doktorskiej nie odnalazłem informacji o źródłach finansowania tej pracy. Uważam, że w obecnych warunkach finansowania badań naukowych, zamieszczanie takich informacji w publikowanych pracach, w tym w pracach doktorskich i habilitacyjnych, jest także zawodowym obowiązkiem. Co prawda, Doktorantka nie zamieściła w pracy doktorskiej pełnej informacji o dotychczasowym dorobku naukowym, ale taki dorobek odnalazłem w trakcie uważnego studiowania monografii doktorskiej i cytowanych w niej pozycji literatury. Pod numerami 97 i 101 odnalazłem zespołowe prace doświadczalne opublikowane, odpowiednio, w czasopiśmie *Frontiers in Microbiology* (2016) oraz *Photodiagnosis Photodynamic Therapy* (2013), w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Po analizie wyników opisanych w tych pracach mogę powiedzieć, że obie prace są ściśle związane z tematem i celami ocenianej pracy doktorskiej, a w pierwszej z nich zatytułowanej „*Factors Determining Staphylococcus aureus Susceptibility to Photodynamic Mikrobial Chemotherapy*”, opublikowanej w 2016 roku, upowszechniono w światowym obiegu naukowym znaczną część najważniejszych wyników opisanych i diskutowanych w recenzowanej pracy doktorskiej.

**2. Szczegółowa ocena**

Cześć teoretyczna pracy (28 stron wydruku komputerowego) obejmuje 6 logicznie uporządkowanych podrozdziałów. Treści trzech pierwszych podrozdziałów zatytułowanych, odpowiednio, *Chorobotwórczość i czynniki wirulencji Staphylococcus aureus, Lekooporność*

*Staphylococcus aureus*, Inaktywacja fotodynamiczna) - są ściśle podporządkowane tytułowi i celom pracy doktorskiej. Groźne patogenne bakterie *Staphylococcus aureus*, narastająca sekcja szczepów szpitalnych, opornych na stosowane antybiotyki, koncentruje uwagę badaczy na innych, alternatywnych strategiach terapii zakażeń gronkowcowych. Jedną z możliwych staje się również metoda fotodynamicznej terapii (ang. *Photodynamic Therapy*, PDT), nazwana inaktywacją fotodynamiczną (*Photodynamic inactivation*, PDI), szczególnie w warunkach zastosowaniu nowych, lepszych, chemicznych fotouczulaczy. W tej dziedzinie prof. dr hab. Krzysztof Bielawski i Jego współpracownicy mają bardzo duże doświadczenie i znaczący dorobek naukowy.

Stąd, temat i kierunkowy cel pracy doktorskiej mgr Kossakowskiej - Zwierucho postrzegam, z jednej strony, jako logiczną kontynuację tej tematyki, z drugiej zaś jako istotne pogłębienie badań, których kierunkowym celem jest lepsze zrozumienie molekularnych mechanizmów fotodynamicznej inaktywacji groźnych patogennych komórek bakterii. Zatem bardzo dobrym pomysłem było opisanie w kolejnych 4 podrozdziałach *Wstępu* danych literatury światowej na temat: „*Mechanizmu działania PDI*”, „*Charakterystyki Fotouczulaczy*”, „*Typów uszkodzeń powstających w komórce bakteryjnej*”, „*Odpowiedzi Staphylococcus aureus na stres oksydacyjny*” oraz „*Badań klinicznych z zastosowaniem przeciwdrobnoustrojowej inaktywacji dynamicznej*”. W moim odbiorze treści zawarte w tych podrozdziałach stanowią bardzo dobre, dodatkowe uzasadnienie podjętego tematu oraz sformułowanego celu ocenianej pracy doktorskiej.

*W podrozdziale 3.4 zatytułowanym „Typy uszkodzeń powstających na skutek PDI w komórce bakteryjnej”. Przytaczając dane literaturowe na stronie 18 stwierdza, między innymi, że „uszkodzenia kwasów nukleinowych są zjawiskiem wtórnym”, nie mającym bezpośredniego związku ze śmiercią komórki”, a na stronie 19 dodaje „mimo występowania uszkodzeń DNA, nie obserwowano efektu mutagennego”. Nie mogę pogodzić się jednak z tymi stwierdzeniami, w moim przekonaniu, nieuprawnionymi. Nie wiem, jakimi metodami „policzono” w populacjach bakterii traktowanych PDI liczbę komórek zabitych w wyniku destrukcji polimerów błony komórkowej i liczbę komórek zabitych w wyniku destrukcji kwasów nukleinowych? Nie wiem także, nawet nie rozumiem, jak, w jaki sposób, nawet najsprawniejsze mechanizmy naprawy uszkodzeń puli nukleotydów i DNA reaktywnymi formami tlenu (pula 8-oxo-dGTP i pojedynczych oraz podwójnych pęknięć nici DNA) mogą zostać perfekcyjnie naprawione, bez żadnych mutacji. W naprawę różnych uszkodzeń DNA zaangażowane są polimerazy DNA: II, IV i V, które naprawiając uszkodzenia „ratują” życie komórki, ale wprowadzają liczne błędy, a więc procesy tych napraw są bardzo mutagenne. Myślę, że sekwencjonowanie genomów komórek, które przeżyły inaktywację fotodynamiczną dało obraz częstości i rodzaju generowanych mutacji. Dostępne są także wskaźnikowe szczepy bakterii, przy pomocy których możnaby dość precyzyjnie ocenić liczbę, a nawet rodzaj mutacji generowanych PDI.*

W ramach kierunkowego celu, sformułowano cztery ambitne cele szczegółowe. Dwa pierwsze obejmowały zbadanie udziału, odpowiednio, operonu *sigB* w odpowiedzi wzorcowego szczepu *S. aureus* na inaktywację fotodynamiczną oraz genetyczną i funkcjonalną analizę systemu aktywacji alternatywnego czynnika  $\sigma^B$  w komórkach klinicznych szczepów izolowanych od pacjentów. Trzeci, równie ciekawy cel, dotyczył ustalenia natury subkomórkowych „tarcz” *S. aureus* dla bójezkiego działania PDI. Postawiono ważne pytanie - czy zahamowanie syntezy stafyloksantyny, zwiększenie płynności bakteryjnych błon komórkowych oraz zahamowanie aktywności katalazy mogą być odpowiedzialne za uwrażliwienie szczepów *S. aureus* na inaktywację fotodynamiczną, przy zastosowaniu dobranych, najlepszych fotouczulaczy.

Dla realizacji celów pracy wykorzystano dobrze scharakteryzowane szczepy referencyjne, w tym dobrane, izogeniczne mutanty, a także 15 szczepów klinicznych. W obszernym rozdziale *Materialy i Metody* wystarczająco dokładnie opisano warunki hodowli, zastosowane fotouczulacze, sposób przeprowadzania inaktywacji fotodynamicznej i analizy przeżywalności komórek. Bogaty warsztat nowoczesnych „narzędzi” molekularnych wprzęgnięto do analiz rodzaju, lokalizacji i znaczenia różnych mutacji ważnych dla efektywnej fotodynamicznej inaktywacji komórek szczepów referencyjnych, różnych dobrze dobranych mutantów oraz sporej kolekcji szczepów klinicznych. Podobnie, za dobrze dobrane uznaję zastosowane metody biochemiczne i biofizyczne dla ustalenia zawartości karotenoidów i stafyloksantyny, aktywności katalazy oraz płynności błon komórkowych. Ważne, że wszystkie prezentowane w pracy wyniki, jak pisze Doktorantka, są wartością średnią dla przynajmniej trzech niezależnych doświadczeń i podlegały analizom statystycznym przy zastosowaniu testu T-Studenta, programu STATISTICA 10, a także statystycznej metody aglomeracji Warda.

Z dużą, naukową przyjemnością przeczytałem i przeanalizowałem bardzo dobrze skonstruowany rozdział *Wyniki* oraz *Dyskusję*, napisaną przez Doktorantkę z naukową „pasją”, w oparciu o własną wiedzę i naukowy krytycyzmu. Jak pisałem wcześniej, część bardzo interesujących, w tym nowych, oryginalnych wyników opisanych w pracy doktorskiej mgr Moniki Kossakowskiej-Zwierucho, zostało upowszechnionych w 2016 roku w międzynarodowym obiegu naukowym w bardzo dobrym czasopiśmie *Frontiers in Microbiology*. Stąd, jak recenzent tej bardzo dobrej pracy doktorskiej mam znacznie ułatwione zadanie, bowiem część wyników podlegała ocenie dokonanej przez edytorów tego czasopisma i bardzo wymagających recenzentów. Stąd, pozwalam sobie na bardziej szczegółową ocenę tylko niektórych wyników, które dla mnie są szczególnie interesujące. Podejmę też z Doktorantką dyskusję na temat możliwości przeprowadzenia w ramach kolejnego projektu, innych, dodatkowych badań, które, moim zdaniem, mogą przynieść nowe wyniki na temat zwiększenia skuteczności fotodynamicznej inaktywacji groźnych patogennych bakterii, w tym opornych na antybiotyki.

Do ważnych rezultatów pracy doktorskiej mgr Moniki Kossakowskiej - Zwierucho zaliczam bardzo dobrze udokumentowane wyniki przedstawione w podrozdziale 6.2. Zastosowany model izogenicznych szczepów *Staphylococcus aureus* SH1000 (szczep dziki) i BN6390 $\Delta$ rsbU (mutant, pozbawiony całego operonu *sigB*) pozwolił uzyskać jednoznaczne wyniki, które dowodzą, że brak w komórkach gronkowca złocistego białka będącego aktywatorem alternatywnego czynnika  $\sigma^B$ , czyni je bardzo wrażliwymi na reaktywne formy tlenu, generowane przez metodę fotodynamiczną w obecności trzech wcześniej dobranych fotuczulaczy (diargininianu protoporfiryny, ftalocyjaniny cynkowej i różu bengalskiego).

Z dużym zainteresowaniem przestudiowałem wyniki bardzo dobrze zaplanowanych doświadczeń z zastosowaniem 15 klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus*. Szczepy te, poddane fotodynamicznej inaktywacji przyniosły niezwykle ciekawe, nowe wyniki. Okazało się, że wrażliwość tych szczepów na fotodynamiczną inaktywację jest bardzo zróżnicowana; od niewrażliwych do bardzo wrażliwych na poziomie szczepu referencyjnego (5-6 log<sub>10</sub> CFU/ml). Ustalono, że dla większości badanych szczepów wrażliwość komórek na PDI nie jest wynikiem niskiej akumulacji zastosowanych fotouczulaczy, ale innymi czynnikami i mechanizmami. Szczepy wrażliwe na PDI poddano genomicznej analizie sekwencjonując geny operonu *sigB*, w tym gen *rsbU* kodujący białko głównego aktywatora podjednostki  $\sigma^B$  (*rsbU*). Szczegółowa analiza rodzaju i lokalizacji mutacji pozwoliła zidentyfikować różne mutacje (punktowe, delecje, insercje), zlokalizowane w większości w genie *rsbU*. Co więcej, przy pomocy genu reporterowego, którego ekspresja jest warunkowana obecnością funkcjonalnej podjednostki  $\sigma^B$ , ujawniono znaczący spadek ilości transkryptu w 5 badanych szczepach, noszących mutacje w genie *rsbU*. Nie mam wątpliwości, że te wyniki uprawniały

Doktorantkę do postawienia wniosku o szczególnym znaczeniu RsbU-zależnego czynnika  $\sigma^B$  dla przeżywalności komórek *Staphylococcus aureus* w warunkach silnego stresu fotoksydacyjnego.

*Dodam w tym miejscu, że omawiane wyżej mutacje zostały zaprezentowane na teoretycznym, monomerycznym modelu strukturalnym białka RsbU. Ten piękny model, przedstawiony i dokładnie scharakteryzowany w Dyskusji pracy doktorskiej mgr Moniki Kossakowskiej-Zwierucho (strona 77), został opublikowany w 2016 roku we wcześniej wspomnianym czasopiśmie *Frontiers in Microbiology* - jako pierwszy w literaturze światowej. Nie mam wątpliwości, że jest to duże osiągnięcie naukowe całego Zespołu prof. dr hab. Krzysztofa Bielawskiego, a więc i utalentowanej Doktorantki.*

Niezwykle interesujące, bardzo dobrze udokumentowane wyniki przedstawiono w rozdziale 7.3, które dotyczą udziału złotego barwnika, stafyloksantyny, w ochronie komórek *Staphylococcus aureus* przed bójczym działaniem fotodynamicznej inaktywacji. Silne ochronne działanie stafyloksantyny Doktorantka udowodniła w układzie pary izogenicznych szczepów, z których jeden był mutantem pozbawionym zdolności syntezy tego pigmentu, drugi zaś miał zdolność nadprodukcji tego białka. Co więcej, szczepy kliniczne o zaburzonej aktywności RsbU-zależnego czynnika  $\sigma^B$ , wrażliwe na PDI, były równocześnie pozbawione zdolności syntezy tego ochronnego barwnika. Zatem postawiony wniosek o silnym, ochronnym działaniem stafyloksantyny (*jak sądzę jako bardzo silnego zmiatacza generowanych RFT*), jest w pełni uprawniony. W świetle opisanych w pracy wyników o udziale czynnika  $\sigma^B$  zarówno w regulacji syntezy stafyloksantyny, jak i płynności błon bakteryjnych - molekularny mechanizm odpowiedzialny, z jednej strony za uwrażliwienie komórek na fotodynamiczną inaktywację, z drugiej zaś dla ochronnego działania przed fotodynamiczną inaktywacją, jest zapewne znacznie bardziej złożony. Stad, popieram przekonanie Doktorantki, przedstawione w Dyskusji na stronie 80 pracy. Jak pisze, „*właściwy mechanizm, wedle którego stafyloksantyna uczestniczy w obronie Staphylococcus aureus przed stresem w warunkach inaktywacji fotodynamicznej - wymaga rozstrzygnięcia i dalszych badań*”.

*Stawiam więc w tym miejscu pytanie, jakie badania i na jakich modelach winny zostać przeprowadzone, by takie „rozstrzygnięcie” było możliwe?*

Nie do końca rozumiem natomiast wyniki przedstawione w obszernym podrozdziale 6.11, wskazujące na braku istotnego wpływu aktywności katalazy (znanego zmiatacza rodników  $H_2O_2$ ) na bójczą efektywność fotodynamicznej inaktywacji, a także na brak związku pomiędzy tolerancją badanych szczepów na działanie  $H_2O_2$  (generatora reaktywnych form tlenu) a stresem oksydacyjnym. W oparciu o moją wiedzę na temat dróg i mechanizmów generowania w komórkach bakterii reaktywnych form tlenu oraz mechanizmów ochrony komórki w warunkach stresu oksydacyjnego mogę jedynie powiedzieć, że różne warunki prowadzenia hodowli, rodzaj podłoża i zawartych w nich związków chemicznych, temperatura, pH, a nawet faza wzrostu bakterii - mogą mieć bardzo istotny wpływ na poziom i rodzaj produkowanych reaktywnych form tlenu, a także na odpowiedź komórek na działanie wysokich stężeń nadtlenu wodoru i stres oksydacyjny.

*Zgodnie z moją wiedzą wszystkie czynniki i warunki, które hamują tlenowe procesy komórkowe (np. inhibitory łańcucha oddechowego, cyklu Krebsa) winny czynić komórki mniej wrażliwymi na działanie PDI. I odwrotnie, wszystkie czynniki i związki, które generują dodatkową pulę RFT, czy bardziej „agresywnych” - winny wzmacniać skuteczność inaktywacji fotodynamicznej. Po trzecie, wszystkie czynniki i substancje, które niezależnie od RFT,*

uszkadzają struktury komórkowe lub materiał genetyczny (np. antybiotyki, sulfonamidy, chemiczne mutageny), winny uwrażliwiać komórkę na działanie PDI. Wreszcie, po czwarte, czynniki i mutacje, które osłabiają lub inaktywują komórkowe mechanizmy naprawy białek i kwasów nukleinowych (białka opiekuńcze, systemy naprawy DNA: BER, NER, MMSR, NHEJ, rekombinacyjnej naprawy RecA zależnej) winny w sposób znaczący wzmacniać skuteczność inaktywacji fotodynamicznej. Czy mam rację ?

*W zakończeniu niniejszej oceny stawiam dwa pytania: Po pierwsze, czy zastosowanie jako modeli badawczych np. dobrze dobranych mutantów Staphylococcus aureus i inhibitorów procesów i mechanizmów naprawy białek, DNA i RNA, byłoby przydatnym „narzędziem” badawczym? Po drugie, czy kojarzona terapia powierzchniowych zakażeń gronkowcem złocistym przy pomocy inaktywacji fotodynamicznej kojarzonej z antybiotykoterapią - nie byłaby jeszcze bardziej skuteczną metodą leczenia tych groźnych zakażeń ? Antybiotyki wszystkich 4 klas, niezależnie od mechanizmu ich specyficznego działania, indukują bezpośrednio lub pośrednio syntezę reaktywnych form tlenu, które stanowią bardzo istotną komponentę bakteriobójczego działania praktycznie wszystkich antybiotyków. Z drugiej strony, w obecności dużych stężeń antybiotyków generowana jest mała populacja bakterii uspionych metabolicznie (ang. persister cells), opornych na działanie wszystkich antybiotyków. Te metabolicznie uspione bakterie, po zakończeniu terapii antybiotykami, są odpowiedzialne za reaktywację zakażeń. Inaktywacja fotodynamiczna, stosowana równocześnie lub po zakończeniu antybiotykoterapii eliminowałaby, być może, skutecznie takie komórki z miejsca zakażenia.*

Chciałbym z Panią mgr Moniką Kossakowską-Zwierucho podjąć dyskusję na ten temat w czasie publicznej obrony pracy doktorskiej. By mogła lepiej przygotować się do tej dyskusji, w załączeniu do recenzji pracy doktorskiej przesyłam Jej i Promotorowi, prof. dr hab. Krzysztofowi Bielawskiemu, PDF artykułu przeglądowego na temat udziału reaktywnych form tlenu w bakteriobójczym działaniu , który w oparciu o najnowszą światową literaturę opublikowałem w 2017 roku.

#### **Wnioski końcowe.**

*Z pełnym naukowym przekonaniem stwierdzam, że praca doktorska mgr Moniki Kossakowskiej - Zwierucho, opracowana w postaci monografii, spełnia wszystkie formalne i naukowe wymogi Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki - stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora w dziedzinie nauk biologicznych. Zatem z pełnym, naukowym przekonaniem wnoszę do Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku o dopuszczenie mgr Moniki Kossakowskiej - Zwierucho do dalszych etapów przewodu doktorskiego.*

*Wnoszę także do Wysokiej Rady o rozważenie możliwości stosownego wyróżnienia tej bardzo wartościowej pracy doktorskiej oraz utalentowanej Doktorantki, ze względu na podjęcie nie tylko bardzo interesującego tematu, ale także z uwagi na wartość naukową uzyskanych wyników o charakterze poznawczym i aplikacyjnym, które zostały upowszechnione w międzynarodowym obiegu naukowym w postaci dwóch wartościowych prac doświadczalnych, opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR.*

