



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

Dziękuję MWB UG i GUMed

Wpłynęło dnia 12-04-2019

L.dz. nr 4000/22/2019

Kraków, 8 kwietnia 2019

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Zakład Biofizyki

Kierownik Pracowni Fotobiofizyki

Prof. dr hab. Tadeusz Sarna

**Recenzja pracy doktorskiej mgr Grzegorza Fila, zatytułowanej „Wpływ fototerapii z użyciem światła 405 nm na czynniki wirulencji *Pseudomonas aeruginosa*”, wykonanej na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego**

Coraz szybszy, trudny do zatrzymania, wzrost oporności bakterii na znane antybiotyki wymaga opracowania nowych skutecznych strategii przeciwbakteryjnych. Wśród alternatywnych terapii do zwalczania opornych mikroorganizmów szczególną nadzieję pokłada się w tzw. przeciwbakteryjnej inaktywacji fotodynamicznej (aPDI), polegającej na użyciu barwnika o właściwościach fotosensybilizatora, który po aktywacji światłem widzialnym generuje w komórkach bakterii tzw. reaktywne formy tlenu, czyli wzbudzony tlen singletowy oraz produkty częściowej redukcji tlenu cząsteczkowego. aPDI nadaje się do leczenia zlokalizowanych infekcji, przy czym terapii tej nie towarzyszy pojawienie się wzmożonej oporności mikroorganizmów. Niestety, aPDI posiada poważne ograniczenia i niektóre barwniki fotosensybilizujące są nieskuteczne w indukcji stresu oksydacyjnego niezbędnego dla zabicia bakterii. Taka sytuacja dość często występuje w przypadku Gram-ujemnych bakterii, których zewnętrzna błona jest praktycznie nieprzepuszczalna dla ujemnie naładowanych cząsteczek takich fotosensybilizatorów jak barwniki ksantenowe i niektóre pochodne porfiryn. Brak aktywności aPDI tych fotosensybilizatorów można tłumaczyć nieefektywnym oddziaływaniem krótko-żyjących reaktywnych form tlenu, generowanych poza komórką bakteryjną z jej kluczowymi składnikami, których krytyczna modyfikacja prowadzi do inaktywacji bakterii. Pomimo istotnego nasilenia fotodynamicznej inaktywacji zarówno Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych bakterii przy udziale kationowych i anionowych fotosensybilizatorów poprzez wprowadzenie do środowiska bakterii wysokich stężeń pseudohalogenków, metodę tą trudno uznać za uniwersalną, szczególnie w leczeniu zakażeń bakteryjnych u ludzi.

Interesującą alternatywą dla typowej aPDI, jest fototerapia z użyciem krótkofalowego promieniowania widzialnego, czyli światła fioletowego, bez egzogennych fotosensybilizatorów. Okazuje się, że promieniowanie fioletowe w odpowiednich dawkach zdolne jest do efektywnej inaktywacji Gram-ujemnych i Gram-dodatnich bakterii a także drożdży i pleśni. Chociaż dokładny mechanizm inaktywacji bakterii przy pomocy światła fioletowego nie jest jeszcze poznany, postuluje się, że kluczową rolę odgrywają reaktywne formy tlenu fotogenerowane przez endogenne barwniki takie jak porfiryny czy flawiny.

Tą ważną i aktualną tematyką badawczą zajmował się mgr Grzegorz Fila, a efektem jego badań są wyniki przedstawione w pracy doktorskiej zatytułowanej „Wpływ fototerapii z użyciem światła 405 nm na czynniki wirulencji *Pseudomonas aeruginosa*”, która została wykonana na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

tel. +48 (12) 664 6504

email: tadeusz.sarna@uj.edu.pl

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Promotorem recenzowanej pracy doktorskiej jest prof. dr hab. Krzysztof Piotr Bielawski a promotorem pomocniczym dr hab. Mariusz Stanisław Grinholc z Zakładu Diagnostyki Medycznej.

Praca doktorska mgr G. Fila składa się z dwu części: 15-stronicowego opracowania po polsku, oraz trzech prac doświadczalnych, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach zagranicznych. W polskiej części pracy doktorskiej znajdują się - zwięźle „Streszczenie”, „Wprowadzenie”, „Hipoteza i cele pracy”, „Plan pracy” i krótkie „Podsumowanie”. We Wprowadzeniu doktorant uzasadnia wybór *P. aeruginosa* jako obiektu swoich badań. Ma to związek ze wzrastającą liczbą zakażeń z udziałem *P. aeruginosa*, zwłaszcza w środowisku szpitalnym, przy czym zakażenia te stają się bardzo niebezpieczne dla pacjentów. Okazuje się, że pałeczki ropy błękitnej mogą wywoływać ostre lub przewlekłe infekcje dróg oddechowych, dróg moczowych, ucha środkowego i zatok, centralnego układu nerwowego i gałki ocznej oraz układu krwionośnego, często charakteryzujące się ciężkim i skomplikowanym przebiegiem. Ze względu na oporność w stosunku do wielu antybiotyków, tempo patogenez, wysoką wirulencję i odsetek śmiertelnych zakażeń, *P. aeruginosa* została zaliczona do szczególnie niebezpiecznej grupy bakterii zwanych ESKAPE. W zaistniałej sytuacji koniecznym jest poszukiwanie alternatywnych, pozaantybiotykowych metod zwalczania infekcji przy udziale tych bakterii. Doktorant wymienia kilka takich metod, w tym zastosowanie ekstraktów roślinnych, nanocząstek metali, zwłaszcza srebra, terapię fagową oraz przeciwbakteryjną terapię fotodynamiczną (aPDT). Pomimo wielu zalet, aPDT posiada istotne ograniczenia, które celnie punktuje doktorant. Ograniczenia te związane są z ograniczoną penetracją błon komórki bakteryjnej przez niektóre fofotsensybilizatory oraz nieselektywnym działaniem aPDT, mogącym prowadzić do uszkodzenia komórek gospodarza. Z tego właśnie powodu, szczególnie interesujące wydaje się zastosowanie krótkofalowego promieniowania widzialnego, zwłaszcza światła fioletowego, do inaktywacji bakterii, które krótko omawia doktorant.

Badania przeprowadzone przez doktoranta opierały się na hipotezie, o skutecznej inaktywacji wielolekoopornych bakterii *P. aeruginosa* przy pomocy światła z zakresu 405-411 nm, będącej wynikiem zarówno zahamowania produkcji biofilmu jak i zmniejszenia wirulencji bakterii. Dla weryfikacji przedstawionej hipotezy badawczej, doktorant sformułował cztery spójne cele, które należało osiągnąć poprzez realizację zaplanowanych badań:

1. Określenie aktywności biobójczej aBL w stosunku do wielolekoopornych szczepów pałeczki ropy błękitnej,
2. Sprawdzenie wpływu terapii światłem niebieski na produkcję oraz aktywność wybranych czynników wirulencji, cząsteczek sygnalizacyjnych Quorum Sensing oraz tworzenia biofilmu u *P. areuginosa*,
3. Wyznaczenie wpływu światła niebieskiego na antybiotykooporność wybranych szczepów pałeczki ropy błękitnej,
4. Optymalizacja zwierzęcego modelu zakażenia ran przez *P. aeruginosa* do badań związanych z inaktywacją fotodynamiczną

Najobszerniejszą częścią opracowania polskiego jest blisko siedmio-stronicowy „Plan pracy”, w którym mgr Fila w zwięzły ale treściwy sposób przedstawia założenia zaplanowanych badań i sposoby ich realizacji oraz odnosi się do najważniejszych uzyskanych wyników. Rozdział ten zawiera więc krótki opis aktywności biobójczej aBL, wpływu światła

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ  
Zakład Biofizyki

niebieskiego na czynniki wirulencji oraz antybiotykooporność szczepów *P. aeruginosa*, wpływu terapii światłem niebieskim na cząsteczki Quorum Sensing oraz biofilm, endogenne porfiryny i charakterystykę mysiego modelu zakażonych ran. Opracowanie po polsku kończy się pół-stronicowym „Podsumowaniem”, nawiązującym do przedstawionych celów pracy doktorskiej, z którego wynika, że cele te zostały pomyślnie zrealizowane. Najbardziej obiecującym wynikiem zrealizowanych badań, jest wg doktoranta zaobserwowana zależność pomiędzy naświetlaniem bakterii światłem niebieskim a wzrostem ich wrażliwości na badane antybiotyki. Zamieszczona Bibliografia zawiera 77 odnośników do prac, które ściśle wiążą się z tematyką badań doktoranta. Cytowania te pokazują, że mgr G. Fila bardzo dobrze orientuje się w zagadnieniach stanowiących przedmiot jego pracy doktorskiej.

Pierwsza praca doświadczalna, która znajduje się w przedstawionej przez mgr G. Fila pracy doktorskiej zatytułowana jest „Blue light treatment of *Pseudomonas aeruginosa*: Strong bactericidal activity, synergism with antibiotics and inactivation of virulence factors”. Praca ukazała się drukiem w międzynarodowym czasopiśmie *Virulence* o wysokim współczynniku przebiecia bo 3.947. Jej autorami są: Grzegorz Fila, A. Kawiak, i M.S. Grinholc. Jak wynika z załączonych oświadczeń wszystkich współautorów pracy, udział doktoranta w powstaniu tej pracy był największy i wynosił 50%.

Autorzy stwierdzili silny efekt bakteriobójczy światła o długości fali 405 nm emitowanego przez specjalny oświetlacz diodowy. Dawki światła 50 J/cm<sup>2</sup> redukowały przeżywalność wszystkich 15 badanych szczepów *P. aeruginosa* przynajmniej o 5 rzędów wielkości. Okazało się, że zastosowana fototerapia światłem niebieskim jest skuteczna także w przypadku wielolekoopornych szczepów MDR a nawet XDR, co wskazuje na duży potencjał aBL w terapii zakażeń wywołanych *P. aeruginosa*. W pracy opisano systematyczne badania wpływu aBL na maszynierię wirulencji *P. aeruginosa*, a więc wici i fimbrie, lipopolisacharydy oraz czynniki wydzielane przez bakterie, tj. elastazy, proteazy, egzotoksyny, pyocyjanina i pozakomórkowe polisacharydy. Letalne dawki światła fioletowego w znaczący sposób redukowały aktywność pyocyjaniny, zmniejszyły aktywność elastazy A i elastazy B oraz całkowitą aktywność proteolityczną *P. aeruginosa*. Zmniejszenie aktywności czynników wirulencji wydzielanych przez komórki bakteryjne po naświetleniu światłem fioletowym wskazuje na dodatkowe zalety terapii przeciwbakteryjnej BLT w przypadku chorób infekcyjnych. W przeciwieństwie do omówionych powyżej przykładów zmniejszenia aktywności czynników wirulencji pod wpływem BLT, światło fioletowe nie zmniejszało aktywności hemolitycznej badanych szczepów bakteryjnych.

Chociaż badane w pracy przyżyciowe dawki światła fioletowego nie miały wpływu na produkcję lub aktywność czynników wirulencji, naświetlanie bakterii *P. aeruginosa* dawkami sub-letalnymi w sposób istotny zwiększało wrażliwość szczepów opornych na leki na antybiotyki. Synergistyczne efekty pomiędzy antybiotykami i fotodynamiczną inaktywacją bakterii opisano były wcześniej, jednak publikacja G. Fila i współautorów jest pierwszą, w której przedstawiono dowody na synergii pomiędzy przeciwbakteryjnym działaniem antybiotyków a BLT bez egzogennych fotosensybilizatorów. Niestety, jak na razie brakuje w pełni przekonującego wyjaśnienia zaobserwowanych efektów. Omawiana publikacja jest również pierwszym wiarygodnym doniesieniem o inaktywacji czynników wirulencji *P. aeruginosa* w wyniku działania światła fioletowego bez udziału egzogennych fotosensybilizatorów.

Druga z publikacji, które opisuje wyniki stanowiące osiągnięcia recenzowanej pracy doktorskiej, została opublikowana w *Journal of Biophotonics* (współczynnik przebiecia czasopisma IF = 3,768) w roku 2018. Współautorami pracy, zatytułowanej „Antimicrobial blue light photoinactivation of *Pseudomonas aeruginosa*: Quorum sensing signaling molecules, biofilm formation and pathogenicity”, są Grzegorz Fila, M. Krychowiak, K.P. Bielawski i M. Grinholc. Udział Grzegorza Fila w powstaniu tej pracy był większy niż sumaryczny udział pozostałych współautorów i wynosił 55%. Celem badań opisanych w tej publikacji była analiza wpływu światła fioletowego na patogenność *P. aeruginosa*, zdolność do tworzenia biofilmu oraz aktywność cząsteczek układu quorum sensing (QS). Autorzy publikacji przyjęli, że reaktywne formy tlenu generowane przez światło fioletowe w komórkach bakterii, odpowiedzialne są za modyfikacje oksydacyjne, które zmniejszają aktywność cząsteczek QS, tworzenie biofilmu i patogenność bakterii. Dla potwierdzenia fotogenerowania reaktywnych form tlenu w badanych bakteriach, Fila i współautorzy zastosowali wybrane sondy molekularne, których konwersja do form fluoryzujących miała wskazywać na produkcję tlenu singletowego i rodników hydroksylowych. Chociaż ten fragment badań z pewnością nie należy do najważniejszych opisanych w omawianej pracy, ze względu na osobiste zainteresowanie właściwościami fizykochemicznymi tzw. reaktywnych form tlenu i sposobami ich detekcji, chciałem zwrócić uwagę doktoranta na następujące kwestie.

- i. Pomimo znacznych wysiłków, nie udało się, jak dotychczas, wprowadzić do badań biomedycznych sond fluorescencjonogennych, które wykazywałyby rzeczywiście specyficzne oddziaływanie z reaktywnymi formami tlenu lub azotu, umożliwiając ich selektywną detekcję. Warto w tym miejscu odnieść się do wybranych prac przeglądowych, które w sposób krytyczny dyskutują te kwestie (P. Wardman, *FRBM* 2007, 43:995; B. Kalyanaraman et al., *FRBM* 2012, 52:1; Andina et al., *Chemistry* 2017)
- ii. Specyficzna detekcja rodnika hydroksylowego, zwłaszcza w układzie komórkowym, jest szczególnie trudna ze względu na jego bardzo dużą reaktywność praktycznie ze wszystkimi składnikami komórki. Oczywiście, że OH będzie reagował z sondą typu aminofenylu fluoresceina (APF) tyle tylko, że w żadnym razie nie jest to oddziaływanie specyficzne. Bardziej specyficznym jest oddziaływanie APF z anionem podchlorynowym, którego wynikiem jest utlenienie APF do fluoresceiny (J. Flemmig et al., *JBC* 2012). W układzie bezkomórkowym pewnie można zastosować APF do wygodnej detekcji OH, ale aby być pewnym, że właśnie tę reaktywną formę tlenu się monitoruje, należałoby najpierw wykazać hamujący wpływ zmiataczy OH, np. DMSO, na konwersję APF do fluoresceiny. Jest to o tyle istotne, że jak wykazano jakiś czas temu, APF również utlenia się do fluoresceiny w wyniku oddziaływania z tlenem singletowym (M. Price et al., *Photochem. Photobiol.* 2009, 85:1177).
- iii. Pomimo, iż SOSG jest często używanym próbnikiem tlenu singletowego, najważniejszą wadą tej sondy jest jej niestabilność fotochemiczna, szczególnie przy aktywacji krótkofalowym światłem widzialnym. Niestety, fotochemicznie zmodyfikowany SOSG może sam przez się fotogenerować tlen singletowy! (Kim et al., *J. Phys Chem B*, 2013; Ragas et al., *Chem Commun.* 2009).


Nie mam natomiast żadnych zastrzeżeń w stosunku do pozostałych metod, jakie zastosowali G. Fila i współautorzy w badaniach opisanych w pracy. Stosując pomiary spektrofotometryczne, autorzy stwierdzili w ekstrakcie *P. aeruginosa* obecność chromoforu, którego absorpcja i emisja są porównywalne z takimi parametrami protoporfiryny IX. Choć nie jest to wystarczającym dowodem na kluczową rolę porfiryn jako endogennych barwników fotosensybilizujących odpowiedzialnych za działanie przeciwbakteryjne światła fioletowego, wykazanie obecności fotoreaktywnych porfiryn w badanych bakteriach stanowiłoby przekonujący argument za takim działaniem. Zastosowanie letalnych dawek światła fioletowego prowadziło do zróżnicowanego zahamowania aktywności cząsteczek sygnalizacyjnych QSSM. Natomiast przyżyciowe dawki światła hamowały tworzenie biofilmu przez dwa szczepy kliniczne i szczep referencyjny *P. aeruginosa* oraz zmniejszały patogenność bakterii w stosunku do *Caenorhabditis elegans*, użytego jako model *in vivo* infekcji. Najważniejsze wyniki badań opisanych w tej pracy jak i w poprzedniej sugerują, że terapia z użyciem światła fioletowego jest obiecującą metodą do zwalczania zakażeń przy udziale *P. aeruginosa*.

Trzecia publikacja, która stanowi część pracy doktorskiej mgr Grzegorza Fila zatytułowana jest „Murine model imitating chronic wound infections for evaluation of antimicrobial photodynamic therapy efficacy”, ukazała się drukiem w *Frontiers in Microbiology* (współczynnik, przebiecia 4,076) roku 2016. Jej współautorami są: Grzegorz Fila, K. Kasimova, Y. Arenas, J. Nakonieczna, A. Grinholc, K.P. Bielawski i L. Lilge, przy czym udział doktoranta w powstaniu tej pracy jest zdecydowanie największy i sumarycznie wynosi 42%. Praca ta powstała w wyniku współpracy naukowej pomiędzy Zakładem Diagnostyki Molekularnej UG i GUM oraz Princess Margaret Cancer Center i Department of Medical Biophysics Uniwersytetu Toronto. Celem tych badań było sprawdzenie na zaproponowanym modelu zwierzęcym chronicznych zakażeń ran przeciwbakteryjnej efektywności terapii fotodynamicznej przy użyciu czterech wybranych fotosensybilizatorów. W modelu tym, stosunkowo niewielkie rany w skórze myszy infekowano bioluminescencyjnymi szczepami MRSA, XEN i PAK i zabezpieczano specjalnym opatrunkiem, który zapewniał odpowiednią wilgotność rany, przepuszczalność dla tlenu i całkowitą transparentność dla światła widzialnego. W badaniach użyto źródła światła opartego na diodach świecących, które emitowało promieniowanie przy 525 nm. Najpierw sprawdzono efektywność fotodynamicznego zabijania bakterii *in vitro* przy udziale rożu bengalskiego, nowego błękitu metylenowego, ujemnie naładowanej pochodnej porfirykowej oraz kompleksu rutenu (II). Wyniki potwierdziły, iż wszystkie użyte fotosensybilizatory, w odpowiednich stężeniach, wykazują efektywność fotodynamiczną. W badaniach *in vivo* okazało się jednak, że efektywność użytych fotosensybilizatorów jest znacznie mniejsza niż w układzie *in vitro* i fotoaktywacja żadnego z nich nie doprowadziła do sterylizacji ran, która odpowiadałaby redukcji przeżywalności bakterii o 6, lub bodaj trzy rzędy wielkości. Choć tak duże różnice w efektywności fotodynamicznego zabijania bakterii w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*, przy użyciu tych samych fotosensybilizatorów, będące wynikiem wielu czynników biologicznych i fizykochemicznych, mogą się wydawać rozczarujące, nawet częściowa redukcja przeżywalności bakterii w ranie może mieć znaczenie kliniczne ze względu na potencjalne opóźnienie silnej odpowiedzi zapalnej i ryzyko wystąpienia ogólnego zakażenia organizmu. Ważnym wynikiem przeprowadzonych badań jest potwierdzenie przydatności modelu zwierzęcego chronicznych zakażeń ran, który zdał egzamin w badaniach nad przeciwbakteryjną terapią fotodynamiczną przy użyciu typowych fotosensybilizatorów.

Przeoglądając materiały i metody omawianej pracy natknąłem się na błędnie podane wartości molowych współczynników absorpcji użytych fotosensybilizatorów (str. 71). Autorzy pracy podają, że parametr ten wynosi 3653 mol/lcm dla różu bengalskiego przy 525 nm, 471 mol/lcm dla nowego błękitu metylenowego 1306 mol/lcm dla TMpyP oraz 831 mol/lcmdla dla badanego kompleksu rutenu (II). Wartości te są zaniżone przynajmniej o rząd wielkości, o czym można przeczytać w wielu opracowaniach specjalistycznych, a co wynika również z pomiarów absorpcji tych barwników przedstawionych na rys. 1. Dla przykładu: jeśli absorpcja  $10^{-5}$  M różu bengalskiego przy 525 nm wynosi około 0,4, to molowy współczynnik absorpcji będzie bliski  $4 \times 10^4$  mol/lcm.

Wyniki uzyskane przez doktorantkę należy uznać za wartościowe i ważne dla zrozumienia mechanizmów działania przeciwbakteryjnej terapii z użyciem światła fioletowego. Można mieć nadzieję, że stwierdzone przez doktoranta zależności i zastosowane nowatorskie modele in vivo przyczynią się do optymalizacji warunków skutecznej fototerapii przeciwbakteryjnej.

Rozprawa doktorska mgr Grzegorza Fila spełnia zwyczajowe standardy prac doktorskich z zakresu nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia oraz wymogi art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o dopuszczenie mgr Grzegorza Fila do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
/Tadeusz Sarna/