



Dziękuję MWB UG i GUMed
Wpłynęło dnia: 12-04-2019
L.dz. nr: 4000/23/2019

Politechnika Wroclawska

Wrocław, dnia 9.04.2019

dr hab. Irena Maliszewska
Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii
Wydział Chemiczny
mail: irena.helena.maliszewska@pwr.edu.pl
tel. 71 3203256

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Grzegorza Fila

pt. „Wpływ fototerapii z użyciem światła 405 nm na czynniki wirulencji
Pseudomonas aeruginosa”

Promotor: prof. dr hab. Krzysztof Piotr Bielawski
Promotor pomocniczy: dr hab. Mariusz Stanisław Grinholc

Zakażenia wywołane przez odporne na antybiotyki szczepy bakteryjne stanowią duże wyzwanie dla współczesnej medycyny. Na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat stały się one jednym z najpoważniejszych problemów w dziedzinie zdrowia publicznego, a w szczególności w leczeniu szpitalnym. W 2008 roku, doktor Luis B. Rice w publikacji pt. „*Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE*”, która ukazała się w „*The Journal of Infectious Diseases*” (2008, vol. 197, numer 8, str. 1079–1081) wskazał nowy paradygmat w zakresie patogenezы i oporności na antybiotyki, jakim są tzw. „uciekające” bakterie. Utworzony przez niego, z pierwszych liter nazw rodzajowych, sześciu ważnych patogenów: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter sp.*, akronim ESKAPE określa grupę bakterii, które „uciekają” od możliwości stosowania wobec nich antybiotykoterapii. Kliniczne znaczenie patogenów z grupy ESKAPE polega na tym, że są one zwykle wysoko wirulentne i cechują się obecnością licznych mechanizmów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, co bezpośrednio wpływa na niepowodzenia terapeutyczne, a także przedłużające się terapie, i co za tym idzie – podnosi koszty leczenia.

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Grzegorza Fila, wykonanej w Zakładzie Diagnostyki Molekularnej Katedry Biotechnologii Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, dotyczy oceny wpływu światła niebieskiego (w zakresie długości 405–411 nm) na rozwój i czynniki wirulencji wielolekoopornych szczepów pałeczki ropy błękitnej, która należy do grupy „uciekających” bakterii.



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614
NIP: 896-000-58-51
Bank Zachodni WBK S.A.
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Mgr Grzegorz Fila jako pracę doktorską przedkłada zbiór 3 oryginalnych artykułów naukowych, opatrzonych wspólnym tytułem: „**Wpływ fototerapii z użyciem światła 405 nm na czynniki wirulencji *Pseudomonas aeruginosa***”.

Taka forma rozprawy jest zgodna z art. 13.2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), który mówi, że „Rozprawa doktorska może mieć formę (...) spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych lub przyjętych do druku w czasopismach naukowych, określonych przez ministra właściwego do spraw nauki (...)”.

Wspomniany powyżej zestaw trzech prac (opublikowanych w latach 2016–2018 w czasopismach z listy Filadelfijskiej) został poprzedzony komentarzem (wprowadzeniem) Doktoranta, w którym opisano patogenność i czynniki wirulencji pałeczki ropy błękitnej oraz pokazano alternatywne dla antybiotykoterapii metody zwalczania tej bakterii, obejmujące zastosowanie ekstraktów roślinnych, nanocząstek metali (głównie srebra), fagów oraz techniki opartej na działaniu światła czyli tzw. przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej. Z komentarza wynika, że celem pracy było: (1) określenie aktywności biobójczej światła niebieskiego w stosunku do wielolekoopornych szczepów *P. aeruginosa*, (2) sprawdzenie wpływu światła niebieskiego na wytwarzanie i aktywność wybranych czynników wirulencji, (3) wyznaczenie wpływu światła niebieskiego na antybiotykkooporność wybranych szczepów pałeczki ropy błękitnej oraz (4) optymalizacja zwierzęcego modelu zakażenia ran przez badany patogen do doświadczeń związanych z fotodynamicznym niszczeniem drobnoustrojów.

Materia treściowa rozprawy obejmuje następujące zagadnienia (udział Autora jest przywołany poniżej w odniesieniu do każdej omawianej pracy):

1. **Fila Grzegorz**, Kawiak Anna, Grinholc Mariusz Stanisław, Blue light treatment of *Pseudomonas aeruginosa*: strong bactericidal activity, synergism with antibiotics and inactivation of virulence factors. *Virulence* (2017), vol. 8, numer 6, strony 938-958;

IF 3.947

Bogata część doświadczalna publikacji obejmuje ocenę wpływu światła niebieskiego na wybrane czynniki wirulencji *P. aeruginosa*: wici i fimbrie, wytwarzanie piocyjaniny oraz aktywność enzymów. Uzyskane wyniki badań pokazały, że letalna dawka światła niebieskiego skutecznie hamuje aktywność piocyjaniny, elastazy A i B oraz innych proteaz. Dawka subletalna nie wpływa na ekspresję proteaz, lipazy oraz na zdolność do ruchu badanej pałeczki (wici i fimbrie typu IV).



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 00001614
NIP: 896-000-58-51
Bank Zachodni WBK S.A.
37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Niezwykle interesujący jest wpływ światła niebieskiego w dawkach subletalnych na zwiększenie wrażliwości szczepów wobec gentamycyny, ceftazydymu i meropenemu.

Zgodne oświadczenia współautorów wykazują 50%-owy udział Doktoranta w powstaniu tej publikacji. Warto zwrócić uwagę, że Doktorant przeprowadził 95% eksperymentów.

2. **Fila Grzegorz**, Krychowiak Marta, Rychłowski Michał, Bielawski Krzysztof Piotr, Grinholc Mariusz Stanisław, Antimicrobial blue light photoinactivation of *Pseudomonas aeruginosa*: quorum sensing signalling molecules, biofilm formation and pathogenicity. *Journal of Biophotonics* (2018). doi: org/10.1002/jbio.201800079; **IF 3.768**

Przedstawione w publikacji wyniki badań pokazały, że światło niebieskie wpływa na zdolność pałeczki ropy błękitnej do tworzenia biofilmu, poprzez zmniejszenie aktywności cząsteczek sygnalizacyjnych systemów „porozumiewania się” bakterii, takich jak las i rhl. Nie obserwowano wpływu tego światła na cząsteczki systemu PQS. Potwierdzeniem uzyskanych obserwacji były eksperymenty *in vivo* z wykorzystaniem modelu nie pasożytniczego nicienia *Caenorhabditis elegant*, w których pokazano, że subletalne dawki światła niebieskiego prowadzą do osłabienia wirulencji *P. aeruginosa*.

W tej publikacji podjęto również próbę wyjaśnienia fotouczulającego mechanizmu światła niebieskiego i wykazano, że główne znaczenie odgrywa protoporfiryna IX (lub jej pochodne), która pod wpływem światła generuje toksyczne dla bakterii rodniki hydroksylowe i tlen singletowy.

Zgodne oświadczenia współautorów pokazują 55%-owy udział Doktoranta w powstaniu tej publikacji. W tym przypadku oszacowano, że Doktorant przeprowadził 55% eksperymentów. Znaczący jest również udział Doktoranta (75%) w przygotowaniu manuskryptu.

3. **Fila Grzegorz**, Kasimova Kamola, Arenas Yaxal, Nakonieczna Joanna, Grinholc Mariusz Stanisław, Bielawski Krzysztof Piotr, Lilge Lothar. Murine model imitating chronic wound infections for evaluation of antimicrobial photodynamic therapy efficacy. *Frontiers in Microbiology* (2016) 7:1258; doi: org/103389/fmicb.2016.01258; **IF 4.019**



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska

Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614

NIP: 896-000-58-51

Bank Zachodni WBK S.A.

37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Publikacja opisuje wyniki prac dotyczących zastosowania 4 różnych fotouczulaczy do foto-niszczenia komórek gronkowca złocistego i pałeczki ropy błękitnej w badaniach *in vitro* i *in vivo*, stosując światło LED o długości 525 ± 15 nm.

W badaniach *in vivo* wykorzystano zaprojektowany model myszy polegający na wycięciu jedynie małego kawałka skóry, a następnie zaklejeniu go półprzepuszczalnym opatrunkiem, tworząc w ten sposób znakomite warunki do rozwoju drobnoustrojów. Autorzy podają, że taki model ogranicza ból i stres zwierząt doświadczalnych oraz umożliwia trzymanie kilku zwierząt w jednej klatce bez ryzyka zakażeń krzyżowych. Bardzo ważny w tym modelu jest fakt, że przezroczysty opatrunek umożliwia bezpośrednie działanie światła na ranę oraz obserwację sygnału bioluminescencyjnego patogenów.

Zgodne oświadczenia współautorów wskazują na 42%-owy udział Doktoranta w przygotowaniu tej publikacji. W tym przypadku oszacowano, że 62% eksperymentów zostało przeprowadzonych przez Doktoranta. Doktorant podaje, że zaprojektował i zoptymalizował zwierzęcy model zakażenia *P. aeruginosa*. Znaczący jest również udział Doktoranta (50%) w przygotowaniu manuskryptu.

Z obowiązku Recenzenta pragnę zwrócić uwagę na drobne błędy w przedstawionej w pracy.

- W części pierwszej pracy doktorskiej tj. „Wprowadzeniu”, mgr Grzegorz Fila opisuje i patogenność i czynniki wirulencji *P. aeruginosa* i zwraca uwagę na konieczność poszukiwania alternatywnych dla antybiotykoterapii sposobów walki z tym groźnym patogenem. Część literaturowa (77 pozycji) dowodzi dobrej znajomości omawianych zagadnień przez Autora. W cytowanej literaturze Doktorant nie ustrzegł się pewnych usterek redakcyjnych. Przykładowo: (1) łacińskie nazwy rodzajowe/gatunkowe organizmów powinny być pisane kursywą, (2) tytuły czasopism powinny być pisane wielką literą.
- W oświadczeniach autorów odnoszących się do ich udziału w przygotowaniu publikacji:
Fila Grzegorz, Kasimova Kamola, Arenas Yaxal, Nakonieczna Joanna, Grinholc Mariusz Stanisław, Bielawski Krzysztof Piotr, Lilge Lothar. Murine Model imitating chronic wound infections for evaluation of antimicrobial photodynamic therapy efficacy. *Frontiers in Microbiology* (2016) 7:1258, w kolumnie “Writing” sumaryczny udział autorów wynosi 106%.



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska

Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 00001614

NIP: 896-000-58-51

Bank Zachodni WBK S.A.

37 1090 2402 0000 0006 1000 0434



Politechnika Wroclawska

Poniżej wykaz moich pytań (*stricte* o charakterze dyskusyjnym), wobec których oczekuję ustosunkowania się przez Doktoranta w trakcie obrony:

1. Czy Doktorant próbował przeprowadzić badania niszczenia pałeczek ropy błękitnej na modelu mysim z zastosowaniem jedynie światła niebieskiego (bez dodatkowego fotouczulacza wprowadzanego do układu)?
2. Który wynik rozprawy doktorskiej Autora jest najważniejszy pod względem osiągnięć naukowych, a który stanowi osiągnięcie o największym znaczeniu aplikacyjnym i dlaczego?

Pomyślna realizacja badań była możliwa dzięki zastosowaniu szeregu nowoczesnych, komplementarnych technik badawczych. Porównując cel i założenia pracy z osiągniętymi wynikami, z przekonaniem mogę stwierdzić, że program badań został całkowicie zrealizowany. Chciałabym podkreślić, że Doktorant posiada szeroką wiedzę z zakresu biochemii mikroorganizmów i uzyskał kompetencje instrumentalne, umożliwiające prawidłowy dobór procedur i technik badawczych, wykonanie pomiarów i interpretację wyników. Opublikowanie rezultatów badań w renomowanych czasopismach międzynarodowych świadczy zarówno o aktualności tematyki badawczej, jak i o wysokim ich poziomie naukowym, który *de facto* został już pozytywnie oceniony przez światowej klasy ekspertów.

Niniejszym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Grzegorza Fila w charakterze zbioru trzech oryginalnych artykułów naukowych o sumarycznym współczynniku oddziaływania 11.734 – zatytułowana: „**Wpływ fototerapii z użyciem światła 405 nm na czynniki wirulencji *Pseudomonas aeruginosa***”, odpowiada warunkom Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym, a dorobek naukowy Doktoranta uzasadnia nadanie mu stopnia naukowego doktora nauk biologicznych w dyscyplinie biochemia.

Wnioskuje o dopuszczenie przedstawionej pracy doktorskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

Politechnika Wroclawska

Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

www.pwr.edu.pl

REGON: 000001614

NIP: 896-000-58-51

Bank Zachodni WBK S.A.

37 1090 2402 0000 0006 1000 0434