



UNIWERSYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Dr hab. Ewa Dworniczek
Katedra i Zakład Mikrobiologii
Wydział Lekarski,
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Ul. Chałubińskiego 4,
50-368 Wrocław

Wrocław 6.06.2023r

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Michała Karola Pierańskiego,
pt.: Ewaluacja potencjału fotoinaktywacji w eradykacji nosicielstwa *Streptococcus agalactiae* w układzie moczowo-płciowym” (Evaluation of photoinactivation potential in eradication of *Streptococcus agalactiae* in the urogenital system),

wykonanej w Zakładzie Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem naukowym promotora dr hab. Mariusza Grinholca, prof. UG.

Podstawę formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej mgr Michała K. Pierańskiego stanowi pismo przewodniczącej Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego, dr hab. Joanny N. Izdebskiej, prof. UG, zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego.

Zasadność podjętej tematyki

Paciorkowce grupy B (GBS), których najważniejszym przedstawicielem jest *Streptococcus agalactiae*, są przyczyną zakażeń o charakterze inwazyjnym u osób starszych, z obniżoną odpornością i cierpiących na choroby współistniejące. Jednak podkreślenia wymaga fakt, że bakterie te wciąż pozostają główną przyczyną zakażeń noworodków na całym świecie. Dla przykładu, w roku 2020, wczesne lub późne zakażenia spowodowane przez GBS odnotowano wśród 400 tys. noworodków, a 91 tys. zakażeń zakończyło się zgonem. Paciorkowce grupy B są wykrywane w mikrobiomie pochwy i przewodu pokarmowego u 1/3 kobiet, co stanowi poważny czynnik ryzyka zakażenia krwi i rozwoju sepsy, u dziecka i matki. Bakteriemia, którą stwierdza się głównie w okresie okołoporodowych i poporodowym dotyczy 20-25% hospitalizowanych kobiet w ciąży. Szacuje się, że w skali ogólnoswiatowej kolonizacja paciorkowcami grupy B dotyczy średnio 20 mln kobiet, a 40 tys. z nich, każdego roku zapada na sepsę.

W terapii zakażeń powodowanych przez *S. agalactiae* jak również w profilaktyce śródporodowej, powszechnie stosowane są antybiotyki β -laktamowe, jako leki pierwszego rzutu. Chociaż antybiotyki są obecnie zalecanym sposobem zapobiegania skutkom klinicznym kolonizacji przez GBS, to ich szerokie stosowanie niesie ze sobą ryzyko rozwoju oporności. Do niedawna, wszystkie kliniczne izolaty GBS były uważane za wrażliwe na β -laktamy. Obecnie izolowane szczepy mogą wykazywać zmniejszoną wrażliwością na

penicylinę (PRGBS), a wiele z nich dodatkowo brak wrażliwości lub oporność na fluorochinolony i makrolidy. Niepokój budzą tendencje do rozwoju oporności wielolekowej, co będzie skutkowało dużym ograniczeniem w leczeniu i profilaktyce zakażeń powodowanych przez tę grupę bakterii.

Ograniczanie rozwoju oporności drobnoustrojów chorobotwórczych na leki, jest jednym z priorytetów polityki mającej na celu ochronę antybiotyków. Uzasadnione jest zatem sięganie po metody alternatywne, które zapewnią skuteczną ochronę zdrowia publicznego.

W ciągu ostatnich lat dokonał się znaczący postęp w badaniach nad zastosowaniem inaktywacji fotodynamicznej (aPDI) w mikrobiologii. Przeciwbakteryjne działanie aPDI zostało udowodnione wielokrotnie, jednak skuteczność tej metody jest ściśle związana z charakterem fotosensybilizatora oraz rodzajem niszczonego drobnoustroju.

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Michała Pierańskiego dotyczy oceny skuteczności inaktywacji fotodynamicznej z udziałem różu bengalskiego (RB) w eradykacji *Streptococcus agalactiae*, komensalnych bakterii dróg moczowo-płciowych człowieka. Proponowana metoda jest złożona jednak wielce obiecująca i w niewielkim stopniu obciążona działaniem niepożądanym.

Struktura rozprawy doktorskiej

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska zawarta jest na 92 stronach i ma formę spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych, w okresie od 2020-2023. W jej skład wchodzi cztery następujące artykuły naukowe:

- A1. An extended logistic model of photodynamic inactivation for various levels of irradiance using the example of *Streptococcus agalactiae*. Brasel M, **Pieranski M**, Grinholc M. Sci Rep. 2020 Aug 25;10(1):14168.
- A2. Increased photoinactivation stress tolerance of *Streptococcus agalactiae* upon consecutive sublethal phototreatments. **Pieranski M**, Sitkiewicz I, Grinholc M. Free Radic Biol Med. 2020 Nov 20;160:657-669.
- A3. Optimization of *Streptococcus agalactiae* Biofilm Culture in a Continuous Flow System for Photoinactivation Studies. **Pieranski MK**, Rychlowski M, Grinholc M. Pathogens. 2021 Sep 18;10(9):1212.
- A4. Antimicrobial Photodynamic Inactivation: An Alternative for Group B *Streptococcus* Vaginal Colonization in a Murine Experimental Model. **Pierański MK**, Kosiński JG, Szymczak K, Sadowski P, Grinholc M. Antioxidants (Basel). 2023 Apr 1;12(4):847.

Udział mgr M. Pierańskiego w powstaniu ww. czterech artykułów wieloautorskich został określony na podstawie oświadczeń złożonych przez wszystkich autorów i wynosi odpowiednio, 30%, 60%, 70% i 50%. Doktorant jest pierwszym autorem w trzech publikacjach i drugim autorem w jednej publikacji. W oświadczeniach nie opisano dokładnego wkładu autorów w powstanie wyżej wymienionych prac. Jednak informacja ta została przedstawiona w końcowej części każdego z artykułów co daje wystarczający obraz i możliwość oceny zaangażowania Doktoranta.

Wszystkie artykuły ukazały się w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach naukowych - *Scientific Reports*, *Free Radical Biology and Medicine*, *Pathogens* oraz

Antioxidants, a sumaryczny współczynnik wpływu, Impact Factor wynosi: 25,30 (liczba punktów MEiN: 480). Wg bazy Web of Science, aktualny kwartył czasopism *Free Radical Biology and Medicine* oraz *Antioxidants* to Q1, a dla *Scientific Reports* i *Pathogens* - Q2.

Praca doktorska jest podzielona na 5 rozdziałów poprzedzonych stroną tytułową, spisem treści, streszczeniem i informacją o źródłach finansowania. W pierwszym rozdziale dysertacji znajduje się wstęp, postawiona hipoteza i cele pracy. Opis dokonań badawczych jest zawarty w rozdziałach 2-5, na które składają się publikacje poprzedzone streszczeniami. W końcowej części rozprawy zamieszczone są: podsumowanie, spis literatury (36 pozycji) i załączniki z oświadczeniami o procentowym udziale twórców publikacji. Streszczenie pracy doktorskiej przedstawione jest w językach polskim i angielskim, a pozostałe jej części tylko w języku angielskim.

Układ pracy jest moim zdaniem dobrze przemyślany, a streszczenia dobrze eksponują najważniejsze osiągnięcia Doktoranta. Nie pojawiają się tutaj zbędne treści będące jedynie powtórzeniem treści zamieszczonych artykułów. Tekst prowadzi czytelnika przez kolejne etapy rozprawy zachowując ciąg przyczynowo skutkowy. Autor rozpoczyna pracę od stworzenia rozszerzonego modelu właściwości dynamicznych aPDI z wykorzystaniem *S. agalactiae*. W kolejnych badaniach dokonuje oceny prawdopodobieństwa rozwoju oporności / tolerancji badanych bakterii na zastosowaną aPDI. Zebrane wyniki badań pozwalają na zaplanowanie kolejnych eksperymentów ukierunkowanych tym razem na optymalizację warunków hodowli, a następnie inaktywację fotodynamiczną biofilmu tworzonego stacjonarnie i w warunkach przepływu. W dalszej kolejności badane są biofilmy wielogatunkowe, działanie mutagenne aPDI i ocena skuteczność proponowanej techniki wykonana na modelu zwierzęcym.

Merytoryczna ocena rozprawy

Mając na uwadze ograniczenie zjawiska kolonizacji i transmisji drobnoustrojów chorobotwórczych oraz związanych z nimi stanów patologicznych, Doktorant przedstawił możliwość zapobiegania zakażeniom *S. agalactiae* poprzez eradykację tych bakterii za pomocą inaktywacji fotodynamicznej (aPDI). Po nakreśleniu problemu badawczego, mgr Michał Pierański postawił hipotezę badawczą, że fotoinaktywacja z użyciem różu bengalskiego jako fotosensybilizatora, ma znaczący potencjał w eliminacji *S. agalactiae* z dróg moczowo-płciowych. Aby udowodnić swoją hipotezę, Doktorant zaprojektował szeroki wachlarz badań, których złożoność odzwierciedla dziewięć, następujących celów pracy doktorskiej:

- 1) ocena bakteriobójczej skuteczności fotoinaktywacji *S. agalactiae*;
- 2) ocena bakteriobójczej skuteczności fotoinaktywacji *Lactobacillus* spp., bakterii wchodzących w skład mikrobioty pochwy człowieka;
- 3) ocena prawdopodobieństwa rozwoju oporności *S. agalactiae* na inaktywację fotodynamiczną w wyniku wielokrotnego oddziaływania na bakterie;
- 4) ocena fototoksyczności i cytotoksyczności badanego protokołu fotoinaktywacji w odniesieniu do ludzkich komórek epitelialnych;
- 5) ocena mutagenności powyższego protokołu z wykorzystaniem komórek prokariotycznych i eukariotycznych;
- 6) optymalizacja protokołu fotoinaktywacji za pomocą modelowania komputerowego;
- 7) ocena skuteczności fotoinaktywacji w procesie dekolonizacji *S. agalactiae* z pochwy, na modelu zwierzęcym (myszy);

- 8) ocena wpływu fotoinaktywacji na mikrobiotę pochwy;
- 9) histopatologiczna analiza tkanki pochwy, po fotoinaktywacji.

Należy dodać, że wyżej wymienione cele są jednocześnie głównymi celami artykułów wchodzących w skład zbioru. W prezentowanym spisie zabrakło mi jednoznacznego sformułowania celu jakim jest również ocena skuteczności aPDI w eradykacji biofilmu tworzonych przez badane drobnoustroje.

Z uwagi na fakt, że wszystkie cztery prace były już recenzowane przez specjalistów w danej dziedzinie, pozostaje mi tylko ich ogólna ocena.

W artykule A1, mgr M. Pierański przedstawił nowatorskie badania, których wyniki posłużyły do oceny dynamiki procesu inaktywacji fotodynamicznej drobnoustrojów, na przykładzie *Streptococcus agalactiae*. W pracy wykazano, że poziom natężenia promieniowania istotnie wpływa na dynamikę zamierania komórek bakteryjnych, a spadek liczebności populacji jest tym szybszy im większa jest moc promieniowania. Zmianę żywotności bakterii oceniano w 12 punktach czasowych, dla czterech różnych wartości natężenia światła (70 mW/cm^2 , $52,5 \text{ mW/cm}^2$, 35 mW/cm^2 , $17,5 \text{ mW/cm}^2$) i przy stałym stężeniu fotosensybilizatora (RB).

Na podstawie uzyskanych wyników został stworzony rozszerzony model logistyczny aPDI, model dynamicznych właściwości aPDI, który pozwala oszacować czas naświetlania niezbędny do uzyskania pożądanej skuteczności procesu. Proponowany model, zdaniem Autora, obok lepszego zrozumienia dynamiki fotoinaktywacji, stwarza możliwość szybszego wdrażania wyników badań laboratoryjnych do praktyki klinicznej oraz możliwość porównywania wyników badań przeprowadzanych na innych, podobnych modelach.

W Artykule A2, opisano interesujący problem badawczy jakim jest możliwość rozwoju tolerancji *S. agalactiae* na inaktywację fotodynamiczną. W tym miejscu mgr M. Pierański odniósł się do sytuacji klinicznych, w których złożone środowisko zakażonej tkanki wpływa na ograniczoną skuteczność aPDI. Jest to interesująca praca, w której wykorzystano rozległy warsztat badawczy i wykazano, że paciorkowce *S. agalactiae* poddawane wielokrotnie działaniu subletalnych dawek aPDI i fotosensybilizatora (RB), rozwijają tolerancję na tę formę leczenia. Opisany problem jest wciąż aktualny także w odniesieniu do antybiotykoterapii.

Uzyskane wyniki badań pozwoliły Doktorantowi nakreślić obraz złożonego mechanizmu, który leży u podstawy zjawiska tolerancji *S. agalactiae* na aPDI, na który składają się m. in. obecność enzymów chroniących przed ROS, produkcja karotenoidów, zwiększona ekspresja genów zaangażowanych w ochronę przed stresem oksydacyjnym czy zmiana fenotypu prowadząca do rozwoju subpopulacji wolnorosnących.

Warto też zauważyć, że Autor wyraźnie rozgranicza pojęcia oporności i tolerancji drobnoustrojów i odnosi się w tym zakresie do wytycznych stosownego Komitetu Naukowego (SCCS). Stanowi to jeden z wielu dowodów świadczących o odpowiednim przygotowaniu Doktoranta do analizy opisywanego problemu.

W artykule A3, mgr M. Pierański podjął próbę optymalizacji warunków hodowli i inaktywacji biofilmów tworzonych przez cztery najczęściej izolowane warianty serologiczne *Streptococcus agalactiae*. Doktorant wykonał analizę porównawczą, dla biofilmów hodowanych w warunkach stacjonarnych (mikro płytki, pomiar gęstości optycznej) oraz w warunkach ciągłego przepływu (bioreaktor CDC do hodowli biofilmu, wizualizacja w mikroskopie konfokalnym). Te ostatnie, najlepiej oddają naturalny proces transformacji i wzrastania drobnoustrojów w formie osiadłej. Biofilmy były poddawane inaktywacji

fotodynamicznej z wykorzystaniem rózu bengalskiego, jako fotosensybilizatora i światła (λ_{max} 522 nm, 10,6 mW/cm²). Warto podkreślić, że były to pionierskie badania dotyczące fotoinaktywacji biofilmów *S. agalactiae*. Dodatkowo, w celu wykazania wpływu ustalonych warunków aPDI na tkankę człowieka, wykonano testy cytotoksyczności z wykorzystaniem ludzkich keratynocytów.

Sformułowane wnioski wskazują, że inaktywacja fotodynamiczna z użyciem RB, jest skuteczną metodą eradykacji tak formy planktonicznej jak i biofilmu tworzonego przez *S. agalactiae*, w procesie kolonizacji pochwy. Mając na uwadze duże ograniczenia jakie stoją przed medycyną w zakresie walki z biofilmem, uzyskane wyniki badań są wysoce obiecujące. Proponowana forma terapii jak wykazano, cechuje się wysoką bakteriobójczą skutecznością, brakiem działania mutagennego na komórki ludzkie i nie ma negatywnego wpływu na równowagę biologiczną w obrębie mikrobioty pochwy.

W artykule A4, Doktorant przedstawił inaktywację fotodynamiczną z udziałem RB, jako alternatywną formę eradykacji *S. agalactiae*. Inaktywacja dotyczyła planktonicznych form bakterii (7 szczepów *S. agalactiae* i 3 szczepy *Lactobacillus* spp.), a następnie mieszanych biofilmów utworzonych w warunkach stacjonarnych z użyciem obu rodzajów bakterii. Na uwagę zasługuje właściwy dobór gatunków - *L. gasseri*, *L. crispatus* i *L. jensenii*, naturalnie zasiedlających pochwę. Doktorant wykonał pomiar foto- i cytotoksyczności w odniesieniu do keratynocytów ludzkich i ludzkich komórek nabłonka pochwy, a także przeprowadził analizę dynamiki wzrostu komórek eukariotycznych w czasie rzeczywistym, testy mutagenności dla bakterii (test Ameysa) oraz testy genotoksyczności dla komórek eukariotycznych (test kometowy). W części eksperymentalnej prowadzonej in vivo, samicom myszy podawano dopochwowo zawiesiny *S. agalactiae* i RB, a następnie naświetlano. DNA pobranych komórek bakteryjnych poddano sekwencjonowaniu i analizie, z kolei pobrane tkanki zwierzęce były oceniane w badaniu histopatologicznym. Doktorant wykazał, że zastosowana technika inaktywacji fotodynamicznej prowadzi do znaczącego spadku przeżywalności *S. agalactiae*, form planktonicznych i biofilmów ale też do nieznacznego naruszenia ilości pozostałych składowych mikrobioty pochwy, głównie bakterii *Lactobacillus*. Zdaniem Autora, zastosowane parametry aPDI są bezpieczne dla ludzkich keratynocytów i nabłonka pochwy, co potwierdziły badania. Przedstawione w niniejszej pracy podejście, które łączy narzędzia badawcze z zakresu mikrobiologii i bioinformatyki, może stanowić istotny element wsparcia w procesie eradykacji bakterii chorobotwórczych.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska posiada moim zdaniem wysoka wartość naukową, a treść czterech artykułów odzwierciedla przemyślany program badawczy. Dyskusja dotycząca uzyskanych wyników daje jasny pogląd na teoretyczne i co istotne, praktyczne znaczenie prowadzonych badań. Mgr Michał Pierański zaprezentował w swojej pracy doktorskiej bogaty, zróżnicowany warsztat i dojrzałość badawczą, a także nowatorskie podejście do rozwiązania założonego problemu. Poszukiwanie nowych rozwiązań w zakresie zwalczania drobnoustrojów chorobotwórczych, a także propagowanie terapii fotodynamicznej w mikrobiologii i medycynie, z uwzględnieniem tzw. biofilmu medycznego, uważam za ważne osiągnięcie naukowe mgr M. Pierańskiego.

Uwagi krytyczne i pytania

1. W artykule nr 4, zaobserwowano, że aPDT z RB prowadziła do znaczącego zmniejszenia ilości *S. agalactiae* w pochwie badanych zwierząt. Obserwowano też nieznaczný spadek ilości pozostałych drobnoustrojów tworzących mikrobiotę, z wyjątkiem pałeczek z rodziny

Enterobacteriaceae i ziarenkowców *Staphylococcus* spp. co jak stwierdzono, w odniesieniu do prób kontrolnych, nie miało związku z aPDI. Jednak eliminacja jednego ogniwa i nawet nieznaczne zmniejszenie liczebności pozostałych drobnoustrojów jest zaburzeniem ich środowiska. Czy zatem nie należy się spodziewać dalszych konsekwencji wynikających jednak z naruszenia homeostazy pochwy? Skutkiem tego może być nadmierne namnożenie mniej korzystnych bakterii czy grzybów, co nie pozostanie obojętne dla organizmu gospodarza.

2. Środowisko pochwy stanowią złożone biofilmy tworzone przez większą liczbę gatunków bakterii niż te poddane analizie przez Doktoranta. Łączy je sieć wzajemnych powiązań, która obejmuje nawet najmniej liczne populacje. Uważam zatem, że ostateczną opinię na temat proponowanej metody eradykacji GBS należy wyraźnie uzależnić od oceny jej oddziaływania na zdecydowanie większą grupę drobnoustrojów, które kolonizują ludzką pochwę. Czy jest zdaniem Doktoranta możliwość ochrony bakterii „dobroczynnych” dla organizmu człowieka, przed niszczącym i nieselektywnym działaniem ROS?

3. Czy zdaniem Doktoranta, inaktywacja fotodynamiczna z udziałem RB lub innego fotosensybilizatora, posiada wystarczający potencjał do walki z drobnoustrojami wieloopornymi na leki (MDR)?

Ocena końcowa

Rozwiązanie problemu badawczego i weryfikacja hipotezy postawionej w rozprawie doktorskiej, zostały wykonane na wysokim poziomie merytorycznym. Doktorant opanował złożony warsztat badawczy, umiejętność projektowania i wykonania prac doświadczalnych. Wykazał się też zdolnością do analizy danych za pomocą nowoczesnych narzędzi analitycznych i umiejętnością konfrontacji z wynikami innych zespołów. Rozprawa doktorska mgr Michała Pierańskiego, pt.: „Ewaluacja potencjału fotoinaktywacji w eradykacji nosicielstwa *Streptococcus agalactiae* w układzie moczowo-płciowym”, zrealizowana pod kierunkiem dr hab. Mariusza Grinholca, prof. UG, potwierdza przygotowanie i ogólną wiedzę Doktoranta w zakresie dyscypliny nauki biologiczne. Stanowi ona dowód na umiejętność prawidłowego prowadzenia pracy naukowej.

Tym samym stwierdzam, że zostały spełnione wszystkie warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 Nr 65 poz. 595; z późn. zm.) i jednocześnie ujętym w przepisach wprowadzających ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (art. 179. 1. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.) i przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego, o dopuszczenie mgr Michała Pierańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową recenzowanej rozprawy doktorskiej, aktualna problematykę badawczą, innowacyjne rozwiązania, a także publikacje w recenzowanych czasopismach naukowych, **wniosuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr Michała Pierańskiego.**

Wrocław 6 czerwca 2023r

