



Politechnika
Wroclawska

Politechnika Wroclawska
Wydział Chemiczny

Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław
tel./fax 71 320 24 27

dr hab. Irena Maliszewska, prof. PWr
irena.helena.maliszewska@pwr.edu.pl
tel. 71 320 4027 lub 71 320 3256

Wrocław, dnia 17.05.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Michała Karola Pierańskiego

pt. „Ewaluacja potencjału fotoinaktywacji w eradykacji nosicielstwa

***Streptococcus agalactiae* w układzie moczowo-płciowym”**

Promotor: dr hab. Mariusz Stanisław Grinholc, prof. UG

Praca została wykonana w Zakładzie Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego

Pierwsze wzmianki o medycznych zastosowaniach substancji fotouczulających pochodzą z czasów starożytnego Egiptu, Indii czy Grecji, gdzie ekstrakt roślinny zawierający psoralen, w połączeniu ze światłem, stosowano do leczenia łuszczycy i bielactwa. Od tych czasów terapia fotodynamiczna, ze względu na prostą procedurę oraz liczne zalety, wzbudza ogromne zainteresowanie, nie tylko lekarzy, ale również biologów i fizyków.

Do przeprowadzenia takiej terapii niezbędne są trzy składniki: fotouczulacz, który ma za zadanie akumulację w miejscu docelowym (komórka, tkanka); źródło światła, którego zadaniem jest wzbudzenie skumulowanego fotouczulacza oraz tlen zawarty w miejscu stosowania terapii fotodynamicznej, niezbędny do prawidłowego zajścia reakcji fotochemicznej. Każdy z tych składników stosowany osobno nie jest cytotoksyczny. Jednakże połączone działanie tych trzech składników pozwala na wygenerowanie reaktywnych form tlenu (ROS), które działają destrukcyjnie na komórki żywe.

Terapia fotodynamiczna znalazła zastosowanie w leczeniu niektórych nowotworów, nienowotworowych chorób skóry, w stomatologii oraz kosmetologii. Liczne badania pokazują możliwość wykorzystania tej techniki w leczeniu innych poważnych chorób, takich jak: miażdżyca tętnic, choroby dermatologiczne, reumatoidalne zapalenie stawów, zwyrodnienie płamki żółtej oraz chorób hematologicznych.

Obserwowany od wielu lat problem rosnącej antybiotykooporności drobnoustrojów spowodował konieczność poszukiwania alternatywnych dla antybiotykoterapii metod niszczenia patogenów. Szczególnie obiecująco w tym względzie przedstawia się terapia fotodynamiczna, która w przypadku eradykacji mikroorganizmów określana jest jako przeciwdrobnoustrojowa terapia fotodynamiczna (aPDT) lub inaktywacja fotodynamiczna mikroorganizmów (aPDI).

Zakres badań przeprowadzonych przez Doktoranta dotyczący oceny skuteczności foto-inaktywacji *Streptococcus agalactiae*, możliwości rozwoju oporności/tolerancji na terapię fotodynamiczną wraz z oceną potencjału aPDI w niszczeniu tego paciorkowca w pochwie modelu zwierzęcego- myszy, bardzo dokładnie wpisuje się w zasygnalizowany powyżej obszar nauki.

Pan magister Michał Pierański jest współautorem 11 artykułów opublikowanych w renomowanych czasopismach międzynarodowych: *Lighting Research & Technology* (IF=2,680); *Future Medicinal Chemistry* (IF=4,767), *Scientific Reports* (IF=4,996); *Journal of Molecular Liquids* (IF=6,633); *Free Radical Biology and Medicine* (IF=8,101); *Frontiers in Medicine* (IF=5,058); *Biomolecules* (IF=6,064); *Pathogens* (IF=4,31); *Journal of Biological Macromolecules* (IF=8,025); *Antioxidants* (IF=7,675). Sumaryczny współczynnik oddziaływania jest imponujący i wynosi 63,305.

Doktorant w trzech publikacjach jest pierwszym autorem. Pan mgr Michał Pierański w latach 2019-2022 uczestniczył w 9 konferencjach krajowych i zagranicznych. Aktywność naukowa Doktoranta przełożyła się na uzyskanie w roku 2016 projektu badawczego dla uczestników Interdyscyplinarnych Przyrodniczo-Matematycznych Studiów Doktoranckich (LISMIDOS) pt. „Optimisation of the multispecies biofilm culture of *Streptococcus agalactiae* and vaginal physiological flora as a model for *S. agalactiae* carriage studies”. Doktorant był również głównym wykonawcą grantu NCN OPUS 12.

Na uwagę zwraca również aktywność dydaktyczna Autora rozprawy doktorskiej, gdyż w latach 2017-2022 prowadził trzy różne kursy dla studentów (Diagnostyka mikrobiologiczna, Diagnostyka molekularna oraz Indywidualna praktyka laboratoryjna). Na podkreślenie

zasługuje również aktywny udział w wielu szkoleniach, które dotyczyły głównie nowoczesnych metod analitycznych.

Formalna ocena pracy

Pan magister Michał Pierański jako rozprawę doktorską przedkłada zbiór czterech oryginalnych artykułów naukowych, opatrzonych wspólnym tytułem: „Ewaluacja potencjału fotoaktywacji w eradykacji nosicielstwa *Streptococcus agalactiae* w układzie moczowo-płciowym”. 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. z roku 2017 poz. 1789 z późniejszymi zmianami) oraz z rozporządzeniem MNiSW z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261).

Wspomniany powyżej zestaw czterech oryginalnych prac naukowych (opublikowanych w latach 2020–2023 w renomowanych czasopismach z listy Filadelfijskiej) został poprzedzony wprowadzeniem czytelnika do problemu występowania i patogenności *Streptococcus agalactiae* oraz krótką charakterystyką przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej. Teza, cel i zakres pracy zostały określone na stronie 12 rozprawy doktorskiej. Teza pracy została sformułowana na podstawie danych literaturowych i wcześniejszych badań naukowych prowadzonych w Zakładzie Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej. W sformułowanej tezie wskazano, że róż bengalski jako fotouczulacz może być stosowany do eradykacji nosicielstwa *S. agalactiae* w układzie moczowo-płciowym. Tak postawiona teza oraz cel pracy określiły zakres badań, którymi były: (1) ocena biobójczej aktywności aPDI wobec *Streptococcus agalactiae*; (2) ocena aktywności biobójczej aPDI wobec szczepów *Lactobacillus* spp.; (3) ocena prawdopodobieństwa nabycia odporności wobec aPDI w wyniku wielokrotnej ekspozycji badanych bakterii na światło w obecności fotouczulacza; (4) ocena foto- i cytotoksyczności stosowanego protokołu aPDI wobec ludzkich keranocytów; (5) ocena mutagenności stosowanej procedury wobec wybranych komórek pro- i eukariotycznych; (6) optymalizacja protokołu aPDI za pomocą modelowania komputerowego; (7) ocena efektywności zastosowanej terapii do niszczenia *S. agalactiae* kolonizującego pochwę myszy; (8) ocena wpływu aPDI na florę bakteryjną pochwy i (9) histopatologiczna analiza komórek pochwy mysiej po ekspozycji na światło w obecności różu bengalskiego.

Rozprawa doktorska została podzielona na 4 rozdziały, których tytuły zaczerpnięto

bezpośrednio z publikacji stanowiących cykl prac wchodzących w skład recenzowanej rozprawy. Materia treściowa rozprawy obejmuje następujące zagadnienia (udział Autora jest przywołany poniżej w odniesieniu do każdej omawianej pracy).

1. Michał Brasel, **Michał Pierański**, Mariusz Grinholc („An extended logistic model of photodynamic inactivation for various levels of irradiance using the example of *Streptococcus agalactiae*”); opublikowano w *Scientific Reports* 10(1), 1-17. 2020.

Bogata część doświadczalna publikacji obejmuje analizę wpływu promieniowania na efektywność aPDI wobec *S. agalactiae* w obecności rózu bengalskiego jako fotouczulacza oraz próbę matematycznego modelowania otrzymanych zależności dla wybranych poziomów napromienienia. W pracy przedstawiono kilka wariantów modyfikacji parametrów wraz z oceną kryterium jakości dopasowania modelu. Dyskusję nad odpowiednim doбором parametrów do modyfikacji przeprowadzono w formie analizy porównawczej kilku studiów przypadku. Autor podaje, że udało się stworzyć rozszerzony model logistyczny aPDI, który efektywnie opisuje dynamikę śmiertelności badanego mikroorganizmu w całym zakresie testowanych zakresów dawek promieniowania.

Zgodne oświadczenia współautorów wykazują 30%-owy udział Doktoranta w powstaniu tej pracy.

2. **Michał Pierański**, Izabela Sitkiewicz, Mariusz Grinholc („Increased photoinactivation stress tolerance of *Streptococcus agalactiae* upon consecutive sublethal phototreatments”); opublikowano w *Free Radical Biology and Medicine*, 160. 657-669. 2020.

Autorzy tej pracy poddali dziesięciokrotnej ekspozycji na światło, w obecności rózu bengalskiego, szczep referencyjny *S. agalactiae* ATCC 27956 i dwa izolaty kliniczne oznaczone dla celów doświadczalnych jako 2306/02 i 2974/07, reprezentujące odpowiednio serotypy III i V. Zastosowanie czulej metody analitycznej jaką jest qRT-PCR umożliwiło jednoznaczne wykazanie, że dziesięciokrotna subletalna dawka światła prowadziła do zwiększonej ekspresji wszystkich badanych głównych elementów odpowiedzi na stres oksydacyjny, co wskazywało na możliwość rozwoju tolerancji wobec aPDI. Ponadto zaobserwowane zostały zmiany morfologii kolonii (np. zwiększona liczba kolonii ciemnych, bez pigmentu itp.). Nie wykazano jednak podwyższonej oporności tych bakterii na podchloryn, parakwat (środek chwastobójczy), czy aPDI prowadzoną w obecności innego fotouczulacza, którym była ftalocyjanina.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że *S. agalactiae* może rozwinąć stabilną tolerancję na aPDI, ale nie jest to oporność. Autorzy postulowali, że możliwość rozwoju tolerancji wobec przeciwbakteryjnej terapii fotodynamicznej należy uwzględnić w projektowaniu skutecznych protokołów aplikacyjnych (np. klinicznych).

Doktorant jest pierwszym autorem tej pracy. Zgodne oświadczenia współautorów pokazują 60%-owy udział Doktoranta w powstaniu tej publikacji. W tym przypadku oszacowano, że Pan mgr Michał Pierański przeprowadził 100% eksperymentów.

3. **Michał K. Pierański**, Michał Rychłowski M, Mariusz Grinholc M. (Optimization of *Streptococcus agalactiae* biofilm culture in a continuous flow system for photoinactivation studies); opublikowano w *Pathogens*. 10(9):1212, 2021.

W tej pracy Autorzy zajęli się oceną efektywności przeciwdrobnoustrojowej terapii fotodynamicznej wobec biofilmów tworzonych przez szczep referencyjny *S. agalactiae* ATCC 27956 oraz trzy izolaty kliniczne reprezentujące popularne serotypy IA, III i V.

Ocena efektywności aPDI wobec badanych bakterii została poprzedzona doбором odpowiednich warunków hodowlanych dla wydajnego tworzenia biofilmu. Autorzy opracowali warunki pozwalające na stabilny i powtarzalny wzrost biofilmu *S. agalactiae* w warunkach ciągłego przepływu.

Następnie została oceniona fototoksyczna aktywność rózu bengalskiego wobec biofilmów tworzonych przez *S. agalactiae* w modelu stacjonarnym (na płytkach do mikromiareczkowania) oraz wobec biofilmu formowanego w warunkach ciągłego przepływu.

Autorzy jednoznacznie wykazali, że fotoinaktywacja w obecności rózu bengalskiego jest skuteczna w usuwaniu biofilmów i nie jest cytotoksyczna/fototoksyczna dla ludzkich keratynocytów linii HaCaT.

Doktorant jest pierwszym autorem tej pracy. Zgodne oświadczenia współautorów pokazują 70%-owy udział Doktoranta w powstaniu tej publikacji. W tym przypadku oszacowano, że Pan mgr Michał Pierański przeprowadził 85% eksperymentów. Znaczący jest również udział Doktoranta (80%) w przygotowaniu manuskryptu.

4. **Michał K. Pierański**, Jan G. Kosiński, Klaudia Szymczak, Piotr Sadowski, Mariusz Grinholc (Antimicrobial photodynamic inactivation: an alternative for

group B *Streptococcus* vaginal colonization in a murine experimental model); opublikowano w *Antioxidants* 12, 847. 2023.

W tej pracy Autorzy ocenili skuteczność terapii fotodynamicznej prowadzonej w obecności rózu bengalskiego wobec hodowli planktonowych *S. agalactiae* (szczep referencyjny ATCC 27956), izolatów klinicznych reprezentujących serotypy IA, IB, III, IV, V i IX, trzech szczepów z rodzaju *Lactobacillus* (*Lactobacillus gasseri* LMG 13134, *L. crispatus* LMG 12005 i *L. jensenii* LMG 06414) oraz biofilmów wielogatunkowych (tworzonych przez *S. agalactiae* oraz *L. jensenii*). Ponownie zostało dowiedzione, że przeciwbakteryjna terapia fotodynamiczna jest niezwykle skuteczną metodą niszczenia badanych paciorkowców, ale również pałeczek z rodzaju *Lactobacillus*. Okazało się, że pałeczki z rodzaju *Lactobacillus* są mniej wrażliwe na aPDI. Szeroki zakres zastosowanych technik analitycznych (np. monitorowanie proliferacji komórek w czasie rzeczywistym, test Ames'a, test kometkowy, analiza PCR) udowodniły, że technika aPDI, w której fotouczulaczem jest róż bengalski nie jest mutagenna, jest bezpieczna dla ludzkich keranocytów i komórek nabłonkowych pochwy.

Wysoką skuteczność techniki aPDI potwierdzono także w badaniach in vivo z wykorzystaniem modelu mysiego. Analiza histopatologiczna tkanki pochwy i szyjki macicy nie wykazały żadnych zmian po zastosowaniu tej procedury. Wykazano, że równowaga i żywotność flory bakteryjnej pochwy jest utrzymywana.

Doktorant jest pierwszym autorem tej pracy. Zgodne oświadczenia współautorów pokazują 50%-owy udział Doktoranta w powstaniu tej publikacji.

Pomyślna realizacja badań była możliwa dzięki zastosowaniu nowoczesnych, komplementarnych technik analitycznych. Porównując cel i założenia pracy z osiągniętymi wynikami, z przekonaniem stwierdzam, że program badań został całkowicie zrealizowany. Chciałabym podkreślić, że Pan mgr Michał Pierański posiada szeroką wiedzę z zakresu mikrobiologii i biochemii oraz uzyskał kompetencje instrumentalne, umożliwiające prawidłowy dobór procedur i technik badawczych, wykonanie pomiarów i interpretację wyników. Opublikowanie uzyskanych wyników 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.

Z obowiązku recenzenta pragnę jednak zwrócić uwagę na zaobserwowany problem ogólny. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została w większości (poza jednym streszczeniem)

przygotowana w języku angielskim. W wielu miejscach Doktorant posługuje się "informal language", który jak wiadomo nie powinien być stosowany w przypadku opracowań naukowych. Nie ma potrzeby cytowania takich fragmentów, ale na jedno zdanie, jako przykład niezwykle potocznego języka, muszę zwrócić uwagę. Otóż w rozdziale 1 (Introduction), na stronie 11 (czwarty wiersz od dołu) znajduje się sentencja: „*If this treatment would additionally have a limited effect on the physiological flora, there would be no concern for the administration of this treatment without the screening test*”.

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

1. Czy Doktorant ma wiedzę na temat efektywności lub próbował przeprowadzić badania foto-niszczenia bakterii beztlenowych, np. z rodzajów *Prevotella*, *Peptostreptococcus* lub *Fusobacterium*, o których wiadomo, że stanowią bardzo istotną część naturalnej mikroflory pochwy?
2. Czy doktorant ma wiedzę lub próbował przeprowadzić badania zależności wielokrotnej ekspozycji badanych paciorkowców na subletalne dawki światła a efektywnością kolonizacji tkanek ludzkich, która zależy od obecności, np. adhezyn?
3. Który wynik rozprawy doktorskiej Autora jest najważniejszy pod względem osiągnięć naukowych?

Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana magistra Michała Pierańskiego w charakterze zbioru czterech oryginalnych artykułów naukowych o sumarycznym współczynniku oddziaływania wynoszącym 25,082, zatytułowana: „**Ewaluacja potencjału fotoinaktywacji w eradykacji nosicielstwa *Streptococcus agalactiae* w układzie moczowo-płciowym**” w pełni odpowiada warunkom Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym, a dorobek naukowy Doktoranta uzasadnia nadanie mu stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pana magistra Michała Pierańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Biorąc pod uwagę osiągnięcie naukowe recenzowanej rozprawy doktorskiej (wyniki badań opublikowane w czterech prestiżowych czasopismach naukowych o sumarycznym współczynniku oddziaływania wynoszącym 25,082), nowość i znaczenie uzyskanych danych dla celów praktycznych, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Jacek Malinski