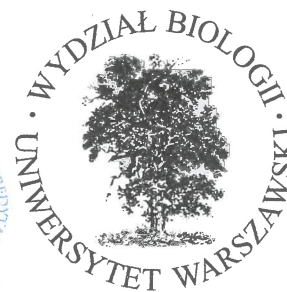




UNIwersYTET WARSZAWSKI WYDZIAŁ BIOLOGII

ul. ILJI MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA
TEL: (+22) 55-41-304, FAX: (+22) 55-41-304

e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl



OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR INŻ. AGATY WOŹNIAK

„Fotoinaktywacja światłem widzialnym jako narzędzie uwrażliwienia wielolekoopornych patogenów na działanie antybiotyków”

Wciąż postępujące zjawisko nabywania oporności drobnoustrojów na antybiotyki stało się w ostatnich latach jednym z 10 największych zagrożeń dla ludzkości. Dlatego poszukiwanie nowych antybiotyków i chemioterapeutyków skierowanych przeciwko najgroźniejszym wielolekoopornym bakteriom stało się bardzo istotnym nurtem badań naukowych. Poszukiwanie leków aktywnych przeciwko szczepom *Staphylococcus aureus* MRSA czy VRSA czy też *Enterococcus faecium* VRE, a także innych możliwości działania przeciwko opornym na antybiotyki bakteriom stało się priorytetem w wielu programach badawczych. Praca doktorska Pani mgr inż. Agaty Woźniak doskonale wpisuje się w ten nurt badań naukowych, które dążą do znalezienia nowych skutecznych rozwiązań w walce z opornymi na drobnoustroje bakterie. Zwalczanie drobnoustrojów poprzez fotoinaktywację światłem widzialnym to stosunkowo nowe narzędzie mikrobiologów do walki z drobnoustrojami. Przedstawiona do oceny praca doktorska poświęcona jest w całości wykorzystaniu inaktywacji fotodynamicznej celem uwrażliwienia izolatów klinicznych z grupy bakterii ESKAPE na działanie antybiotyków. Praca ta została wykonana w Zakładzie Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Pana Profesora Mariusza Grinholca. Praca powstała w ramach badań naukowych prowadzonych w Zakładzie wynikających z realizacji projektów badawczych dotyczących związanych z diagnostyką i terapią fotodynamiczną zakażeń bakteryjnych i zmian nowotworowych. Dlatego tematyka ocenianej rozprawy dotyczy wykorzystania procesu inaktywacji fotodynamicznej poprzez reaktywne formy tlenu względem grupy groźnych i opornych na antybiotyki bakterii patogennych należących do tzw. grupy ESKAPE. Zniesienie wysokiego poziomu oporności na antybiotyki tych bakterii stosowaną metodą było głównym celem dysertacji, a uzyskane wyniki pozwoliły na osiągnięcie postawionego celu pracy, a ponadto pozwoliły na wyjaśnienie efektu synergistycznego fotoinaktywacji i działania antybiotyków. W pracy

podjęto także próbę wykorzystania łączonej terapii (fotoinaktywacji i antybiotyku) z wykorzystaniem mysiego modelu in vivo rany zakażonej opornymi na antybiotyki szczepami *Staphylococcus aureus* oraz *Pseudomonas aeruginosa*.

Uzyskane wyniki badań naukowych zrealizowanych w rozprawie doktorskiej opublikowano w 5 załączonych publikacjach naukowych. Wszystkie prace są spójne tematycznie, dotyczą bowiem problemów związanych z procesem inaktywacji fotodynamicznej. Już na początku recenzji tej pracy powinno się zaznaczyć, iż oceniana rozprawa zawiera wielki potencjał zastosowań praktycznych, co czyni ją bardzo istotną także z punktu widzenia biotechnologii medycznej. Podjęty problem badawczy jest aktualny i niezwykle atrakcyjny pod względem naukowym, tym bardziej, że dotychczasowe informacje naukowe dotyczące terapii fotodynamicznej miały dotychczas charakter przeważnie hipotetyczny. Doktorantka podejmując się zadań badawczych przewidzianych w ramach pracy doktorskiej dużo ryzykowała, albowiem poziom wiedzy w tym zakresie był jeszcze niewielki. Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma ciekawą konstrukcję, która w mojej ocenie zbliża Autorkę do zrealizowania idealnej formy rozprawy doktorskiej. W obszernym wstępie Doktorantka zawarła przegląd zawierający wszystkie najnowsze dane na temat terapii fotodynamicznej względem bakterii patogennych. Praca została podzielona na 5 rozdziałów, z czego podstawą rozdziału stała się publikacja związana z tematem. Przedstawienie badanego problemu na początku i tego typu wstęp do pracy doktorskiej stanowi bardzo dobre rozwiązanie. Następnym rozdziałem rozprawy jest część wynikowa, którą doktorantka podzieliła na 6 rozdziałów, z których pierwszy jest wstępem teoretycznym do całości rozprawy, a każdy z 5 pozostałych prowadzi do rozwiązania postawionego zadania badawczego. I tu także każdy z etapów sprowadzono do wyników opisanych w każdej z kolejnych publikacji, poprzedzonych obszernym wstępem. Tak więc podstawą rozdziału 2 jest praca przeglądowa z *Frontiers of Microbiology* (praca 1), a podstawą rozdziałów 3-6 są prace oryginalne, które opublikowano w prestiżowych czasopismach naukowych, takich jak: *Frontiers in Microbiology* (praca 2), *Biomolecules* (3), *Journal of Photochemistry and Photobiology* (4) i *Antioxidants* (5). Zamierzone cele badawcze pracy zawarte w kolejnych rozdziałach dysertacji są więc osiągnięte i potwierdzone przez dołączone publikacje. Należy zaznaczyć, że wszystkie prace opublikowano w czasopismach o stosunkowo wysokich współczynnikach cytowania powyżej 6 lub 7. Każda z załączonych prac oryginalnych jest spójna tematycznie z tematem rozprawy. Tak więc po obszernym wstępie i przeglądzie badań prowadzonych na świecie Autorka przechodzi do wyników własnych, które kolejno udawadniają zjawisko synergizmu aktywności przeciwdrobnoustrojowej inaktywacji fotodynamicznej i środków

przeciwdrobnoustrojowych skierowanych przeciwko różnym drobnoustrojom. Prace oryginalne poprzedzono pracą przeglądową, w której przedstawiono obecny stan badań w zakresie tematycznym synergistycznego działania inaktywacji fotodynamicznej i różnych substancji przeciwbakteryjnych. Następny rozdział dysertacji ocenia znaczenie środków przeciwbakteryjnych jako adiuwanta do fotodynamicznej inaktywacji do eradykacji silnie lekoopornych szczepów *Acinetobacter baumannii* (rozdział 3), następnie opisuje wpływ inaktywacji fotodynamicznej na wrażliwość *Enterococcus sp.* na antybiotyki w kulturach biofilmowych i planktonowych (rozdział 4), aby w rozdziale następnym udowodnić, że wstępne traktowanie komórek zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych fotoinaktywacją, prowadzi do zmian zwiększających szanse późniejszej terapii antybiotykowej czy chemoterapii (rozdział 5), a także wykazuje, że połączenie inaktywacji fotodynamicznej z antybiotykami pozwala zwalczyć wielolekooporne szczepy takich bakterii jak *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* zarówno w eksperymentach *in vitro* jak i *in vivo*. Dzięki tak obszernej i szczegółowej analizie realizowanej w tej pracy doktorskiej wykazano, że połączenie terapii fotodynamicznej i antybiotyków może być stosowane do eradykacji najgroźniejszych szczepów bakteryjnych. Wniosek ten na podstawie przedstawionych wyników jest absolutnie uprawniony i wnosi cenne nowe rozwiązanie umożliwiające walkę z drobnoustrojami opornymi na antybiotyki. Potencjał aplikacyjny pracy został mocno podkreślony, a przedstawione publikacje zapewniają o bardzo wysokim poziomie naukowym rozprawy. Przedstawiona rozprawa doktorska z całą pewnością stoi na poziomie naukowym porównywalnym z niejedną rozprawą habilitacyjną.

Odrębnym elementem ocenianej pracy doktorskiej są oświadczenia współautorów publikacji, wśród których w każdym przypadku Pani mgr inż. Agata Woźniak jest głównym i pierwszym autorem. Z oświadczeń współautorów prac wynika wyraźnie, iż we wszystkich publikacjach wchodzących w skład pocenianej rozprawy doktorskiej jej udział jest wiodący i wynosi od 35 do 65%. Jej udział we wszystkich pracach polegał na wykonaniu większości doświadczeń opisywanych w publikacjach, a także na wspólnym planowaniu doświadczeń oraz przygotowaniu manuskryptów. Szczegółowa analiza eksperymentów realizowanych przez doktorantkę w ramach rozprawy doktorskiej widzianych w perspektywie przedstawionych prac oryginalnych pozwala z całą pewnością na stwierdzenie, iż rzeczywiście jest ona głównym Autorem przedstawionych publikacji, a publikacje te mogą z powodzeniem stworzyć cykl prac oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Zaprojektowanie i uzyskanie kolejnych wyników oraz ich pełna interpretacja wymagała dobrej organizacji pracy oraz dużej pracowitości, albowiem liczba przeprowadzonych analiz i liczba

wyników uzyskanych w rozprawie doktorskiej znacznie wykracza poza przeciętną. Z całą pewnością rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agaty Woźniak daje podstawę do dalszej pracy nad badaniem mechanizmów i efektów wynikających z zastosowania terapii fotodynamicznej. Uwrażliwienie na antybiotyki opornych bakterii przez inaktywację fotodynamiczną zostało udowodnione, aczkolwiek nie bardzo wyobrażam sobie zastosowania tej metody chociażby w przypadku enteropatogenów czy patogenów wewnątrzkomórkowych *in vivo*. Tego aspektu pracy nie dyskutowano w rozprawie. Wspomożenie terapii antybiotykowej przez fotoinaktywację jest udowodnione, ale ciekawe jest jak tego typu terapia może wyglądać w przypadku działania na inne drobnoustroje, takie jak glony czy grzyby. Ze względu na formę rozprawy doktorantka nie rozważa o perspektywach dalszych badań tego typu będących kontynuacją wyników osiągniętych w ramach rozprawy, nie dyskutuje także o ewentualnych kolejnych eksperymentach prowadzących do możliwości opanowania problemu pewnych chorób, dla których terapia skojarzona byłaby skuteczna. Ze względu na to, że w ramach obecnej formy rozpraw doktorskich nie ma miejsca na tego typu rozważania, chciałbym dowiedzieć się, jak wyobraża sobie doktorantka program badawczy w tym kierunku i jak wygląda perspektywa realizacji tego typu badań naukowych.

Biorąc wszystko powyższe pod uwagę uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Agaty Woźniak spełnia wymagania wszelkie stawiane współczesnym pracom doktorskim i wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed o przyjęcie tej rozprawy i dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wysoki poziom naukowy wszystkich opublikowanych wyników predysponuje tę dysertację do wyróżnienia. Ze względu na wysoki poziom naukowy 5 opublikowanych prac wchodzących w skład pracy doktorskiej, a także ogrom pracy wniesiony przez doktorantkę w organizację i realizację badań naukowych oraz przygotowanie przedstawionych publikacji, wnioskuję o stosowne wyróżnienie tej rozprawy doktorskiej.

Warszawa, 29. 09. 2022.



Prof. dr hab. Jacek Bielecki