



UNIWERSYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Katedra i Zakład Mikrobiologii

Kierownik: dr hab. Grażyna Gościński, prof. nadzw.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr biol Tomasza Olszaka

pt Efektywność działania litycznego bakteriofagów środowiskowych wobec szczepów

***Pseudomonas aeruginosa* izolowanych od chorych z mukowiscydozą**

**której promotorem jest dr hab. Zuzanna Drulis-Kawa prof. nadzw. z Instytutu Genetyki i
Mikrobiologii Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego**

Od czasu wynalezienia penicyliny a z czasem też innych antybiotyków sądzono, że z ich pomocą uda się zwalczyć wszelkie infekcje. Aktualnie ze względu na lawinowo narastającą lekooporność drobnoustrojów i trudności w eradykacji zarówno szczepów szpitalnych jak i pozaszpitalnych a zwłaszcza bakterii takich jak *P. aeruginosa* znanych z uporczywej kolonizacji np. w drogach oddechowych chorych na mukowiscydozę poszukuje się nowych alternatywnych metod terapii. Od wielu lat próbuje się wykorzystać bakteriofagi w diagnostyce i leczeniu zakażeń bakteryjnych. Bakteriofagi znalazły zastosowanie w terapii zakażeń bakteryjnych skóry, duru brzuszego i czerwonki.

Dzięki rozwojowi badań molekularnych niekonieczne jest stosowanie w terapii całych fagów ponieważ możemy wykorzystać tylko niektóre produkty fagowe np. endolizyny czy holiny. W terapii bakteriofagami wykorzystuje się fagi lityczne, które w procesie namazania się w komórce bakteryjnej prowadzą do jej całkowitego rozpadu i uwolnienia potomnych cząstek fagowych zdolnych do dalszego działania.

Podjęte przez doktoranta badania mające na celu pogłębienie wiedzy na temat możliwości zastosowania bakteriofagów litycznych pochodzących ze środowiska w eradykacji szczepów *P. aeruginosa* izolowanych od chorych na mukowiscydozę jest bardzo aktualny i szczególnie uzasadniony.

Rozprawa doktorska mgr Tomasza Olszaka ma typowy układ dla tego rodzaju opracowań. Bardzo cennym dodatkiem jest podany na wstępie pracy, szczegółowo opracowany wykaz skrótów.

Wstęp, obejmujący 20 stron przedstawiony w oparciu o bogate piśmiennictwo szkoda, że tylko anglojęzyczne, jest dobrym wprowadzeniem do części doświadczalnej pracy.

W pierwszej części wstępu przedstawiony został aktualny stan wiedzy o czynnikach etiologicznych odpowiedzialnych za infekcje układu oddechowego u chorych z rozpoznaną klinicznie mukowiscydozą.

W części drugiej autor zaprezentował aktualny stan wiedzy o pałeczkach z rodzaju *Pseudomonas*. Podkreślił rolę poszczególnych czynników ułatwiających przystosowanie *P. aeruginosa* do kolonizacji płuc pacjentów z mukowiscydozą oraz uwypuklił problem ich lekooporności.

Ostatnia najbardziej obszerna część jest poświęcona bakteriofagom między innymi: wykorzystanie bakteriofagów w terapii zakażeń bakteryjnych ze szczególnym uwzględnieniem ich zastosowania w zwalczaniu infekcji płuc u pacjentów z mukowiscydozą.

Całość wstępu logicznie i przejrzysto przedstawionego świadczy o dobrej znajomości tematu i uzasadnia celowość podjętych badań.

Cel pracy zredagowany jest jasno i konkretnie wypunktowany, wymienione cele szczegółowe informują bliżej o programowanych badaniach.

Do realizacji zaplanowanych celów pracy mgr Tomasz Olszak zastosował odpowiednie metody. Do badań wykorzystano 32 bakteriofagi i 188 szczepów *P. aeruginosa* pochodzące z różnych źródeł w tym 121 szczepów wyizolowanych od pacjentów z mukowiscydozą pozyskano z kolekcji Wydziału lekarskiego Uniwersytetu Karola w Pradze. Dla pełniejszej charakterystyki tych szczepów, przydałaby się informacja odnośnie wieku chorych oraz w jakich warunkach przechowywano szczepy.

Wyniki badań, które przeprowadził doktorant przedstawione są w kolejności logicznie zaplanowanych etapów pracy. Są opisane oraz zobrazowane 29 wykresami, 5 tabelami i 4 rycinami. Prowadzenie badań i ich dokumentacja nie budzą zastrzeżeń.

Doktorant wykazał, że 93,6% szczepów *P. aeruginosa* było wrażliwych na lityczne działanie bakteriofagów. Interesujący i warty dokładniejszego opracowania jest szczep ST 1021 izolowany z wymazu z gardła, który był niewrażliwy na fagi. Nie znalazłam w pracy informacji jaki odsetek izolatów uzyskanych z wymazów z gardła był wrażliwy na bakteriofagi.

Niewątpliwym sukcesem promotora pracy i doktoranta było wykonanie dokładnej charakterystyki genetycznej i morfologicznej faga PA5oct, który okazał się największym, wyizolowanym dotąd, wirusem specyficznym względem *P. aeruginosa*. Bardzo ciekawe były doświadczenia

sprawdzające in vitro i in vivo działanie bakteriofagów na szczepy *P.aeruginosa* na modelu larw barciaka większego i wykazanie że przeżywalność larw poddanych fagoterapii zależy od aktywności litycznej bakteriofagów. Szkoda tylko, że autor pracy nie udokumentował wyników zdjęciami larw.

W skromnej bo 5 stronicowej dyskusji Doktorant konfrontuje uzyskane wyniki z doniesieniami z najnowszego piśmiennictwa co potwierdza cytowanie 42 pozycji z ostatnich pięciu lat. Uzasadnił celowość większości aspektów prowadzonych badań. W mojej opinii dyskusja, dotycząca poruszanych zagadnień została przeprowadzona interesująco.

Zakończeniem dyskusji jest sformułowanie siedmiu wniosków, z których sześć ma umocowanie w wynikach przeprowadzonych badań.

Wniosek 1 „Typowanie fagowe 121 (188) izolatów PA CF ujawniło, że szczepy te nie wykazują obniżonej oporności na działanie bakteriofagów (93,6% szczepów wrażliwych) raczej powinno być wykazują znaczną wrażliwość na zastosowane bakteriofagi.

Z kolei wniosek 2 jest wnioskiem „życzeniowym”, „nie odnotowano korelacji między aktywnością lityczną bakteriofagów a mukoidalnością szczepów”. Typowanie bakteriofagami przeprowadzono na podłożu TSA a na tym podłożu szczepy *P. aeruginosa* słabo rosną w formie śluzowej. Sprawą przyszłości jest sprawdzenie aktywności litycznej bakteriofagów z zastosowaniem podłoża na którym szczepy silnie wytwarzają śluz np. podłoża opracowanego przez Goto i wsp.: Jap. J .Microbiol 1973, 17, 45-51

Przedstawiam kilka uwag które należy traktować jako polemikę z autorem rozprawy, w niczym nie umniejszającej jej niewątpliwej wartości.

- Str. 13 i wiele innych - Alginat – Szczepy *P. aeruginosa* mogą mieć otoczkę zbudowaną z alginianu czyli powinno być alginian a nie nazwa angielska alginat
- Str 17 - pilusy płciowe --- raczej fimbrie płciowe oczywiście nazwa łacinska fimbri to pilli
- Str 17 - Instytut Hirszfelda--- Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im L. Hirszfelda
- Str 17 - Niepatogenna flora organizmu ---- raczej flora fizjologiczna. Należy pamiętać, że, każdy drobnoustrój jeżeli zmieni miejsce naturalnego bytowania może wywołać zakażenie.
- Str 19 - sowiecka publikacja – nie brzmi to ładnie - raczej rosyjska publikacja
- W materiałach i metodach doktorant podał, że wykorzystał 192 szczepy *P. aeruginosa* a ja doliczyłam się 188 szczepów (121+ 43+15+2 wzorcowe +7 ze zbiorów Instytutu Genetyki UW = 188)
- Str 32- badania nie wykonywano na płytkach TSA tylko na podłożu TSA

- Str 43 - Co to znaczy szczep sparowany i niesparowany. Czy szczepy niesparowane to tak jak tabeli 7 u pacjenta LB wyizolowane z różnego materiału np. płwociny i aspiratu z zatok. W tabeli 7 brak opisu które to szczepy sparowane a które niesparowane.
- Tabela 7. Dlaczego izolat od pacjenta KJ nr CF786 zaliczono do wczesnego etapu infekcji. Szczep CF-786 wyizolowano po 6 latach od szczepu CF200 i jak ustalono szczepy należą do tego samego clusteru 7
- Str 46 - Charakterystyka szczepów *P. aeruginosa*. Doktorant podaje, że do badań wykorzystał szczep ST- 1169 takiego szczepu w spisie nie ma chyba, że chodzi o szczep St- 1196
- str 53 - naturalny patogen nie ma takiego określenia – jest flora naturalna ewentualnie podział drobnoustrojów na: bezwzględnie chorobotwórcze (tj drobnoustroje zawsze wywołujące choroby i drobnoustroje warunkowo czyli względnie chorobotwórcze

Podsumowując uważam pracę za wartościową, prezentującą szeroki zakres badań zmierzających do naświetlenia podjętego tematu. Praca została wykonana rzetelnie i dobrze udokumentowana. Autor wykazał dobre przygotowanie merytoryczne, dojrzałość naukową w planowaniu, realizacji i analizie wyników badań. Uzyskane wyniki mają znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska pt „Efektywność działania litycznego bakteriofagów środowiskowych wobec szczepów *Pseudomonas aeruginosa* izolowanych od chorych z mukowiscydozą” spełnia wymogi stawiane tego typu opracowaniom na stopień naukowy doktora.

Przekładam Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Tomasza Olszaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie i nagrodzenie rozprawy doktorskiej.

Wrocław 12.08.2014

Prof. dr hab. Grażyna Gościński

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
kierownik
Gościński
dr hab. Grażyna Gościński
prof. nadzw.