

Wrocław 22.08.2014

Dr hab. Andrzej Gawęł prof. nadzw.
Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków
i Zwierząt Egzotycznych
Uniwersytetu Przyrodniczego
we Wrocławiu

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Tomasza Olszaka pt.: „Efektywność działania litycznego bakteriofagów środowiskowych wobec szczepów *Pseudomonas aeruginosa* izolowanych od chorych z mukowiscydozą”, wykonanej pod kierunkiem dr hab. Zuzanny Drulis-Kawy prof. nadzw. w Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii Instytutu Genetyki i Mikrobiologii

Podstawę formalną recenzji stanowi pismo z dnia 14 lipca 2014 roku, zgodne z uchwałą Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego z dnia 22 maja 2014r.

Mukowiscydoza (CF – cystic fibrosis) jest jedną z najczęstszych chorób genetycznych, dziedziczonych recesywnie, występujących w ludzkiej populacji (około 1/2500 żywych urodzeń). Gęsta wydzielina oskrzelowa uniemożliwiająca prawidłowe funkcjonowanie nabłonka migawkowego sprzyja rozwojowi chronicznych infekcji bakteryjnych, które w połączeniu ze stale trwającą reakcją zapalną prowadzą do nieodwracalnych uszkodzeń płuc. Flora bakteryjna występująca u pacjentów z mukowiscydozą tworzy skomplikowany, wielogatunkowy ekosystem. Większość badań związanych z tym problemem wykazuje, że płuca pacjentów z mukowiscydozą kolonizowane są przez kilka gatunków bakterii takich jak *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* oraz *Burkholderia cepacia* complex. Brak wdrożenia antybiotykoterapii skutkuje niewydolnością oddechową i śmiercią w młodym wieku.

Mimo terapii antybiotykowej, połączonej z naturalną aktywnością układu immunologicznego nie ma gwarancji eradykacji patogenów. Szczególną opornością wykazują się szczepy *P. aeruginosa*, które są przyczyną powstawania infekcji chronicznych, z którymi zmagają się większość pacjentów powyżej 20 roku życia. Dużym problemem w leczeniu tego typu infekcji jest znaczna heterogenność klonalna szczepów zasiedlających płuca pacjentów z mukowiscydozą. Szczepy *P. aeruginosa* izolowane z przypadków mukowiscydozy charakteryzują się także dużą mukoidalnością oraz obniżoną w stosunku do szczepów środowiskowych wirulencją.

Trudności w leczeniu infekcji wywołanych przez *P. aeruginosa*, wynikające zarówno z aspektów biologicznych tego gatunku, jak i ze stale rosnącej antybiotykooporności, wymuszają poszukiwanie alternatywnych metod terapii. Kwestia opracowania skutecznego

preparatu zwalczającego szczepy odporne na większość antybiotyków jest jednym z najpoważniejszych wyzwań stojących przed współczesną nauką i medycyną. Wiele grup badawczych upatruje rozwiązania tego problemu w metodzie na wskroś biologicznej, wykorzystującej naturalnych wrogów bakterii – bakteriofagi.

Terapia fagowa to jedna z najstarszych, potwierdzonych naukowo metod przeciwdziałania infekcjom bakteryjnym. Wysoka skuteczność terapii fagowej jest związana głównie z dwiema cechami biologii bakteriofagów – wysoką specyficznością względem receptorów, rozpoznawanych na powierzchni komórki bakteryjnej oraz fizycznego niszczenia komórki bakteryjnej w trakcie cyklu życiowego wirusa.

Bakteriofagi charakteryzują się wysoką specyficznością względem infekowanych szczepów bakteryjnych. Najczęściej są one w stanie zainfekować tylko jeden gatunek bakterii lub konkretne szczepy w obrębie gatunku. Spektrum aktywności bakteriofagów wynika ze swoistych interakcji pomiędzy białkami receptorowymi bakteriofaga, a niektórymi strukturami na powierzchni komórki gospodarza (LPS, kwasy teichojowe, peptydoglikan, białka błony zewnętrznej, otoczki, rzęski, pilusy płciowe oraz fimbrie typu IV). Wysoka selektywność działania bakteriofagów zapewnia brak wpływu tego typu terapii na funkcjonowanie niepatogennej flory organizmu.

Bakteriofagi stanowią zatem alternatywną metodę leczenia wielu chorób bakteryjnych, w tym także zakażeń układu oddechowego u osób z mukowiscydozą.

Mgr Tomasz Olszak podjął wieloetapowe badania mające na celu między innymi scharakteryzowanie szczepów *P. aeruginosa* izolowanych od pacjentów z mukowiscydozą i ocenę aktywności bakteriofagów *in vitro* i *in vivo* względem szczepów *P. aeruginosa*.

Manuskrypt ocenianej rozprawy ma strukturę i układ typowy dla prac doktorskich i liczy 80 stron wydruku komputerowego. Obszerną dokumentację dysertacji stanowi 11 tabel, 13 rycin i 29 wykresów, umiejętnie wkomponowanych w tekst rozprawy. Rozprawa napisana jest zwięzłym i zrozumiałym językiem.

Obszerny „Wstęp” obejmujący 19 stron, zawiera informacje dotyczące infekcji układu oddechowego pacjentów z mukowiscydozą i roli *P. aeruginosa* w tych zakażeniach, oraz wykorzystania bakteriofagów w terapii chorób bakteryjnych zarówno w przeszłości, jak i w aspekcie najnowszych badań.

Celem pracy doktorskiej mgr Tomasza Olszaka była ocena aktywności litycznej bakteriofagów środowiskowych specyficznych względem *P. aeruginosa*, izolowanych od pacjentów z mukowiscydozą. W tym celu:

- scharakteryzowano biologię szczepów *P. aeruginosa* izolowanych od pacjentów z mukowiscydozą
- zbadano morfologię i genetykę bakteriofagów środowiskowych o najszerszym spektrum aktywności litycznej
- oceniono aktywności preparatów fagowych *in vitro* i *in vivo*, na modelu owadzim – barciaku większym (*Galleria mellonella*)
- zdefiniowano receptory powierzchniowe *P. aeruginosa* niezbędne do adhezji bakteriofagów
- oraz dodatkowo oceniono aktywność lityczną bakteriofagów względem szczepów *P. aeruginosa* z międzynarodowego panelu BCCM/LMG.

Rozdział „Materiały i metody” zawiera charakterystykę użytych szczepów bakteryjnych i bakteriofagów, opis przygotowywania i oczyszczania hodowli bakteriofagów, ocenę morfologiczną z użyciem mikroskopii elektronowej i ocenę wielkości genomu określonych fagów. Opisano również metody oceny wytwarzania fimbrii i biofilmu przez szczepy *P. aeruginosa* oraz testy *in vivo* z użyciem larw barciaka większego.

Wyniki pracy badawczej są obiecujące ze względu na wykazaną wysoką wrażliwość izolatów *P. aeruginosa* pochodzących od chorych na mukowiscydozę na badane bakteriofagi. Aż 93,6% szczepów była wrażliwa *in vitro* na co najmniej jednego bakteriofaga. Określono iż najwyższą skutecznością względem *P. aeruginosa* cechowały się dwa fagi – PA5oct i φKT28, które scharakteryzowano uwzględniając morfologię wirusa i wielkość genomu. Do dalszych badań wybrano również 6 szczepów *P. aeruginosa* różniących się znacznie pod względem cech fenotypowych, a następnie oceniono aktywność lityczną powyższych bakteriofagów *in vitro*. Tymi samymi szczepami zakażano larwy, a następnie oceniono skuteczność bakteriofagów oraz „koktajli fagowych”.

Dyskusja jest wnikliwym omówieniem uzyskanych wyników badań w odniesieniu do danych zawartych w dostępnym piśmiennictwie i świadczy o dużej wiedzy i gruntownej znajomości literatury z omawianego tematu.

Wnioski płynące z pracy doktorskiej mgr Tomasza Olszaka sugerują, iż terapia fagowa może wkrótce stać się realną alternatywą dla chemioterapeutyków w walce z zakażeniami układu oddechowego, które wywoływane są przez *P. aeruginosa*. Poza dużą wrażliwością szczepów na bakteriofagi zaobserwowano również, iż szczepy izolowane od jednego pacjenta na przestrzeni dłuższego okresu czasu nie wykazywały zmniejszonej wrażliwości na bakteriofagi. Jest to niewątpliwą korzyścią w porównaniu z chemioterapeutykami, na które podczas dłuższego stosowania może rozwinąć się oporność.

Uzupełnieniem pracy jest bogaty wykaz piśmiennictwa, świadczący o zdolności doktoranta do wyboru prac odpowiednich do analizy uzyskanych wyników i dyskusji w ramach tematyki, będącej przedmiotem badań.

W pracy zawarto również syntetyczne streszczenie w języku polskim i angielskim.

W mojej ocenie rozprawa mgr Tomasza Olszaka stanowi wartościowe opracowanie naukowe dotyczące aktualnego problemu badawczego, a zastosowanie różnorodnych metod badawczych świadczy o dogłębnej analizie podjętego tematu.

Praca bez wątpienia zawiera elementy postępu i odpowiada wymogom naukowym i formalnym stawianym rozprawom doktorskim. Biorąc pod uwagę innowacyjność badań i konieczność poszukiwania alternatywnych metod leczenia chorób bakteryjnych ze względu na narastający problem lekooporności, pracę należy zaliczyć do prac o dużej wartości aplikacyjnej.

Z obowiązku recenzenta pragnę jednakże zwrócić uwagę na następujące niedociągnięcia:

- nieujednolicenie rycin we „Wstępie” – należałoby zdecydować się na opisy polskie do wszystkich rycin (ryciny 1-3, 7 są opisane w języku polskim, a ryciny 4 i 5 w języku angielskim)

- w rozdziale „Materiały i metody”

- doktorant podaje iż w trakcie badań wykorzystano 192 szczepy *P. aeruginosa*, a zsumowanie wymienionych szczepów daje liczbę 188
- brak rozdziału dotyczącego metod analizy profilu chemicznego szczepów *P. aeruginosa* - wyniki pojawiają się w rozdziale 4.6 „Analiza profilu chemicznego wybranych szczepów *P. aeruginosa*”

- w rozdziale „Wyniki”

- W podrozdziale 4.3” Analiza zmienności szczepów..” niezrozumiałe jest podsumowanie rozdziału:

„Zmienność hipermutacyjna i powiązane z nią zróżnicowanie fenotypowe szczepów PA CF, mimo istotnego wpływu na dostosowanie się szczepów do specyficznej niszy płuc osób z mukowiscydozą, nie koreluje z ogólną wrażliwością szczepów na bakteriofagi. Zmiany w poziomie ekspresji poszczególnych czynników wirulencji (fimbrii typu IV, pilusów płciowych czy lipopolisacharydu), mogą wiązać się z obniżeniem wrażliwości szczepu na konkretne bakteriofagi, jednak w żadnym wypadku nie jest to czynnik eliminujący fagi z użycia w terapii”.

Przytoczony fragment, powinien znaleźć się w rozdziale „Dyskusja”, a nie być umieszczony w rozdziale „Wyniki”.

W rozdziale „Wnioski”:

- Doktorant ponownie podaje nieprawidłową liczbę 192 szczepów *P. aeruginosa* objętych badaniem oraz liczbę 34 bakteriofagów środowiskowych, podczas gdy w „Materiałach i metodach” była mowa o 28 fagach z Uniwersytetu Wrocławskiego i 4 z Uniwersytetu co daje liczbę 32, a nie 34.
- Wniosek 1 – „Typowanie fagowe 121 izolatów PA CF ujawniło, że szczepy te nie wykazują obniżonej oporności na działanie bakteriofagów” – proszę o sprecyzowanie, sformułowania „obniżona oporność na działanie bakteriofagów”
- Wniosek 5 - „Wrażliwość szczepów *P. aeruginosa* na bakteriofagi *in vitro* pokrywa się z wynikami uzyskanymi w eksperymentach *in vivo*, na modelu owadzie *Galleria mellonella*. Zastosowanie koktajlu fagowych zarówno w typowaniu *in vitro*, jak i w terapii larw *G. mellonella* wykazuje wyższą skuteczność, niż stosowanie lizatów pojedynczych fagów”.

Należy zmienić wniosek gdyż:

W badaniach *in vitro*, nie odnotowano istotnych różnic między skutecznością koktajlu fagowego i hodowli jednego z fagów.

Porównując *in vivo* skuteczność koktajlu fagowego do fagów PA5oct i ϕ KT28 wykazano, iż w przypadku 3 szczepów *P. aeruginosa*, zastosowanie faga ϕ KT28 dało lepsze efekty, niż użycie koktajlu fagowego.

Ponadto, należy ujednolicić cytowania umieszczone w tekście rozprawy, decydując się na przypisy bibliograficzne w systemie harvardzkim, w którym wymienia się nazwisko pierwszego autora z użyciem dopisku „i wsp”. lub „et.al” w przypadku wielu autorów.

Przygotowując pracę do druku, należy także ujednolicić wykaz piśmiennictwa: autorzy, rok, tytuł, czasopismo, tom, nr strony.

Doktorant nie uniknął również kilku niezręczności językowych, na przykład:

- na stronie 34 użyto sformułowania: „masa badanych próbek” zamiast „wielkość całkowita genomu”
- na stronie 54 zamiast „larwy zaszczerpione płynem fizjologicznym” należy użyć sformułowania „larwy którym podano płyn fizjologiczny”

Pomimo wspomnianych niedociągnięć, aktualność poruszanego problemu badawczego, jego innowacyjność, nowoczesny i rzetelny warsztat badawczy, przeprowadzona z dużym znanstwem dyskusja i wyciągnięcie właściwych wniosków sprawiają, iż zaprezentowana dysertacja spełnia wymogi stawiane dysertacjom doktorskim 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, dlatego przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego wniosek o dopuszczenie mgr Tomasza Olszaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wnoszę o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Dr hab. Andrzej Gawęł prof. nadzw.

