

Prof. dr hab. Robert Czajkowski
Zakład Badania Związków Biologicznie Czynnych
Tel: +48 58 5236333
Fax: +48 58 5236426
E-mail: robert.czajkowski@ug.edu.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr Mateusza Wdowiaka zatytułowanej:
„Stabilization of bacteriophages against adverse conditions”, wykonanej pod kierunkiem
Pana dr hab. Jana Paczesnego, prof. IChf**

Bakteriofagi, czyli wirusy infekujące i zabijające bakterie, są znane światu naukowemu od ponad stu lat, kiedy to zostały po raz pierwszy niezależnie opisane przez Fredericka Tworta i Felixa d’Herelle’a na początku XX wieku. Wirusy te są przedmiotem badań zarówno podstawowych jak i aplikacyjnych, a atrakcyjność wykorzystania bakteriofagów w leczeniu chorób wzrasta w XXI wieku za sprawą powszechnie obserwowanej antybiotykooporności bakterii patogennych dla człowieka. Powszechnie uważa się, że bakteriofagi mogą zostać z powodzeniem wykorzystane jako alternatywne do antybiotykoterapii metody zwalczania lekoopornych bakterii w różnych systemach biologicznych, w tym, w terapiach ludzi i zwierząt, w rolnictwie i produkcji żywności, a także do dezynfekcji powierzchni i sprzętów laboratoryjnych. Jednym z ograniczeń aplikacyjnego zastosowania bakteriofagów może być ich stabilność środowiskowa, która może wpływać na ich efektywną aplikację i działanie.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Mateusza Wdowiaka, wykonana pod kierunkiem Pana prof. Jana Paczesnego w Instytucie Chemii Fizycznej w Warszawie, podejmuje temat stabilności bakteriofagów i prób opracowania nowych metod, które mogłyby zwiększać stabilność tych wirusów w różnych warunkach środowiska. Pomimo faktu, że temat analizy oraz modyfikacji stabilności wirusów bakteryjnych przez dodatek różnych związków aktywnych był i jest podejmowany przez wiele zespołów naukowych, dotychczasowa wiedza jest często niewystarczająca i ciągle istnieje potrzeba poszukiwania nowych, uniwersalnych materiałów, które mogłyby zostać wykorzystane w tym celu. **Z tego względu badania zaproponowane i przeprowadzone przez Doktoranta uważam za niezwykle interesujące, istotne oraz innowacyjne.** Co więcej, badania nad stabilnością bakteriofagów mają niejednokrotnie

bezpośrednie przełożenie na badania stabilności wirusów eukariotycznych i z tego względu ich wyniki stanowią również ogromną wartość poznawczą w szerszej skali dla wirusologii.

W swojej pracy doktorskiej, jako model badawczy, Doktorant wykorzystał 9 szczepów bakteriofagów bardzo dobrze scharakteryzowanych w literaturze przedmiotu (fagi te zostały tak dobrane, aby reprezentować różne grupy bakteriofagów o różnej organizacji genomu i morfologii kapsydów) oraz różne czynniki środowiskowe, potencjalnie wpływające na stabilność tych wirusów (takie jak: promieniowanie UV, temperatura, czas, dodatek nanocząstek). **Temat stabilności bakteriofagów w zależności od warunków środowiska został zatem potraktowany bardzo szczegółowo. Co należy podkreślić, podejście badawcze zaproponowane przez Doktoranta ma również bardzo duży potencjał aplikacyjny.**

Rozprawa doktorska Pana mgr Mateusza Wdowiaka została przygotowana w postaci pośredniej między typową monografią, a zbiorem powiązanych tematycznie publikacji eksperymentalnych. Rozprawa doktorska została przygotowana w języku angielskim i zawiera wymienione rozdziały: Streszczenia (w języku polskim oraz angielskim), Wstęp, Cel pracy i założenia, Sekcje Eksperymentalną z opisem materiałów i procedur laboratoryjnych, Wyniki podzielone na kilka rozdziałów (Rozdziały od 4 do 7), Podsumowanie i Wnioski oraz Cytowaną Literaturę. Poza tym, rozprawa doktorska jest bogato ilustrowana i zawiera listę publikacji powstałych w ramach realizacji projektu doktorskiego, innych publikacji Doktoranta oraz listę patentów i aplikacji patentowych, wynikających z przeprowadzonych badań. **Co warto podkreślić, ogromna większość informacji przedstawionych w kolejnych rozdziałach pracy doktorskiej Pana mgr Mateusza Wdowiaka została już opublikowana w postaci pracy przeglądowej (Rozdział 1) oraz prac eksperymentalnych (Rozdziały 4 i 5), albo została wysłana do recenzji (Rozdziały 5, 6 i 7) - co oznacza, że większość otrzymanych wyników pracy doktorskiej zostało już z sukcesem upublicznionych albo zostanie upublicznionych w niedalekiej przyszłości.**

Szczegółowe omówienie poszczególnych części rozprawy doktorskiej:

(przy omówieniu kolejnych rozdziałów pracy doktorskiej, dla wygody oraz z racji faktu przygotowania mojej recenzji w języku polskim, posłużę się polskimi odpowiednikami angielskich nazw rozdziałów)

Rozdziały takie jak: Wykaz skrótów, Spis treści, Streszczenia w języku angielskim i języku polskim zostały przygotowane standardowo, mają formę i treść powszechnie przyjętą dla tego typu wykazów i opracowań naukowych oraz zawierają wszystkie wymagane i potrzebne informacje.

Rozdział Wstęp przedstawia problem wielolekoopornych patogenów bakteryjnych, wirusy bakteryjne i ich możliwe zastosowanie w medycynie i naukach pokrewnych, wpływ różnych parametrów środowiska na bakteriofagi i możliwości zwiększenia stabilności tych wirusów poprzez dodatki różnych związków i materiałów. Szczególnie ostatnia część wstępu, opisująca różne możliwości zwiększania stabilności bakteriofagów w środowisku, jest bardzo interesująca i stanowi bardzo dobre i wnikliwie wprowadzenia do tematu pracy doktorskiej. **Rozdział ten jest wyczerpujący, ciekawy i bardzo dobrze napisany.**

Rozdział Cele i Założenia zawiera krótkie wprowadzenie i uzasadnienie podjęcia badań, cel badań oraz krótkie i syntetyczne podsumowanie otrzymanych wyników, z wyraźnym zwróceniem uwagi czytającego na najważniejsze wyniki i obserwacje. Rozdział ten ponownie wprowadza w tematykę pracy doktorskiej i jednocześnie też podsumowuje jej przebieg.

Rozdział Sekcja eksperymentalna zawiera opis wszystkich odczynników, materiałów, protokołów i procedur wykorzystanych przez Doktoranta w trakcie przygotowywania pracy doktorskiej. Podobnie, opis metod zawiera wszystkie niezbędne szczegóły pozwalające na niezależne powtórzenie opisywanych eksperymentów i ich analizę statystyczną.

Rozdziały od 4 do 7 prezentują otrzymane i zanalizowane przez Doktoranta Wyniki pracy doktorskiej i z tego względu są oczywiście najbardziej interesujące dla czytelnika. Każdy z tych rozdziałów eksperymentalnych zawiera też szczegółową dyskusję wyników z dostępnymi danymi literaturowymi oraz krótkie podsumowanie i wnioski.

Rozdział 4 prezentuje wyniki badań stabilności bakteriofagów w czasie ich długotrwałego przechowywania w standardowych pojemnikach laboratoryjnych. Temat ten był do tej pory raczej zanedbywany w literaturze. Doktorant wykazał, że bakteriofagi mogą nieodwracalnie przylegać do wewnętrznej powierzchni pojemników, w których są przechowywane, czego wynikiem jest spadek liczby wolnych (infekcyjnych) bakteriofagów w środowisku (spadek poważny bo nawet tysiąckrotny i większy). Problem ten ma istotne konsekwencje praktyczne, bo może skutkować innym niż oczekiwanie stężeniem aplikowanych wirionów w preparatach w czasie ich przechowywania np. na potrzeby medyczne czy w rolnictwie albo ochronie żywności. Doktorant wykazał eksperymentalnie, że problem nieodwracalnego przylegania bakteriofagów do powierzchni pojemników może zostać znacząco ograniczony poprzez zastosowanie nanokompozytów polioksoboranów złota (BOA) jako modyfikacji wewnętrznej powierzchni pojemników. Co więcej, Doktorant wykazał, że nanokompozyty BOA nie tylko stabilizują bakteriofagi podczas przechowywania, ale posiadają także właściwości antybakteryjne i przeciwwgrzybicze.

- Czy rutynowe stosowanie modyfikacji wewnętrznej powierzchni pojemników do przechowywania bakteriofagów byłoby opłacalne? Czy Doktorant mógłby pokusić się o oszacowanie kosztów tego rodzaju modyfikacji powierzchni pojemników?

W Rozdziale 5 pracy doktorskiej, Doktorant skupił się na zwiększeniu stabilności bakteriofagów podczas ich ekspozycji na promieniowanie ultrafioletowe (UV) z wykorzystaniem barwników drobnocząsteczkowych. Jak wiadomo, promieniowanie UV jest jednym z najważniejszych czynników wpływających negatywnie na stabilność bakteriofagów w środowisku, co bezpośrednio przekłada się na problem aplikacji tych wirusów wszędzie tam, gdzie promieniowanie UV jest obecne naturalnie czy też wprowadzone sztucznie np. w celu sterylizacji powierzchni. Doktorant na początku skupił się na czerwieni Kongo, a w dalszym etapie swojej pracy przetestował inne barwniki drobnocząsteczkowe (np. błękit brylantowy FCE), również spożywcze i ich wpływ na stabilność bakteriofagów ekspozowanych na promieniowanie UV. Co więcej, Pan mgr Wdowiak zaproponował mechanizm molekularny odpowiedzialny za zwiększoną stabilność bakteriofagów przy aplikacji czerwieni Kongo - tzw. molekularny filtr przeciwsłoneczny - wynikający z zaabsorbowania cząsteczek barwnika na powierzchni kapsydów. Nasuwają mi się tutaj następujące pytania:

- Czy zasadne byłoby przetestowanie kombinacji dwóch albo większej liczby barwników i efektu ochronnego takiej kombinacji na stabilność bakteriofagów w porównaniu z zastosowaniem jednego barwnika? Czy w ten sposób można byłoby obniżyć stężenie każdego z zastosowanych barwników, a co za tym i koszty i toksyczność?
- Czy byłoby zasadne przeprowadzenie testów cytotoksyczności i ekotoksyczności dla barwników drobnocząsteczkowych zaplanowanych do wykorzystania np. w rolnictwie czy też produkcji żywności?

Rozdział 6 prezentuje natomiast wyniki badań stabilności bakteriofagów podczas ekspozycji na podwyższoną temperaturę. Temperatura jest jednym z najważniejszych, obok promieniowania UV, czynnikiem ograniczającym stabilność bakteriofagów w środowisku. Aby zwiększyć stabilność bakteriofagów w podwyższonej temperaturze, Doktorant zaproponował użycie termoczułego polimeru: poli(eteru metylowo-winyloвого) - PVME, oraz przeprowadził testy porównania działania tego polimeru i innych związków wysokocząsteczkowych, wybranych na podstawie danych literaturowych, do stabilizacji bakteriofagów w podwyższonej temperaturze. Doktorant zaproponował też mechanizm molekularny stabilizacji bakteriofagów w podwyższonej

temperaturze przez dodatek PVME - jak sam zauważa, najprawdopodobniej cząsteczki polimeru absorbują energię cieplną i w ten sposób ograniczają jej wpływ na białka strukturalne kapsydów bakteriofagów.

Rozdział 7 jest niejako logicznym rozwinięciem badań i eksperymentów przedstawionych w Rozdziale 5 i Rozdziale 6, bo przedstawia analizy stabilności bakteriofagów w eksperymentach jednoczesnego stresu cieplnego i obecności promieniowania UV. Do badań zaprezentowanych w tym rozdziale, Doktorant wybrał jako model błękit brylantowy FCE (jako barwnik drobnocząsteczkowy, chroniący bakteriofagi przed promieniowaniem UV) oraz poli(eter metyloowo-winylowy - PVME) jako stabilizator cieplny i założył, że obecność razem obu tych elementów wpłynie korzystnie na stabilność bakteriofagów w warunkach stresowych. Taka hipoteza badawcza jest bardzo interesująca, również z uwagi na fakt, że w środowisku naturalnym bakteriofagi, podobnie jak inne układy biologiczne, poddawane są bardzo różnym stresom, występującym najczęściej w tym samym czasie. W eksperymentach Doktorant wykorzystał różne podejścia badawcze, między innymi, sterylizację membran filtrów oraz powierzchni liści sałaty z wykorzystaniem promieniowania UV i formulacji bakteriofagów. Oba podejścia zakończyły się sukcesem - Doktorant jednoznacznie wykazał, że kombinacja błękitu brylantowego FCE i poli(eteru metyloowo-winylowego (PVME) chroni bakteriofagi przed promieniowaniem UV i ciepłem. Co należy również podkreślić, kombinacja BB FCE i PVME nie wykazywała cytotoksyczności na liniach nowotworowych HeLa i A549. Nasuwa mi się tutaj następujące pytanie:

- Czy Doktorant zbadał cytotoksyczność kombinacji BB FCE i PVME na liniach komórkowych nienowotworowych np. na fibroblastach, co jest standardową procedurą w określaniu cytotoksyczności? Jeżeli nie, to prosiłbym wytłumaczyć, podczas publicznej obrony, dlaczego tego typu badania mają znaczenie i jaką wartość poznawczą miałyby tego rodzaju obserwacje i wyniki?

Ostatni rozdział to Podsumowanie i Wnioski, który zawiera krótkie podsumowanie każdego z wcześniejszych rozdziałów i przedstawia najważniejsze, zdaniem Doktoranta, uzyskane wyniki. Jest to krótki rozdział ponieważ, jak już zaznaczyłem wcześniej, rozdziały eksperymentalne zawierają (każdy z nich) dyskusję otrzymanych wyników. Następnie w ostatnich akapitach tego rozdziału, Pan Mateusz Wdowiak przedstawia swoje wyniki i wnioski w szerszym kontekście i postuluje, że bakteriofagi są bytami z pogranicza dwóch światów: bytów biologicznych i układów chemiczno-fizycznych. Jest to koncepcja integrująca różne podejścia badawcze i obserwacje, która ma także aspekt filozoficzny. Również ten rozdział jest bardzo dobrze napisany i interesujący.

- Chciałbym zapytać Doktoranta o Jego opinię w temacie uniwersalnych materiałów zwiększających stabilność bakteriofagów w środowisku. Czy będzie kiedykolwiek możliwe opracowanie uniwersalnej formułacji chroniącej wszystkie bakteriofagi przed wszystkimi możliwymi negatywnymi skutkami środowiska podczas ich aplikacji?

Praca doktorska Pana Mateusza Wdowiaka zawiera jeszcze rozdział Referencje, gdzie Autor przedstawił wszystkie wykorzystywane i cytowane prace innych autorów (ponad 250 pozycji literaturowych, również publikacje z ostatnich kilku lat).

Przygotowanie pracy doktorskiej i uwagi edytorskie:

Pod względem przygotowania edytorskiego oceniam pracę Pana Mateusza Wdowiaka bardzo wysoko. Praca jest napisana bardzo starannie, bardzo dobrym językiem naukowym, w sposób interesujący dla czytającego. Liczne i profesjonalnie przygotowane ryciny (wykresy oraz schematy) bardzo dobrze uzupełniają treść pracy doktorskiej. Występujące czasami w pracy drobne błędy edytorskie i sformułowania nieprecyzyjne są tak mało istotne, że pozwolę je sobie pominąć w mojej recenzji. Nie wpływają one bowiem na całokształt odbioru i wysoką wartość merytoryczną pracy doktorskiej Pana Mateusza Wdowiaka.

Podsumowanie i Wnioski końcowe:

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska Pana mgr Mateusza Wdowiaka stanowi oryginalny i ważny wkład w tematykę badań stabilności wirusów bakteryjnych w środowisku, a szczególnie w tematykę zwiększania stabilności bakteriofagów z wykorzystaniem różnych materiałów i formułacji. **Z tego względu moja ocena pracy doktorskiej jest jednoznacznie pozytywna.**

Uzasadniając:

- (1) przedstawiona praca doktorska została poprawnie i ze starannością zaplanowana,
- (2) przedstawia spójną tematykę badawczą oraz spójny ciąg myślenia naukowego,
- (3) doprowadziła do istotnych odkryć naukowych i rozwiązań aplikacyjnych
- (4) Doktorant posłużył się w swojej pracy różnymi metodami badawczymi i technikami laboratoryjnymi, aby jednoznacznie sformułować odpowiedzi na postawione przez siebie pytania
- (5) praca doktorska definiuje nowe obszary i cele badawcze

(6) wyniki badań zostały w większości opublikowane w czasopismach o zasięgu światowym

Uważam zatem, że recenzowana praca doktorska spełnia wszystkie wymogi Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku (Dz. U. 2018r. poz. 1668, tekst jednolity Dz. U. z 2023 r. poz 742, 1088, 1234) i dlatego też wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytut Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pana mgr Mateusza Wdowiaka do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na wysoki poziom merytoryczny przedstawionych badań, opublikowanie wyników pracy doktorskiej w czasopismach z listy JCR o zasięgu ogóln światowym, oraz opracowaniu wynalazków chronionych patentami, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej i uhonorowanie Pana mgr Mateusza Wdowiaka stosowną nagrodą.

Z wyrazami szacunku,

Prof. dr hab. Robert Czajkowski

Gdańsk, 28.05.2024

Zakład Badania Związków
Biologicznie Czynnych MWB UG i GUMed



prof. dr hab. Robert Czajkowski