



Wrocław, 20.06.2024

RECENZJA**rozprawy doktorskiej mgr. Mateusza Wdowiaka pt. „Stabilization of bacteriophages against adverse conditions”**

Opracowanie nowych i skutecznych metod walki z rozprzestrzeniającymi się i lekoopornymi drobnoustrojami stało się bardzo ważnym celem badaczy z pogranicza wielu dziedzin. Zastosowanie bakteriofagów wykazujących wysoką specyficzność względem konkretnych bakterii, które są dodatkowo w stanie ewoluować równie szybko jak patogenne drobnoustroje, wydaje się idealnym rozwiązaniem w czasach antybiotykooporności. Dlatego bardzo ważnym zadaniem jest opracowanie skutecznych metod walki z patogennymi bakteriami, które w odróżnieniu od leków, będących substancjami chemicznymi, ulegają łatwemu uszkodzeniu ze względu na obecność białek i materiału genetycznego. W zagadnienia te wpisuje się recenzowana praca mgr. Wdowiaka, która została wykonana w Instytucie Chemii Fizycznej PAN w Warszawie pod opieką naukową dr. hab. Jana Paczesnego, prof. IChF.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska ma charakter rozprawy, choć mogłaby być tzw. „spinką” ze względu na ilość opublikowanych prac (trzy opublikowane artykuły oraz dwa wysłane do wydawcy), które stały się jej podstawą. Należy wspomnieć, że we wszystkich z nich Doktorant jest pierwszym autorem. Praca doktorska napisana została w języku angielskim i liczy 133 strony. Choć oceniana praca jest rozprawą, to jej struktura jest nieco odmienna od większości recenzowanych

dotąd przeze mnie rozpraw, gdyż rozdziały prezentujące rezultaty poprzedzone są każdorazowo krótkim wstępem mimo pierwszego rozdziału będącego niewątpliwie wprowadzeniem w tematykę rozprawy. Jest on jednakże krótki (16 stron), co wyjaśnia sens wspomnianych wstępów w rozdziałach eksperymentalnych. Rozdział pierwszy zatytułowany „Wprowadzanie do stabilizacji bakteriofagów” prezentuje podstawowe informacje na temat bakterii, ich rozpowszechnienia, podziału na gatunki nieszkodliwe dla ludzi, zwierząt i roślin oraz te patogenne. Autor obrazowo opisał również szkody wywoływane przez bakterie patogenne nie tylko dla ludzi, ale szkodliwe dla przemysłu czy rolnictwa. Jednak wstęp zawiera przede wszystkim informacje na temat bakteriofagów, ich budowy, cyklu życiowego czy wysokiej specyficzności względem bakterii, a także terapii fagowych. Najistotniejsza dla rozprawy jest jednak stabilizacja samych fagów i temu zagadnieniu poświęcony jest najdłuższy rozdział, w którym Autor przedstawia stosowane metody stabilizacji wskazując zarówno na ich zalety jak i wady. Metody te opisane są w nieprzypadkowy sposób, tak by bardzo spójnie łączyły się ze sobą, a opisane informacje są przydatne w zrozumieniu kolejnych technik/metod. Autor jako najistotniejszą, lub raczej najbardziej obiecującą metodę, wskazuje stabilizację dzięki nanomateriałom. Wstęp rozprawy mimo swojej krótkiej formy jest bardzo treściwy, co jest jego ewidentną zaletą. Zawiera wszystkie niezbędne informacje potrzebne czytelnikowi by pojąć w pełni cel pracy.

Cel przedstawiony jest w kolejnym, dwustronicowym rozdziale. Niepotrzebnie może Autor zawarł tu informacje o wadach metod stosowanych w stabilizacji. Mogłyby one spokojnie stanowić ostatni rozdział Wprowadzenia. To samo, z odnośnikami literaturowymi, których raczej nie stosuje się przy definiowaniu celu pracy. Autor również w nietypowy sposób prezentuje tu zawartość rozdziałów eksperymentalnych zdradzając nawet uzyskane wyniki. Mimo tego, rozdział jest spójny i jasno z niego wynika, że celem pracy było opracowanie metod zwiększających stabilizację czy miano bakteriofagów, t. j. metody zapobiegającej niekontrolowanemu osadzaniu się na powierzchni przy długotrwałym przechowywaniu fagów, zwiększonej temperaturze, promieniowaniu UV czy wysychaniu.

Część eksperymentalna pracy napisana jest bardzo porządnie i zawiera listę stosowanych odczynników, materiałów oraz procedur użytych przy otrzymywaniu nanomateriałów, preparacji bakteriofagów i ich dalszemu użyciu. Znalazłem tu kilka drobnych błędów, jak choćby stosowanie wielkich liter w środku zdań wymieniających odczynniki czy brak kursywy w nazewnictwie pewnych odczynników. Zaciekała mnie informacja, że fagi LR1_PA01 były izolowane z wody morskiej z Zatoki Gdańskiej. Czy Doktorant dokonywał tej izolacji? W rozdziale brak jest również informacji o zaangażowaniu współautorów w poszczególne badania. Proszę zatem by podczas obrony, Doktorant mógł przedstawić krótko udział swój oraz innych autorów w prezentowanych badaniach.

Podstawą pierwszego etapu badań była obserwacja, opublikowana wcześniej przez prof. Paczesnego, że bakteriofagi mogą lepić się do powierzchni plastikowych, co skutkuje zmniejszeniem ich ilości w czasie przechowywania. Jest to zdecydowane jeden z czynników utrudniających ich dalszą aplikację. W związku z tym Doktorant podjął się działań mających na celu zapobieżeniu przyklejania się fagów i tym samym zwiększeniu stabilności roztworów, w których są one zawieszane. W celu kontroli hydrofobowości powierzchni plastikowych zastosował ich opłaszczanie nanokompozytem złoto-oksoboranowym (BOA). Płaszcz polioksoboranowy wykazuje właściwości amfifilowe zmieniając hydrofobowość powierzchni plastikowych, na którym jest zdeponowany w postaci nanomateriału. Doktorant przeprowadził syntezę nanocząstek złota, opłaszczył je BOA, a następnie scharakteryzował uzyskane powierzchnie analizując skład pierwiastkowy oraz wykonał serię zdjęć z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego. Wyniki EDAX ukazały dużą zawartość węgla z polipropylenu (93,19%) oraz 6,81% złota. Analiza ta nie ukazała zawartości boru czy tlenu. Dlaczego? Następnie Autor zastosował trójrotnie opłaśczone naczynka do badań z użyciem bakteriofagów. Wykazały one, że po 24 godzinach inkubacji w opłaśczonych naczynkach fagi MS2 oraz M13 wykazały o 99% mniejszą adherentność w porównaniu do próby kontrolnej bez opłaśczenia. Natomiast fagi T4 wykazywały adherentność, jednakże zmniejszoną o ok. 50% w stosunku do kontroli. Wyjaśnieniem tego zjawiska był wysoki kąt zwilżania wodą tychże fagów i tym samym ich zwiększona adherencja. Doktorant wykonał również badania porównawcze wzrostu

bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oraz drożdży *Sacharomyces cerevisiae* w opłaszczonych naczynkach. Wyniki ukazały, że naczynka obniżają wyraźnie wzrost drożdży i bakterii Gram-pozytywnych, a mniej bakterii Gram-ujemnych. Uzyskane wyniki pokazują, że opłaszczenie powierzchni plastikowych nanokompozytem BOA jest łatwe w wykonaniu oraz nieszkodliwe dla środowiska. Powierzchnie wykazują wysoką aktywność antygrzybiczną i bakteryjną zwiększając zarazem stabilność fagów.

Najobszerniejszy rozdział rozprawy został poświęcony stabilizacji fagów przy ekspozycji na promieniowanie UV za pomocą powszechnie stosowanych barwników. Promieniowanie UV stosowane w procesach sterylizacji (przeciwbakteryjnej) wspólnie z bakteriofagami obniża ich miano ze względu na szybkie uszkodzenia zarówno struktur białkowych jak i samego materiału genetycznego. Istnieje zatem potrzeba opracowywania metod, które zapewniłyby skuteczną sterylizację UV wraz z zapewnieniem odpowiedniego poziomu fagów działających również bakteriobójczo. W pierwszej kolejności Doktorant przetestował wpływ czerwieni Kongo na ochronę fagów przed promieniowaniem UV. Uzyskane rezultaty pokazują, że barwnik był w stanie chronić wszystkie testowane fagi dzięki własnej absorpcji UV, lecz w różnym stopniu. Wyznaczone parametry E_{50} wykazały, że minimalne stężenie barwnika zależnie od fagów winno wynosić ok 1%. Parametr E_{50} wyznaczony był poprzez dopasowanie równania Hilla do testu przeżyciowego, w którym zmianie ulegało stężenie barwnika. Moje pytanie jest takie, czy współczynnik Hilla, który nie został podany w pracy niesie również ze sobą jakąś informację o wpływie UV na bakteriofagi lub o samym barwniku? Doktorant zauważył również, że czerwień Kongo usuwa drożdże nawet bez promieniowania. Z czym to jest związane? W kolejnym kroku zostały przetestowane inne popularne barwniki używane jako indykatory pH oraz substancje wybarwiającej komórki. Nie wykazały one jednak zadawalającej ochrony. Jedynie Eozyna Y chroniła testowane fagi w pewnym stopniu. Autor również przetestował barwniki używane w przemyśle spożywczym. Wszystkie testowane barwniki były tu w stanie chronić fagi o różnej morfologii przed promieniowaniem UV. Ponadto, wyznaczone parametry E_{50} wskazują, że mogą być stosowane w wyraźnie niższych stężeniach, około 0.2-0.3%.

Przy tym opisie zabrakło mi konkluzji. Czy oznacza to, że są one skuteczniejsze od czerwieni Kongo? Ciekawym testem była również analiza ochronnego wpływu barwników zarówno na bakterie i jej specyficzne bakteriofagi. Poza jednym z nich, błękitem brylantowym, wszystkie barwniki chroniły zarówno gości jak i gospodarzy. Czy Doktorant ma pomysł, skąd bierze się ta różnica w ochronie? Wielką zaletą badań Autora była próba wyjaśnienia mechanizmu ochronnego testowanych barwników. Według Autora mechanizm ten zachodzi wedle tzw. modelu molekularnego filtra przeciwsłonecznego (*ang.* molecular sunscreen), w którym to barwnik łączy się z powierzchnią faga tworząc warstwę absorbującą promieniowanie UV. W tym celu przeprowadził on pomiary spektroskopii absorpcyjnej UV-vis barwnika z różnymi fagami i zauważył przesunięcia pasm, świadczące o oddziaływaniu białek kapsydu z barwnikiem. Przeprowadzone miareczkowanie pozwoliły na wyznaczenie stałej asocjacji bakteriofaga T4 z czerwiecią Kongo wynoszącą $1.3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Uzyskany współczynnik obsadzenia N był bardzo wysoki $>10^{11}$ świadczący pozytywnie o rodzaju mechanizmu. Autor wspomina również, że najbardziej prawdopodobnym celem oddziaływań są regiony białka bogate w kartki beta. Czy Doktorant ma wiedzę, jakie białka kapsydu mogą oddziaływać z barwnikiem i dlaczego te struktury drugorzędowe są najbardziej prawdopodobnym celem? Ponadto, z czystej ciekawości, proszę o krótkie przybliżenie metody Scatchard, użytej do wyznaczenia stałej oddziaływania. Jaki jest błąd tej stałej i o jakiej regresji liniowej ($R^2 = 0.99$) jest mowa w rozprawie? Kolejne pytanie dotyczy tego, czy Doktorant próbował lub rozważał jakieś inne metody badań oddziaływań bakteriofag-barwnik i ewentualnie dlaczego ich nie użył lub nie zaprezentował?

Ciekawym spostrzeżeniem, którego dokonał Autor jest to, że barwniki efektywne w ochronie bakteriofagów powinny zawierać ugrupowania sulfonowe, które oddziaływać mają elektrostatycznie z grupami aminowymi (lizyna) w białkach oraz to, że obecność grup hydroksylowych w cząsteczce barwnika sprzyja tworzeniu się wiązań wodorowych. Jeśli tak jest, to przydatne byłoby sprawdzenie czy oddziaływanie słabnie w obecności wysokiej siły jonowej lub obecności soli chaotropowych. Czy Doktorant rozważał takie podejście? Tzw. „wisienką na torcie” w badaniach Doktoranta nad

ochronną rolą barwników było zastosowanie czerwieni Kongo do sterylizacji membran w filtrach PTFE. Jak pokazano, użycie barwnika do sterylizacji pod wpływem promieni UV było nieskuteczne w usunięciu *E. coli* oraz *P. aeruginosa*. Dopiero zastosowanie trzech czynników- bakteriofagów, barwnika i UV okazało się niezwykle skuteczne w procesie sterylizacji membran.

W kolejnym kroku badań Doktorant przyjrzał się ochronnej roli polimerów rozpuszczalnych w wodzie na ekspozycję bakteriofagów na zwiększoną temperaturę. W swoich badaniach porównał ze sobą popularny PEG o różnej długości oraz jego pochodne, a także termoczulą polimer PVME. W tym celu wyznaczył optymalne stężenie polimeru na witalność fagów T4, a wykonany test porównawczy wykazał, że tylko PVME wykazuje ochronny wpływ na testowane fagi przy wyraźnie uboższym ochronnym wpływie PEG₆₀₀₀ lub pomijalnym wpływie innych polimerów. Badania z użyciem cryoSEM wykazały jednak, że polimer nie oddziałuje z fagami, a jego działanie ochronne polega na pochłanianiu energii cieplnej i zamianie jej na wiązania chemiczne. Czy Autor ma tu na myśli sieciowanie cząsteczek polimeru połączone z dehydratacją czy tworzenie jeszcze jakichś innych wiązań? Ostatni etap badań Doktoranta to opracowanie szybkich i efektywnych protokołów do sterylizacji membran, powierzchni roślin (sałaty) czy eliminacji zanieczyszczeń bakteryjnych. W tym celu wykorzystał połączenie ochronnego wpływu błękitu brylantowego, jako bardziej przyjaznego organizmom żywym, promieniowania UV oraz formułację z użyciem polimeru PVME. Testowane przez niego kombinacje czynników ochronnych fagów wykazały, że najlepszy rezultat uzyskuje się wówczas, gdy do sterylizacji użyje się bakteriofagów, barwnika, promieniowania UV oraz termoczulę polimeru. W jaki sposób wygląda aplikowanie uzyskanego preparatu na żywe rośliny i w jaki sposób bada się wówczas poziom aktywnych bakteriofagów?

Opis rezultatów kończy się krótkim podsumowaniem uzyskanych wyników wraz z ogólnymi przemyśleniami na temat bakteriofagów i potrzeby pracy nad ich zastosowaniu w walce z patogennymi i szkodliwymi bakteriami.

Przedstawiona do recenzji rozprawa prezentuje ogrom pracy włożonej w optymalizację warunków mających celu zwiększenie stabilności bakteriofagów. Szczególnie wartościowe, poza

samymi spostrzeżeniami i wynikami, jest ustalenie przez Doktoranta mechanizmu, wedle którego dany czynnik poprawia miano fagów lub na niego nie wpływa. Pozostaje jeszcze wiele pytań, ale myślę, że podczas swojej prezentacji jak i obrony Pan Wdowiak rozwinie niewyjaśnione wątki. Nie mam zasadniczych zastrzeżeń do recenzowanej pracy, a swoje wątpliwości czy pytania zawarłem powyżej. Rozprawę czyta się bardzo dobrze i muszę przyznać, że jest to jedna z najlepiej napisanych prac doktorskich, jakie do tej pory czytałem, mimo pewnych różnic w strukturze do klasycznych rozpraw. Myślę, że właśnie te odstępstwa dodały wiele walorów. Wartym podkreślenia jest to, że Autor bardzo logicznie i sprytnie połączył ze sobą rozdziały, tworząc tym samym bardzo dobrą lekturę. Przekonany jestem, że jest to również zasługa Promotora rozprawy. Praca opatrzona jest starannie wykonanymi ilustracjami. Zawiera pomocną listę stosowanych skrótów, a także informacje o finansowaniu badań czy publikacjach wchodzących w skład doktoratu, jak i powstałych w wyniku realizacji innych projektów, a także informację o zgłoszeniach patentowych. Przyznaję, że osiągnięcia Doktoranta na polu nauki są co najmniej ponadprzeciętne. Zarówno osiągnięcia jak i forma użyta do przygotowania pracy wskazują na duży entuzjazm naukowy Kandydata do stopnia doktora.

Podsumowując stwierdzam, że cel ogólny pracy został zrealizowany przez Doktoranta, a mianowicie opracował nowe rozwiązania (i wyjaśnił ich podłoże molekularne czy fizyczne) zwiększające stabilność bakteriofagów i pozytywnie wpływające na ich przechowywanie czy pracę laboratoryjną, a także aplikacyjną. Doktorant krok po kroku opisał zarówno sukcesy jak i porażki swoich działań, choć tych ostatnich prawie w ogóle w pracy nie ma (lub nie zostały przedstawione). Rezultaty badań Doktoranta wnoszą istotną wiedzę na temat zarówno samych bakteriofagów jak i metod ich produkcji, przechowywania i pracy z nimi. Drobne potknięcia jak na przykład niefortunne sformułowania czy też drobne błędy gramatyczne nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny przedstawionych osiągnięć Pana mgr Mateusza Wdowiaka. Rozprawa doktorska została przygotowana w sposób staranny od strony merytorycznej i edytorskiej. Zawiera pełną dokumentację przeprowadzonych badań, ciekawą i rzetelną dyskusję uzyskanych wyników, poprawnie

sformułowane wnioski. Wszystkie rysunki zostały wykonane rzetelnie. Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Mateusza Wdowiaka w pełni spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim zwarte w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. W związku z tym, z pełnym przekonaniem stawiam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Mateusza Wdowiaka do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Biorąc pod uwagę zarówno ilość przeprowadzonych badań, jak i ich rangę oraz to, że badania zostały już opublikowane lub są w trakcie publikacji wnoszę o wyróżnienie ocenianej rozprawy.

Z wyrazami szacunku

Artur Krężel