



Poznań, 2024-06-13

RECENZJA

Pracy doktorskiej Pana Mateusza Wdowiaka

pt.: „**Stabilization of bacteriophages against adverse conditions**”

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgra Mateusza Wdowiaka została wykonana w Zakładzie Chemii Fizycznej Układów Biologicznych, w Instytucie Chemii Fizycznej PAN w Warszawie, pod kierunkiem Pana dra hab. Jana Paczesnego, profesora instytutu oraz kierownika Zespołu 2 „Żywe materiały”. Badania zawarte w niniejszej pracy były wspierane finansowo w ramach: 1) grantu SONATA BIS zatytułowanego „Modyfikacja stabilności wirionów - stabilizacja i dezaktywacja wirusów” kierowanego przez Promotora. oraz 2) projektu o akronimie HYPHa, realizowanego w ramach programu TEAM-NET Fundacji na rzecz Nauki Polskiej, w ramach Programu Operacyjnego Inteligentny Rozwój 2014-2020.

Motywacją do podjęcia pracy nad tematem polepszenia stabilizacji bakteriofagów wobec różnych czynników zewnętrznych był fakt postrzegania bakteriofagów jako sprzymierzeńców w walce z patogenami (bakteriami chorobotwórczymi). Z tej perspektywy, bakteriofagi jawić się mogą nawet jako broń biologiczna albo przyszłe leki do zwalczania infekcji wywoływanych przez lekooporne bakterie. Zatem uzasadniona jest potrzeba opracowania nowych metod i procedur pozwalających zwiększyć ich przeżywalność na działanie czynników zewnętrznych, między innymi promieniowania UV czy też wysokiej temperatury.

Ocena pracy

Z formalnego punktu oceniana praca doktorska ma formę jednotomowego opracowania z podziałem na 9 głównych części. Poprzedzone są one streszczeniem pracy zarówno w języku polskim, jak i w języku angielskim, po którym zamieszczony został wykaz użytych skrótów oraz spis treści. Dodatkowo na początku umieszczono jeszcze informacje o źródłach finansowania badań oraz spis publikacji i patentów Doktoranta. Właściwą rozprawę rozpoczyna rozdział 1 czyli 27-stronicowe teoretyczne wprowadzenie, rozdział 2 omawia cele pracy, dalej w rozdziale 3 zawarta jest obszerna część eksperymentalna. Omówienie wyników obejmuje rozdziały 4-7, całość podsumowano w rozdziale 8, zawierającym też wnioski końcowe. Pracę kończy spis cytowanej literatury obejmujący 258 pozycji opublikowanych w latach 1949 - 2024. Praca została napisana w języku angielskim i obejmuje 133 strony, na których łącznie zamieszczono 40 rysunków.

W części literaturowej (tj. rozdziale 1 zatytułowanym „Introduction to bacteriophage stabilization”) Autor zapoznaje Czytelnika z przedmiotem swoich badań czyli bakteriofagami kładąc główny nacisk na stosowane metody ich stabilizacji tj. użycie polimerów, enkapsulacja, liofilizacja, zastosowanie nanomateriałów (np. nanocząstek złota).

W kolejnym rozdziale (zatytułowanym „Goals and objectives”) w sposób zwięzły został sformułowany cel pracy czyli opracowanie nowych metod stabilizacji bakteriofagów przed niekorzystnymi warunkami, takimi jak niekontrolowana adsorpcja podczas długotrwałego przechowywania, napromieniowanie UV, podwyższona temperatura oraz wysuszenie. Przy okazji Autor krok po kroku przedstawia nam motywację do podjętych badań, których rezultaty można znaleźć w czterech rozdziałach.

W rozdziale numer 3 zostały zamieszczone informacje dotyczące stosowanych odczynników, aparatury pomiarowej oraz analizy statystycznej. Ponadto opisany został sposób otrzymywania powierzchni modyfikowanej nanokompozytem BOA (*ang.* gold-oxoborate). Szczegółowo opisano metody hodowania i składowania bakteriofagów, bakterii i drożdży oraz opisano poszczególne procedury pomiarowe dotyczące ich ekspozycji na

promieniowanie UV i/lub wysoką temperaturę. Osobno przedstawiono protokół postępowania dla testu MTT, procedury stabilizacji bakterii i bakteriofagów za pomocą BB-PVME w warunkach laboratoryjnych lub naturalnych oraz walidacji procedury prowadzącej do ochrony żywności dzięki stabilizacji bakteriofagów za pomocą BB-PVME.

Jak już wspomniano, Doktorant podzielił swoją pracę badawczą na 4 części, a uzyskane wyniki zostały przedstawione w rozdziałach od 4 do 7. Co nietypowe, każdy z tych rozdziałów poprzedzony jest informacją na temat ich publikacji oraz zawiera dodatkowe wprowadzenie teoretyczne (w tym motywację do podjętych badań) i podsumowanie/wnioski końcowe. Po zapoznaniu się z tymi rozdziałami, uważam, że Doktorant zrealizował cele rozprawy. Chciałabym też podkreślić, iż Autor w sposób jasny i merytoryczny omawia rezultaty swoich badań oraz odnosi je do wyników uzyskanych przez innych badaczy.

Pracę badawczą Doktorant zaczął od badania naczyń laboratoryjnych wykonanych z polipropylenu i pokrytych nanokompozytem BOA (*ang.* gold-oxoborate), dla określenia na ile adsorpcja fagów na tak zmodyfikowanych powierzchniach będzie zahamowana. BOA-modyfikowane materiały zostały opracowane uprzednio przez Promotora (dra hab. Jana Paczesnego, prof. instytutu) i współpracowników, którzy wykazali antybakteryjne działanie tak modyfikowanych naczyń plastikowych. W ramach niniejszej pracy, Doktorant wykazał dodatkowo, iż BOA-modyfikowane polipropylenowe naczynia wykazują właściwości przeciwgrzybicze (obserwowano 99% spadek ilości *Saccharomyces cerevisiae* po 24h inkubacji).

Dalsza część rozprawy związana jest z poszukiwaniem sposobów na uchronienie bakteriofagów przed ich dezaktywacją podczas sterylizacji przy pomocy promieniowania UV, działania wysokiej temperatury czy też obydwu tych czynników równocześnie. Do najważniejszych rezultatów tej części pracy można zaliczyć:

1) wykazanie, że sól disodowa kwasu 3,3'-([1,1'-difenylo]-4,4'-diyl)bis(4-aminonaftaleno-1-sulfonowego, czyli czerwień Kongo (CR), zapewnia ochronę bakteriofagów bezotoczkowych przed naświetlaniem UV. Dla CR określono wartości EC_{50} ,

które wynoszą od 0,7% to 1,1% w zależności od typu bakteriofagów. Co istotne, ochrona ta nie działa w przypadku komórek bakterii Gram ujemnych i drożdży, w przeciwieństwie do bakterii Gram dodatnich;

2) wykazanie, że inne związki tj. barwniki reagujące na zmiany pH (czerń eriochromowa T, fiolet krystaliczny, oranż metylowy, błękit tymolowy i czerwień fenolowa) oraz powszechnie stosowane związki barwiące lub absorbujące promieniowanie UV (rodamina B, zieleń SYBR i chinina) nie chronią wcale bakteriofagów przed destrukcyjnymi skutkami promieniowania UV. Pewne działanie ochronne wykazał barwnik eozyna Y, lecz Doktorant uznał, że było to „poniżej pożądanego poziomu ochrony”;

3) wykazanie, że wybrane barwniki spożywcze także chronią bakteriofagi przed negatywnymi skutkami promieniowania UV, a na dodatek w zakresie niższych stężeń. W sumie przebadanych zostało 8 barwników spożywczych, a ich wartości EC_{50} mieszczą się w przedziale od 0,11% do 0,33%. Co istotne, stwierdzono, że tylko barwnik błękit brylantowy FCF (BB) nie chroni bakterii Gram ujemnych przeciw ekspozycji na promieniowanie UV;

4) zaproponowanie mechanizmu ochrony bakteriofagów przed promieniowaniem UV z udziałem barwnika czerwieni Kongo (CR) i wykazanie, że jest to mechanizm typu „molecular sunscreen”. W tym przypadku dochodzi do wiązania cząsteczek barwnika do białek kapsydu, co miejscowo zwiększa stężenie CR, a w konsekwencji prowadzi do absorpcji promieniowania UV zanim dotrze ono do genomu wirionu;

5) wskazanie na istotne 3 elementy budowy barwników wykazujących efektywne działanie ochronne bakteriofagów przed promieniowaniem UV tj. obecność grup sulfonowych, obecność grup hydroksylowych czy też aromatyczny charakter;

6) dokonanie oceny użyteczności procedury z użyciem promieniowania UV w obecności CR i bakteriofagów jako metody do wydajnej sterylizacji membrany bioreaktora skażonego bakteriami Gram ujemnymi (jako model membrany bioreaktora wykorzystano filtry strzykawkowe Nylon 66 0,22 μm);

7) wykazanie, że roztwór PVME (poli(eteru winylowo-metylowego)) chroni bakteriofagi przed negatywnymi skutkami działania wysokiej temperatury. Ponadto

porównanie działania ochronnego innych polimerów (PEG 6000, PEG 20000, APEG, PVP, PVME) wobec bakteriofagów poddanych działaniu wysokiej temperatury i stwierdzenie, że PVME wykazuje najlepszy efekt ochronny;

8) wykorzystanie rezultatów dotychczasowych badań i stworzenie optymalnej mieszaniny BB-PVME (0,5% BB + 0,1% PVME), która przy udziale bakteriofagów i promieniowania UV służyć może do sterylizacji membran w przemyśle spożywczym. Wykazanie aplikacyjnego charakteru rezultatów badań poprzez dokonanie oceny skuteczności preparatu BB-PVME w ochronie żywności pochodzenia roślinnego przed zanieczyszczeniami bakteryjnymi, dzięki zwiększeniu stabilizacji bakteriofagów wobec promieniowania UV oraz podwyższonej temperatury, także w warunkach naturalnych.

W rozdziale 8 Autor jeszcze raz w sposób bardzo zwięzły podsumowuje wyniki uzyskane w poszczególnych etapach swojej pracy i dodatkowo uświadamia Czytelnikowi trudności w pracy eksperymentalnej wynikające z właściwości bakteriofagów.

Według mnie, bardzo istotnym osiągnięciem Doktoranta jest zaproponowanie w/w rozwiązania (mieszaniny BB-PVME) do ochrony bakteriofagów, a w konsekwencji do ochrony roślin i żywności przed niekorzystnym działaniem bakterii w warunkach nasłonecznienia i co za tym idzie wysokiej temperatury oraz narażenia na wysuszenie. Warto zaznaczyć, że w kontekście użycia optymalnego stężenia BB-PVME (0,5% BB + 0,1% PVME) do ochrony żywności wykonano testy MTT na dwóch liniach komórek nowotworowych - HeLa (komórki raka szyjki macicy) oraz A549 (komórki niedrobnokomórkowego raka płuc), które wskazały poziom przeżywalności na poziomie 70-75%. Jest to bardzo ważny wynik, bowiem badania z użyciem hodowli komórkowych w celu przewidywania właściwości toksycznych różnych substancji chemicznych dodawanych do żywności stały się obecnie powszechne i niezbędne. Zastanawia mnie jak wyglądałaby przeżywalność normalnych/zdrowych komórek, bowiem komórki rakowe mają inną przepuszczalność błon komórkowych, jak i zaburzony metabolizm. Czy przewiduje się jeszcze podjęcie takich badań w przyszłości?

Jeżeli chodzi o eksperymenty mające na celu potwierdzenie przewidywanego mechanizmu ochronnego działania barwnika CR na bezotoczkowe bakteriofagi przy ekspozycji na promieniowanie UV (rozdział 5.3.3.) to uważam, że Autor powinien wykonać pomiar widm absorpcji roztworów bakteriofagów (w buforze TM oraz PBS) zamiast cytować publikację dotyczącą opracowanego dozymetru UV zawierającego nukleoproteinę (bakteriofaga T7; ATCC11303-B7). Niemniej jednak faktem jest, że białko w znacznym stopniu przyczynia się do widma absorpcji bakteriofagów, co od dawna już wykorzystywano do obliczenia stężenia fagów w wirionach/ml (Day i in., 1978). Proszę o wyjaśnienie, co Doktorant chciał przekazać na rysunku 24D i w jaki sposób znormalizowano przedstawione tutaj widma – bo raczej nie jest to długość fali 586 nm jak wskazuje podpis pod rysunkiem. Doktorant posłużył się zmianą absorbancji 1% CR przy długości fali 600 nm od stężenia fagów T4, żeby skonstruować krzywą pokazaną na rysunku 25 i obliczyć wartość stałej wiązania. Prosiłabym o pokazanie widm absorpcji, zarejestrowanych po kolejnych dodatkach roztworu fagów T4. Zastanawia mnie bowiem, czy Doktorant obserwował rozpraszanie i czy wzrost absorbancji przy 600 nm nie jest tego skutkiem? Czy wykonany był kontrolny eksperyment, w którym mierzone były widma absorpcji po kolejnych dodatkach fagów T4 do roztworu buforowego bez barwnika CR?

Ponadto, analizując rysunki przedstawiające dane służące do obliczeń EC_{50} dla testowanych barwników zauważyłam, że niejednokrotnie błędy pomiarowe dla poszczególnych wyników są bardzo duże (na przykład na rysunku 8 dla przeżywalności fagów MS2 poddanych naświetlaniu UV w obecności różnych stężeń CR - od 0,001% do 2,000%). Czy zatem obliczone wartości EC_{50} można przyjąć za prawidłowe?

Abstrahując, chciałabym podkreślić, że wysoko oceniam ładunek merytoryczny ocenianej dysertacji. Jestem pod wrażeniem nie tylko ogromnej ilości pracy włożonej przez mgra Mateusza Wdowiaka podczas realizacji celów pracy doktorskiej, ale także różnorodności tej pracy – zwłaszcza należy zwrócić uwagę na jej interdyscyplinarny charakter (m.in. biologia molekularna, chemia fizyczna).



Z uwagi na fakt, iż praca jest napisana w języku angielskim trudno mi ocenić poprawność stylu, ale też praktycznie nie zauważyłam literówek. W kilku miejscach Doktorant użył określenia „absorption” zamiast “adsorption” (np. na stronie 47 lub 49). Podpis pod rysunkiem 4 zawiera błąd – powinno być „The inset in F) /.../” zamiast „The inset in C) /.../”. Wykaz skrótów jest bardzo skąpy, brakuje tam choćby rozwinięcia skrótu BOA (*ang.* gold-oxoborate). Czy opis osi y na rysunku 24A oraz 24B jest prawidłowy tzn. czy przedstawione widma na pewno są znormalizowane? Na rysunku 24D nie dostrzegam widma T4. Rysunek 28 byłby bardziej czytelny, gdyby skala osi x kończyła się przy 500 nm. Z uwag redaktorskich dodam jeszcze tylko, że równania zawarte w pracy (strona 78-79) powinny być ponumerowane. W tym miejscu należy stwierdzić, że wyżej wymienione uwagi, w żaden sposób nie wpływają na moją pozytywną ocenę rozprawy.

Jak wspomniano na początku, w niniejszym opracowaniu zawarto też informacje na temat działalności naukowej Doktoranta. I tak, Pana Mateusz Wdowiak jest współautorem 9 publikacji (7 było opublikowanych w dniu składania rozprawy) oraz 1 przyznanego patentu i 1 zgłoszenia patentowego. Brak jest informacji o aktywności konferencyjnej Doktoranta. Pan mgr Wdowiak brał udział w realizacji grantu NCN SONATA BIS nr 2017/26/E/ST4/00041 „Modyfikacja stabilności wirionów - stabilizacja i dezaktywacja wirusów”, ponadto badania przedstawione w niniejszej dysertacji były też finansowane przez FNP (program TEAM-NET) w ramach projektu POIR.04.04.00-00-14D6/18-00 “Hybrid sensor platforms for integrated photonic systems based on ceramic and polymer materials (akronim HYPHa)”.

Podsumowując, podjęta tematyka dotycząca ograniczenia negatywnego wpływu czynników zewnętrznych (niekontrolowanej adsorpcji, promieniowania UV, podwyższonej temperatury) na bakteriofagi jest jak najbardziej aktualna i niewątpliwie ma potencjał aplikacyjny, o czym świadczą zgłoszenia patentowe. Uzyskane oraz opisane w ramach przedstawionej pracy wyniki bezsprzecznie poszerzyły wiedzę na temat bakteriofagów i nie tylko dostarczyły cennych informacji na temat sposobów ich stabilizacji, ale też wskazały na możliwe mechanizmy za tym stojące. Ponadto, otrzymane rezultaty mogą stanowić punkt



wyjścia do podejmowania kolejnych prac badawczych nad opracowaniem selektywnych metod do stabilizacji wybranych mikroorganizmów czy też przy produkcji szczepionek.

Wniosek końcowy

Niniejszym stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgra Mateusza Wdowiaka zatytułowana „**Stabilization of bacteriophages against adverse conditions**” spełnia kryteria określone w art. 187 ust. 1-2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgra Mateusza Wdowiaka do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na szeroki zakres badań, jak i ich wartościowy naukowo, a także udowodniony charakter aplikacyjny otrzymanych rezultatów (co potwierdza obecność w dorobku naukowym patentu, o numerze P.441359 oraz zgłoszenia patentowego z dnia 02.02.2024, o numerze P.447692) wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o wyróżnienie niniejszej rozprawy doktorskiej.

Z poważaniem,

dr hab. Anna Dembska, prof. UAM