



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 2025-08-27

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska
Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
Polska Akademia Nauk
ul. Weigla 12
53-114 Wrocław
tel. +48 71 3371172 wew. 316
email: dabrowska@hirsztfeld.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Sady Raza pt. „Inactivation of bacteriophages”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr **Sady Raza** została wykonana pod opieką promotorską Pana dr hab. Jana Paczesnego w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Jest to uznana polska grupa naukowa od lat prowadząca badania łączące biologię i fizykę, starając się wyjaśnić jakie oddziaływania fizyko-chemiczne mogą mieć istotny wpływ na bakteriofagi. Bakteriofagi zyskują coraz większe zainteresowanie środowiska naukowego, ze względu na ich powszechność w przyrodzie, istotną rolę jaką odgrywają w naturalnych mikrobiomach, na ich potencjał terapeutyczny, ale także na negatywną rolę, jaką odgrywają w przemyśle biotechnologicznym i farmaceutycznym. Właśnie to ostatnie zagadnienie stało się przedmiotem badań podjętych w ocenianej pracy doktorskiej. Szczegółowo, bakteriofagi cechujące się zdolnością do zabijania bakterii, stają się problemem w przemysłowych kulturach bakteryjnych, często udaremniając produkcję ważnych związków i produktów biologicznych pozyskiwanych z bakterii, a nawet niszczą produkcje mleczarskie i inne stosowane w produkcji żywności. Taka perspektywa wymaga więc opracowania selektywnych metod inaktywacji fagów w taki sposób, aby nie utracić przy tym wykorzystywanych w produkcji bakterii. Opracowane związki i substancje





przeciwbakteriofagowe nie mogą jednocześnie wykazywać istotnej aktywności przeciwbakteryjnej. W ocenianej pracy właśnie pozyskanie takich związków, wykazujących jednocześnie ogólne bezpieczeństwo biologiczne i środowiskowe, stało się celem wykonanego projektu.

Praca ma charakter monografii, obejmującej takie typowe rozdziały jak Wstęp, Cel i zakres pracy, Materiały i metody, Wyniki w podziale na rozdziały tematyczne, Bibliografia. Praca nie zawiera typowej Dyskusji, zawarto jednak rozdział obejmujący podsumowanie i konkluzje, a elementy typowej dyskusji naukowej są zawarte w każdym z rozdziałów tematycznych przedstawiających wyniki. Ponadto uwzględniono elementy pomocnicze jak Spis treści, Streszczenie w języku polskim i angielskim, Wykaz skrótów, Listę publikacji oraz Finansowanie grantowe. Struktura pracy jest więc w większości typowa, prawidłowa i wystarczająca dla zrozumienia treści oraz sprawnego analizowania przedstawionych tematów.

Przystępując do analizy treści przedstawionej do oceny pracy, chciałabym zacząć od przejrzystego i dobrze napisanego wstępu. Wstęp daje dobrą podstawę teoretyczną dla zrozumienia pozostałych części rozprawy, Doktorantka zadbała o to, aby wszystkie zagadnienia, które zawarła w części opisującej wyniki zostały odpowiednio wprowadzone i omówione we wstępie. Obejmuje zarówno zagadnienia fizyko-chemiczne, praktyczne zagadnienia dotyczące przemysły biotechnologicznego i farmaceutycznego, jak i aspekty biologiczne, szczególnie biologię bakteriofagów.

W zakresie merytorycznym mam do tej części pracy następujące uwagi:

1. Oszacowanie ilości ciągle nieodkrytych bakteriofagów opiera się na estymacji z roku 2003, a jako, że przez ponad 20 lat świat naukowy dokonał ogromnego postępu w zakresie wiedzy o fagach (co można zobaczyć np. w bazie GenBank)- jest to oszacowanie już całkowicie nieuprawnione (str. 16)
2. Podobnie wspomniana we wstępie morfologiczna klasyfikacja fagów pochodzi z roku 2009 i została już zatąpiona klasyfikacją genetyczną, nad którą zespół ekspertów fagowych pracuje od ok. 10 lat (str. 16)
3. Cykle rozwojowe fagów występujące poza cyklem litycznym i lizogennym to także np. infekcja chroniczna czy pseudolizogenia (str. 17)



4. Naukowcy uznani za odkrywców fagów, Twort i d'Herelle, odkryli fagi na początku XX wieku, a nie w wieku XIX (str. 18)

Cel i zakres pracy uważam za przedstawiony w sposób odpowiedni i jasny.

Materiały i metody są w większości kompletne i wystarczająco szczegółowe. To, co mogłoby zostać przedstawione bardziej szczegółowo to główni bohaterzy tej pracy, czyli przebadane bakteriofagi. Typowo, ich jednoznaczne zdefiniowanie wymaga podania, poza nazwą, która może być myląca, także referencji GenBank. Ze względów praktycznych cenne są informacje na temat zakresu specyficzności, morfologii i typu kwasu nukleinowego każdego faga (str. 37).

Wyniki przedstawione w pracy są obszerne, spójne, dobrze przedstawione. Zakres wykonanych prac i analiz jest naprawdę imponujący. Został też bardzo dobrze zaplanowany, ponieważ opisywane kolejne kroki układają się w logiczną i ciekawą historię. Opis jest dość drobiazgowy i opatrzone dużą liczbą rycin i tabel, które są niezbędne dla zrozumienia tej części rozprawy. Uważam, że zakres wykonanych prac jest szeroki, ambitny i z pewnością pozwolił na zdobycie szerokich umiejętności i pogłębionej wiedzy przez Doktorantkę. Mam jednak kilka uwag do tej części pracy:

1. W niektórych rycinach trudno mi jest zrozumieć jakie były wyniki analizy statystycznej, w niektórych wypadkach nie odnajduję „gwiazdek” nawet mimo wskazania na nie w legencie ryciny, np. Ryc. 6
2. W niektórych częściach tekstu i odpowiednich do nich rycinach, bardzo barkowało mi jasnego określenia jak długo trwała ekspozycja fagów na nanocząstki i określone warunki. Jest to perspektywa, która jest bardzo istotna w ocenie efektów biologicznych oraz możliwości ich praktycznego wykorzystania. Stało się tak np. w opisie i rycinie nr. 19, 25, 28, 31, 33
3. Mam też pytanie, jak przedstawia się oporność/wrażliwość faga M13 na Tween20, ponieważ fagi bywają wrażliwe na detergenty (str. 66)



4. Niestety nie mogę się zgodzić z elementem interpretacji wyników na str. 71/72, gdzie czytamy, że wrażliwość faga na nanocząstki żelaza różniła się w zależności od morfologii fagów- jako, że testowane były po jednym fagu z danego typu morfologicznego nie możemy niestety stwierdzić, że to morfologia, a nie indywidualna kompozycja białek i ich cechy decydowała o wrażliwości.
5. Mam również uwagę dotyczącą oceny toksyczności opracowanych nanocząstek względem komórek eukariotycznych. Niestety poziom przeżycia komórek eksponowanych na naocząstki na poziomie 90% stanowi już wskazanie na toksyczne lub anty-proliferacyjne efekty przez nie wywierane. Zgadzam się oczywiście, że nie jest to efekt dramatyczny, można byłoby jednak zadać przewrotne pytanie, czy chcielibyśmy, aby badany związek zabił 10% komórek w naszym ciele- to oczywiście jedynie obrazowe porównanie, ale wskazuje ono na fakt, że nawet niewielkiej toksyczności nie możemy ignorować. Co więcej, nie wiemy czy jest to rzeczywiście 10% jeśli ocena procentowa została wykonana na odczytach fluorescencji- powinna zostać zastosowana krzywa standardowa dla fluorescencji względem liczby komórek w próbce, aby można było dokonywać takich bezpośrednich przeliczeń. Szczegółowe dane dotyczące bezpieczeństwa opracowanych nanocząstek zapewne zostaną jeszcze zebrane w przyszłości.
6. Mam też pytanie powodowane naukową ciekawością: jak warunki zastosowane w pracy przekładają się na realia produkcji biotechnologicznych i farmaceutycznych, jak duże stężenia fagów trzeba z nich usuwać- tutaj zastosowano często stężenia wydające się być dość niskie, np. 10^3 - 10^4 pfu/ml. Jak to wygląda „na polu walki”? (str 79)
7. Ze względu na bardzo ciekawe wyniki uzyskane z wykorzystaniem indygokarminu mam pytanie, jak, poza przywołanym statusem produktu zatwierdzonego przez FDA, wyglądają regulacje dotyczące tego produktu w UE?

Na koniec chciałabym zawrzeć także kilka szczegółowych uwag pozytywnych:

1. Za bardzo ciekawy i wart docenienia uważam pomysł łącznego stosowania fagów i nanocząstek, które wykazały aktywność bakteriobójczą a nie wykazały jej, wbrew



oczekiwaniom, przeciwko fagom. Jest to wspaniały przykład kreatywnego i otwartego myślenia naukowego, a praktyczne zastosowanie tego pomysłu może dać świetne wyniki w przyszłości.

2. Chciałabym docenić podjęte w pracy próby proponowania i oceny mechanizmów obserwowanych zjawisk, co znacznie wzbogaca pracę i udowadnia naukowe podejście do tego praktycznego problemu (np. str 98, 111,).
3. Na koniec chciałabym pogratulować sukcesu, jakim jest opracowanie nanocząstek, które wykazały zakładaną i poszukiwaną w ocenianej pracy aktywność. Uważam, że znajdą one ważne zastosowania zarówno w przemyśle, jak i w obszarze ochrony zdrowia i być może w innych dziedzinach.

Podsumowanie i elementy dyskusji przedstawione w pracy są związane, ale wystarczające, są adekwatne do zaprezentowanych wyników. Dobrze lokują nowe, zawarte w pracy obserwacje na tle istniejącego stanu wiedzy.

Na koniec chciałabym podkreślić, że wskazane w niniejszej recenzji uwagi nie zmieniają ogólnej, wysokiej wartości pracy. Chcę też podkreślić, że jest to jedna ze starannie opracowanych, edytowanych i uporządkowanych prac doktorskich, jakie oceniałam. Literówki czy potknięcia językowe, błędy w przypisaniu numerów rycin, tabel, odsyłaczy itp. właściwie w niej nie występują, a czytanie tak starannie przygotowanej rozprawy było dużą przyjemnością.

Podsumowanie

Po dokładnym zapoznaniu się z przedstawioną do oceny pracą stwierdzam, że zakres wykonanych badań i uzyskanych wyników spełnia z należytą wagą wymagania stawiane pracom doktorskim, w tym spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dn 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024r., poz. 1571 ze zm.). Przeprowadzone badania dowodzą wysokich umiejętności zarówno w zakresie mikrobiologii, jak i fizyki oraz chemii. Stwierdzam, że Doktorantka wykonała ciekawą i nowatorską pracę badawczą, wnoszącą oryginalny wkład w dziedzinę. Rozprawa została napisana ciekawie, zrozumiale i



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

starannie. Przedstawiona do oceny rozprawa spełnia w mojej ocenie wymagania stawiane ustawowo i zwyczajowo rozprawom doktorskim, dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Sady Raza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na bardzo szeroki i wykazujący wysoki poziom naukowy zakres przeprowadzonych badań, ich duże znaczenie i unikalność w dziedzinie, a także ze względu na imponujący dorobek publikacyjny związany z ocenianą rozprawą, wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie ocenianej pracy.

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska
kierownik
LABORATORIUM BIOLOGII
MOLEKULARNEJ BAKTERIOFAGÓW
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
Wrocław





INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Centrum Doskonałości : IMMUNE

Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA

Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71

www.iitd.pan.wroc.pl

Wrocław, 2025-08-27

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska
Laboratorium Biologii Molekularnej Bakteriofagów
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej
Polska Akademia Nauk
ul. Weigla 12
53-114 Wrocław
tel. +48 71 3371172 wew. 316
email: dabrowska@hirszfeld.pl

REVIEW

of the doctoral dissertation by Mr. Sady Raza titled "Inactivation of Bacteriophages"

The doctoral dissertation presented for evaluation, authored by Sada Raza, was carried out under the supervision of Dr. Hab. Jan Paczesny at the Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences in Warsaw. This is a recognized Polish scientific group that has been conducting research for years in an original field combining biology and physics, aiming to understand the physicochemical interactions that may significantly affect bacteriophages. Bacteriophages have been gaining increasing attention in the scientific community due to their widespread presence in nature, their crucial role in natural microbiomes, their therapeutic potential, as well as their negative role in the biotechnology and pharmaceutical industries. The latter issue became the subject of research undertaken in the evaluated doctoral thesis. Specifically, bacteriophages that have the ability to kill bacteria are problematic in industrial bacterial cultures, often hindering the production of important compounds and biological products derived from bacteria, and even destroying dairy production and other food-related processes. This perspective thus requires the development of selective methods to inactivate phages in such a way that the bacteria used in production are not lost. The compounds and substances developed to combat bacteriophages must not exhibit significant antibacterial activity. The goal of the project undertaken in the evaluated thesis was to obtain such compounds that exhibit both general biological and environmental safety.

The dissertation is structured as a monograph, including typical sections such as Introduction, Aim and Scope of the Thesis, Materials and Methods, Results divided into thematic chapters, and





Bibliography. The dissertation does not contain a typical Discussion section, but it does include a chapter summarizing the findings and conclusions, and elements of a typical scientific discussion are included in each of the thematic chapters presenting the results. Additionally, supplementary elements such as the Table of Contents, Abstract in Polish and English, List of Abbreviations, List of Publications, and Funding Sources have been provided. The structure of the dissertation is therefore mostly typical, correct, and sufficient for understanding the content and efficiently analyzing the presented topics.

Upon starting the analysis of the content of the dissertation presented for evaluation, I would like to begin with the clear and well-written introduction. The introduction provides a solid theoretical foundation for understanding the rest of the dissertation. The doctoral candidate made sure that all the issues addressed in the results section were properly introduced and discussed in the introduction. It covers both physicochemical issues, practical aspects concerning the biotechnology and pharmaceutical industries, and biological aspects, particularly the biology of bacteriophages.

In terms of Introduction, I have the following comments on this section of the dissertation:

1. The estimate of the number of still undiscovered bacteriophages is based on an estimate from 2003. However, over the last 20 years, the scientific world has made significant advances in phage knowledge (as seen, for example, in the GenBank database), making this estimate outdated (p. 16).
2. Similarly, the morphological classification of phages mentioned in the introduction is from 2009 and has already been replaced by genetic classification, which has been developed by a team of phage experts over the past 10 years (p. 16).
3. Developmental cycles of phages beyond the lytic and lysogenic cycles also include chronic infection or pseudolysogeny (p. 17).
4. The scientists recognized as discoverers of phages, Twort and d'Herelle, discovered phages at the beginning of the 20th century, not the 19th century (p. 18).

The Aim and Scope of the thesis are presented appropriately and clearly.

The Materials and Methods section is mostly complete and sufficiently detailed. However, what could be presented in more detail are the main subjects of this dissertation, i.e., the



bacteriophages. Typically, their unambiguous definition requires not only the name (which can be misleading) but also a reference to the GenBank entry. For practical reasons, information about the specificity range, morphology, and nucleic acid type of each phage would also be helpful for a reader (p. 37).

The results presented in the dissertation are extensive, coherent, and well-presented. The scope of the work and the analyses is truly impressive. The work is very well planned, as the described steps form a logical and interesting story. The description is quite detailed and accompanied by a large number of figures and tables that are essential for understanding this part of the dissertation. I believe the scope of the work is broad, ambitious, and certainly allowed the doctoral candidate to acquire a wide range of skills and in-depth knowledge. However, I have a few remarks regarding this section:

1. In some figures, it is difficult to understand the results of statistical analysis, and in some cases, I cannot find the "stars" even though they are indicated in the figure legend (e.g., Fig. 6).
2. In some parts of the text and corresponding figures, I found it lacking clear information on how long the phages were exposed to nanoparticles under specific conditions. This is a very important perspective for assessing biological effects and their potential practical applications. This is evident in figures and descriptions such as Fig. 19, 25, 28, 31, 33.
3. I also have a question about the resistance/sensitivity of phage M13 to Tween20, as phages are sometimes sensitive to detergents.
4. Unfortunately, I cannot agree with the interpretation of the results on pages 71/72, where it is stated that the phage's sensitivity to iron nanoparticles differed depending on the phage's morphology. Since only one phage from each morphological type was tested, we cannot conclude that morphology, rather than individual protein composition and its characteristics, determined the sensitivity.
5. I also have a comment regarding the toxicity assessment of the developed nanoparticles in relation to eukaryotic cells. Unfortunately, a cell survival rate of 90% indicates toxic or anti-proliferative effects. I acknowledge they are not dramatic, but one could ask provocatively whether we would want a substance tested to kill 10% of cells in our body.



This is of course just an illustrative comparison, but it highlights the fact that even minimal toxicity cannot be ignored. Moreover, we do not know if it is truly 10% since the percentage assessment was made based on fluorescence readings, which require a standard curve relative to the number of cells in the sample in order to make such direct conversions. Detailed data on the safety of the developed nanoparticles will likely be gathered in the future.

6. I also have a question driven by scientific curiosity: how do the conditions applied in this study translate to the realities of biotechnology and pharmaceutical production? How high are the concentrations of phages that need to be removed? Here, relatively low concentrations were often used (e.g., 10^3 – 10^4 pfu/ml). How does this look in real-world applications? (p. 79).
7. Given the very interesting results obtained using indigo carmine, I would like to know how the regulations on this product look in the EU, apart from the FDA-approved product status mentioned?
- 8.

Finally, I would like to highlight several positive aspects:

1. I find the idea of combining phages and nanoparticles very interesting and worth appreciating. These nanoparticles exhibited bactericidal activity but, contrary to expectations, did not show activity against the phages. This is a wonderful example of creative and open scientific thinking, and the practical application of this idea could yield excellent results in the future.
2. I would like to appreciate the attempts made in the dissertation to propose and evaluate the mechanisms behind the observed phenomena, which greatly enriches the thesis and proves the scientific approach to this practical issue (e.g., p. 98, 111).
3. Finally, I would like to congratulate the success of developing nanoparticles that showed the intended and sought-after activity in this dissertation. I believe they will find important applications in both the industry and healthcare, and possibly in other fields.

The summary and discussion elements presented in the dissertation are concise but sufficient, and they are appropriate for the results presented. The new observations made in the dissertation are well-placed against the existing state of knowledge.



INSTYTUT IMMUNOLOGII I TERAPII DOŚWIADCZALNEJ
IM. LUDWIKA HIRSZFELDA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
Centrum Doskonałości : IMMUNE
Rudolfa Weigla 12, 53-114 Wrocław, POLSKA
Telefon: (+48-71) 337 11 72, (+48-71) 370 99 30 Fax: (+48-71) 337 21 71
www.iitd.pan.wroc.pl

Finally, I would like to emphasize that the comments in this review do not affect the overall high value of the dissertation. I also want to emphasize that this is one of the most carefully prepared, edited, and organized doctoral theses I have evaluated. There are virtually no typographical or linguistic errors, mistakes in figure or table references, or cross-references, and reading such a carefully prepared dissertation was a great pleasure.

Summary

After thoroughly reviewing the presented dissertation, I conclude that the scope of the research conducted and the results obtained more than meet the requirements for doctoral theses, including meeting the conditions specified in Article 187 of the Act of 20 July 2018 – Law on Higher Education and Science (Journal of Laws of 2024, item 1571, as amended). The studies demonstrate high proficiency in microbiology, physics, and chemistry. I affirm that the doctoral candidate has conducted an interesting and innovative research project, contributing original findings to the field. The dissertation is written in an engaging, understandable, and careful manner. The dissertation presented for evaluation meets the statutory and customary requirements for doctoral theses, and I therefore submit a request to the High Council of the Scientific Discipline at the Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences, to admit Sada Raza to the next stages of the doctoral process.

Due to the very broad scope of the research conducted, demonstrating a high scientific level, its significant impact and originality in the field, as well as the impressive publication record associated with the evaluated dissertation, I respectfully request the High Council to award distinction to the dissertation.

Prof. Dr hab. Krystyna Dąbrowska

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska
kierownik
LABORATORIUM BIOLOGII
MOLEKULARNEJ BAKTERIOFAGÓW
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN
Wrocław

