



# UNIwersytet Warszawski WYDZIAŁ BIOLOGII

ul. ILJI MIECZNIKOWA 1, 02-096 WARSZAWA

TEL: (+22) 55-41-304, FAX: (+22) 55-41-304

e-mail: jbielecki@biol.uw.edu.pl



## OCENA PRACY DOKTORSKIEJ MGR GRACJI TOPKI-BIELECKIEJ –

### **„Charakterystyka wybranych bakteriofagów wyizolowanych ze ścieków komunalnych – badania na poziomie molekularnym i potencjalne znaczenie biotechnologiczne”**

Rozprawa doktorska Pani Gracji Topki-Bieleckiej została w całości zrealizowana w laboratoriach Katedry Biologii Molekularnej Uniwersytetu Gdańskiego pod bezpośrednim kierunkiem prof. dr hab. Grzegorza Węgrzyna jako promotora i Pani dr hab. Bożeny Nejman-Faleńczyk pełniącej w tym przewodzie doktorskim funkcję promotora pomocniczego. Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma postać zbioru trzech zespołowych, monotematycznych prac doświadczalnych, opublikowanych w latach 2019-2021 w bardzo dobrych czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej, odpowiednio we *Front. Microbiol.* (2019), *Int. J. Mol. Sci.* (2020) and *Viruses* (2021) i pracy przeglądowej w *Antibiotics* (2021). Należy mocno podkreślić to, iż we wszystkich tych publikacjach Pani mgr Topka-Bielecka jest pierwszym autorem. Wnioskując z oświadczeń doktorantki i współautorów prac oryginalnych, a także promotora i promotora pomocniczego udział Doktorantki w tych publikacjach był wiodący. Pracę doktorską wzbogacają zwarte streszczenia, bardzo dobrze opracowane zarówno w języku polskim jak i angielskim, w których Doktorantka jednoznacznie sformułowała kierunkowy cel podjętych badań oraz cele etapowe. Podstawowym celem pracy doktorskiej było, cyt.: „wyizolowanie i scharakteryzowanie nieznanymi wcześniej fagów litycznych, wykazujących potencjalne zastosowanie w walce z biofilmem bakteryjnym”. Dlatego też Doktorantka zdecydowała się na poszukiwania fagów w próbkach ścieków komunalnych, pochodzących z Gdańskiej Oczyszczalni Ścieków. Izolacja fagów została przeprowadzona zgodnie z klasyczną procedurą, w której surową próbkę ścieków miejskich zmieszano z hodowlą wybranego gatunku/szczepu bakteryjnego w celu pozyskania cząstek fagowych zdolnych do rozwoju w komórkach gospodarza. Do izolacji bakteriofagów wykorzystano dwa gatunki bakterii powszechnie występujących w biofilmach wielogatunkowych, t.j. *Escherichia coli* i *Enterococcus faecalis*. Należy zaznaczyć, że *E. coli*

i *E. faecalis* należą do grupy drobnoustrojów biofilmujących, które wykazują negatywny wpływ na światową gospodarkę i medycynę. Powstawanie struktur biofilmów wielogatunkowych, opornych na działanie antybiotyków oraz badania związane ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania bakteriofagów i kodowanych przez nie enzymów zarówno w terapiach indywidualnych, jak i skojarzonych (z innymi środkami przeciwbakteryjnymi) było tematem przewodnim pracy przeglądowej z czasopisma *Antibiotics* oznaczonej przez doktorantkę jako praca nr 1 w rozprawie doktorskiej. Opisanie stanu wiedzy na temat osiągnięć mikrobiologii w walce z biofilmami bakteryjnymi to istotny element pracy doktorskiej, który można traktować jako wstęp do pracy doktorskiej. Jest on zarazem w pewnym sensie podsumowaniem kolejnych prac Doktorantki, tym razem eksperymentalnych, prowadzących do odkrycia nowych bakteriofagów skutecznych w walce z biofilmami. Dlatego wyizolowanie bardzo aktywnego i wysoce skutecznego względem biofilmu bakteriofaga stało się istotnym wyzwaniem dla prowadzonych przez Doktorantkę badań. Nowo wyizolowany bakteriofag vB\_EcoS-95 stał się głównym obiektem badawczym kolejnej pracy w rozprawie, tym razem oryginalnej. Jak się okazało bakteriofag vB\_EcoS-95 przy wysokim mianie niezwykle szybko i skutecznie likwidował odpowiedni biofilm bakteryjny *E. coli*. Wyniki badań nad tym nowo poznanym bakteriofagiem pozwoliły na kolejne wnioski o jego potencjalnym wykorzystaniu w dalszych badaniach nad rozwojem nowatorskich narzędzi biotechnologicznych, mających zastosowanie m.in. w inżynierii genetycznej. W następnej pracy oryginalnej doktorantka scharakteryzowała kolejnego nowopoznanego bakteriofaga, tym razem wirulentnego faga vB\_EfaS-271, który wydajnie infekuje kliniczny szczep *Enterococcus faecalis* 271 i wykazuje wysoką efektywność w niszczeniu biofilmu utworzonego przez tę bakterię. W późniejszych badaniach doktorantka wykazała przydatność badanego bakteriofaga w walce z bakteriami infekującymi tkanki zwierzęce w ramach szeroko pojętej terapii fagowej. Należy podkreślić, że tematyka podjęta w rozprawie doktorskiej jest ważna i aktualna. Wyniki uzyskane w ramach ocenianej pracy wskazują na duży potencjał nowo odkrytych fagów w niszczeniu i zapobieganiu tworzenia się biofilmów przez bakterie *E. coli* i *E. faecalis*. Co istotne, w obydwu przypadkach obserwuje się znaczne zmniejszenie liczby komórek bakteryjnych w strukturze biofilmu. Nowo odkryte bakteriofagi vB\_EcoS-95 i vB\_EfaS-271 mogą być potencjalnie wykorzystywane do opracowania metod zwalczania biofilmów wielogatunkowych. Nie zamierzam w niniejszej recenzji bardzo szczegółowo oceniać ani znaczenia przeprowadzonych przez Doktorantkę i współpracowników badań poznawczych, ani wartości poznawczej uzyskanych wyników. Zarówno wprzęgnięty w te badania znany mi, nowoczesny warsztat badawczy, jak i uzyskane

wyniki oraz sformułowane wnioski - podlegały bowiem wcześniej surowej ocenie dokonanej przez specjalistów - recenzentów i edytorów „rankingowych” czasopism naukowych, w których zostały opublikowane. Stąd, chciałbym w tym miejscu jedynie skomentować niektóre rezultaty, które moim zdaniem są oryginalne i mocno aplikacyjne, szczególnie z podkreśleniem tych wyników i sformułowanych wniosków, które zostały przedstawione w pracy doświadczalnej opublikowanej w czasopiśmie *Viruses*. W pracy tej wykazano, że bakteriofag vB\_EfaS-271 jest bezpieczny dla komórek ssaków, nie wpływa na ich żywotność i morfologię. Skutecznie zmniejsza liczbę żywych komórek *E. faecalis* w biofilmach utworzonych na cewnikach oraz we współkulturach z mysimi fibroblastami. Z drugiej strony można wyselekcjonować mutanty odporne na vB\_EfaS-271, zwłaszcza w warunkach wysokiej wartości m.o.i. Niemniej jednak takie mutanty wydają się być mniej konkurencyjne w stosunku do komórek typu dzikiego, co sugeruje, że mogą zostać wyeliminowane w warunkach naturalnych. Dlatego vB\_EfaS-271 można uznać za obiecującego wirusa ze względu na jego potencjalne zastosowanie w terapii fagowej. Opisane powyżej wyniki uzyskane przez Doktorantkę stanowią o wielkich możliwościach tego bakteriofaga pod względem wykorzystania jako czynnika przeciwbakteryjnego podczas eradykacji bakterii w przypadku zakażeń tkanek ludzkich. Praca ta otwiera perspektywy użycia tego bakteriofaga w medycynie. Z pewnością dyskusyjne może być włączenie do dysertacji wieloautorskiej pracy przeglądowej, ponieważ zgodnie z oświadczeniami autorskimi Doktorantka jest autorem 2 rozdziałów opisujących działanie depolimeraz na biofilmy bakteryjne jako alternatywy dla antybiotyków oraz terapii skojarzonych, wykorzystujących depolimerazy fagowe oraz inne czynniki przeciwbakteryjne. Tematyka tych rozdziałów odbiega nieco od głównego nurtu dysertacji prowadzącego do wykrycia i izolacji nowych aktywnych bakteriofagów skierowanych przeciwko biofilmom bakteryjnym. Zgadzam się, iż cała publikacja w sensie bardzo ogólnym tematycznie nawiązuje do badań doktorantki, jednak jej włączenie w dysertację ma raczej znaczenie uzupełniające. Izolacja nowych, nieznanych dotychczas bakteriofagów i ich pełna charakterystyka molekularna, a także pełna ocena pod względem aplikacji to największe atuty przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej. W każdej z prac oryginalnych Pani mgr Gracja Topka-Bielecka była wykonawcą eksperymentów, w zakresie badań związanych z tytułem rozprawy, tj. oceną skuteczności działania preparatu fagowego na odpowiednie biofilmy, ocenę stabilności preparatu oraz oceną toksyczności preparatów fagowych wobec komórek ssaczy.

Zgodnie z oświadczeniami współautorów pracy ich udział w większości polegał na zaprojektowaniu prac badawczych, analizie uzyskanych danych eksperymentalnych oraz

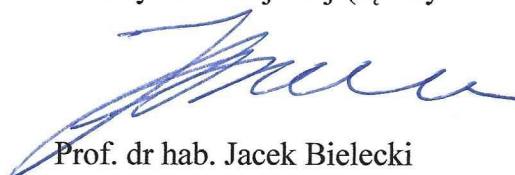
przygotowanie manuskryptu. Doświadczalny pierwszoplanowy udział w tej pracy Doktorantki nie pozostawia więc żadnych wątpliwości, aczkolwiek w kilku oświadczeniach współautorów dotyczącym udziału w publikacji istnieje zapis o przeprowadzeniu części doświadczeń jako wykonanych i opisanych w rozprawie przez Doktorantkę. Trudno w takim przypadku o ocenę samodzielności doktorantki. Należy z całą pewnością uznać, że badania prowadzone przez Doktorantkę miały kluczowe znaczenie dla wszystkich prac oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej i można ocenić je wysoce pozytywnie. Cel pracy doktorskiej, tj. ocena udziału bakteriofagów w zwalczaniu biofilmów bakteryjnych został w pełni osiągnięty. Dysertacja ma charakter zarówno badań podstawowych jak i aplikacyjny. Oceniana praca doktorska, której podstawą są trzy wspomniane publikacje oryginalne i jedna przeglądowa jest poprzedzona wstępem, będącym przeglądem informacji na temat zwalczania biofilmów przy udziale bakteriofagów lub ich produktów, a przede wszystkim charakterystyką właściwości biologicznych nowo odkrytych bakteriofagów. Eksperymenty realizowane przez Doktorantkę w ramach Zespołu autoryzującego publikacje tworzą całość i prowadzą do ostatecznej oceny roli bakteriofagów w likwidowaniu biofilmów. Dla przedstawienia pełnego obrazu mechanizmów działania bakteriofagów na określone biofilmy dobrze byłoby przeprowadzić kolejne eksperymenty oceniające znaczenie powstających mutacji oporności na cały proces usuwania biofilmów. Ten problem doktorantka ocenia krótko tak, że pojawianie się niewrażliwych na faga vB\_EfaS-271 mutantów może sugerować ograniczenie stosowania tego wirusa w terapii fagowej, to jednak upośledzony wzrost i niższa konkurencyjność takich mutantów sugeruje, że połączenie terapii fagowej z innym leczeniem przeciwbakteryjnym może nadal przynosić skuteczne efekty. To stwierdzenie wymaga jednak pełniejszej analizy i zdecydowanej, jednoznacznej oceny. Do kolejnych osiągnięć rozprawy wśród licznie przedstawionych wyników w publikacjach oryginalnych należy zaliczyć udane przygotowanie warsztatu badawczego w postaci realizowanych zadań badawczych oraz ocena i wyjaśnienie mechanizmów usuwania biofilmów. Zaprojektowanie eksperymentów oraz pełna charakterystyka biologiczna badanych procesów wymagała dobrej organizacji pracy oraz dużej pracowitości, albowiem liczba eksperymentów i liczba wyników uzyskanych w rozprawie doktorskiej jest duża. Szczegółowa analiza eksperymentów realizowanych przez Doktorantkę w ramach rozprawy doktorskiej widzianych w perspektywie przedstawionych prac oryginalnych pozwala z całą pewnością na ostateczne stwierdzenie, iż jest ona głównym wykonawcą większości eksperymentów prowadzących do powstania tych publikacji, co w mojej ocenie przekłada się na tezę rozprawy doktorskiej Pani mgr G. Topki-Bieleckiej.

Z całą pewnością rozprawa doktorska Pani mgr Topki – Bieleckiej daje podstawę do dalszej pracy nad walką z biofilmami. Doktorantka nie rozważa jednak konkretnie o perspektywach dalszych badań będących kontynuacją wyników osiągniętych w ramach rozprawy, nie dyskutuje także o ewentualnych kolejnych eksperymentach prowadzących do możliwości poznania innych bakteriofagów czy też metod mieszanych. Chciałbym jednak poznać jej plany i opinię na ten temat podczas obrony pracy.

W świetle wyżej przedstawionej, bardzo pozytywnej oceny całej pracy doktorskiej mgr Gracji Topki-Bieleckiej, w tym szczególnie wartości wyników, w tym wyników oryginalnych oraz ważnych wniosków o charakterze poznawczym - stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wszystkie wymagania Ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych, które są stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora. Stąd, z pełnym, naukowym przekonaniem wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologii, Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Gracji Topki-Bieleckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnoszę także o rozważenie możliwości stosownego wyróżnienia zarówno tej bardzo ambitnej pracy doktorskiej, jak i utalentowanej Doktorantki, mgr Gracji Topki-Bieleckiej, stosowną nagrodą lub wyróżnieniem JM Rektora Uniwersytetu Gdańskiego. Mocnym uzasadnieniem sformułowanego wniosku, w moim przekonaniu, są cztery publikacje, opublikowane w wysoko notowanych czasopismach z listy filadelfijskiej (łącznie IF= 16,50), stanowiące Jej pracę doktorską.

Warszawa, 15.05.2021.



Prof. dr hab. Jacek Bielecki