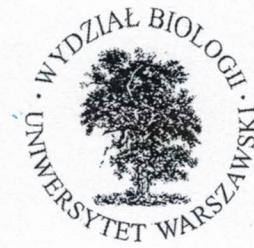




UNIwersytet
Warszawski



Wydział Biologii
Instytut Mikrobiologii
Zakład Mikrobiologii i Biotechnologii Środowiskowej
Dr hab. Monika Radlińska
m.radlinska@uw.edu.pl

Warszawa, 07 grudnia 2022

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Kosznik-Kwaśnickiej pt. „Porównanie efektywności antybiotykoterapii i fagoterapii w zwalczaniu bakterii *Salmonella enterica* powodujących zakażenia drobiu”, (ang. *Comparison of the effectiveness of antibiotic treatment and phage therapy in eradication of Salmonella enterica responsible for infections of poultry*).

Rozprawa doktorska została wykonana w Pracowni Biologii Molekularnej Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Gdańsku pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Alicji Węgrzyn.

Przedłożona mi do recenzji dysertacja dotyczy możliwości wykorzystania bakteriofagów jako terapeutyków do zwalczania infekcji *Salmonella enterica* drobiu. W ramach prac doświadczalnych wyizolowano i scharakteryzowano kilka wirusów infekujących *Salmonella enterica* celem wyboru takich, które miały wejść w skład przyszłego leczniczego koktajlu fagowego skierowanego przeciwko serotypom Typhimurium i Enteritidis. Skuteczność terapeutyczna tego koktajlu była następnie testowana w szeregu doświadczeń przeprowadzonych w warunkach *in vitro* i *in vivo* z wykorzystaniem modeli zwierzęcych, i porównywana z efektywnością antybiotykoterapii.

OCENA PRACY

Pracę doktorską Pani mgr Katarzyny Kosznik-Kwaśnickiej stanowi zbiór spójnych tematycznie czterech prac prezentujących oryginalne wyniki badań, opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym o ustalonym współczynniku wpływu tj. *Impact Factor* (IF) oraz jednej pracy przeglądowej. Artykuły te zostały wydane w latach 2019-2022. We wszystkich pięciu publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. W rozprawie doktorskiej, oprócz tych prac, zamieszczono spis Dorobku naukowego Doktorantki, niezwykle obszerne Streszczenia w języku polskim i angielskim oraz Oświadczenia współautorów o wkładzie w ich powstanie i opublikowanie, co było konieczne gdyż wszystkie prace stanowiące rozprawę doktorską są wieloautorskie (artykuły 1-3 mają ośmiu, artykuł 4 - sześciu, a artykuł 5 dwudziestu współautorów). Cel główny pracy doktorskiej, a także zadania dodatkowe, został przez mgr Kosznik-Kwaśnicką podane w Streszczeniu (s. 8-9 dysertacji), cytując: „stworzenie eksperymentalnego koktajlu fagowego przeciwko najpopularniejszym serotypom *S. enterica*: Typhimurium i Enteritidis oraz porównanie jego skuteczności z dotychczas stosowanymi w weterynarii antybiotykami z wykorzystaniem różnych modeli badawczych”. Ten jasno sformułowany cel został osiągnięty.

Narastająca antybiotykooporność patogennych bakterii to problem dotyczący nie tylko leczenia zakażonych ludzi, ale także w weterynarii, a tu wyzwaniem jest nie tylko zwalczanie infekcji zwierząt

gospodarczych, ale przede wszystkim ich zapobieganie. W przypadku salmonellozy drobiu nie podejmuje się w ogóle leczenia zwierząt gdyż w Unii Europejskiej jest ono prawnie zabronione, podobnie jak profilaktyczne podawanie antybiotyków ptactwu hodowlanemu. W konsekwencji konieczne jest poszukiwanie nowych rozwiązań, stanowiących alternatywę dla antybiotyków. Jednym z takich rozwiązań jest wykorzystanie bakteriofagów, które z sukcesem jest już stosowane w przemyśle spożywczym w krajach poza UE. W literaturze naukowej można znaleźć artykuły opisujące izolację fagów infekujących *S. enterica* a także testy wskazujące na ich skuteczność w zwalczaniu *S. enterica* w warunkach laboratoryjnych. Znacznie mniej jest prac wychodzących poza te ramy, w szczególności z użyciem drobiu jako modelu badawczego i w zasadzie brak jest analiz porównawczych skuteczności antybiotyków i fagoterapii. Dlatego tak ważne, z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego, są prace zespołu pod kierunkiem prof. Alicji Węgrzyn, ściśle wpisujące się w tę tematykę. Wśród nich znajdują się właśnie te zgłoszone przez mgr Katarzynę Kosznik-Kwaśnicką w ramach jej rozprawy doktorskiej.

Artykuł oznaczony przez mgr Kosznik-Kwaśnicką numerem 1 to praca przeglądowa (rozdział: *The Use of Bacteriophages in Animal Health and Food Protection* w monografii: *Phage Therapy: A Practical Approach*, 2019). Praca ta stanowi dobry wstęp dla przedstawionego do oceny cyklu artykułów eksperymentalnych, dostarczając informacje o przedmiocie badań Doktorantki. Przedstawiono między innymi główne choroby bakteryjne drobiu, a także sposoby ich zwalczania z użyciem antybiotyków i fagów, w tym podejścia eksperymentalne.

Artykuły nr 2 i 3, które ukazały się w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (IJMS) w roku 2020, zawierają opis kompleksowej charakterystyki pięciu fagów *S. enterica*, w tym także właściwości istotnych w odniesieniu do możliwości ich zastosowania w fagoterapii. Dwa wirusy - vB_Sen-TO17 i vB_SenM-2 – weszły w skład eksperymentalnego koktajlu fagowego, wykorzystanego na dalszych etapach prac badawczych Doktorantki. Drobną uwagę - współczynnik wpływu dla danej publikacji podaje się zgodnie z rokiem jej opublikowania. Dla IJMS w roku 2020 wynosił on 5,923 a nie jak podano na stronach 80 i 138 - 6,208.

Artykuły 4 i 5, które ukazały się w roku 2022 w czasopismach *Microbiological Research* oraz *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (IF odpowiednio 5,07 i 6,073) demonstrują potencjał leczniczy stworzonego koktajlu fagowego w zwalczaniu serotypów Typhimurium i Enteritidis *S. enterica* w testach *in vitro* i *in vivo* (modele zwierzęce: larwy *Galleria mellonella* i kura domowa, *Gallus gallus*). Wykazano między innymi, że aktywność antybakteryjna koktajlu jest znacznie większa niż zastosowanie pojedynczych fagów vB_Sen-TO17 i vB_SenM-2, a także, że jest on nie mniej skuteczny niż powszechnie stosowane w weterynarii antybiotyki. Jednocześnie fagi cechowała wysoka selektywność bakteriobójcza w porównaniu do antybiotyków. Zmieniony, po zastosowaniu którejkolwiek z terapii, mikrobiom kur dość szybko powracał do składu identyfikowanego w kontroli w przypadku użycia do leczenia fagów, a same fagi były usuwane z organizmów kurcząt maksymalnie po kilkunastu dniach od zakończenia terapii.

Wnioski końcowe płynące z rezultatów cyklu prac są bardzo obiecujące – zademonstrowano, że bakteriofagi mogą mieć zastosowanie w leczeniu salmonellozy kurcząt, są tak samo skuteczne jak antybiotyki a przy tym wydają się być bardziej wybiórcze, a zatem bezpieczniejsze niż antybiotykoterapia.

Trzeba podkreślić, że przedstawiony do oceny cykl prac jest nie tylko spójny tematycznie, ale co ważniejsze kolejne prace stanowią wyraźną kontynuację poprzednich. Cały cykl charakteryzuje się oryginalnością i wysokim poziomem naukowym, a podjęta tematyka, jak wspomniałam wcześniej, jest ważna z punktu widzenia poznawczego i aplikacyjnego. Nie będę w niniejszej recenzji bardzo szczegółowo oceniać ani przeprowadzonych doświadczeń ani wartości poznawczej uzyskanych wyników. Zarówno warsztat badawczy, wykorzystany do przeprowadzenia eksperymentów, jak i uzyskane wyniki oraz sformułowane wnioski podlegały bowiem bardzo wnikliwej i skrupulatnej ocenie dokonanej przez specjalistów – recenzentów i edytorów czasopism naukowych, w których zostały opublikowane. Chcę natomiast zwrócić uwagę, że eksperymenty przeprowadzono z użyciem różnorodnych metod badawczych, co dowodzi wysokich umiejętności technicznych i biegłości w pracy laboratoryjnej mgr Katarzyny Kosznik-Kwaśnickiej. Jestem też pod wrażeniem ogromu prac jaka została wykonana w każdej z publikacji.

Prace stanowiące rozprawę doktorską są wieloautorskie. Pozycja pierwszego autora we wszystkich artykułach pozwala wnioskować o wiodącej roli mgr Kosznik-Kwaśnickiej w prowadzonych pracach. Ponadto Doktorantka w swoich oświadczeniach jasno określiła swój wkład w powstanie prac, co zostało potwierdzone przez innych współautorów.

PYTANIA I ZAGADNIENIA DO DYSKUSJI

Po przeczytaniu przedstawionej mi do recenzji pracy nasunęły mi się następujące pytania, proszę więc Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich:

- 1) Co zdecydowało o wyborze fagów vB_Sen-TO17 i vB_SenM-2 do przyszłego koktajlu terapeutycznego, dlaczego pozostałe odrzucono, czy planuje się testowanie tych pozostałych w innych kombinacjach koktajlu?
- 2) Zaskoczyła mnie, w mojej opinii nie najwyższa stabilność faga vB_Sen-TO17 w temperaturze 4°C (artykuł nr 3, Tabela 4, str. 4 w IJMS, 2020, 21, 8821, str. 143 dysertacji), przeżywalność ok. 86% po 24 h. Czy ta tendencja się utrzymywała (tj. czy liczba aktywnych fagów systematycznie spadała w tej temperaturze przy dłuższej niż 24 h inkubacji)? Czy nie stanowiło to jakiegoś problemu w wykorzystaniu vB_Sen-TO17 w koktajlu, jak zatem został on rozwiązany?
- 3) Fag vB_Sen-TO17 przypuszczalnie koduje enzym degradujący polisacharydowy składnik otoczki gospodarza (tzw. depolimerazę wchodzącą w skład kapsydu), co sugeruje powstające halo wokół łąsinek. Czy podjęta została próba identyfikacji genu kodującego ten enzym oraz jego charakterystyki? Depolimerazy fagowe mają ogromny potencjał aplikacyjny jako enzybiotyki, czy mogły by więc być wykorzystane w weterynarii? Czy znane są z literatury takie przykłady?

4) Kilkakrotnie podano, że wielkości vB_Sen-TO17 i vB_SenM-2 znacząco się różnią, co może być przyczyną identyfikowanej neutralizacji tego drugiego przez kurczące osocze. Jakie faktycznie są to różnice w wielkości? Parametry rozmiaru vB_SenM-2 nie były podane w dostarczonych artykułach.

5) Na podstawie uzyskanych wyników (artykuł 5) można bez wątplenia postawić wniosek, że koktajl bakteriofagów vB_Sen-TO17 i vB_SenM-2 może mieć zastosowanie w leczeniu zakażeń u drobiu. Natomiast konkluzję Doktorantki, zawartą w Streszczeniu (s. 13), że ten fagowy „preparat może być z powodzeniem stosowany w profilaktyce zakażeń”, uważam jednak za daleko idącą i nie popartą eksperymentalnie. Ścisłej – przeprowadzone testy nie zawierały w swoim scenariuszu wariantu w którym grupie kur podano by najpierw koktajl bakteriofagowy, a dopiero później zostałyby zainfekowane patogenną *S. enterica*. Wariant, w którym koktajl jest podany 24h po infekcji kur przez *S. enterica* nie jest w mojej opinii, z nim tożsamy. Tym bardziej w świetle zmian jakie są obserwowane w kurzym mikrobiomie po podaniu samych fagów. Można się spodziewać, że patogenne *S. enterica* natrafiają na inny skład mikroorganizmów w obu przypadkach. Prosiłabym Doktorantkę o przedyskutowanie tej kwestii. Czy takie badania, w których koktajl bakteriofagowy został podany kurkom wcześniej, a dopiero później były one infekowane patogenną *S. enterica*, zostały już przeprowadzone, ale ich wyniki nie zostały opublikowane?

6) W artykule 5 uzyskano bardzo ciekawy wynik (już wyżej przywołany) wskazujący na zmianę struktury społeczności drobnoustrojów jelitowych po podaniu samego koktajlu (bez pre-infekcji *S. enterica*). Prosiłabym o rozważenie przez Doktorantkę możliwości, że przyczyną tego rezultatu była obecność w mikrobiomie kur bakterii wrażliwych na fagi z koktajlu, vB_Sen-TO17 czy vB_SenM-2. I gdyby tak było, jaki mogłoby mieć to wpływ na efektywność koktajlu, także w profilaktyce?

Chciałabym też zaznaczyć, że dorobek naukowy mgr Katarzyny Kosznik-Kwaśnickiej jest znacznie szerszy niż pięć publikacji tworzących cykl rozprawy doktorskiej, bo oprócz nich, Doktorantka był współautorem 9 publikacji, które ukazały się w uznanych czasopismach. Ponadto Doktorantka prezentowała swoje wyniki podczas wystąpień na sześciu konferencjach międzynarodowych.

WNIOSKI KOŃCOWE

Przedstawiona mi do recenzji praca spełnia wymogi określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. 2003 Nr 65 poz. 595 z późn. zm.), w zw. z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U.2018.1669) z późn. zm. i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Stanowi też dowód umiejętności samodzielnego prowadzenia przez Doktorantkę prac naukowych. W związku z powyższym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Katarzyny Kosznik-Kwaśnickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mając na uwadze wysoką wartość uzyskanych wyników oraz fakt, że zostały one opublikowane w czterech oryginalnych artykułach w renomowanych czasopismach naukowych, przy udokumentowanym bardzo dużym wkładzie mgr Kosznik-Kwaśnickiej w ich powstanie, wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy stosowną nagrodą.

Rosdwahe -