



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, 2022-11-23

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 Katarzyny Kosznik-Kwaśnickiej

pt. „Porównanie efektywności antybiotykoterapii i fagoterapii w zwalczaniu bakterii *Salmonella enterica* powodujących zakażenia drobiu”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Katarzyny Kosznik-Kwaśnickiej została wykonana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Alicji Węgrzyn, na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego i przedłożona Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne.

Projekt doktorski Pani mgr Katarzyny Kosznik-Kwaśnickiej został zrealizowany pod opieką naukowca z ogromnym doświadczeniem i dorobkiem w dziedzinie, jaką jest biologia i praktyczne wykorzystanie bakteriofagów. Badania Pani prof. dr hab. Alicji Węgrzyn są szczególnie ukierunkowane i wnoszą oryginalny wkład w zagadnienia związane z zastosowaniem fagów jako aktywnych, przeciwbakteryjnych czynników o dużym potencjale terapeutycznym. Obejmują bardzo ciekawe badania w modelach zwierzęcych i mają bardzo silnie zaznaczony aspekt aplikacyjny. Właśnie taki kierunek obrała w swoich badaniach Doktorantka, Pani mgr Katarzyna Kosznik-Kwaśnicka, która podjęła się ambitnego zadania stworzenia eksperymentalnego koktajlu fagowego przeciwko najpopularniejszym serotypom *Salmonella enterica*: Typhimurium i Enteritidis, oraz porównania jego





skuteczności ze stosowanymi dotychczas w weterynarii antybiotykami. Podjęty problem badawczy jest bardzo dobrze uzasadniony negatywną rolą, jakie szczepy *Salmonella enterica* odgrywają w medycynie i weterynarii. Są to bowiem szczepy bakteryjne powodujące ciężkie zakażenia jelitowe, mogące prowadzić nawet do takich powikłań jak sepsa czy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Częstość ich występowania na świecie jest bardzo wysoka, a jednym z głównych źródeł zakażenia są produkty pochodzenia drobiowego, w tym mięso i jaja. Salmonellozy powiązane z produkcją drobiu z jednej strony stanowią istotny problem zdrowotny, a z drugiej stanowią bardzo duży problem ekonomiczny, ponieważ prewencja zakażeń u ludzi wymaga drastycznych kroków mających na celu ograniczanie zakażeń w stadach hodowlanych, w szczególności całościowe likwidacje stad, które pociągają za sobą poważne straty finansowe hodowców i wymierne koszty na poziomie całych gałęzi gospodarki. Ze względu na to, że jednoznacznie wykazano szkodliwość stosowania antybiotyków w hodowli kurcząt, a następnie wprowadzono surowe regulacje zakazujące prewencyjnego stosowania antybiotyków u ptaków hodowlanych, problem opracowania nie-antybiotykowych, najlepiej biologicznych i naturalnych metod kontroli Salmonelli w stadach kurcząt jest palący. Właśnie w tę niszę wpisuje się projekt doktorski mgr Katarzyny Kosznik-Kwaśnickiej, która jako alternatywę dla antybiotyków wybrała bakteriofagi.

Przedstawiona do recenzji rozprawa została wykonana w formie zbioru pięciu publikacji naukowych. Pierwsza praca ma charakter teoretyczny, t.j. przeglądu tematycznego i podsumowania literatury. Pozostałe cztery pozycje mają charakter oryginalnych prac eksperymentalnych. Na pozytywne podkreślenie zasługuje fakt, że we wszystkich pięciu pozycjach Doktorantka pełni rolę pierwszego autora, zatem jej wiodąca rola we wchodzących w skład cyklu pracach wydaje się jednoznacznie udokumentowana. Taka forma doskonale spełnia nie tylko wymogi formalne, a także współczesne oczekiwania dotyczące eksperymentalnych prac doktorskich. Cykl opatrzone polskojęzycznym i angielskojęzycznym streszczeniem, w którym nie zapomniano o określeniu celu podjętej pracy doktorskiej; cel ten zdefiniowano jasno i w zgodzie z tytułem oraz treścią rozprawy. Załączono informację o dorobku naukowym Doktorantki, załączono szczegółowe



oświadczenia dotyczące wkładu autorskiego w powstanie poszczególnych publikacji stanowiących element cyklu.

Pierwsza z prac wchodzących w skład przedstawionego cyklu została opublikowana w jako rozdział w książce „Phage Therapy: A Practical Approach” wydanej nakładem wydawnictwa Springer w roku 2019. Jest to praca o charakterze przeglądowym, poświęcona ogólnemu zagadnieniu jakim jest wykorzystanie bakteriofagów do ochrony zdrowia zwierząt i w produkcji żywności. Adekwatna do tematu rozprawy oraz wskazana przez Doktorantkę jako autorska część rozdziału nie jest szczególnie obszerna, ale bardzo dobrze podsumowuje wiedzę na temat bakteriofagów w przemyśle spożywczym oraz ich przeciwbakteryjnego stosowania u ptactwa hodowlanego. Stanowi bardzo dobry wstęp dla przygotowanej rozprawy i jednocześnie dokumentuje bardzo dobrą orientację Doktorantki w podjętym problemie.

Druga z prac wchodzących w skład cyklu została opublikowana w piśmie *International Journal of Molecular Sciences* (współczynnik wpływu wynosi 6,208, punktacja MEiN 140); praca ta ma charakter eksperymentalny. Objęła charakterystykę wybranych bakteriofagów atakujących bakterie *Salmonella*, przy czym wybrane szczepy fagowe były już wcześniej obecne w kolekcji macierzystej jednostki Doktorantki. Praca jest bardzo obszerna, zawiera imponujący raport licznych i rozległych doświadczeń, zarówno w głównym tekście pracy jak i w bogatym materiale dodatkowym (*Supplementary*), które pozwoliły na drobiazgową charakterystykę mikrobiologiczną trzech wybranych fagów. Ciekawym elementem jest wykonanie w pracy testów na biofilmach bakteryjnych, jak również badania efektywności przeciwbakteryjnej fagów w warunkach temperatur, jakie występują w ciałach zwierząt, w tym u ptaków. W streszczeniu rozprawy wspomniano, że raportowana w tej publikacji analiza genetyczna fagów pozwoliła stwierdzić, że brak jest w ich genomach genów toksycznych. Chciałabym więc prosić o rozwinięcie tego problemu, ponieważ nie został on szczegółowo omówiony w samej publikacji. Jaka była metodyka oceny obecności genów toksycznych (np. baza referencyjna takich genów), a także prosiłabym o komentarz Doktorantki, jakie ograniczenia dotyczą analizy tego typu. Czy rzeczywiście jesteśmy w



stanie ostatecznie przesądzić, że dane bakteriofagi są całkowicie wolne od genów kodujących niekorzystne czynniki?

Trzecia z prac wchodzących w skład cyklu została również opublikowana w piśmie *International Journal of Molecular Sciences* i ma charakter eksperymentalny. Praca objęła szczegółową analizę bakteriofagów, w których Doktorantka dostrzegła dobry potencjał terapeutyczny. Dlatego też przeprowadzone badania ukierunkowała na warunki występujące w organizmach kurcząt (np. temperatura ciała). Chciałabym więc prosić o dodatkowy komentarz dotyczący przebadanych zakresów pH i wrażliwości na nie bakteriofagów: jakie są typowe zakresy pH charakteryzujące różne odcinki przewodu pokarmowego kurcząt i czy w kontekście tych wartości różnice we wrażliwości na odczyn kwaśny środowiska zaobserwowane pomiędzy fagiem vB_Sen-E22 a fagiem vB_Sen-TO17 (inaktywacja odpowiednio w pH 2,2 oraz 2,0 będzie miała istotne znaczenie w stosowaniu *in vivo*? Z naukowej ciekawości zapytam, ile homogenatów materiału pochodzącego od kurcząt Doktorantka musiała przebadać, aby uzyskać kolekcję 25 izolatów fagowych wspomnianych w tej publikacji oraz czym kierowała się wybierając do dalszej analizy dwa ostatecznie opisane w pracy szczepy fagowe? Ciekawym problemem w badaniach genomowych fagów jest predykcja cyklu życiowego, chciałabym prosić o rozwinięcie tego problemu, a także podanie na jakim konkretnie poziomie pewności były predykcje bioinformatyczne w wypadku tych dwóch fagów (określone w pracy jako niepewne).

Kolejny, czwarty artykuł cyklu został opublikowany w piśmie *Microbiological Research* i również ma charakter eksperymentalny. Przedstawia m.in. wyniki oceny w modelu *Galleria mellonella* przeciwbakteryjnej aktywności badanych przez Doktorantkę bakteriofagów (tych samych, których szczegółową charakterystykę poznaliśmy w poprzedniej pracy). Wyniki badania są zachęcające, ponieważ wykazują, że fagi mają działanie terapeutyczne i zwiększają przeżywalność modelowych larw, przy czym efekt ten jest szczególnie widoczny w wypadku zastosowania koktajlu fagowego. W tej pracy widzimy też porównanie przeciwbakteryjnego działania *in vitro* pomiędzy fagami a wybranymi antybiotykami. Na pozytywne podkreślenie zasługuje fakt wykonania znacznej części badań w modelu uwzględniającym tworzenie biofilmu, a także przeprowadzenie badań oceniających powstawanie bakteryjnej oporności. W odniesieniu do tej części badań chciałabym prosić,



aby Doktorantka określiła, jakimi przesłankami kierowała się wybierając takie a nie inne antybiotyki i ich stężenia zastosowane w badaniu, a także chciałabym prosić o przedyskutowanie jakie istotne podobieństwa oraz istotne różnice występują pomiędzy zastosowanym modelem: *Galleria mellonella* a prawdziwym celem tego projektu czyli organizmami ptaków hodowlanych.

Piątym i ostatnim elementem ocenianego cyklu jest publikacja w piśmie *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Praca ta ma również charakter eksperymentalny, jest spójną kontynuacją badań nad fagami vB_Sen-E22 i vB_Sen-TO17, i przedstawia wyniki imponującego swoimi rozmiarami doświadczenia badającego efektywność tych fagów w zwalczaniu zakażenia bakteriami *Salmonella* u drobiu. W doświadczeniu uwzględniono kilka różnych grup badanych, odpowiednio planując kontrole i wielokrotne pobrania różnorodnego materiału, badając zarówno obecność bakterii, jak i fagów. Również tu uwzględniono odniesienie do referencyjnych antybiotyków. Jestem pod wrażeniem ogromu pracy, jaki został wykonany, a także wysoko oceniam zakres użytecznej wiedzy, jaką dzięki tej pracy udało się jednocześnie zgromadzić. Określone zostały profile występowania badanego patogenu, ale także ogólne profile mikrobiomu bakteryjnego w poszczególnych grupach, penetrację faga do poszczególnych organów, oraz indukcję odpowiedzi na podane fagi poprzez określenie neutralizacji faga przez surowice zwierząt z poszczególnych grup. W odniesieniu do tej grupy wyników chciałabym prosić o przedyskutowanie, z czego mogą zdaniami Doktorantki wynikać różnice w penetracji tkankowej pomiędzy dwoma zbadanymi fagami, a także z czego mogą wynikać różnice w indukcji neutralizującej aktywności układu odpornościowego?

Podsumowanie

Po dokładnym zapoznaniu się z przedstawioną do oceny pracą stwierdzam, że zakres wykonanych badań i uzyskanych wyników spełnia z nawiązką wymagania stawiane pracom doktorskim. Doktorantka dowiodła, że posiada wysokie umiejętności i wiedzę w zakresie biologii bakteriofagów, a także w zakresie ich praktycznego stosowania jako przeciwbakteryjnych preparatów terapeutycznych.



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

Stwierdzam, że przedstawiony do oceny cykl prac stanowi spójną, ciekawą i nowatorską pracę badawczą, wnoszącą oryginalny wkład w dziedzinę. Rozprawa została napisana zrozumiale, starannie, kompletnie. Spełnia ona w mojej ocenie wymagania stawiane ustawowo rozprawom doktorskim (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. Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę-Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.)), dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Kosznik-Kwaśnickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy

Jednocześnie składam wniosek o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy, jako uzasadnienie wskazując szeroki zakres przeprowadzonych badań i zgromadzonego materiału, ich bardzo dobry poziom naukowy, a jednocześnie mocny aspekt praktyczny, związany z potencjalnym zastosowaniem fagów w weterynarii.

Prof. dr hab. Krystyna Dąbrowska

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

