

Autoreferat
dr Ewa Jończyk-Matysiak

Laboratorium Bakteriofagowe
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda
Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Wrocław, wrzesień 2022

1. Imię i nazwisko: **Ewa Jończyk-Matysiak**

(<https://orcid.org/0000-0001-6963-1415>)

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

czerwiec 2015: doktor nauk biologicznych (tytuł rozprawy doktorskiej: Wpływ preparatów bakteriofagowych na zdolność fagocytów do wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii), Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polska Akademia Nauk we Wrocławiu, promotor Prof. dr hab. med. Andrzej Górski;

czerwiec 2007: magister biologii (tytuł pracy magisterskiej: Transformacja drożdżowym bankiem genów mutantów *aci Saccharomyces cerevisiae* należących do VIII grupy komplementacyjnej), Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski, biologia, studia magisterskie uzupełniające promotor: dr hab. Maciej Wieczorek;

czerwiec 2005: Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski, biologia, studia licencjackie (tytuł pracy licencjackiej: Genetyka molekularna w sądownictwie);

Wykształcenie uzupełniające::

2316- 2017: studia podyplomowe: Badania kliniczne – metodologia, organizacja i zarządzanie, Medyczne Centrum Kształcenia podyplomowego Uniwersytetu Jagiellońskiego;

2006-2008: studia podyplomowe z biotechnologii (tytuł pracy dyplomowej: Metody molekularne w analizie genów) Wydział Przyrodniczo-Techniczny, Uniwersytet Opolski.

Dyplomy kursów i szkoleń:

18.03. 2021- szkolenie on-line: Korupcja w administracji publicznej;

21.03.2018: szkolenie: Efektywna komercjalizacja badań naukowych, Centrum Promocji Informatyki, Warszawa;

10-11.06. 2017: Warsztaty praktyczne z zakresu zarządzania projektem, Medyczne Centrum Kształcenia podyplomowego Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków;

27-28.05. 2017: Warsztaty praktyczne z zakresu monitorowania badań klinicznych, Medyczne Centrum Kształcenia podyplomowego Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków;

16-20.11.2015: szkolenie Polskiego Towarzystwa Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych – PolLASA, Wrocław;

26-27.03.2014: kurs: Zastosowanie statystyki w badaniach medycznych. StatSoft Polska, Wrocław;

11.12.2013: szkolenie Praktyczne aspekty wdrożenia systemu Dobrej Praktyki Laboratoryjnej (GLP). CE2 Centrum Edukacji, Wrocław.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

październik 2016- obecnie: Samodzielne Laboratorium Bakteriofagowe IITD PAN we Wrocławiu, (od czerwca 2021 Laboratorium Bakteriofagowe, Zakład Terapii Fagowej), **adiunkt.**

styczeń 2016 - wrzesień 2016: Samodzielne Laboratorium Bakteriofagowe IITD PAN we Wrocławiu, **specjalista biotechnolog.**

luty 2009 - grudzień 2015: Samodzielne Laboratorium Bakteriofagowe IITD PAN we Wrocławiu, **wykonawca** w projektach badawczych realizowanych przez Laboratorium.

4. Osiągnięciem w myśl ustawy (art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.)) jest wskazany poniżej cykl publikacji powiązanych tematycznie dołączony do dokumentacji jako załącznik 3 i zatytułowany:

Izolacja fagów do celów terapeutycznych oraz określenie wpływu czynników zewnętrznych na ich aktywność lityczną

W dobie kryzysu antybiotykoterapii spowodowanego rozprzestrzenianiem się wśród bakterii oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe oraz szerzenia się nawracających infekcji bakteryjnych (m.in. dróg moczowych) stanowiących coraz poważniejszy problem społeczny i medyczny, izolacja i kompleksowa charakterystyka fagów o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym stanowi obiecującą perspektywę, a czasem nawet jedyny dostępny sposób na zwalczanie tych zakażeń. Problem ten dotyczy głównie przewlekłe chorych, niejednokrotnie osób z niedoborami odporności, u których antybiotykoterapia okazała się nieskuteczna. Co więcej, ostatnie dane opublikowane przez amerykańskie Centrum ds. Zwalczania i Zapobiegania Chorobom (ang. Centers for Disease Control and Prevention, CDC) wskazują na wzrost liczby (między 2019 a 2020 r.) infekcji wywoływanych przez antybiotykooporne szczepy bakteryjne, w tym aż o 78% wzrost zakażeń, których przyczynę stanowią oporne na karbapenemy szczepy *Acinetobacter baumannii* (Kuehn, 2022). Powoduje to, że badania nad wirusami bakteryjnymi (bakteriofagami, fagami) i terapią fagową znalazły się w centrum zainteresowania nauki i medycyny w ciągu ostatnich lat mając wielki potencjał aplikacyjny. Wprawdzie terapia ta ma status terapii eksperymentalnej, zastosowanie fagów w leczeniu na obecnym etapie lub w perspektywie wprowadzenia preparatów fagowych do powszechnego obrotu, wiąże się nie tylko z kwestią ich skuteczności i bezpieczeństwa, ale przede wszystkim ze zdolnością fagów zawartych w preparacie do zachowania aktywności litycznej zarówno podczas jego przechowywania, jak i po podaniu (tzn. w miejscu infekcji).

Z uwagi na fakt, że fagi infekują i niszczą komórki swoistych bakterii, mogą one być wykorzystane w celowanej terapii antybakteryjnej. Postęp wiedzy na temat genomiki fagów, immunobiologii i terapii eksperymentalnej zwierząt i ludzi sugeruje, że fagi mogą znaleźć zastosowanie w terapii w najbliższym okresie czasu. Stąd wynika moje zainteresowanie pozyskiwaniem bakteriofagów do celów terapeutycznych i przeanalizowaniem możliwie jak największej liczby czynników, które mogą przyczynić się do zwiększenia skuteczności terapeutycznej fagów.

Wybrane prace stanowią powiązany tematycznie cykl publikacji poświęconych zagadnieniu pozyskiwania i charakterystyki bakteriofagów do celów terapeutycznych ze szczególnym uwzględnieniem wpływu czynników zewnętrznych (środowiskowych, fizjologicznych) na zdolność fagów do zachowania ich aktywności litycznej.

W poniższej pracy przeglądowej, stanowiącej pozycję **nr 1** cyklu, podsumowaliśmy dostępne praktyczne informacje mogące ułatwić pozyskiwanie fagów do celów terapeutycznych.

Weber-Dąbrowska B., **Jończyk-Matysiak E.**, Żaczek M., Łobocka M., Łusiak-Szelachowska M., Górski A. Bacteriophage procurement for therapeutic purposes. *Front. Microbiol.* 2016 Aug 12;7:1177; doi:10.3389/fmicb.2016.01177. **IF: 4,076 (35 pkt MNiSW)**. Łączna liczba cytowań według Web of science: 78 (28.07.2022). Łączna liczba cytowań według Scopus: 94 (29.07.2022). Merytoryczny wkład w pracę polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu i poprawek sugerowanych przez recenzentów.

W szczególności wskazano, że pomimo wszechobecności fagów w środowisku, ich izolacja może powodować trudności, a samo jej powodzenie nie oznacza jeszcze możliwości ich wykorzystania jako środka terapeutycznego. Specyfika próbki (źródło pochodzenia, stan skupienia, konieczność wstępnego przygotowania próbki), w której poszukujemy fagów oraz wymagania życiowe szczepu gospodarza (temperatura inkubacji, skład podłoża hodowlanego, dodatek jonów) mają tu kluczowe znaczenie, nie mniejsze niż dobór metody izolacji. Ten ostatni aspekt związany jest z czułością i dokładnością pozwalającą na wykrycie nawet pojedynczych cząstek fagowych w jak najmniejszej objętości badanej próbki. Dostępne dane literaturowe wskazują, że metoda izolacji powinna być dostosowana indywidualnie, co więcej, w celu zwiększenia prawdopodobieństwa wykrycia fagów w próbce wykorzystuje się kilka metod (np. metodę typowania fagowego, metodę hodowli wzbogaconej i metodę kolorymetryczną) przy jednoczesnym zastosowaniu próbek wyjściowych (nieinkubowanych), inkubowanych oraz zagęszczonych z wykorzystaniem możliwie jak największej objętości próbki. Jako rozwiązanie zwiększające prawdopodobieństwo wykrycia cząstek fagowych w jak najmniejszej objętości próbki, zapewniające jednocześnie ocenę wrażliwości jak największej liczby szczepów bakteryjnych wskazywana jest metoda kolorymetryczna (Fisher i wsp., 2013). Na podstawie zebranej literatury wskazujemy, że najlepszym źródłem fagów do izolacji są ścieki, głównie pochodzenia szpitalnego. Uważa się, że próbki w formie płynnej służące do poszukiwania w nich fagów są łatwiejsze do przebadania. W przypadku trudności z izolacją fagów lub gdy obserwowane łysinki są bardzo małe zaleca się zastosowanie subletalnych stężeń antybiotyków lub innych suplementów do podłoża hodowlanego. Sugerujemy, że w celu poszerzenia spektrum litycznego fagów (możliwe zjawisko synergizmu między fagami w

preparacie), jak i ograniczenia możliwości nabycia przez bakterie oporności na stosowany preparat fagowy, powinny być stosowane koktajle fagowe. Można też zaobserwować, że nowo izolowane szczepy bakteryjne są mniej wrażliwe na fagi wcześniej wyizolowane, co może wynikać z faktu, że szczepy bakteryjne mutują. Sposobem na zminimalizowanie tego problemu może również być zastosowanie koktajli fagowych. Celem zapewnienia bezpieczeństwa fagów przeznaczonych do terapii oraz uniknięcia możliwości inkorporacji do genomu fagowego niebezpiecznych genów pochodzenia bakteryjnego, zaleca się użycie do amplifikacji fagów niepatogennych szczepów gospodarzy pozbawionych profagów oraz innych mobilnych elementów genomu. Z uwagi na to, że fagi zawierają białka, mogą być one niestabilne w roztworach wodnych i z tego powodu konieczne jest dostosowanie metody przechowywania do ich indywidualnych właściwości. Chodziło tu o zwrócenie uwagi na konieczność dodania substancji chroniących cząstki fagowe przed inaktywacją (m.in. w procesie liofilizacji lub kapsułkowania), które poprawiają stabilność fagów. Jak sugerują dostępne dane literaturowe przechowywanie fagów w niskiej temperaturze lub liofilizacja są skutecznymi metodami, które pozwalają im na długotrwałe zachowanie ich aktywności.

Poszerzenie naszej wiedzy na temat biologii fagów, ich indywidualnych właściwości i stabilności w różnych formach dostępnych preparatów przybliża perspektywę skutecznego zastosowania fagów jako środka terapeutycznego. Preparaty fagowe przeznaczone do leczenia infekcji u ludzi powinny być bezpieczne, sterylne i pozbawione endotoksyn, a przy tym wykazywać wysokie miano, które zapewni im skuteczność. Dane literaturowe wskazują, że terapia fagowa jest wolna od poważnych skutków ubocznych także u chorych o obniżonej odporności (Międzybrodzki *i wsp.*, 2012; Borysowski i Górski 2008). Fagi przeznaczone do celów terapeutycznych powinny być także scharakteryzowane genetycznie, ponieważ tylko taka analiza potwierdza potencjalne bezpieczeństwo dając możliwość oceny, czy fag jest lityczny i czy nie posiada w genomie sekwencji kodujących niebezpieczne geny (integraz, oporności na antybiotyki, toksyn) (Suh *i wsp.*, 2021).

Liczba naturalnie występujących fagów jest praktycznie nieograniczona, bakterie ewoluują i wytwarzają coraz to nowe, bardziej skomplikowane mechanizmy oporności na antybiotyki, dlatego też istnieje ciągła potrzeba prowadzenia badań oraz pozyskiwania danych przedklinicznych na temat nowych fagów w celu oceny ich skuteczności i bezpieczeństwa, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.

W poniższej pracy przeglądowej, stanowiącej pozycję **nr 2** cyklu prac powiązanych tematycznie, zebrałam i podsumowałam praktyczne aspekty dotyczące czynników działających na fagi, tym razem zarówno na etapie przygotowania preparatów fagowych, jak i ich aplikacji

Jończyk-Matysiak E., Łodej N., Kula D., Owczarek B., Orwat F., Międzybrodzki R., Neuberg J., Bagińska N., Weber-Dąbrowska B., Górski A. Factors influencing phage stability/activity-challenges in practical phage application *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2019 Aug;17(8): 583-606; doi: 10.1080/14787210.2019.1646126. **IF: 3,767 (100 pkt MNiSW) (autor korespondencyjny)**. Łączna liczba cytowań według Web of science: 27 (28.07.2022). Łączna liczba cytowań według Scopus: 28 (29.07.2022). Merytoryczny wkład w pracę polegał na tym, że byłam pomysłodawcą koncepcji pracy, miałam wiodący udział w przygotowaniu manuskryptu oraz poprawek sugerowanych przez recenzentów.

Struktura, rozmiar i farmakokinetyka fagów różnią się od tradycyjnych leków przeciwbakteryjnych (których cząsteczki są mniejsze i farmakokinetyka dobrze opisana). Pomimo postępu w badaniach nad fagami nasza wiedza jest nadal niewystarczająca. Omówione w pracy czynniki determinujące aktywność i stabilność fagów, są istotne z punktu widzenia przygotowania i zastosowania preparatów fagowych o możliwie najwyższej skuteczności terapeutycznej.

Jak wskazuje literatura, aktywność, a tym samym skuteczność fagów mogą kształtować działające na nie czynniki fizykochemiczne, przechowywanie, indywidualne wymagania gospodarza, właściwości biologiczne (kinetyka infekcji fagiem: czas i stopień adsorpcji, okres latencji, plon faga – znajomość ich jest kluczowa z punktu widzenia efektywnej amplifikacji każdego faga, a tym samym przygotowania preparatu fagowego), a także skład samego preparatu fagowego, jego miano, droga podania faga, forma preparatu oraz zdolność faga do penetracji i osiągnięcia wysokiego miana w miejscu spodziewanego działania (miejscu infekcji).

Temperatura i zakwaszenie środowiska to najważniejsze czynniki limitujące występowanie bakterii i z tego względu czynniki te wpływają również na aktywność bakteriofagów. Proces przygotowania preparatów fagowych powinien wykluczać możliwości występowania jakichkolwiek zanieczyszczeń w składzie preparatu oraz inaktywację cząstek fagowych w nim zawartych. Powinien on być przeprowadzony w zoptymalizowanych warunkach (temperatury, pH, wytrząsania z uwzględnieniem dodatku do podłoża substancji umożliwiających osiągnięcie wysokiego miana, np. dodatku jonów). W przygotowaniu preparatów fagowych po etapie amplifikacji i osiągnięciu względnie wysokiego miana fagów, proces oczyszczania (minimalizujący prawdopodobieństwo wystąpienia reakcji anafilaktycznej), w zależności od wybranej metody (dostosowanej do danego faga) może wiązać się także z narażeniem fagów na czynniki inaktywujące. Ultrawiórowanie, zastosowanie chloroformu oraz obecność soli w trakcie ładowania próbki na kolumnę, a także adsorpcja cząstek fagowych do złoża w kolumnie chromatograficznej może przyczynić się do zmniejszenia aktywności fagów, a co za tym idzie obniżenia ich miana w otrzymanym finalnie preparacie oczyszczonym. Z tego powodu istotna jest znajomość wrażliwości fagów na czynniki towarzyszące konkretnej procedurze.

Skład i forma ostatecznego preparatu przeznaczonego do zastosowania ma również znaczenie. Dodatek fagów do komercyjnie dostępnych produktów, np. maści, powinien uwzględniać możliwe inaktywujące działanie na fagi składników tych maści (np. jonów, substancji powierzchniowo czynnych, substancji o działaniu dezynfekującym, alkoholu, konserwantów). Przykładowo, z danych literaturowych wynika, że każdy fag charakteryzuje się inną wrażliwością na rozpuszczalniki organiczne i jest ona jednocześnie uzależniona od pH środowiska. Wykorzystanie zaś zdolności fagów do odwracalnej agregacji i wrażliwości fagów na ten proces może mieć implikacje praktyczne np. w przypadku fagów stosowanych miejscowo. Według danych literaturowych odpowiednia forma emulsji zapewnia ochronę fagom przechowywanym nawet w temperaturze pokojowej.

Stabilność fagów jest pojęciem trudnym do jednoznacznego zdefiniowania dla wszystkich fagów. Jak wspomniano w poprzedniej pracy poz. nr 1 w cyklu, jest ona kwestią

indywidualną, ale należy pamiętać, że oprócz dodatku substancji stabilizujących przechowywany preparat, należy dodatkowo uwzględnić warunki, takie, jak m.in. wilgotność i dostęp do światła, które mogą wpływać na przechowywane fagi inaktywująco. W zależności od sposobu podania preparatu powinny zostać uwzględnione czynniki, które mogą działać inaktywująco na fagi zarówno jeszcze przed penetracją do miejsca zakażenia. Jedną ze skutecznych możliwości zabezpieczenia fagów przed działaniem niekorzystnych czynników (niskiego pH soku żołądkowego, soli żółciowych) po podaniu doustnym jest kapsułkowanie. Co ciekawe, kapsułkowane fagi charakteryzują się nie tylko większą odpornością na działanie niekorzystnego pH w przewodzie pokarmowym, ale także lepszą stabilnością podczas ich przechowywania w niskich temperaturach. Również podawanie środków zobojętniających pH żołądka, np. spożycie jogurtu może chronić fagi podane doustnie przed niszczeniem ich struktury w kwaśnym pH żołądka czy zasadowym soku jelitowym. Przy zastosowaniu fagów w formie aerozolu należy sprawdzić, czy przeznaczone do zastosowania fagi nie są wrażliwe na sam proces nebulizacji i czy nie powoduje on rozpadu cząstek fagowych.

Jak wspomniałam powyżej wiriony fagowe w organizmie człowieka ekspozowane są na wiele czynników jednocześnie jak: kontakt z kwaśnym pH w żołądku, sole kwasów żółciowych, elementy odporności wrodzonej, jak i nabytej m.in. fagocyty i przeciwciała, a także obecność toksycznego mocznika, które mogą powodować utratę przez nie aktywności (co jednocześnie obniża ich skuteczność terapeutyczną). Należy zatem udoskonalić metody podawania fagów oraz formę preparatów fagowych przeznaczonych do zastosowania, aby zmniejszyć narażenie fagów na działanie czynników destrukcyjnych, a jednocześnie zapewnić osiągnięcie możliwie wysokiego miana w miejscu ich działania. Nowoczesne techniki biologii molekularnej dają możliwość uzyskania fagów o zwiększonej precyzji dostarczania oraz ich aktywności przeciwbakteryjnej, możliwe jest także kształtowanie spektrum litycznego fagów w zależności od potrzeb terapeutycznych.

Na aktywność zastosowanych fagów mogą mieć również wpływ składniki spożywanego pokarmu (np. sok pomarańczowy, miód, czy zielona herbata mogą działać na fagi inaktywująco). Także przyjmowanie antybiotyków, w zależności od rodzaju i dawki może mieć różny efekt na aktywność fagów (Łusiak-Szelachowska *i wsp.*, 2022).

W pracy wskazujemy również, że w perspektywie stosowania enzymów fagowych, m.in. endolizyn (hydrolaz peptydoglikanu), wzięcie pod uwagę czynników zewnętrznych mogących spowodować ich inaktywację (temperatura pH, stężenie soli) jest również kluczowe z punktu widzenia zachowania ich aktywności przeciwbakteryjnej.

Trudno uwzględnić wszystkie możliwe czynniki, które działają na fagi zarówno w środowisku zewnętrznym, jak i w organizmie człowieka; co więcej należy pamiętać, że działa wiele czynników jednocześnie (w warunkach laboratoryjnych nie jesteśmy w stanie stworzyć symulacji działania wszystkich jednocześnie), ale znajomość możliwego wpływu każdego z nich, może choćby częściowo pomóc w uzyskaniu oczekiwanego efektu terapeutycznego fagów.

Bakteriofagi – jako potencjalna alternatywa dla antybiotyków mogą wspomagać działanie układu odpornościowego w eliminacji antybiotykoopornych patogenów, będących

często przyczyną przewlekłych, trudnych w leczeniu infekcji, toteż określenie bezpieczeństwa stosowania preparatów fagowych, ich wpływu na układ odpornościowy, jak i możliwych interakcji z jego składnikami wydaje się niezbędne do wyjaśnienia.

Interakcje między fagami a komórkami układu odpornościowego ssaków wynikają przede wszystkim z immunogennych właściwości fagów (wytwarzanie swoistych przeciwciał przez antygeny fagowe) oraz ich immunomodulującego działania na układ odpornościowy ssaków (funkcja fagocytów – np. fagocytoza, wytwarzanie reaktywnych form tlenu lub proliferacja limfocytów T). Udowodniono, że zarówno u chorych, jak i zwierząt poddanych terapii fagowej produkowane są w odpowiedzi na fagi swoiste przeciwciała (Łusiak Szelachowska *i wsp.*, 2021; Hodyra -Stefaniak *i wsp.*, 2020; Majewska *i wsp.*, 2019). Także fagocyty jako główny element odporności wrodzonej eliminują antygeny z wykorzystaniem swoich „narzędzi” w postaci zarówno reaktywnych form tlenu, jak i enzymów degradujących – zawartych w granulach. Postęp wiedzy dotyczący wpływu fagów na czynności fagocytów jest niezbędny do oceny, w jaki sposób takie interakcje mogą kształtować odpowiedź układu odpornościowego w przypadku infekcji bakteryjnej. Dane sugerujące, że fagi nie osłabiają funkcji fagocytów są szczególnie istotne dla koncepcji i dalszego rozwoju terapii fagowej, zrozumienia roli fagów w przyrodzie i racjonalnego wykorzystania fagoterapii, mogą także dostarczyć ważnych informacji dotyczących bezpieczeństwa terapii fagowej. Większość dotychczasowych badań w tym zakresie przeprowadzono *in vitro* lub na modelach zwierzęcych i potrzebne są bardziej szczegółowe dane, zwłaszcza u ludzi.

Kompleksowa charakterystyka fagów (struktury ich genomu, właściwości biologicznych oraz stabilności, potencjalnych oddziaływań z komórkami eukariotycznymi) daje możliwość oceny ich potencjału terapeutycznego.

W pracy, stanowiącej pozycję **nr 3** prezentowanego cyklu prac, przedstawiłam wyniki badania wpływu bakteriofagów na zdolność ludzkich fagocytów krwi obwodowej (neutrofili oraz monocytów) do wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii.

Jończyk-Matysiak E., Łusiak-Szelachowska M., Kłak M., Bubak B., Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Żaczek M., Fortuna W., Rogóż P., Letkiewicz S., Szufnarowski K., Górski A. (2015) The effect of bacteriophage preparations on intracellular killing of bacteria by phagocytes. *Journal of Immunology Research*. 482863, doi:10.1155/2015/482863. IF= 2,93 (**autor korespondencyjny**). Merytoryczny wkład w pracę polegał na opracowaniu koncepcji pracy, analizie i interpretacji wyników, wiodącym udziale w przygotowaniu manuskryptu oraz poprawek sugerowanych przez recenzentów. Praca prezentująca część wyników uzyskanych podczas realizacji badań w ramach mojej pracy doktorskiej.

Zaobserwowałam, że już sama przewlekła infekcja bakteryjna u chorych kwalifikowanych do eksperymentalnej terapii fagowej powoduje obniżenie zdolności bakteriobójczych fagocytów. Co istotne, stosowanie lizatów fagowych nie powoduje dalszego pogłębienia tego deficytu. Fagocyty krwi obwodowej chorych (neutrofile, monocyty we frakcji komórek jednojądrzastych) przed terapią fagową charakteryzowały się obniżonym zabijaniem wewnątrzkomórkowym szczepów patogennych (wyizolowanych od chorych): *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oraz

niepatogenicznego szczepu *E. coli* B (wykorzystanego w badaniach jako kontrola) w porównaniu do zdolności do wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii charakteryzującej fagocyty osób zdrowych. Istotny wzrost wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii przez monocyty w trakcie i po terapii zaobserwowano w przypadku szczepu *E. coli* B u chorych, u których uzyskano dobrą odpowiedź na terapię fagową (ocena skuteczności terapii: A-C według skali zaproponowanej przez Międzybrodzkiego *i wsp.*, 2012) oraz u chorych ze zdiagnozowanym zakażeniem układu moczowego (istotny wzrost aktywności bakteriobójczej fagocytów po terapii w porównaniu do wartości wyjściowej przed rozpoczęciem terapii). Potwierdziłam tym samym, że terapia fagowa nie wywiera negatywnego wpływu na właściwości bakteriobójcze fagocytów krwi obwodowej izolowanych od chorych leczonych fagami. Ponadto, stosowanie terapii fagowej nie wywoływało także wpływu na odsetek frakcji leukocytów krwi obwodowej, ocenianych w rozmazie (granulocyty o jądrze pałeczkowatym, granulocyty o jądrze segmentowanym, granulocyty kwasochłonne, granulocyty zasadochłonne, limfocyty, monocyty), więc prawdopodobnie nie wpływało na mielopoiezę. Nie stwierdzono także istotnego wpływu tej terapii na poziom markerów zapalnych u pacjentów (OB, CRP), którzy stosowali terapię fagową, co może sugerować, że eksperymentalna terapia fagowa nie aktywuje procesu zapalnego, a nawet może powodować jego złagodzenie. Uzyskane wyniki mają znaczące implikacje praktyczne, potwierdzając bezpieczne stosowanie preparatów fagowych, zwłaszcza u chorych z pierwotnymi i wtórnymi niedoborami odporności. Wykazałam także w warunkach *in vivo* w mysim modelu zakażenia układu moczowego, że zastosowaniu trzech dawek lizatu fagowego aktywnego wobec *E. faecalis* może podwyższać aktywność bakteriobójczą mysich fagocytów śledziony (Górski *i wsp.*, 2018).

Dostępne dane literaturowe wskazują, że fag gronkowcowy A3/R nie stymulował produkcji cytokin i reaktywnych form tlenu *in vitro* oraz nie wywoływał degranulacji neutrofilii (Borysowski *i wsp.*, 2017), a co za tym idzie, badany fag nie wywoływał szkodliwej dla tkanek nadmiernej reakcji zapalnej. Co więcej, istnieje możliwość stymulacji pochłaniania bakterii chorobotwórczych, co może pomóc w opanowaniu infekcji nie tylko poprzez działanie przeciwbakteryjne, ale także w wyniku oddziaływania fagocytów. Z uwagi na fakt różnorodności fagów (m.in. struktura genomu, morfologia, właściwości) potrzebne są dalsze badania w tym zakresie, w szczególności uwzględniające fagi przeznaczone do terapii, co pozwoli na ocenę ich wpływ na przebieg odpowiedzi zapalnej.

Istotnych informacji dotyczących wpływu czynników fizjologicznych, jak i czynników działających na fagi w warunkach przechowywania, zastosowanym preparacie, oraz w miejscu ich oddziaływania dostarczyły badania opublikowane w ramach kolejnej pracy włączonej do cyklu:

Jończyk-Matysiak E., Owczarek B., Popiela E., Światała-Jeleń K., Migdał P., Cieślik M., Łodej N., Kula D., Neuberg J., Hodyra-Stefaniak K., Kaszowska M., Orwat F., Bagińska N., Mucha A., Belter A., Skupińska M., Bubak B., Fortuna W., Letkiewicz S., Chorbiński P., Weber-Dąbrowska B., Roman A., Górski A. Isolation and characterization of phages active against *Paenibacillus larvae* causing American Foulbrood in honey bees in Poland. *Viruses*. 2021 Jun 23;13(7):1217; doi: 10.3390/v13071217. **IF: 5,818 (100 pkt MEiN) (autor korespondencyjny)**. Merytoryczny wkład w pracę polegał na tym, że byłam pomysłodawcą

koncepcji projektu oraz koncepcji pracy (prezentującej wyniki projektu) planowaniu eksperymentów i analizie wyników, miałam wiodący udział w przygotowaniu manuskryptu i poprawek sugerowanych przez recenzentów.

Celem powyższej pracy była charakterystyka wyizolowanych fagów swoistych wobec szczepów *Paenibacillus larvae* stanowiących czynnik etiologiczny zgnilca amerykańskiego, zakaźnej i łatwo rozprzestrzeniającej się choroby występującej u larw pszczoł miodnych (bakterie wywołujące zgnilca amerykańskiego produkują formy przetrwalnikowe, które są odporne na niekorzystne warunki środowiska oraz środki dezynfekcyjne), a następnie opracowanie preparatu do zapobiegania i leczenia tej groźnej choroby.

Z przebadanego materiału wyizolowano i scharakteryzowano pięć fagów specyficznych dla *Paenibacillus* spp: *Paenibacillus phage* vB_PlaS-1/A, *Paenibacillus phage* vB_PlaS-1A, *Paenibacillus phage* vB_PlaS-3/A, *Paenibacillus phage* vB_PlaS-4/A, *Paenibacillus phage* vB_PlaS-5/A, oznaczonych symbolem 1-5/A. Charakterystyka ta została przeprowadzona w celu określenia potencjału litycznego tych fagów, jak i skomponowania swoistego koktajlu fagowego przeznaczonego do zastosowania u pszczoł zainfekowanych zgnilcem amerykańskim. Do izolacji uzyskanych 5 fagów (spektrum lityczne 31–46%) posłużyły próbki biologiczne i środowiskowe (gleba, woda, wosk, pszczoły, miód) pozyskiwane z pasiek i ich otoczenia, które były następnie zawieszane w płynnym podłożu hodowlanym i filtrowane z wykorzystaniem filtrów bakteriologicznych. Otrzymane fagi wyizolowano od pszczoł oraz z wosku z wykorzystaniem metody płytkowej (Ślopek, 1983). Podczas etapu poszukiwania fagów zauważyliśmy, że szczepy *Paenibacillus larvae* charakteryzują się powolnym wzrostem na podłożu MYPGP (OIE, 2018) to stwarzało możliwość wzrostu innych, konkurujących i bardziej ekspansywnych szczepów bakteryjnych, np. *Escherichia coli* w otrzymanym materiale, przy braku wzrostu szczepów *P. larvae*, a tym samym ograniczało szanse izolacji swoistych fagów. Ponadto, szczepy gospodarzy dla fagów zgnilcowych to szczepy środowiskowe o niestandardowych wymaganiach hodowlanych, konieczna była więc optymalizacja procesu amplifikacji dla każdego faga indywidualnie. W tym celu podjęto próbę amplifikacji fagów w hodowli płynnej z wykorzystaniem dwóch szczepów. Szczepy gospodarzy dla fagów do hodowli mieszanych zostały wybrane na podstawie dynamiki ich wzrostu i wrażliwości na wyizolowane fagi. Krzywe wzrostu wykreślono mierząc gęstość optyczną (OD) przy długości fali $\lambda = 600$ nm podczas hodowli szczepu bakteryjnego w pożywce płynnej MYPGP (34°C i 0 RPM./min). Wyniki pomiarów pozwoliły wyróżnić dwie grupy szczepów, dla których faza logarytmicznego wzrostu przypadała na 10–18 h i 22–35 h hodowli. Pięć izolowanych bakteriofagów zostało poddanych amplifikacji tylko w hodowli wzbogaconej. Przeprowadzenie optymalizacji amplifikacji badanych bakteriofagów swoistych do *Paenibacillus* pozwoliło nam wykazać, że w większości przypadków optymalny stosunek faga do bakterii wynosił 1:100 lub 1:1000. Dla badanych fagów najlepsze wyniki uzyskano w warunkach: 34°C/0 RPM/18 godz.

Stabilność lizatów fagowych, jak i oczyszczonych preparatów (fagi zawieszone w buforze PBS i oczyszczone z wykorzystaniem chromatografii wykluczania przy użyciu kolumny Sepharose CL-4B, zawartość endotoksyn: 0,24–2,5 EU/mL) badano w trzech temperaturach: 4 °C, temperaturze pokojowej (ok. 22 °C) i 35 °C (podobne do warunków

panujących w ulu) przez 147 dni. Stabilność koktajlu (1/A + 3/A) badano dalej w 22 °C i 4 °C przez 254 dni.

Wyniki przeprowadzonych eksperymentów wskazują, że różnice w średniej stabilności fagów podczas przechowywania zależą zarówno od temperatury, jak i formy preparatu fagowego. Fagi w postaci lizatu i w preparatach oczyszczonych (z wyjątkiem faga 4/A) przechowywane w 4 °C utrzymywały swoją aktywność lityczną do 147 dnia eksperymentu. Koktajl fagowy w temperaturze pokojowej charakteryzował się szybkim spadkiem miana. W temperaturze pokojowej lizaty fagowe były stabilne do dnia 68, z nieznacznym spadkiem miana zaobserwowanym w 27. dniu, natomiast w 147. dniu w lizacie nie wykrywano już aktywnych cząstek fagowych. Z kolei w oczyszczonych preparatach zaobserwowano spadek miana aktywnych cząstek fagowych we wszystkich badanych temperaturach. W 27. i 68. dniu eksperymentu nastąpił spadek miana, zarówno dla temperatury pokojowej, jak i 4°C i był on na tym samym poziomie (~ spadek o dwa rzędy wielkości). W dniu 147 preparat przechowywany w temperaturze pokojowej całkowicie stracił swoją aktywność, natomiast mieszanina oczyszczonych fagów przechowywana w 4 °C nie zmieniała swojej aktywności. Preparat w temperaturze 35 °C nie wykazywał już aktywnych cząstek fagowych do 27 dnia eksperymentu. Uzyskane w publikacji wyniki wskazują, że dla badanych fagów swoistych wobec *P. larvae* najkorzystniejsza temperatura przechowywania to 4 °C; ponadto preparaty w postaci lizatów dłużej zachowały swoją aktywność, co jest związane ze sprzyjającym „środowiskiem” zawierającym pozostałości bakterii i pożywki hodowlanej (w tym odpowiednie stężenia soli i innych składników odżywczych). Udowodniłam w publikacji, że preparaty pozbawione endotoksyn charakteryzowały się gorszą stabilnością podczas przechowywania.

Jednym z celów badawczych był wybór bezpiecznego nośnika, którego dodatek nie spowoduje utraty aktywności fagów w preparatach przeznaczonych do podania pszczołom w warunkach laboratoryjnych. Zbadano preparaty: P1 (1/A), P2 (3/A) i P3 (1/A + 3/A) z dodatkiem m.in. 50% roztworu sacharozy, które przechowywano w temperaturze pokojowej i w 4 °C, w celu weryfikacji optymalnych warunków przechowywania preparatu przeznaczonego do potencjalnego wykorzystania w przyszłości w pasiekach. W temperaturze 4 °C dodatek sacharozy pozwalał na utrzymanie aktywności fagów nawet przez 8 miesięcy eksperymentu (nastąpił spadek średniego miana o około dwa rzędy wielkości), w temperaturze pokojowej, po 3 miesiącach eksperymentu średnie miano badanych fagów spadło. Preparat fagowy P3 o stężeniu 10% zawieszony w 50% syropie cukrowym (miano w zakresie 10^3 - 10^5 PFU/mL) okazał się najlepszym rozwiązaniem dla stabilności fagów. Sacharoza to najpowszechniejszy i (w momencie przeprowadzania eksperymentów) najtańszy cukier, często używany przez pszczelarzy do karmienia pszczoł i dobrze tolerowany przez te zwierzęta.

Sprawdzono również wpływ 5% mleczka pszczelego (wykorzystywanego przez pszczoły do karmienia larw) na aktywność fagów przez 12 dni w 4 °C. Nasze obserwacje wskazują, że zmniejszyło się średnie miano wszystkich preparatów fagowych zawieszonych w mleczku pszczelim już w pierwszym dniu eksperymentu (spadek o trzy rzędy wielkości). Fagi zawarte w preparacie z mleczkiem pszczelim uległy inaktywacji z powodu jego składu oraz niskiego pH (Ribeiro *i wsp.*, 2019). Uzyskane wyniki wskazują, że mleczko pszczele jest

produktem, który powoduje szybką inaktywację fagów i z tego względu nie jest to odpowiedni nośnik odpowiedni do stosowania w terapii fagowej. Obecność produktów pszczelich, m.in. mleczka pszczelego, czy miodu w ulu, mogą być jedną z możliwych przyczyn niepowodzenia zastosowania fagów u pszczoł dziesiątkowanych przez zgnilca amerykańskiego.

Bakteriofagi to wirusy składające się z białek i kwasów nukleinowych. Ze względu na to, że większość białek pozostaje bardziej stabilna w stanie stałym niż ciekłym (Ohtake *i wsp.* 2011; Manohar *i wsp.*, 2019). Manohar *i wsp.* (2019) wykazali, że liofilizacja jest skuteczną metodą zapewniającą długotrwałą stabilność fagom zawartym w preparatach jej poddanych. Fagi mogą podlegać stresom fizycznym w roztworze wodnym (zawiesinom), takim jak zmiany pH/temperatury, mieszanie i wystawienie na działanie środków denaturujących, co może prowadzić do agregacji i utraty ich aktywności. Celem zbadania zdolności do zachowania stabilności podczas długotrwałego przechowywania fagów *P. larvae* przeprowadzono ich liofilizację. Jest to metoda powszechnie uznawana za skuteczną. Dodatkowo, istotną kwestią dla zachowania aktywności fagów po procesie liofilizacji było znalezienie odpowiedniego krioprotektanta. Wcześniejsze dane sugerują, że cukry są dobrym wyborem ze względu na to, że zabezpieczają fagi podczas przechowywania (Manhor *i wsp.*, 2019, Dini *i wsp.*, 2013). W naszych badaniach fagi poddano liofilizacji bez lub z dodatkiem krioprotektanta (cukru, który dodawano do 10% końcowej objętości (wag./obj.). zamrożone w -80 °C próbki poddano liofilizacji przez 48 h w liofilizatorze Christ Alpha LS-4 (próżnia 1,03 mbar) (zmodyfikowana metoda opisana przez Manohara *i wsp.*, 2019). Próbkę poddane liofilizacji były następnie badane w 40, 75, 100 i 125 dniu po liofilizacji. Preparaty fagowe bez krioprotektanta straciły swoją aktywność 40 dnia eksperymentu. W 125. dniu średnie miano faga wynosiło 10 PFU/ml dla 2/A, $98,25 \times 10^3$ PFU/ml dla 1/A, 4×10^2 PFU/ml dla 3/A, $1,2 \times 10^3$ PFU/mL dla 5/A i 4×10^2 PFU/mL dla 1/A + 3/A (spadek o cztery do pięciu rzędów wielkości). Wśród preparatów z dodatkiem cukrów, najbardziej stabilne były te z dodatkiem sacharozy. Najbardziej stabilny okazał się preparat zawierający faga 1/A i 3/A, w przypadku którego nie zaobserwowano spadku średniego miana po liofilizacji.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że w przypadku badanych fagów najkorzystniejszą temperaturą do przechowywania jest 4 °C, najkorzystniejszą zaś formą preparatu jest lizat. Przechowywanie preparatu z dodatkiem 50% sacharozy i liofilizacja z dodatkiem sacharozy zapewniał preparatom fagowym stabilność w warunkach przechowywania. Wstępne badania bezpieczeństwa na zdrowych pszczołach sugerują, że podawany preparat fagowy (analiza genomów wykazała, że są to fagi łagodne) jest nieszkodliwy, a forma podania jest dobrze tolerowana przez te zwierzęta.

Badania nad nowymi fagami terapeutycznymi i ich zastosowaniem u ludzi stanowią ważny aspekt rozwoju terapii fagowej w szczególności w przypadku możliwości jej zastosowania w leczeniu infekcji wywołanych przez patogeny należące do grupy ESKAPE. W szczególności zainteresowaliśmy się *Enterobacter cloacae* wywołującym zakażenia szpitalne, który może stanowić przyczynę m.in. sepsy, zapalenia płuc, zakażenia układu moczowego (głównie jako powikłanie po cewnikowaniu) oraz zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych.

W poniższej pracy Cieślak *i wsp.* (2022), stanowiącej **poz. nr 5** prezentowanego cyklu, opisano dwa fagi lityczne: Entb_43 (vB_EclM-43) oraz Entb_45 (vB_EclM-45) swoiste do *Enterobacter*

spp, izolowane z próbek wody (poddanych zagęszczeniu 20 razy z wykorzystaniem filtracji tangencjalnej).

Cieślik M., Harhala M., Orwat F., Dąbrowska K., Górski A., **Jończyk-Matysiak E.** Two newly isolated *Enterobacter*-specific bacteriophages: biological properties and stability studies *Viruses*. 2022 Jul 12; 14(7): 1518; doi: 10.3390/v14071518. **IF 5,818 (100 pkt MEiN) (autor korespondencyjny)**. Łączna liczba cytowań według Web of science: 0. Merytoryczny wkład w pracę polegał na opracowaniu koncepcji pracy, planowaniu eksperymentów, analizie i interpretacji uzyskanych wyników, udziale w przygotowaniu manuskryptu oraz poprawek według sugestii recenzentów.

Fagów poszukiwano metodą Ślopka (1983). Wyizolowane fagi to miowirusy, które wykazują aktywność lityczną przeciwko wielolekoopornym klinicznym izolatom *Enterobacter* spp (*E. cloacae*, *E. hormaechei* i *E. kobei*), na podstawie struktury genomów zostały sklasyfikowane jako przedstawiciele podrodziny *Tevenvirinae* (Entb_43 został rozpoznany jako *Karamvirus* i Entb_45 jako *Kanagawavirus*). Spektrum lityczne fagów wynosiło 40 i 60%. Najskuteczniejszy współczynnik infekcji fagiem (ang multiplicity of infection, MOI) wynosił MOI = 0,01 i MOI = 0,001. Całkowitą adsorpcję do komórek gospodarza uzyskano po około 20 min dla Entb_43 i 10 min dla Entb_45.

Badane lizaty fagowe zostały umieszczone w różnych warunkach temperaturowych: 37 °C, 22–24 °C (temperatura pokojowa), 4 °C i zamrożone w -70 °C z dodatkiem lub bez 20% glicerolu (Difco). Eksperymenty prowadzono przez 6 miesięcy, a próbki sprawdzano po 1, 2, 4, 10, 14, 18 i 24 tygodniach. Celem oceny, czy wielokrotne odmrażanie wpłynęło na miano bakteriofagów przechowywanych w -70°C, ta sama próbka była kilkakrotnie rozmrażana. Badane fagi wykazały odporność na 5-krotny cykl zamrażania i rozmrażania (miano fagów nie wykazywały istotnego spadku). Lizaty fagowe zachowały swoje początkowe miano nawet po sześciu miesiącach przechowywania zarówno w -70 °C, jak i 4 °C, podczas gdy przechowywanie w 37 °C powodowało całkowitą utratę aktywności. W lizacie fagowym Entb_45 nie znaleziono aktywnych cząstek fagowych po 18 tygodniach przechowywania w 37 °C, podczas gdy miano faga Entb_43 spadło z 10^{10} do 10^1 PFU/mL po 24 tygodniach inkubacji. Uzyskane wyniki pozwoliły udowodnić, że w przypadku badanych fagów swoistych wobec *Enterobacter* przechowywanie w warunkach chłodniczych oraz mrożenie z dodatkiem lub bez dodatku krioprotektanta (glicerolu) jest korzystniejsze dla zachowania aktywności litycznej przez te fagi.

Stabilność fagów oceniano przez ich inkubację w wodzie peptonowej o różnym pH w zakresie od 3 do 12 (5 M HCl lub 10 M NaOH) przez 1 godz. i 24 godz. w 37 °C. Jako kontrolę użyto standardową pożywkę hodowlaną o pH = 7,2. Najistotniejsze różnice w mianach fagów zaobserwowano po inkubacji w najbardziej skrajnych wartościach pH (pH=12 dla faga Entb_43 i Entb_45, pH=11 dla faga Entb_45 i pH=3 dla obydwu fagów). Co ciekawe, wyższe miano fagów uzyskano w wyniku inkubacji w podłożu o pH = 8, co może wskazywać na ich efektywniejszą amplifikację w wyżej wspomnianych warunkach).

W pracy przedstawiono także wyniki badania stabilności fagów po inkubacji 1 i 24 godz. w dostępnych komercyjnie roztworach nanocząsteczek srebra i miedzi (Nano-Tech,

Polska) w stężeniu 50 mg/kg (ppm), stosowanych jako środki przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze. Obydwa bakteriofagi zachowały aktywność przez 30 min inkubacji z roztworami nanocząstek w temperaturze pokojowej. 24-godzinna inkubacja spowodowała bardziej istotny spadek miana fagów w przypadku srebra niż miedzi. Uzyskane wyniki mogą sugerować potencjał przeciwbakteryjny przy zastosowaniu preparatów zawierających zarówno fagi, jak i nanocząsteczki metali. Istnieje jednak potrzeba dalszych badań nad tym zjawiskiem w szczególności w kontekście zastosowania fagów podawanych dopęcherzowo przez cewniki powlekane nanocząsteczkami miedzi lub srebra, co mogłoby zwiększać skuteczność działania fagów w miejscu infekcji. W literaturze naukowej dostępne są dane na temat przeciwdrobnoustrojowej aktywności nanocząsteczek srebra oraz miedzi. Roe *i wsp.*, (2008) wykazali, że powierzchnie cewnika powlekane nanocząsteczkami srebra wykazywały aktywność przeciwbakteryjną *in vitro*, zapobiegło to także wytwarzaniu biofilmu przez *E. coli*, *Enterococcus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* oraz *Candida albicans*. Wskazuje to na duży potencjał w zastosowaniu nanocząsteczek srebra w zapobieganiu zakażeniom odcewnikowym, zwłaszcza w przeciwdziałaniu kolonizacji cewników przez bakterie. Z drugiej jednak strony ważna była ocena interakcji naszych fagów swoistych wobec *Enterobacter* z nanocząsteczkami ze względu na dostępne dane dotyczące możliwej nieodwracalnej inaktywacji fagów swoistych do *E. coli* przez nanocząsteczki (Richter *i wsp.*, 2021; Sinclair *i wsp.*, 2021).

Zachowanie aktywności fagów w wyniku kontaktu ze środkami dezynfekującymi/surfaktantami może mieć duże znaczenie z praktycznego punktu widzenia w sytuacji, gdy stosowanie środków powierzchniowo czynnych lub dezynfekujących może wspierać działanie przeciwbakteryjne fagów (np. dezynfekcja powierzchni skóry przed miejscowym zastosowaniem fagów). W przypadku charakteryzowanych fagów zaobserwowano, że istotny spadek miana fagów powodował środek dezynfekujący zawierający dichlorowodorek oktenidyny i fenoksietanol – obserwowano redukcję miana o ponad 90% dla faga Entb_43 oraz o 99,9% w przypadku faga Entb_45, po 30 min inkubacji) oraz 70% etanol (redukcja miana o prawie 70% dla Entb_43 i o 97% dla faga Entb_45, po 30 min inkubacji). Pozostałe badane środki dezynfekujące i surfaktanty (m.in. mydło, komercyjnie dostępny płyn do mycia naczyń) powodowały spadek miana fagów, ale był on nieistotny.

Badano również zdolność charakteryzowanych fagów do zachowania aktywności w świeżej próbce moczu pobranej od zdrowego dawcy (pH = 6, gęstość 1,015) w 37 °C przez 30 min, 1 godz. i 24 godz. Zarówno po pół, jak i po godzinie inkubacji nie zaobserwowano istotnego spadku miana badanych fagów w moczu. Takie wyniki sugerują, że mocz nie powodował ich inaktywacji, a tym samym, że fagi mogą zachowywać aktywność w miejscu zakażenia (drogi moczowe/pęcherz moczowy). Te wyniki potwierdzają wcześniejsze moje niepublikowane badania z wykorzystaniem oczyszczonego faga T4, który inkubowany w próbce moczu zachował aktywność przez 4 tygodnie w 20 °C.

Obserwowana zdolność fagów do zachowania aktywności podczas inkubacji w próbce moczu wraz z innymi opisanymi w tej pracy właściwościami charakteryzowanych fagów mogą sugerować terapeutyczny potencjał fagów w miejscu zakażenia po podaniu dopęcherzowym.

Najważniejsze osiągnięte rezultaty:

- Zastosowane metody poszukiwania, izolacji, jak i amplifikacji fagów powinny być dobierane indywidualnie i wynikać z kinetyki wzrostu bakteryjnego gospodarza oraz jego wymagań życiowych;
- Fagi przeznaczone do celów terapeutycznych powinny być charakteryzowane pod kątem jak największej liczby potencjalnych czynników inaktywujących z uwzględnieniem potencjalnej drogi podania oraz formę przewidzianego do zastosowania preparatu (płynna, emulsja, fagi kapsułkowane, maści, tabletki);
- Stosowanie fagów nie obniża zdolności fagocytów krwi obwodowej, wyizolowanych od chorych poddanych terapii fagowej, do wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii (w przypadku pewnych bakterii można nawet obserwować korektę upośledzonego procesu zabijania bakterii);
- Fagi *P. larvae* należy przechowywać w temp. co najwyżej 4 °C w formie lizatu. Preparaty fagów oczyszczonych charakteryzują się słabszą stabilnością w warunkach przechowywania;
- Dodatek nośnika cukrowego nie powoduje utraty aktywności cząstek fagowych w preparacie zawierającym fagi *P. larvae* przeznaczonym do podawania pszczołom;
- Dodatek krioprotektanta (cukru) zabezpiecza fagi *P. larvae* poddane liofilizacji przed inaktywacją podczas przechowywania;
- Fagi łagodne *P. larvae* okazały się bezpieczne (po wcześniejszym zbadaniu ich genomów i wykluczeniu obecności genów toksyn oraz genów kodujących oporność na antybiotyki) dla pszczół;
- Środki powierzchniowo czynne i dezynfekcyjne, podobnie jak nanocząsteczki metali: srebra i miedzi nie powodują utraty aktywności przez fagi *Enterobacter* po inkubacji;
- Wielokrotne rozmrażanie lizatów zawierających fagi swoiste wobec *Enterobacter* nie przyczynia się do nagłego spadku miana fagów w preparacie;
- Fagi swoiste wobec *Enterobacter* pozostają aktywne w moczu (co stanowi ważną przesłankę mogącą sugerować zachowanie ich aktywności po podaniu dopęcherzowym).

Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Główny obszar mojej działalności naukowo-badawczej stanowią badania dotyczące możliwości terapeutycznego zastosowania fagów i w tym zakresie jestem współautorem (wyłączając prace objęte cyklem) 39 artykułów (z czego 29 to prace przeglądowe, 10 – oryginalne) dotyczących następujących zagadnień:

- fagi jako modulator czynności komórek eukariotycznych oraz układu odpornościowego:

Cieślik, M., Bagińska, N., Górski, A., **Jończyk-Matysiak E.** Human β -Defensin 2 and Its Postulated Role in Modulation of the Immune Response. *Cells* 2021 Nov 3; 10(11): 2991. doi: 10.3390/cells10112991. **IF: 7,666 (140 pkt MEiN).**

Cieślik M., Bagińska N., **Jończyk-Matysiak E.**, Węgrzyn A., Węgrzyn G., Górski A. Temperate bacteriophages - the powerful indirect modulator of eukaryotic cells and immune functions. *Viruses*. 2021 May 28;13(6):1013; doi:10.3390/v13061013. **IF: 5,818 (100 pkt MEiN).**

Górski A., Międzybrodzki R., **Jończyk-Matysiak E.**, Żaczek M., Borysowski J. Phage-specific diverse effects of bacterial viruses on the immune system. *Future Microbiol.* 2019 Sep; 14(14): 1171–1174. doi: 10.2217/fmb-2019-0222. **IF: 2,907 (100 pkt MNiSW).**

Górski A, **Jończyk-Matysiak E.**, Łusiak-Szelachowska M., Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Borysowski J. Bacteriophages targeting intestinal epithelial cells: a potential novel form of immunotherapy. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Feb; 75(4): 589-595; doi: 10.1007/s00018-017-2715-6. **IF: 7,014 (40 pkt MNiSW).**

Górski A., Dąbrowska K., Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Łusiak-Szelachowska M., **Jończyk-Matysiak E.**, Borysowski J. Phages and immunomodulation. *Future Microbiol.* 2017 Aug; 12: 905-914; doi: 10.2217/fmb-2017-0049. **IF: 3,190 (35 pkt MNiSW).**

Górski A., Międzybrodzki R., Borysowski, J., Dąbrowska K., Wierzbicki P., Ohams M., Korczak-Kowalska G., Olszowska-Zaremba N., Łusiak-Szelachowska M., Kłak M., **Jończyk E.**, Kaniuga E., Gołaś A., Purchla S., Weber-Dąbrowska B., Letkiewicz S., Fortuna W., Szufnarowski K., Pawełczyk Z., Rogóż P., Kłosowska D. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Adv Virus Res.* 2012 83: 41-71. **IF: 2,844 (40 pkt MNiSW).**

- status terapii fagowej w Polsce i na świecie:

Górski A., Międzybrodzki A, Węgrzyn G., **Jończyk-Matysiak E.**, Borysowski J., Weber-Dąbrowska B. Phage therapy: current status and perspectives. *Med. Res. Rev.* 2020 Jan; 40(1):459-463; doi: 10.1002/med.21593.. **IF: 12,944 (140 pkt MNiSW).**

Górski A., Międzybrodzki R., **Jończyk-Matysiak E.**, Borysowski J., Letkiewicz S., Weber-Dąbrowska B. The fall and rise of phage therapy in modern medicine. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2019 Nov; 19(11):1115-1117. doi: 10.1080/14712598.2019.1651287. **IF: 3,224 (100 pkt MNiSW).**

Górski A., Międzybrodzki R., Łobocka M., Głowacka-Rutkowska A., Bednarek A., Borysowski J., **Jończyk-Matysiak E.**, Łusiak- Szelachowska M., Weber-Dąbrowska B.,

Bagińska N., Letkiewicz S., Dąbrowska K., Scheres J. „Phage therapy: What have we learned?” *Viruses* 2018 May 28;10(6): 28; doi:10.3390/v10060288.. **IF: 3,811 (30 pkt MNiSW).**

Górski A., Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Fortuna W., Letkiewicz S., Rogóż P., **Jończyk-Matysiak E.**, Dąbrowska K., Majewska J., Borysowski J. Phage therapy: Combating infections with potential for evolving from merely a treatment for complications to targeting diseases. *Front. Microbiol.* 2016 Sep 26;7:1515; doi:10.3389/fmicb.2016.01515. **IF: 4,076 (35 pkt MNiSW).**

- możliwości zastosowania fagów w leczeniu schorzeń wywołanych przez bakterie w różnych dziedzinach medycyny, m.in.: dermatologia, stomatologia, transplantologia, alergologia:

Kowalski J., Górski A., Cieślik M., Górski A., **Jończyk-Matysiak E.** What are potential benefits of using bacteriophages in periodontal therapy? *Antibiotics (Basel)*. 2022 Mar 25;11(4):446; doi: 10.3390/antibiotics11040446. **IF: 5,222 (70 pkt MEiN) (autor korespondencyjny).**

Bagińska N., Cieślik M., Górski A., **Jończyk-Matysiak E.** The role of antibiotic resistant *A. baumannii* in the pathogenesis of urinary tract infection and the potential of its treatment with the use of phage therapy. *Antibiotics*. 2021 Mar 9; 10(3): 281; **IF: 5,222 (70 pkt MEiN) (autor korespondencyjny).**

Cieślik M., Bagińska N., Górski A., **Jończyk-Matysiak E.** Animal models in the evaluation of the effectiveness of phage therapy for infections caused by Gram-negative bacteria from the ESKAPE group and the reliability of its use in humans. *Microorganisms*. 2021 Jan 20; 9(2): 206; **IF: 4,926 (20 pkt MEiN) (autor korespondencyjny).**

Bagińska N., Pichlak A., Górski A., **Jończyk-Matysiak E.** Specific and selective-bacteriophages in the fight against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Virol. Sin.* 2019 Aug; 34(4): 347-357.doi: 10.1007/s12250-019-00125-0. **IF: 3,242 (70 pkt MNiSW) (autor korespondencyjny).**

Górski A., **Jończyk-Matysiak E.**, Łusiak-Szelachowska M., Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Borysowski J., Letkiewicz S., Bagińska N., Sfanos KK. Phage therapy in prostatitis: recent prospects. *Front. Microbiol.* 2018 Jun 29; 9:1434; doi: 10.3389/fmicb.2018.01434. **IF: 4,259 (35 pkt MNiSW).**

Górski A., **Jończyk-Matysiak E.**, Łusiak-Szelachowska M., Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Borysowski J. Phage therapy in allergic disorders? *Exp Biol Med* (Maywood). 2018 Mar; 243(6): 534-537; doi: 10.1177/1535370218755658. **IF: 3,005 (30 pkt MNiSW).**

Jończyk-Matysiak E., Weber-Dąbrowska B., Żaczek M., Międzybrodzki R., Letkiewicz S., Łusiak-Szelachowska M., Górski A. Prospects of phage application in the treatment of acne caused by *Propionibacterium acnes*. *Front. Microbiol.* 2017 Feb 8; 8: 164; doi: 10.3389/fmicb.2017.00164. **IF: 4,019 (35 pkt MNiSW) (autor korespondencyjny).**

Letkiewicz S., Międzybrodzki R., Kłak M., **Jończyk E.**, Weber-Dąbrowska B., Górski A. The perspectives of the application of phage therapy in chronic bacterial prostatitis, *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010; 60: 99-112. (27 pkt MNiSW).

- Zrozumienie molekularnych mechanizmów aktywności fagów:

Hodyra-Stefaniak K, Lahutta K, Lecion D., Majewska J., Kaźmierczak Z, Harhala M., Beta W., Owczarek B., **Jończyk-Matysiak E.**, Kłopot A., Miernikiewicz P., Kula D., Górski A., Dąbrowska K. Bacteriophages engineered to display foreign peptides may become short-circulating phages. *Microb. Biotechnol.* 2019 Jul;12(4):730-741; **IF: 5,328 (100 pkt MNiSW).**

Zschach H., Larsen MV., Hasman H., Westh H., Nielsen M., Międzybrodzki R., **Jończyk-Matysiak E.**, Weber-Dąbrowska, B., Górski. A. Use of a Regression Model to Study Host-Genomic Determinants of Phage Susceptibility in MRSA. *Antibiotics.* (Basel). 2018 Jan 29;7(1):9; doi: 10.3390/antibiotics7010009. **IF: 2,921.**

W tym zakresie planuje się badania mające na celu ustalenie przyczyn strukturalnych występowania oporności wśród szczepów *Acinetobacter baumannii* na swoiste fagi. Jestem współautorem wniosku grantowego "K/O-antygeny *Acinetobacter baumannii* jako narzędzie przy skutecznym doborze bakteriofagów do terapii", złożonego do Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Opus we współpracy dr hab. Martą Kaszowską z Laboratorium Immunochemii Drobnoustrojów i Szczepionek IITD PAN (wniosek w trakcie oceny).

Brałam udział w badaniach nad penetracją tkankową bakteriofagów (jako wykonawca w projekcie „Penetracja tkankowa bakteriofagów i jej potencjalne znaczenie terapeutyczne” (Tissue bacteriophage penetration of and their potential therapeutic significance), finansowanym ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2006-2010, nr projektu: 2 PO5B 111 30). Efektem badań jest zgłoszenie patentowe: Międzybrodzki R., Bubak B., Kłak M., **Jończyk E.**, Weber-Dąbrowska B., Letkiewicz S., Górski A. Zgłoszenie patentowe do Polskiego urzędu Patentowego "Phage preparation to rectal administration" P 392901; zgłoszony : 13.11.2010. Numer prawa wyłącznego Pat: 214743. Udział w badaniach przed uzyskaniem stopnia doktora.

Przed uzyskaniem stopnia doktora prowadziłam badania nad występowaniem bakteriofagów w moczu chorych (ze zdiagnozowanym zakażeniem dróg moczowo-płciowych) poddanych terapii fagowej, w trakcie których poszukiwałam fagów naturalnie występujących oraz badałam zdolność fagów stosowanych przez chorych drogą doodbytniczą do penetracji do moczu. Badania te nie wykazywały, że zastosowane przez chorych fagi są wydalane z moczem.

- nasze hipotezy odnośnie „pozabakteryjnego” zastosowania fagów (phage repurposing):

Górski A., Bollyky PL., Przybylski M., Borysowski J., Międzybrodzki R., **Jończyk-Matysiak E.**, Weber-Dąbrowska B. Perspectives of phage therapy in non-bacterial infections *Front Microbiol.* 2019 Jan 9; 9: 3306; doi: 10.3389/fmicb.2018.03306. **IF: 4,236 (100 pkt MNiSW).**

Górski A., **Jończyk-Matysiak E.**, Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Łusiak-Szelachowska M., Bagińska N., Borysowski J., Lobočka MB., Węgrzyn A., Węgrzyn G. Phage therapy: beyond the antibacterial action. *Front. Med. (Lausanne).* 2018 May 23;5:146; doi: 10.3389/fmed.2018.00146. **IF: 3,113 (20 pkt MNiSW).**

Górski A., **Jończyk-Matysiak E.**, Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Borysowski J. Phage transplantation in allotransplantation”: possible treatment in Graft Versus Host Disease”. *Front Immunol.* 2018 Apr 27;9:941; doi: 10.3389/fimmu.2018.00941. **IF: 4,716 (35 pkt MNiSW).**

Górski A., Międzybrodzki R., **Jończyk-Matysiak E.**, Weber-Dąbrowska B., Bagińska N., Borysowski J. Perspectives of Phage-Eukaryotic Cell Interactions to Control Epstein-Barr Virus Infections. *Front. Microbiol.* 2018 Apr 3;9:630; doi: 10.3389/fmicb.2018.00630. **IF: 4,259 (35 pkt MNiSW).**

Górski A., Jończyk-Matysiak E., Łusiak-Szelachowska M., Weber-Dąbrowska B., Międzybrodzki R., Borysowski J. Therapeutic potential of phages in autoimmune liver diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 2018 Apr;192(1):1-6; doi: 10.1111/cei.13092. **IF: 3,711 (30 pkt MNiSW).**

Górski A., **Jończyk-Matysiak E.**, Łusiak-Szelachowska M., Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Borysowski J. The potential of phage therapy in sepsis. *Front. Immunol.* 2017 Dec 11; 8:1783; doi:10.3389/fimmu.2017.01783. **IF: 5,511 (35 pkt MNiSW).**

Międzybrodzki R., Borysowski J., Kłak M., **Jończyk-Matysiak E.**, Obmińska-Mrukowicz B., Bubak B., Weber-Dąbrowska B., Górski A. *In vivo* studies on the influence of bacteriophage preparations on autoimmune inflammatory process. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 3612015; doi: 10.1155/2017/3612015. **IF: 2,583 (25 pkt MNiSW).**

Łusiak-Szelachowska M., Weber-Dąbrowska B., **Jończyk-Matysiak E.**, Wojciechowska R., Górski A. Bacteriophages in the gastrointestinal tract and their implications. *Gut Pathog.* 2017 Aug 10; 9: 44; doi: 10.1186/s13099-017-0196-7. **IF: 2,809 (30 pkt MNiSW).**

Jończyk-Matysiak E., Kłak M., Weber-Dąbrowska B., Borysowski J., Górski A. Possible use of bacteriophages active against *Bacillus anthracis* and other *B. cereus* group members in the face of a bioterrorism threat. *BioMed Res Int.* 2014; 2014: 735413; doi:10.1155/2014/735413. **IF: 1,579 (autor korespondencyjny).**

- odpowiedź układu odpornościowego na fagi zastosowane w terapii:

Łusiak-Szelachowska M., Żaczek M., Weber-Dąbrowska M., Międzybrodzki R., Letkiewicz S., Fortuna W., Rogóż P., Szufnarowski K., **Jończyk-Matysiak E.**, Olchawa E., Walaszek K., Górski A. Antiphage Activity of Sera in Patients During Phage Therapy in Relation to its Outcome. *Future Microbiol.* 2017 Feb; 12: 109-117; doi: 10.2217/fmb-2016-0156 **IF: 3,190 (35 pkt MNiSW).**

Żaczek M., Łusiak-Szelachowska M., **Jończyk-Matysiak E.**, Weber-Dąbrowska B., Międzybrodzki R., Owczarek B., Kopciuch A., Fortuna W., Rogóż P., Górski A. Antibody production in response to staphylococcal MS-1 phage cocktail in patients undergoing phage therapy. *Front. Microbiol.* 2016 Oct 24;7:1681; doi:10.3389/fmicb.2016.01681. **IF: 4,076 (35 pkt MNiSW).**

Hodyra-Stefaniak K., Miernikiewicz P., Drapała J., Drab M., **Jończyk-Matysiak E.**, Lecion D., Kaźmierczak Z., Beta W., Majewska J., Bubak B., Harhala M., Kłopot A., Górski A. Mammalian host-versus-phage immune response determines phage fate *in vivo*. *Sci Rep.* 2015 Oct 6;5:14802; doi:10.1038/srep14802. **IF: 4,011 (40 pkt MNiSW).**

Łusiak-Szelachowska M., Żaczek M., Weber-Dąbrowska B., Międzybrodzki R., Kłak M., Fortuna W., Letkiewicz S., Rogóż P., Szufnarowski K., **Jończyk-Matysiak E.**, Owczarek B., Górski A. Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy. *Viral Immunol.* 2014 Aug; 27(6): 295-304, doi: 10.1089/vim.2013.0128. **IF: 1,446 (15 pkt MNiSW).**

Obecnie moja praca koncentruje się na pozyskiwaniu fagów do celów terapeutycznych, w tym fagów przeciwko najbardziej niebezpiecznym patogenom należącym do grupy ESKAPE, m.in. takim jak *Acinetobacter baumannii* (są trudne do pozyskania i amplifikacji). Badania dotyczą prób izolacji nowych fagów (w tym opracowania skutecznej metody pozyskiwania fagów z próbek środowiskowych oraz ścieków), optymalizacji procesu amplifikacji indywidualnie dla każdego faga, kompleksowej charakterystyce fagów (w tym w określeniu struktury genomu i określenia rodzaju cyklu życiowego, parametrów cyklu życiowego m.in. kinetyki infekcji fagiem), czy stabilności w różnych warunkach) oraz oceny skuteczności pozyskanych fagów *in vitro* na biofilmie bakteryjnym, jak i *in vivo* w celu

włączenia do kolekcji fagów terapeutycznych Laboratorium Bakteriofagowego. W szczególności biorę udział w badaniach nad opracowaniem preparatu bakteriofagowego aktywnego wobec wielolekoopornych szczepów *A. baumannii* wywołujących zakażenia dróg moczowych w ramach obecnie realizowanego projektu: „Study of the composition of a bacteriophage preparation specific to multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains” (ACIPHAGE), finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, fundowanego z Norweskiego Mechanizmu Finansowego (projekt w trakcie realizacji, planowane zakończenie 31.05.2023), realizowanego w ramach pracy doktorskiej mgr inż. Natalii Bagińskiej.

Ponadto zajmuję się określeniem wpływu bakteriofagów na zdolność komórek do produkcji defensyn, w szczególności hBD-2. Dotychczas opublikowane badania sugerują, że ludzka β -defensyna 2 jest ważnym białkiem odporności wrodzonej przyczyniającym się do ochrony organizmu przed inwazją patogenów (bakterii, wirusów, grzybów, pasożytów). Jego kluczową rolą jest wzmacnianie odporności. Może być również uważane za marker stanu zapalnego. Sugeruje się jego podawanie terapeutyczne w celu utrzymania homeostazy ustroju w oparciu o odpowiedni skład mikrobioty. Może to być ważne narzędzie terapeutyczne do modulowania odpowiedzi układu odpornościowego w wielu chorobach zapalnych (Cieślik *i wsp.*, 2022). Badania *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej Caco-2 wskazują możliwy efekt immunomodulujący bakteriofaga T4, potwierdzony wyraźnym wzrostem ekspresji genu hBD-2 (DEFB4A) (Borysowski *i wsp.*, 2020). Wyniki te mogą sugerować możliwe zastosowanie fagów jako modulatorów odpowiedzi odpornościowej wspomagających leczenie chorób zapalnych poprzez indukcję hBD-2. Planowane prace mają więc znaczenie praktyczne.

Moje dotychczasowe osiągnięcia dotyczą dziedziny nauki, która oferuje nadzieję na opracowanie nowych sposobów leczenia schorzeń, które dotychczas przedstawiały poważne trudności terapeutyczne. Ostatnie dane sugerujące, że fagi mogą być również stosowane w leczeniu infekcji niebakteryjnych, a także jako środki przeciwzapalne i immunomodulujące, dodają wagi tym badaniom i podkreślają ich aplikacyjny charakter.

W sierpniu b.r. Agencja Badań Medycznych przyznała grant na badanie kliniczne nad zastosowaniem fagów gronkowcowych w leczeniu zapalenia zatok przynosowych, w którym nasz Instytut jest liderem. Mam nadzieję, że postęp w charakterystyce fagów będący obiektem badania w moich pracach pozwoli na ich zastosowanie w kolejnym badaniu klinicznym, niezbędnym dla ich wprowadzenia do terapii.

Jak wiadomo, w ostatniej ewaluacji działalności naukowej uczelni i instytutów badawczych nasz Instytut – jako jedyna placówka w kraju – otrzymał najwyższą kategorię w naukach medycznych (A plus). Niewątpliwie źródłem tego spektakularnego sukcesu były nasze unikalne badania nad bakteriofagami i terapią fagową, do których wniosłam mój wkład. Nie ulega zatem wątpliwości, że prowadzone przeze mnie badania reprezentują osiągnięcia, jakie w międzynarodowej terminologii określa się terminem „cutting edge research”.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Współpraca z Uniwersytetem Przyrodniczym we Wrocławiu

Doniesienie zjazdowe: **Jończyk-Matysiak E.**, Cieślik M., Bagińska N., Harhala M., Orwat F., Gębarowska E., Dąbrowska K., Jędrusiak A., Górski A. Charakterystyka nowo izolowanych fagów swoistych wobec patogenów należących do grupy ESKAPE. Sympozjum baktriofagowe 2022 w Gdańsku 8-10 września (prezentacja ustna, autor prezentujący: **Ewa Jończyk-Matysiak**).

w ramach grantu POIR oraz w ramach badań nad zwalczaniem zgnilca amerykańskiego, w efekcie której powstała:

praca oryginalna, stanowiąca pozycję **nr 4** cyklu:

Jończyk-Matysiak E., Owczarek B., Popiela E., Świtła-Jeleń K., Migdał P., Cieślik M., Łodej N., Kula D., Neuberg J., Hodyra-Stefaniak K., Kaszowska M., Orwat F., Bagińska N., Mucha A., Belter A., Skupińska M., Bubak B., Fortuna W., Letkiewicz S., Chorbiński P., Weber-Dąbrowska B., Roman A., Górski A. Isolation and characterization of phages active against *Paenibacillus larvae* causing American Foulbrood in honey bees in Poland. *Viruses*. 2021 Jun 23;13(7):1217; doi: 10.3390/v13071217. **IF: 5,818 (100 pkt MEiN) (autor korespondencyjny)**.

praca przeglądowa:

Jończyk-Matysiak E., Popiela E., Owczarek B., Hodyra-Stefaniak K., Świtła-Jeleń K., Łodej N., Kula D., Neuberg J., Migdał P., Bagińska N., Orwat F., Weber-Dąbrowska B., Roman A., Górski A. Phages in therapy and prophylaxis of American foulbrood – recent implications from practical applications. *Front Microbiol*. 2020 Aug 11;11:1913; doi: 10.3389/fmicb.2020.01913. **IF: 5,064 (100 pkt MNiSW) (autor korespondencyjny)**.

doniesienia zjazdowe:

1. **Jończyk-Matysiak E.**, Świtła-Jeleń K., Kula D., Bagińska N., Łodej N., Weber-Dąbrowska B., Hodyra-Stefaniak K., Popiela-Pleban E., Migdał P., Roman A., Górski A. The development of a bacteriophage preparation intended to use in the treatment and prevention of the American and European foulbrood of honey bee. *14th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology*, 24-27 czerwca 2018, Wrocław (abstrakt opublikowany w *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2018, 41, sup 1, ISSN 0140-7783. (autor prezentujący: **Ewa Jończyk-Matysiak**).
2. **Jończyk-Matysiak E.**, Świtła-Jeleń K., Hodyra-Stefaniak K., Łodej N., Neuberg J., Kula D., Orwat F., Kaszowska M., Bagińska N., Owczarek B., Popiela-Pleban E.,

Migdał P., Roman A., Weber-Dąbrowska B., Górski A. phages intended for preventing and treating infections caused by *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. *5th World Congress on Targeting Infectious Diseases. Targeting Phage and Antibiotic Resistance Phage Therapy and other innovative ideas.*, 17-18 maja 2018, Florencja, Włochy (autor prezentujący: **Ewa Jończyk-Matysiak**).

3. **Jończyk-Matysiak E.**, Światała-Jeleń K., Popiela-Pleban E., Owczarek B., Kula D., Neuberg J., Łodej N., Orwat F., Hodyra-Stefaniak K., Weber-Dąbrowska B., Roman A., Migdał P., Górski A. Opracowanie preparatu bakteriofagowego do zastosowania w leczeniu oraz profilaktyce zgnilca amerykańskiego występującego u czerwia pszczoły miodnej. 56 Naukowa Pszczelarska konferencja 5-6 marca 2019, Kazimierz Dolny (autor prezentujący: Joanna Neuberg).
4. Popiela E., Migdał P., **Jończyk-Matysiak E.**, Owczarek B., Światała-Jeleń K., Chorbiński P., Hodyra-Stefaniak K., Roman A., Górski A., Kula D., Łodej N. Using specific bacteriophage preparation in honey bee infections caused by *Paenibacillus larvae*. *XIXth International Congress of International Society for Animal Hygiene*, 8-12 września 2019, Wrocław (autor prezentujący: Ewa Popiela).
5. Łodej N., Kula D., Owczarek B., Popiela-Pleban E., Światała-Jeleń K., Hodyra-Stefaniak K., Orwat F., Neuberg J., Bagińska N., Chorbiński P., Roman A., Weber-Dąbrowska B., Górski A., **Jończyk-Matysiak E.** The development of a bacteriophage preparation intended to use in the treatment and prevention of the American Foulbrood of honey bee. *Biennial Evergreen International Phage Meeting*, Evergreen, 4-9 sierpnia 2019, Waszyngton, Stany Zjednoczone (autor prezentujący Norbert Łodej).
6. Neuberg J., Światała-Jeleń K., Popiela-Pleban E., Owczarek B., Orwat F., Hodyra-Stefaniak K., Weber-Dąbrowska B., Roman A., Chorbiński P., Górski A., **Jończyk-Matysiak E.** „Bacteriophage preparation intended to use in the treatment and prevention of the American Foulbrood” 8 Międzynarodowa Konferencja poświęcona pamięci Prof. Rudolfa Weigla: “*Human welfare and infectious diseases in a new microbiome research era. Microorganisms in industrial and medical biotechnology*”, 26-28 czerwca 2019, Łódź (autor prezentujący: Joanna Neuberg).
7. **Jończyk-Matysiak E.**, Światała-Jeleń K., Popiela-Pleban E., Hodyra-Stefaniak K., Neuberg J., Orwat F., Kaszowska M., Owczarek B., Migdał P., Roman A., Weber-Dąbrowska B., Górski A. Prevention and treatment of the American and European Foulbrood of honey bee using specific bacteriophage preparation *Viruses of Microbes*, 9-13 lipca 2018, Wrocław (autor prezentujący: **Ewa Jończyk-Matysiak**).
8. Popiela-Pleban E., Migdał P., **Jończyk-Matysiak E.**, Światała-Jeleń K., Roman A., Chorbiński P., Hodyra-Stefaniak K., Owczarek B., Murawska A., Weber-Dąbrowska B., Górski A. Wpływ preparatu fagowego przeznaczonego do zwalczania zgnilców na

organizm pszczoły miodnej – badania klatkowe. 56 Naukowa Pszczelarska konferencja, 5-6 marca 2019, Kazimierz Dolny.

Współpraca z Warszawskim Uniwersytetem Medycznym, w efekcie, której powstała:

praca przeglądowa:

Kowalski J., Górski A., Cieślak M., Górski A. **Jończyk-Matysiak E.** What are potential benefits of using bacteriophages in periodontal therapy? *Antibiotics (Basel)*. 2022 Mar 25;11(4):446; doi: 10.3390/antibiotics11040446. **IF: 5,222 (70 pkt MEiN) (autor korespondencyjny).**

Jako rezultat współpracy z Zakładem Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego złożony również został wniosek grantowy pt. „Opracowanie preparatu fagowego przeznaczonego do zastosowania w paradontozie” do Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w konkursie Lider XIII (projekt w trakcie oceny merytorycznej- wstępna ocena pozytywna, kierownik B+R **Ewa Jończyk-Matysiak**).

Współpraca z Instytutem Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie w efekcie, której powstała:

praca przeglądowa stanowiąca pozycję **nr 1** cyklu:

Weber-Dąbrowska B., **Jończyk-Matysiak E.**, Żaczek M., Łobocka M., Łusiak-Szelachowska M., Górski A. Bacteriophage procurement for therapeutic purposes. *Front. Microbiol.* 2016 Aug 12;7:1177; doi:10.3389/fmicb.2016.01177. **IF: 4,076 (35 pkt MNiSW).**

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

Osiągnięcia dydaktyczne:

Pełnię funkcję opiekuna pomocniczego doktoranta (od 2018 roku) w badaniach prowadzonych w Laboratorium Bakteriofagowym nad poszukiwaniem izolacji i charakterystyką fagów swoistych wobec lekoopornych szczepów *Acinetobacter baumannii* w ramach projektu: „Study of the composition of a bacteriophage preparation specific to multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains” (ACIPHAGE) finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju i fundowanego z Norweskiego Mechanizmu Finansowego;

Jestem także promotorem 5 prac magisterskich studentów z wrocławskich uczelni (z tego trzy prace obronione, dwie: badania w trakcie realizacji):

1. Optymalizacja metod poszukiwania i amplifikacji fagów *Acinetobacter baumannii*. Badania w trakcie realizacji, przewidywany termin obrony czerwiec- lipiec 2023
2. Ocena aktywności fagów swoistych wobec *Acinetobacter baumannii* na biofilm bakteryjny. Badania w trakcie realizacji, przewidywany termin obrony czerwiec- lipiec 2023.
3. Badanie spektrum litycznego bakteriofagów swoistych wobec szczepów ESBL- dodatkich *Escherichia coli* (obrona 08.07.2019).

4. Poszukiwanie izolacja i charakterystyka nowych fagów terapeutycznych swoistych wobec *Acinetobacter baumannii* (obrona 5.07.2018).
5. Badania spektrum litycznego bakteriofagów swoistych wobec szczepów ESBL- dodatnich *Klebsiella pneumoniae* (obrona 19.07.2017).

W latach 2017-2022 byłam opiekunem praktyk studenckich 10 studentów z wrocławskich uczelni oraz opiekunem naukowym staży dwóch studentów z zagranicy: University of Bristol (30.06.2022-22.07.2022) oraz Warwick Medical University (18.04.25.05.2017) w zakresie pozyskiwania fagów do celów terapeutycznych.

Osiągnięcia popularyzujące naukę:

Wzięłam udział w audycji radiowej „Eureka” „Innowacyjność i nauka w służbie polskiej gospodarce” (25.07.2017) w Programie Pierwszym Polskiego Radia dostępnej na stronie:

<https://www.polskieradio.pl/7/5098/Artykul/1794098,Innowacyjnosc-i-nauka-w-sluzbie-polskiej-gospodarce>

Audycja dotyczyła realizowanego projektu, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju i możliwości praktycznego wykorzystania wyników uzyskanych w trakcie jego realizacji.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Nagrody i wyróżnienia:

1. Zespołowa Nagroda Dyrektora IITD PAN za opublikowanie w latach 2017-2019 pracy przeglądowej o najwyższej liczbie cytowań Górski A., Dąbrowska K., Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Łusiak-Szelachowska M., **Jończyk-Matysiak E.**, Borysowski J.: Phages and immunomodulation. *Future Microbiol.* 2017; 12(10): 905-914.
2. Zespołowa Nagroda Dyrektora IITD PAN za opublikowanie w latach 2017-2019 pracy oryginalnej o najwyższej liczbie cytowań Łusiak-Szelachowska M., Żaczek M., Weber-Dąbrowska B., Międzybrodzki R., Letkiewicz S., Fortuna W., Rogóż P., Szufnarowski K., **Jończyk Matysiak E.**, Olchawa E., Walaszek K.M., Górski A.: Antiphage activity of sera during phage therapy in relation to its outcome. *Future Microbiol.* 2017;12:109-117.
3. Zespołowa Nagroda Dyrektora IITD PAN we Wrocławiu za opublikowanie pracy przeglądowej o najwyższym współczynniku wpływu (IF). Górski A., **Jończyk-Matysiak E.**, Łusiak-Szelachowska M., Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B.,

Borysowski J. The potential of phage therapy in sepsis. *Front. Immunol.* 2017, 8, 1783, IF(5,511). Nagroda otrzymana 11.10.2018 r.

4. Wyróżnienie komitetu organizacyjnego *14th EAVPT Congress* we Wrocławiu, 24 – 27 czerwca, 2018 dla posteru: "The development of a bacteriophage preparation intended to use in the treatment and prevention of the American and European foulbrood of honey bee" autorstwa **Jończyk-Matysiak E.**, Świtała-Jeleń K., Kula D., Bagińska N., Łodej N., Weber-Dabrowska B., Hodyra-Stefaniak K., Popiela-Pleban E., Migdał P., Roman A. Górski A i zakwalifikowanie go do prezentacji ustnej (autor prezentujący: **Ewa Jończyk-Matysiak**).
5. Projekt "Innowacyjny bakteriofagowy preparat ochronny do stosowania w zespole stopy cukrzycowej" (Innovative bacteriophage protective preparation to be used in diabetes foot syndrome) finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, nr projektu: POIG.01.03.01-02-048/1- **Polska Nagroda Innowacyjności** 2015 w kategorii instytuty naukowe.
6. Wyróżnienie dla pracy Hodyra-Stefaniak K., Miernikiewicz P., Drapała J., Drab M., **Jończyk-Matysiak E.**, Lecion D., Kaźmierczak Z., Beta W., Majewska J., Bubak B., Harhala M., Kłopot A., Górski A. (2015) Mammalian Host-Versus-Phage Immune Response Determines Phage Fate *in Vivo*. *Scientific Reports Journal.* **5**, Article number: 14802, doi:10.1038/srep14802, w konkursie im prof. K. Bassalika na najlepsze polskie prace mikrobiologiczne opublikowane w 2015 roku.



(podpis wnioskodawcy)

Literatura:

Kuehn BM. Progress Against Antimicrobial Resistance Has Slipped. *JAMA*. 2022;328(8):702. doi:10.1001/jama.2022.14020.

Fischer S., Kittler S., Klein G., and Glünde G.(2013).Microplate-test for therap iddetermination of bacteriophage-susceptibility of *Campylobacter* isolates–development and validation. PLoS ONE 8:e53899. doi: 10.1371/journal.pone.0053899.

Międzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogóż P, Kłak M, Wojtasik E, Górski A. Clinical aspects of phage therapy. *Adv Virus Res*. 2012;83:73-121. doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7. PMID: 22748809.

Borysowski J, Górski A. Is phage therapy acceptable in the immunocompromised host? *Int J Infect Dis*. 2008 Sep;12(5):466-71. doi: 10.1016/j.ijid.2008.01.006. Epub 2008 Apr 8. PMID: 18400541.

Suh, G.A.; Lodise, T.P.; Tamma, P.D.; Knisely, J.M.; Alexander, J.; Aslam, S.; Barton, K.D.; Bizzell, E.; Totten, K.M.C.; Campbell, J.; et al. Antibacterial Resistance Leadership Group. Considerations for the Use of Phage Therapy in Clinical Practice. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2022, 66, e02071-21.

Łusiak-Szelachowska M, Międzybrodzki R, Drulis-Kawa Z, Cater K, Knežević P, Winogradow C, Amaro K, **Jończyk-Matysiak E**, Weber-Dąbrowska B, Rękas J, Górski A. Bacteriophages and antibiotic interactions in clinical practice: what we have learned so far. *J Biomed Sci*. 2022 Mar 30;29(1):23. doi: 10.1186/s12929-022-00806-1. PMID: 35354477; PMCID: PMC8969238.

Łusiak-Szelachowska, M., Międzybrodzki, R., Fortuna, W. *et al.* Anti-phage serum antibody responses and the outcome of phage therapy. *Folia Microbiol* **66**, 127–131 (2021). <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00835-z>.

Hodyra-Stefaniak, K., Kaźmierczak, Z., Majewska, J., Sillankorva, S., Miernikiewicz, P., Międzybrodzki, R., Górski, A., Azeredo, J., Lavigne, R., Lecion, D., Nowak, S., Harhala, M., Waśko, P., Owczarek, B., Gembara, K., Dąbrowska, K. (2020). Natural and Induced Antibodies Against Phages in Humans: Induction Kinetics and Immunogenicity for Structural Proteins of PB1-Related Phages. *PHAGE: Therapy, Applications, and Research*, 2, 91-99. doi: 10.1089/phage.2020.0004.

Majewska J, Kaźmierczak Z, Lahutta K, Lecion D, Szymczak A, Miernikiewicz P, Drapała J, Harhala M, Marek-Bukowiec K, Jędruchiewicz N, Owczarek B, Górski A, Dąbrowska K. Induction of Phage-Specific Antibodies by Two Therapeutic Staphylococcal Bacteriophages Administered *per os*. *Front Immunol*. 2019 Nov 14;10:2607. doi: 10.3389/fimmu.2019.02607. PMID: 31803179; PMCID: PMC6871536.

Górski A., Międzybrodzki R., Łobocka M., Głowacka-Rutkowska A., Bednarek A., Borysowski J., **Jończyk-Matysiak E.**, Łusiak- Szelachowska M., Weber-Dąbrowska B., Bagińska N., Letkiewicz S., Dąbrowska K., Scheres J. „Phage therapy: What have we learned?" *Viruses* 2018 May 28;10(6): 28; doi:10.3390/v10060288.

Borysowski J, Międzybrodzki R, Wierzbicki P, Kłosowska D, Korczak-Kowalska G, Weber-Dąbrowska B, Górski A. A3R Phage and *Staphylococcus aureus* Lysate Do Not Induce Neutrophil Degranulation. *Viruses*. 2017 Feb 21;9(2):36. doi: 10.3390/v9020036. PMID: 28230780; PMCID: PMC5332955.

Ślopek, S.; Durlakowa, I.; Weber-Dąbrowska, B.; Kucharewicz-Krukowska, A.; Dąbrowski, M.; Bisikiewicz, R. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. I. General evaluation of the results. *Arch. Immunol. Ther. Exp*. 1983,31, 267–291.

OIE (World Organization for Animal Health). American foulbrood of honey bees (infection of honey bees with *Paenibacillus larvae*). In Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 8th ed.; OIE: Paris, France, 2018; pp. 1–17.

Ribeiro, H.G.; Melo, L.D.R.; Oliveira, H.; Boon, M.; Lavigne, R.; Noben, J.P.; Azeredo, J.; Oliveira, A. Characterization of a new podovirus infecting *Paenibacillus larvae*. *Sci. Rep.* 2019, 9, 20355.

Ohtake S, Kita Y, Arakawa T. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011;63:1053–1073. doi: 10.1016/j.addr.2011.06.011.

Manohar P, Ramesh N. Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages. *Sci Rep.* 2019 Oct 23;9(1):15242. doi: 10.1038/s41598-019-51742-4. PMID: 31645642; PMCID: PMC6811570.

Dini C, de Urraza PJ. Effect of buffer systems and disaccharides concentration on *Podoviridae* coliphage stability during freeze drying and storage. *Cryobiol.* 2013;66(3):339–42. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.03.007.

Roe, D.; Karandikar, B.; Bonn-Savage, N.; Gibbins, B.; Rouillet, J.B. Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008, 61, 869–876.

Richter, Ł.; Paszkowska, K.; Cendrowska, U.; Olgiati, F.; Silva, P.J.; Gasbarri, M.; Guven, Z.P.; Paczesny, J.; Stellacci, F. Broad-spectrum nanoparticles against bacteriophage infections. *Nanoscale* 2021, 13, 18684–18694.

Sinclair, T.R.; van den Hengel, S.K.; Raza, B.G.; Rutjes, S.A.; de Roda Husman, A.M.; Peijnenburg, W.J.G.M.; Roesink, H.E.D.W.; de Vos, W.M. Surface chemistry-dependent antiviral activity of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2021, 32, 365101.

Borysowski J., Miedzybrodzki R., Przybylski M., Owczarek B., Weber-Dabrowska B., Gorski A. (2020). The effects of T4 and A5/80 phages on the expression of immunologically important genes in differentiated Caco-2 cells. *Adv. Hyg. Exp. Med.* 74, 371–376, 10.5604/01.3001.0014.3919