Dr hab. Marcin Łoś, profesor nadzwyczajny UG
Katedra Genetyki Molekularnej Bakterii
Wydział Biologii
Uniwersytet Gdański
Ul. Wita Stwosza 59
80-308 Gdańsk

Gdańsk, 19.07.2017

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 21-07-2017
L. dz. 328/2017

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr. Katarzyny Hodyry-Stefaniak pt. "Immunogenność bakteriofagów z grupy PB1 u człowieka i w modelu mysim" przygotowanej pod kierunkiem naukowym dr hab. Krystyny Dąbrowskiej

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska ma postać obszernej (162 strony), bardzo starannie przygotowanej monografii o strukturze typowej dla prac doświadczalnych. Składa się ona ze *Spisu rycin*, *Spisu tabel*, obszernego *Spisu zastosowanych skrótów*, *Wstępu*, który bardzo dobrze wprowadza czytelnika w podstawy tematyki badawczej, jednostronicowego *Celu pracy*, *Materiałów*, *Metod*, *Wyników*, *Dyskusji*, *Wniosków*, *Streszczenia* w wersji polskiej i angielskiej oraz spisu literatury.

Mgr. Katarzyna Hodyra-Stefaniak w przedkładanej rozprawie doktorskiej podejmuje bardzo ważną i aktualna tematykę badawczą jaką jest zdolność fagów użytych w fagoterapii do wywołania odpowiedzi immunologicznej oraz wpływ tej odpowiedzi na skuteczność terapii. W związku z coraz powszechniej występującą antybiotykoopornością wśród patogenów bakteryjnych, coraz większe nadzieje pokładane są w fagoterapii. Mimo tego, iż ta metoda leczenia znana jest dłużej, niż antybiotykoterapia, wiele jej aspektów nie jest dostatecznie poznanych. Jednym z nich jest wpływ użycia fagów na układ odpornościowy pacjenta i wpływ działania układu odpornościowego na skuteczność terapii. Lukę w tych właśnie badaniach stara się zapełnić Mgr. Katarzyna Hodyra-Stefaniak w przedłożonej rozprawie.

Tematem rozprawy jest immunogenność fagów F8, LMA2 i vB_PaeM_CEB_DP1 atakujących *Pseudomonas aeruginosa* i należących do grupy fagów PB1. W swojej pracy Mgr. Katarzyna Hodyra-Stefaniak przeprowadziła również badania nad lokalizacja w kapsydzie fagów białek gp18, gp22 i gp29 fagów F8, LMA2 oraz gp19, gp23 i gp30 faga vB_PaeM_CEB_DP1. Ponadto oceniła ona interakcje wybranych fagów z układem odpornościowym, budowanie odporności swoistej u szczepionych myszy, częstość występowania przeciwciał przeciw białkom strukturalnym wybranych fagów w populacji osób zdrowych oraz poziom przeciwciał przeciw wybranym białkom u osób poddanych

fagoterapii. Interesującym podejściem zastosowanym w pracy jest również wykorzystanie modelu matematycznego przewidującego wynik fagoterapii wykorzystującego trzy zmienne, jakim jest namnażanie się patogenu, namnażanie się faga i interferencja układu odpornościowego.

Treść wstępu jest dobrze dobrana i stanowi bardzo dobry teoretyczny wstęp, który przygotowuje czytelnika do interpretacji wyników części doświadczalnej. We wstępie omówione są właściwości i patogeneza bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. W dalszej części wstępu przybliżane są zagadnienia związane z fagoterapią, właściwościami bakteriofagów z badanej grupy , a następnie przytoczony jest zwięzły opis działania układu odpornościowego i znanych oddziaływań bakteriofagów z tym układem.

Cele pracy są jasno zdefiniowane. W części opisowej zawierają założenia, które wpłynęły na wyznaczenie danych celów. Osobiście brakuje mi w tej części pracy jasno zdefiniowanych hipotez badawczych, choć w przypadku tego typu prac nie jest to poważne uchybienie. Uważam również, że jako cel nie powinno być definiowane potwierdzenie czegoś, lecz raczej weryfikacja słuszności hipotezy, co wynika wprost z założeń metody naukowej.

Dobór metod badawczych jest prawidłowy. Pozwoliły one osiągnąć zdefiniowane cele badawcze i uzyskać niezwykle cenne i interesujące wyniki. Na uwagę zasługuje ogrom pracy włożony w uzyskanie tych wyników, który jest trudny do ocenienia dla osób nie wykorzystujących w swojej pracy badawczej technik biologii molekularnej. W spisie wykorzystanych metod jest aż 40 pozycji, co świadczy o bardzo szerokim wachlarzu technik, jakie musiała zastosować doktorantka w celu realizacji przedstawionych badań.

Dobór literatury i materiałów źródłowych świadczy o dobrej orientacji Doktorantki w temacie badań. W swojej pracy mgr. Katarzyna Hodyra-Stefaniak obficie czerpie z nie tylko z najnowszych dokonań naukowych, ale również ze starszych, często trudnych do zdobycia pozycji literaturowych. Oczywistym jest, że znaczna część cytowanej literatury dotyczy obszernego dorobku macierzystego Instytutu, który od wielu lat zaangażowany jest w badania nad fagoterapią.

Recenzowana praca jest niezwykle starannie napisana. Błędy edytorskie są bardzo nieliczne, co nie zdarza się często w tego typu pracach. Użycie zmienionego nazewnictwa genów i ich produktów w przypadku faga vB_PaeM_CEB_DP1 znacznie ułatwia analizę wyników i było moim zdaniem bardzo dobrym posunięciem. Z kolei skrócenie nazwy faga vB_PaeM_CEB_DP1 do P1 nie było najszczęśliwszym pomysłem w związku z tym, że skrócona nazwa natychmiast kojarzy się z jednym z

modelowych fagów *Escherichia coli*, i, szczególnie na początku, może utrudniać analizę prezentowanych wyników. Jednak po dłuższej chwili skrót ten już nie razi.

Przystępując do oceny uzyskanych rezultatów, musze przyznać, że prace przeczytałem z niesłabnącym zainteresowaniem. Różnorodność uzyskanych wyników i ich jakość przykuwa uwagę czytelnika. Jednocześnie praca jest spójna i dobrze ustrukturyzowana. Bardzo interesującą i jednocześnie niezwykle pracochłonną częścią pracy było uzyskanie oczyszczonych białek fagowych, uzyskanie dla nich surowic i określenie lokalizacji tych białek w kapsydzie fagów.

Moja uwagę przykuły wyniki, które jednoznacznie wskazują na to, iż przeciwciała klasy IgG są znacznie bardziej efektywne w inaktywacji fagów niż przeciwciała klasy IgM, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Czy doktorantka może skomentować ten wynik i zaproponować wyjaśnienie tej obserwacji?

Ciekawe było również potwierdzenie poprzednich obserwacji o zaangażowaniu układu dopełniacza w inaktywację bakteriofagów. Jednak fakt wcześniejszej obserwacji tego fenomenu, udokumentowanej w publikacji nie wchodzącej w skład tej rozprawy, powinien być przytoczony zarówno w wynikach, jak i w podsumowaniu, a nie tylko w dyskusji.

Zastosowanie modelu matematycznego do przewidywania efektu fagoterapii jest niewątpliwie bardzo ciekawym i interdyscyplinarnym podejściem. Niemniej jednak modelowanie tak skomplikowanych interakcji jest niezwykle trudne i bardzo często uzyskane wyniki rozmijają się z rzeczywistością. W związku z tym chciałbym zapytać, czy model był przetestowany na rzeczywistych wynikach?

Następna część pracy została poświęcona indukcji odpowiedzi immunologicznej w modelu mysim. W tym przypadku wyniki są również bardzo interesujące, lecz w czasie ich analizy nasunęło mi się kilka pytań:

- Czemu poziom przeciwciał klasy IgM specyficznych w stosunku do testowanych fagów widoczny na rycinie 5.23 w grupie kontrolnej jest na tak wysokim poziomie? Czy jest to sygnał tła zastosowanego testu ELISA?

- Z czego wynika wzrost poziomu przeciwciał klasy IgG w grupie kontrolnej w wynikach prezentowanych na rycinie 5.24? Czy myszy z grupy kontrolnej miały kontakt z myszami, którym podano bakteriofaga, co mogło wywołać transmisję niewielkich ilości faga do grupy kontrolnej i w konsekwencji nieznaczną reakcję immunologiczną?

Kolejną interesująca częścią badań było sprawdzenie częstości występowania przeciwciał blokujących badane fagi w zdrowej populacji ludzkiej. Bardzo duże różnice w częstości występowania przeciwciał blokujących, mimo dużego podobieństwa bakteriofagów są zastanawiające i niewątpliwie zasługują na dalsze badanie.

Nie do końca mogę się zgodzić z konkluzją w punkcie 5.9.4.. Doktorantka wyciąga tam wniosek że wyniki prezentowane na rycinie 5.31. świadczą o niższej immunogenności białka gpL29. Czy twierdzenie takie może zostać wsparte wynikami immunizacji myszy oczyszczonym białkiem? Jeśli nie, to z prezentowanych wyników można wysnuć jedynie wniosek o niższym mianie przeciwciał przeciw temu białku po immunizacji bakteriofagiem, lecz taki stan może wynikać nie koniecznie z samej immunogenności tego białka, lecz też np. ze struktury białek sąsiadujących w kapsydzie, które mogą maskować ważne epitopy.

W kolejnej części zaprezentowano wyniki badań wzrostu poziomu przeciwciał przeciw wybranym białkom w trakcie fagoterapii u pacjentów. W tym przypadku niezwykle cennym wynikiem było stwierdzenie faktu braku zasadniczych różnic w poziomie przeciwciał przeciw tym białkom bez względu na drogę podania faga, przy czym badane były wyniki przy podaniu miejscowym, doustnym oraz kombinacji tych dwóch dróg.

Po zaprezentowaniu uzyskanych wyników zostały one przedyskutowane w ciekawej i dojrzałej dyskusji w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy. Generalnie trudno się nie zgodzić z większością zawartych w niej wniosków. Niemniej jednak nie mogę zgodzić się z konkluzją, że obserwowana wyższa immunogenność bakteriofaga vB_PaeM_CEB_DP1 może świadczyć o jego częstszym występowaniu w środowisku naturalnym. Podejrzewam, że doktorantka w tym miejscu zastosowała zbyt duży skrót myślowy, co zmieniło sens jej wypowiedzi. Prawdopodobnie chodziło doktorantce o korelację częstości występowania przeciwciał rozpoznających tego faga w surowicach ludzi zdrowych i jego zwiększonej częstości występowania w środowisku. Nie można jednak moim zdaniem łączyć bezpośrednio immunogenności faga, która jest zdolnością do wywołania specyficznej odpowiedzi immunologicznej z jego częstością występowania w środowisku naturalnym.

Podsumowując, uważam, że praca jest niezwykle wartościowym wkładem w poznanie wpływu mechanizmów odporności swoistej na przebieg i rokowania terapii fagowej. Dobitnie świadczy o tym opublikowanie części wyników tej pracy w niezwykle prestiżowym czasopiśmie "Scientific Reports".

Wnioski końcowe

W oparciu o dokonaną analizę treści przedstawionej mi do recenzji pracy mgr. Katarzyny Hodyry-Stefaniak pt. "Immunogenność bakteriofagów z grupy PB1 u człowieka i w modelu mysim" na podstawie zawartych w niej wyników w odniesieniu do aktualnej wiedzy w temacie przedstawionych badań stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymogi ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w

zakresie sztuki stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień doktora w zakresie nauk biologicznych. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Hodyry-Stefaniak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie w uznaniu dla wartości i aktualności zawartych w recenzowanej pracy wyników, wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN o stosowne jej wyróżnienie.