



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej

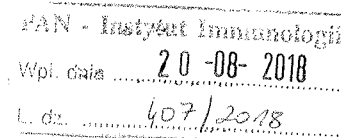
Kierownik: prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz

ul. Wieniawskiego 3
61-712 Poznań

tel. 61 8546 138

fax 61 8546 140

e-mail: szkaradkiewicza@poczta.onet.pl



Ocena

pracy doktorskiej mgr Fairoz Ali Al-Wrafy

pt.: “Immunochemical and biochemical characterization of phage receptors
in two clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*”

(“Immunochemiczna i biochemiczna charakterystyka fagowych receptorów
w dwóch szczepach klinicznych *Pseudomonas aeruginosa*”)

wykonanej pod kierunkiem: prof. dr hab. med. Andrzeja Gamiana

Recenzowana praca dotyczy oceny wpływu bakteriofagów, a w szczególności wyizolowanych z nich białek na wybrane kliniczne szczepy *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteriofagi są wirusami bakterii; charakteryzują się zdolnością do zakażenia, mogą namnażać się w komórkach bakterii i niszczyć swoiste dla nich szczepy bakterii. W świetle narastającej oporności drobnoustrojów na leki, występowania szczepów wielolekoopornych (MDR), a także w ostatnich latach - opornych na wszystkie dostępne leki (PDR), bardzo ważne jest intensywne poszukiwanie nowych skutecznych związków, w tym preparatów biologicznych, pozwalających na eradykację istotnych klinicznie, niebezpiecznych bakterii. Aktualnie uważa się, że terapia fagowa może stanowić realną alternatywę w leczeniu przewlekłych zakażeń. Jednak, prace nad zastosowaniem fagoterapii w medycynie prowadzone są w niewielu ośrodkach na świecie. Jednym z nich jest Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej

PAN we Wrocławiu; profesor Stefan Śłopek był inicjatorem tych badań w latach 80-tych XX wieku. Bardzo istotne dokonania w tym zakresie, pozwoliły profesorowi Andrzejowi Górskiemu na utworzenie w 2005 roku Ośrodka Terapii Fagowej przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu. W ostatniej dekadzie lat w związku z fagoterapią rozwinął się nowy kierunek badawczy, polegający na zastosowaniu w leczeniu zakażeń enzymów litycznych wytwarzanych przez bakteriofagi. W kontekście powyższych danych, temat pracy jest więc całkowicie uzasadniony, podejmuje bowiem aktualne i oryginalne zagadnienia. W kontekście powyższych danych, temat pracy jest więc całkowicie uzasadniony, podejmuje bowiem aktualne i oryginalne zagadnienie.

Praca jest przedstawiona w języku angielskim; ma układ typowy dla rozprawy doktorskiej. Liczy 125 stron wydruku komputerowego, jest podzielona na wstęp, z wydzielonymi założeniami i celem pracy, część metodyczną, prezentację wyników oraz dyskusję z wnioskami. Autorka cytuje 173 pozycji piśmiennictwa, z czego około 70% stanowią pozycje z okresu ostatniej dekady. Praca jest ilustrowana 35 rycinami i 12 tabelami.

We wstępie pracy przedstawiono aktualnie obowiązującą taksonomię bakterii z rodzaju *Pseudomonas*, chorobotwórczość *Pseudomonas aeruginosa* i jego mechanizmy lekooporności, czynniki wirulencji ze szczególnym uwzględnieniem opisu wytwarzanych polimerów egzopolisacharydu (EPS). Jednocześnie, Autorka bardzo obszernie scharakteryzowała bakteriofagi i ich zastosowania kliniczne. Część wstępna stanowi szerokie studium wiedzy w zakresie oportunistycznego patogenu – *Pseudomonas aeruginosa* i możliwości zastosowań bakteriofagów w leczeniu zakażeń.

Cel pracy i zadania badawcze zostały jasno przedstawione, a następnie konsekwentnie realizowane. Dla badań użyto dwóch szczepów *Pseudomonas aeruginosa* (PAR21 i PAR50), pochodzących od chorych z owrzodzeniem stopy cukrzycowej. W pierwszym etapie pracy uzyskano ze ścieków dwa bakteriofagi,

wykazując aktywność bójczą tylko wobec szczepu PAR50 oraz wyizolowano z nich dwa białka (PA-PP1 i PA-PP2), które oczyszczono z wykorzystaniem techniki chromatograficznej i zidentyfikowano za pomocą analizy porównawczej mas peptydów (NCBL, bazy danych UniProt). Jednak szkoda, że nie sklasyfikowano uzyskanych bakteriofagów. Podstawowe dane w tym zakresie są konieczne nie tylko dla uzupełnienia opisu zastosowanych w pracy bakteriofagów, ale także w celu włączenia prezentowanych wyników do badań porównawczych nad aktywnością ich enzymów wobec pałeczek Gram – ujemnych. Drugi etap pracy polegał na poszukiwaniu receptora dla wyizolowanych białek PA-PP1 i PA-PP2 oraz ocenie antybiotykowrażliwości szczepu PAR50 w obecności izolowanych białek. Zanalizowano aktywność enzymatyczną PA-PP1 i PA-PP2 wobec wytwarzanego przez badane szczepy *Pseudomonas aeruginosa* egzopolisacharydu – EPS i jego oczyszczonych frakcji oraz izolowano metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym białka błony zewnętrznej (OMP) szczepu PAR50. Badania prowadzono z wykorzystaniem klasycznych analiz immunochemicznych, opracowanego w tej pracy testu immunoenzymatycznego – ELISA dla oznaczeń EPS, produkowanego przez szczepy PAR21 i PAR50, a także z użyciem metody spektrofotometrycznej, zymografii testu punktowego (spot assay) oraz nowoczesnych metod analizy instrumentalnej: spektrometrii mas i spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego, a także skaningowej mikroskopii elektronowej. W ocenie lekowrażliwości szczepu PAR50 użyto testu dyfuzyjno-krażkowego. Zastosowane w pracy techniki badawcze odpowiadają międzynarodowym standardom, co jest niewątpliwą zasługą promotora tej pracy – Prof. dr hab. Andrzeja Gamiana. Jednak, wątpliwości mogą budzić metody otrzymywania egzopolisacharydu – EPS bezpośrednio z uzyskanej biomasy bakterii *Pseudomonas aeruginosa*, a także z supernatantów ich hodowli. Dobrze jest już przecież wiadomym, że optymalne wytwarzanie *in vitro* polimerów EPS przez różne gatunki bakterii, w tym *Pseudomonas aeruginosa* zachodzi w

następstwie ich adhezji do syntetycznych powierzchni w fazie akumulacji tworzących się mikrokolonii. Uzyskiwany zatem w pracy materiał z płynnego podłoża hodowlanego mógł nie być adekwatny do oceny aktywności anty-EPS izolowanych enzymów PA-PP1 i PA-PP2.

Uzyskane rezultaty zostały szczegółowo udokumentowane na rycinach i w tabelach. Autorka określiła m. cz. otrzymanych białek fagowych - PA-PP1 i PA-PP2, wynoszącą w zakresie 45-66 kDa i wykazała ich przynależność do rodziny proteaz serynowych. Jednocześnie, stwierdzono, że receptorem dla tych enzymów jest jedno z białek porynowych błony zewnętrznej (OMP) o m.cz. w zakresie 31-45 kDa. Enzymy o aktywności proteaz serynowych są także produkowane przez wiele gatunków bakterii pałeczek Gram-ujemnych, w tym z rodzaju *Pseudomonas*. Wcześniej wykazywano już, że niektóre białka porynowe OMP pałeczek Gram-ujemnych mogą spełniać funkcję receptora dla bakteriofagów. Jednak, w ocenianej pracy wskazuje się, że substratem dla poryn mogą być również białka fagowe – proteazy serynowe. Te nowe dane mogą mieć istotne znaczenie dla praktyki medycznej. Jednak, wydają się pozostawać w kontraście do dotychczasowej wiedzy o udziale proteaz serynowych w rozwoju zakażeń bakteryjnych i destrukcji tkanek gospodarza. Z kolei, analizując wrażliwość badanych szczepów na leki wykazano synergizm oddziaływania białek fagowych PA-PP1 i PA-PP2 z antybiotykiem β -laktamowym – piperacyliną, prowadzącego do rewersji stwierdzanej wcześniej oporności szczepu PAR50 na ten lek. Podobne wyniki strefy zahamowania wzrostu PAR50 uzyskano w obecności piperacyliny skojarzonej z inhibitorem β -laktamaz (str. 64), co stanowi interesujące spostrzeżenie.

W dyskusji omówiono otrzymane wyniki własne i w odniesieniu do aktualnego piśmiennictwa. Dyskusja jest szczegółowa, dobrze przeprowadzona, podejmuje szereg aspektów zagadnienia. Świadczy to o dobrym teoretycznym przygotowaniu doktorantki, o jej dojrzałości naukowej.

Wnioski pracy wynikają z rezultatów przeprowadzonych badań.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że wymienione uwagi krytyczne nie obniżają istotnie wartości merytorycznej pracy, a mogą być przydatne Autorce w dalszych badaniach i przygotowaniu publikacji.

Oceniana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm).

Dlatego mam zaszczyt wnieść do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu o przyjęcie tej rozprawy doktorskiej i dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, dnia 14.08.2018r.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej


Prof. dr hab. Andrzej Szkaradkiewicz