



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Prof. dr hab. Beata Sobieszczańska
Katedra i Zakład Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego
Im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Data: 4 września 2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Sosnowskiej
zatytułowanej „Charakterystyka mutantów *Klebsiella pneumoniae* izolowanych z
populacji traktowanej fagami litycznymi”
wykonanej w Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii pod kierunkiem
promotora prof. dr hab. Zuzanny Drulis-Kawa oraz promotora pomocniczego
dr Grażyny Majkowskiej-Skrobek

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja jest monografią naukową charakteryzującą mutanty szczepów *Klebsiella pneumoniae* wyselekcjonowane po zakażeniu bakteriofagami. Podstawą podjęcia przez Doktorantkę badań mutacji genetycznych indukowanych przez bakteriofagi wśród pałeczek *Klebsiella* jest szybko narastająca oporność tych bakterii na antybiotyki, co wymusza poszukiwanie nowych środków przeciwbakteryjnych, aktywnych wobec wieloopornych drobnoustrojów. Jednym z czynników antybakteryjnych wykorzystywanych z powodzeniem w przeszłości do zwalczania zakażeń bakteryjnych są bakteriofagi, swoiste pasożyty bakteryjne, które w przeciwieństwie do antybiotyków cechuje znaczna swoistość w stosunku do patogenów, a tym samym brak wpływu na fizjologiczną mikroflorę organizmu człowieka, aktywność ograniczona do miejsca zakażenia oraz brak efektów ubocznych, np. toksyczności dla człowieka. Cechy te sugerują, że terapia fagami jest niemal idealna. Niestety, są to pozory, weryfikowane podczas faktycznego stosowania bakteriofagów w leczeniu. Drobnoustroje patogenne dość szybko bowiem nabywają oporność na stosowane bakteriofagi, które dodatkowo są inaktywowane w organizmie człowieka przez przeciwciała, nierzadko zanim dotrą do miejsca zakażenia. Wszechobecność bakteriofagów w środowiskach okupowanych przez bakterie, będące gospodarzem dla fagów, m.in. w wodzie pitnej, sprawia, że większość ludzi posiada przeciwciała dla tych wirusów powszechnie obecnych w wodzie i żywności. Dodatkowo, kontakt bakterii

Katedra i Zakład Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

50-368 Wrocław ul. Tytusa Chałubińskiego 4

Tel. 71 784 13 08 e-mail: beata.sobieszczanska@umw.edu.pl

z fagami indukuje zmiany genetyczne w genomie drobnoustrojów, które nie tylko uodparniają się przeciw fagom, ale także nabywają nowe cechy genetyczne, zwiększające ich wirulencję. Stąd, szczegółowa znajomość interakcji na linii bakteria-swoisty bakteriofag i konsekwencji tych interakcji ma zasadnicze znaczenie dla opracowania skutecznej terapii fagowej, która w przyszłości umożliwi niemożliwe, a więc leczenie zakażeń wywoływanych przez szczepy bakterii odporne na wszystkie znane antybiotyki.

Ocena merytoryczna dysertacji

Celem badań Doktorantki była ocena zmian genetycznych w obrębie genomu oraz plazmidu pięciu klinicznych szczepów *Klebsiella pneumoniae* poddanych interakcji z fagami oraz charakterystyka zmian fenotypowych, towarzyszących zmianom genetycznym.

Opis wykonanych badań został przedstawiony w monografii liczącej łącznie 185 stron o typowym dla tego typu prac naukowych układzie, tj. spisie treści, wstępie, celu badań, materiałach i metodach, wynikach, dyskusji, wnioskach, streszczeniach i bibliografii.

Wstęp

Wstęp rozprawy doktorskiej w sposób interesujący i wyczerpujący wprowadza czytelnika w temat podjętych badań. Kanwą tej części pracy jest bogata i aktualna literatura specjalistyczna z zakresu genetyki, badań na bakteriofagami, lekooporności wśród drobnoustrojów oraz pałeczek *Klebsiella*. Na uwagę zasługują cytowane przez Doktorantkę publikacje promotora rozprawy, prof. dr hab. Zuzanny Drulis-Kawa dotyczące badań bakteriofagów, a opublikowane w czasopismach o międzynarodowym zasięgu, podkreślające kompetencje opiekuna naukowego dysertacji. Treść wstępu urozmaicają liczne ryciny ułatwiające lepsze zrozumienie opisywanych zagadnień. Wstęp jest wyczerpujący, ale nie nużący i opisuje wszystkie ważne antygeny pałeczek *Klebsiella*, które Doktorantka oznaczała w części doświadczalnej.

Cele i założenia rozprawy doktorskiej

Doktorantka postawiła sobie ambitny cel weryfikacji hipotezy zakładającej spadek wirulencji bakterii zakażonych swoistymi fagami. Cele pracy zostały opisane zwięźle i jasno.

Metody

Rozdział Materiały i Metody jest opisany starannie i treściwie, zawiera liczne tabele oraz ryciny prezentujące niezbędne dane, np. charakterystykę badanych szczepów bakterii i fagów, sekwencje starterów, skład mieszaniny reakcji PCR, markery mas do odczytu wyników elektroforezy, jakie należy podać opisując część doświadczalną. Rozdział ten doskonale prezentuje rozległy warsztat badawczy Doktorantki, co zasługuje na uznanie. Aby osiągnąć postawione cele pracy, mgr Ewelina Sosnowska wykorzystała liczne techniki badawcze, od hodowli bakteryjnych i namnażania fagów, poprzez

mianowanie i typowanie fagów, izolację bakteryjnej endotoksyny, oznaczenia wrażliwości bakterii na antybiotyki, po testy *in vivo* na modelu larw mola woskowego (*Galleria melonella*), ekspresję depolimeraz fagowych, sekwencjonowanie genomów bakteryjnych, reakcje PCR.

Wyniki

Wyniki badań zostały przedstawione w sposób klarowny i zobrazowane licznymi tabelami i rysunkami. Rozdział Wyniki rozpoczyna rysunek przedstawiający schemat przeprowadzonych doświadczeń, znacznie ułatwiający śledzenie kolejnych etapów badań. Na początku Doktorantka wybrała pięć badanych izolatów *K. pneumoniae* pochodzących z kolekcji szczepów Zakładu Biologii Patogenów i Immunologii Uniwersytetu Wrocławskiego (ZBPI) oraz szczep referencyjny wytwarzający β -laktamazę SHV-18, a także pięć fagów swoistych dla *K. pneumoniae*, również z kolekcji ZBPI z rodzin podowirusów *Autographiviridae*, sifowirusów *Drexelvirusidae* oraz miowirusów *Myoviridae*, reagujące z receptorem otoczkowym CPS bakterii lub rozpoznających inne typy receptorów bakteryjnych. Doktorantka scharakteryzowała te fagi pod kątem ich zdolności rozpoznawania konkretnych receptorów bakteryjnych oraz produkcji depolimeraz.

Z zakażonych szczepów Doktorantka wyizolowała 704 izolaty bakterii, które co warto podkreślić, pochodziły zarówno z planktonicznej fazy wzrostu, jak i struktury biofilmu, a następnie oceniła ich profile fagowe i potwierdziła przynależność wybranych izolatów do konkretnych szczepów *K. pneumoniae* na podstawie amplifikacji unikalnych genów. W dalszej części rozdziału Wyniki, Doktorantka szczegółowo charakteryzuje populacje badanych izolatów bakteryjnych i ich wrażliwości na zastosowane pojedyncze fagi oraz ich mieszaniny. Efektem tych badań jest udokumentowane przez Doktorantkę zjawisko oporności krzyżowej na inne fagi wykorzystujące ten sam receptor bakteryjny u bakterii poddanych fagowej presji selekcyjnej. Doktorantka dokonała również ważnej obserwacji uwrażliwienia mutantów bakterii na miowirusy po selekcji fagami rozpoznającymi i degradującymi otoczki bakteryjne. W dalszej części Doktorantka przedstawiła wyniki badań, będących konsekwencją poczynionych wcześniej obserwacji profili fagowych, zakładając iż zmiany strukturalne w postaci braku otoczki wpływają na ekspozycję receptorów dla miowirusów takich jak LPS lub białka powierzchniowe. Wykonane doświadczenia wykluczyły LPS jako receptor, ale wskazały potencjalną rolę białek jako receptorów dla miowirusów. Generalnie, białkowe bakteryjne receptory fagowe są słabo scharakteryzowane i mało poznane o czym świadczą pojedyncze publikacje na ten temat dostępne w Internecie. Stąd, badania Pani mgr Eweliny Sosnowskiej mają dużą wartość naukową, nawet jeśli receptory te nie zostały jeszcze szczegółowo zbadane.

Kolejne wyniki omawiają zmiany fenotypowe i genotypowe u szczepów *K. pneumoniae* zakażonych wybranymi fagami. Doktorantka celowo wybrała do badań antygeny bakteryjne, należące do PRR i pełniące ważną rolę w zakażeniach u ludzi m. in. strukturę LPS odpowiedzialną za indukowanie odczynu zapalnego, produkcję egzopolisacharydu, hamującego fagocytozę oraz utrudniającego dostęp antybiotyków,

wrażliwość na układ dopełniacza, i w końcu patogenność dla larw mola woskowego, jako organizmu modelowego wrodzonych mechanizmów obronnych ssaków. Doktorantka wykazała zmiany struktury LPS typu konwersja do formy gładkiej lub szorstkiej u nielicznych izolatów zakażonych miowirusami, co Jej zdaniem niekoniecznie związane jest z zakażeniem fagowym. W przeciwieństwie do LPS, Doktorantka udokumentowała wpływ selekcyjnej presji sifowirusem i podowirusami na zdolność pałeczek *Klebsiella* do produkcji egzopolisacharydu (fenotypu mukoidalnego), co Jej zdaniem stanowi mechanizm obronny przeciw zakażeniu fagami. Jej dalsze badania wykazały, że mukoidalne szczepy *Klebsiella* nie zawsze wykazywały zwiększoną patogenność na modelu *in vivo* lub drażliwość na przeciwbakteryjne działanie dopełniacza. Mając na uwadze istotną rolę egzopolisacharydu przewlekłych zakażeń bakteryjnych u ludzi, pragnę zauważyć, że odkrycie to może mieć istotne znaczenie w medycynie i badaniach patomechanizmów chronicznych zakażeń *Klebsiella*. Supresja wirulencji ma kluczowe znaczenie dla przetrwania bakterii w organizmie człowieka i efektywnego pozyskiwania składników odżywczych oraz namnażania.

Dalej Doktorantka wykazała rolę selektywnej presji miowirusa i podowirusa na wzrost drażliwości pałeczek *Klebsiella* na bakteriobójczą aktywność dopełniacza z towarzyszącą zmniejszoną drażliwością larw mola woskowego na zakażenie *Klebsiella*. Przeciwnostawne wyniki badań Doktorantka uzyskała dla sifowirusa, który nadawał szczepom *Klebsiella* zwiększoną zjadliwość. Wyniki te uwypukliły zróżnicowany wpływ konkretnych fagów na wirulencję pałeczek *Klebsiella*, a prawdopodobnie także inne gatunki bakterii. Analiza genotypowa, którą wykonała Doktorantka dotyczyła zmian czynników transkrypcyjnych oraz mutacji wybranych genów, kodujących m. in. otoczkę i LPS, które zwiększały u *Klebsiella* produkcję egzopolisacharydu oraz uwalnianie profagów z genomu bakterii. Na koniec, Doktorantka wykonała oznaczenia drażliwości na antybiotyki badanych szczepów *Klebsiella*, które wykazały, że sifowirusy mogą indukować delecje sekwencji plazmidowych, zmieniając drażliwość *Klebsiella* na antybiotyki, potwierdzając ich udział nie tylko w nadawaniu oporności wśród drobnoustrojów, ale także w jej ograniczaniu. Według Doktorantki wpływ ten również zależy od typu faga zakażającego bakterie i może być związany ze wzrostem oporności na antybiotyki.

Dyskusja

Rozdział Dyskusja został podzielony na sekcje omawiające najważniejsze wyniki pracy na gruncie dotychczasowej wiedzy. Bardzo dobrze napisany rozdział puentujący najważniejsze odkrycia Doktorantki, choć zaskoczyła mnie niekonsekwencja omawiania wyników od zjadliwości badanych szczepów *Klebsiella*, a nie jak to miało miejsce w wynikach, receptorów fagowych. Usprawiedliwiam jednak tą niekonsekwencję twórczym umysłem Pani mgr Eweliny Sosnowskiej, którego dowodem jest niniejsza dysertacja naukowa.

Wnioski

Pracę wieńczy 12 wniosków płynących z wykonanych badań. Wnioski 10 – 12 dotyczące mutacji genowych związanych z otoczką, a wpływających również na biofilmu i strukturę LPS, w moim odczuciu powinny zostać połączone w jeden wniosek. Tym nie mniej, przedstawione wnioski rekapituluja główne odkrycia Doktorantki.

Streszczenia i piśmiennictwo

Dysertację kończą dobrze napisane streszczenia w j. polskim i j. angielskim oraz 144 pozycje piśmiennictwa, 5 cytowanych książek oraz adresy stron Internetowych, z których Doktorantka korzystała m.in. w analizie sekwencjonowania. Ponadto praca zawiera na końcu spis 102 rysunków i 45 Tabel zaprezentowanych w dysertacji.

Uwagi krytyczne i pytania do Doktorantki

- 1) Pomimo bardzo starannego opracowania pracy, pojawiają się w niej nieliczne literówki.
- 2) W części dysertacji Wyniki – Analiza profili fagowych (str. 67) w nawiasach podano błędne oznaczenia tabel prezentujących profile fagowe – powinno być Tabela 14 – 18.

Moje powyższe uwagi wynikają przede wszystkim z obowiązku recenzenta, nie mają natomiast na celu umniejszenia jakości dysertacji, a szczególnie jej wartości merytorycznej.

Pytania do Doktorantki

1. Analizując wyniki badań dotyczących zmian fenotypu LPS u zakażonych fagami szczepów *Klebsiella*, stwierdza Pani, że obserwowane u nielicznych izolatów zmiany formy endotoksyny niekoniecznie indukowane są fagami, a mogą wynikać z wpływu warunków hodowli. W moim rozumieniu eksperymentu naukowego kontrola jest wyznacznikiem zmian struktury badanego antygeny. Jakich Pani zdaniem niesprzyjających warunków, o których Pani wspomina mogły wpłynąć na zmiany struktury LPS u badanych izolatów? Co więcej, wykazany przez Panią wzrost wrażliwości pałeczek *Klebsiella* zakażonych fagami na dopełniacz, wg Pani wniosku z doświadczeń (str. 89) może wynikać ze zmian struktury LPS.
2. Czy Pani zdaniem jest możliwe w przyszłości kontrolowane stosowanie wyselekcjonowanych fagów do zwalczania zakażeń szpitalnych? Jakich warunków musiałby spełniać fagi, aby można było stosować je w leczeniu?

Podsumowanie

Rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane rozprawie na stopień naukowy doktora zgodnie z ustawą „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” z dnia 14 marca 2023 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, w związku z art. 179 ust 3 ustawy z dnia 2. lipca 2018 r., a ponadto zawiera obszerny materiał o dużej wartości naukowej. Doktorantka bardzo dobrze opanowała warsztat badawczy a tematyka przedłożonej mi do oceny Jej dysertacji doktorskiej

stanowi istotny wkład w rozwój nauki, która niewątpliwie może zostać wykorzystana na szerszą skalę, m.in. w zmaganiach leczenia zakażeń wieloopornymi szczepami bakteryjnymi. Ponadto Pani mgr Ewelina Sosnowska wykazała się umiejętnością planowania doświadczeń i wszechstronnością ujęcia podjętego tematu, co świadczy o Jej dojrzałości naukowej.

W związku z tym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie mgr Eweliny Sosnowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na duży wkład pracy Doktorantki oraz istotne znaczenie naukowe tematu i sposób przedstawienia wyników, wnioskuję również do Przewodniczącej oraz Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
prof. dr hab. Beata Sobieszkańska