



Gdańsk 17.11.2023

Dr hab. inż. Piotr Szweda
Katedra Technologii Leków i Biochemii
Wydział Chemiczny
Politechnika Gdańska

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Xymeny Stachurskiej zatytułowanej:
„Wpływ wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność
bakteriolityczną bakteriofagów”**

Charakterystyka tematyki pracy doktorskiej

Zjawisko lekooporności drobnoustrojów staje się jednym z największych wyzwań współczesnej medycyny. W trakcie ostatnich dwóch-trzech dekad liczba infekcji wywoływanych przez mikroorganizmy (bakterie a także grzyby) o obniżonej wrażliwości na stosowane chemioterapeutyki bardzo szybko rośnie. Szczególnie trudne są terapie zakażeń wywoływanych przez bakterie wielolekooporne zaliczane do tzw. grupy ESKAPE (akronimu wywodzi się od nazw gatunków/rodzajów bakterii zaliczanych do tej grupy: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* oraz *Enterobacter*). Niestety, nie idzie to w parze z identyfikacją i wprowadzaniem do praktyki klinicznej nowych antybiotyków. Stąd konieczne jest poszukiwanie nowych, alternatywnych i przede wszystkim skutecznych metod profilaktyki i zwalczania infekcji wywoływanych przez bakterie i grzyby patogenne. Badania, które w ramach swojej pracy doktorskiej prowadziła Pani mgr inż. Xymena Stachurska wpisują się w ten nurt. Na stronach 14 i 15 Autorka rozprawy przedstawiła cel ogólny i cztery cele szczegółowe swoich badań. Podstawowym obiektem zainteresowań Doktorantki było określenie wpływu wybranych antybiotyków, nanocząstek oraz ekstraktów roślinnych na aktywność przeciwbakteryjną bakteriofagów litycznych. Jest to tematyka bardzo ciekawa i przede wszystkim oryginalna. Bakteriofagi zostały odkryte w 1915 r. przez Williama Tworta, a już w 1917 r. (10 lat przed odkryciem penicyliny) Felix d'Herelle zwrócił uwagę na ich potencjał terapeutyczny – „jako czynniki skutecznie zabijające bakterie”. Paradoksalnie, czynnikiem, który na wiele lat zahamował badania potencjału leczniczego fagów i ich bardziej powszechne stosowanie w praktyce klinicznej, był dostęp do coraz większej ilości antybiotyków. Od mniej więcej dwudziestu – trzydziestu lat obserwuje się ponowny, wyraźny wzrost zainteresowania bakteriofagami, także pod kątem wykorzystania ich jako zamiennika antybiotyków. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę zostały opublikowane w postaci czterech prac (trzy już opublikowane, jedna w trakcie recenzji), które ukazały się w renomowanych czasopiśmie naukowych i bez wątpienia stanowią istotny wkład w literaturę światową dotyczącą interakcji bakteriofagów z innymi czynnikami przeciwbakteryjnymi. Ponadto jedna z prac (D-1) zawiera szereg wskazówek dotyczących metodologii badań interakcji fagów litycznych i antybiotyków przeciwbakteryjnych, co dodatkowo podnosi wartość tej publikacji. W mojej ocenie oryginalna tematyka i dobrze przygotowany plan badań są istotnymi atutami recenzowanej pracy doktorskiej.

Ocena formalna pracy doktorskiej

Kandydatka do stopnia naukowego doktora Pani mgr inż. Xymena Stachurska przedłożyła rozprawę doktorską pt. „Wpływ wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność bakteriolityczną bakteriofagów”, która została wykonana pod kierunkiem Pana dr. hab. inż. Pawła Nawrotka, prof. ZUT w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Podstawą rozprawy jest cykl 4 jednotematycznych publikacji, w których badano wpływ różnych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność bakteriolityczną bakteriofagów. Zasadniczą część opracowania stanowią więc kopie publikacji. Poza tym najważniejszymi częściami pracy są:

1. Opis wkładu Doktorantki w przygotowanie poszczególnych prac oraz zestawienie parametrów bibliometrycznych prac stanowiących podstawę pracy – strony 2 i 3;
2. Przedstawienie osób i jednostek naukowych, z którymi Autorka pracy prowadziła współpracę – strona 4;
3. Spis treści – strona 7;
4. Streszczenie w dwóch wersjach językowych – strony 8-11;
5. Wprowadzenie – strony 12 i 13;
6. Przedstawienie hipotez pracy – strona 14;
7. Przedstawienie celu prowadzonych badań – strony 14 i 15;
8. Opis materiałów i metod badawczych – strony 15 – 23;
9. Omówienie uzyskanych wyników – strony 23 – 29;
10. Wnioski – strony 29 i 30;
11. Spis piśmiennictwa – łącznie 43 pozycje, głównie publikacje naukowe z renomowanych czasopism naukowych, które ukazały się w przeciągu ostatnich 15 lat, strony 30-32
12. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowych – strony 32 – 37

W dalszej części pracy, w której nie stosowano numeracji stron, przedstawiono:

1. Załącznik 1 - Kopie trzech publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską;
2. Załącznik 2 - Kopie suplementów do tych publikacji;
3. Załącznik 3 – Oświadczenia współautorów ww. prac;
4. Załącznik 4 – Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego Autorki.

W mojej ocenie taki układ dysertacji jest prawidłowy i nie budzi poważnych zastrzeżeń. Przy czym muszę przyznać, że z punktu widzenia recenzenta zauważyłem kilka niedogodności wynikających z takiej organizacji tekstu opracowania:

1. Uważam, że należało konsekwentnie kontynuować numerację stron w pracy – także w części, w której przedstawiono załączniki. W aktualnej wersji recenzentowi trudno odnosić się do tych fragmentów tekstu, które są zlokalizowane w części dysertacji, w której strony nie są numerowane (podanie strony byłoby w tym miejscu dużym ułatwieniem);
2. Opis wkładu Autorki pracy w prowadzone badania i przygotowanie manuskryptów publikacji należało umieścić po spisie treści;
3. Suplementy do kolejnych publikacji chyba lepiej byłoby prezentować bezpośrednio po każdej z prac;
4. Najważniejsza moja uwaga dotyczy publikacji nr 4, która została zakwalifikowana przez Autorkę jako element cyklu publikacji, ale nie został jeszcze oficjalnie zaakceptowany przez recenzentów (jest w trakcie oceny). Myślę, że mimo to należało

w pracy przedstawić „preprint”, który dostępny jest już pod adresem internetowym, który Pani mgr inż. Xymena Stachurska zaprezentowała na stronie nr 3.

Są to oczywiście drobne uchybienia, które nie mają wpływu na ogólną wartość i ocenę pracy.

Należy przyznać, że pod względem edytorskim i formalnym praca przygotowana jest bardzo starannie. Nie stwierdziłem istotnych błędów w zakresie nazewnictwa fachowego, w tekście rozprawy praktycznie nie występują błędy edytorskie – tzw. literówki. Z obowiązku recenzenta wspomnę tylko o drobnych uchybieniach edytorskich:

1. Strona nr 2 – „mikrobiologiczne reagenty testowe” – trochę niejasne sformułowanie;
2. Strona nr 15 – „Ocena wpływu sześciu wybranych nanocząstek ...” – raczej proponowałbym „sześciu wybranych typów nanocząstek”;
3. Strona nr 19 – „pomiar OD₆₀₀” – typowy żargon laboratoryjny, oczywiście chodzi tu o pomiar gęstości optycznej zawiesiny komórek, który wykonano przy długości fali równej 600 nm.;
4. Strona nr 20 – „worteksując i końcowo wirując” - oczywiście są to skróty myślowe;
5. W opisach uzyskanych wyników doktorantka podaje dwie wersje językowe tematyki badawczej, która była analizowana w kolejnych „Zagadnieniach”. W mojej ocenie podawanie angielskiej wersji językowej jest zbędne;
6. Strona nr 28 - „odbicia wzrostu hodowli” – to sformułowanie też zakwalifikowałbym jako żargon laboratoryjny;
7. Strona nr 36 – Autorka pisze „... zespół badawczy, którego byłam cześcią...” – w mojej ocenie lepiej brzmi sformułowanie – zespół badawczy, którego byłam członkiem.

Są to drobne uchybienia, które nie mają wpływu na ogólną wartość pracy.

Ocena merytoryczna pracy doktorskiej

Pod względem merytorycznym rozprawę oceniam bardzo wysoko. Na uwagę zasługuje multidyscyplinarny charakter przeprowadzonych badań oraz fakt wykorzystania szerokiego spektrum technik badawczych. Wyniki uzyskanych badań zostały już opublikowane. Trzy prace ukazały się już w renomowanych czasopismach naukowych, jedna jest aktualnie oceniana przez recenzentów. Zaakceptowane prace, z pewnością zostały już poddane wnikliwej ocenie recenzentów. Pozwolę sobie w związku z tym przedstawić jedynie krótki komentarz odnośnie każdej prac.

[D-1] Stachurska, X., Roszak, M., Jabłońska, J., Mizielińska, M., Nawrotek, P. (2021)
Double-layer agar (DLA) modifications for the first step of the phage-antibiotic synergy (PAS) identification. *Antibiotics*, 10, 1306. DOI: 10.3390/antibiotics10111306. IF2021 – 5,222; 70 pkt. MEiN

Jest to praca typowo metodologiczna. Doktorantka badała różne warianty/modyfikacje testów wykorzystywanych do oceny interakcji antybiotyków – fag lityczny. Spośród 43 antybiotyków, zaliczanych do różnych klas pod względem budowy chemicznej i co za tym idzie mechanizmu działania wyraźny efekt synergii zaobserwowano dla ampicyliny i cefotaksymu. Dla tych dwóch antybiotyków Pani mgr inż. Xymena Stachurska przeprowadziła badania mające na celu wybór optymalnego wariantu metody podwójnej warstwy agaru. Test z użyciem ampicyliny wykazał mniejsze zróżnicowanie między wynikami z różnych modyfikacji metody, w przeciwieństwie do testu z użyciem cefotaksymu. W przypadku tego antybiotyku największą łączną liczbę łysinek uzyskano podczas dodawania antybiotyku do agaru dolnego w obecności agaru górnego. Efektem takiego zabiegu był wzrost ogólnej liczby łysinek o 114% w porównaniu z użyciem samego agaru górnego i o

37% w porównaniu z metodą standardową. Z kolei najlepszą wizualizację efektu PAS uzyskano w wariancie metody, w którym użyto krążki antybiotykowe. W tym przypadku nie zgodziłbym się jednak z informacją przedstawioną na stronie 24: „Antybiotyki te spowodowały zwiększoną ilość morfologicznie większych (niż standardowe) łysinek faga T45, w obrębie stref zahamowania wzrostu bakterii wywołanych antybiotykiem – efekt wskazujący na synergę.” W strefie zahamowania wzrostu bakterie nie rosną, nie można tam więc zaobserwować łysinek. Z resztą w dalszej części pracy Autorka wyraźnie stwierdza: „Ponieważ synergia jest obserwowana jako znacznie zwiększone morfologicznie łysinki fagowe w strefach otaczających krążki antybiotykowe, w których występuje subletalne stężenie leku ...”. Efekt ten jest szczególnie dobrze widoczny na zdjęciach, które przedstawiono w suplemencie do publikacji.

(D-2) Stachurska, X., Cendrowski, K., Pachnowska, K., Piegat, A., Mijowska, E., Nawrotek, P. (2022) Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7179, DOI: 10.3390/ijms23137179. IF2022 – 6,208; 140 pkt. MEiN

W mojej ocenie jest to najciekawsza praca, którą Pani mgr inż. Xymena Stachurska włączyła do cyklu publikacji stanowiących podstawę pracy doktorskiej. Celem badań Doktorantki, które prowadzono we współpracy z Katedrą Fizykochemii Nanomateriałów ZUT, było określenie wpływu wybranych typów nanocząstek na aktywność lityczną faga T4. Bez wątplenia dużą zaletą tej pracy jest bardzo dobry plan badań, w którym uwzględniono zarówno analizę właściwości fizykochemicznych jak i biologicznych wybranych typów nanocząstek. Doktorantka zaobserwowała wyraźną korelację pomiędzy wartością potencjału zeta (ZP) a sposobem łączenia się nanocząstek z wirionami badanego faga, co z kolei wpływa na aktywność bakteriolityczną wirusa. Doktorantka wykazała, że: 1. w przypadku materiałów, dla których wartość ZP < -35 mV nanocząstki wiążą się elektrostatycznie (odwracalnie) z dodatnio naładowanymi włóknami ogonka faga (co oczywiście skutkuje obniżeniem zdolności litycznych); 2. w przypadku nanomateriałów charakteryzujących się wartością ZP > 35 mV następuje ich łączenie się z główkami faga (pod względem aktywności bakteriolitycznym powoduje to wzrost aktywności); 3. nanomateriały, których wartości potencjału zeta zawierają się pomiędzy tymi wartościami oddziałują z fagami w sposób nieuporządkowany. Uważam, że wyniki te mają dużą wartość zarówno poznawczą jak i aplikacyjną. Odnośnie tej części badań mam dwa pytania, i byłbym wdzięczny gdyby Pani mgr inż. Xymena Stachurska mogła się do nich odnieść w trakcie obrony:

1. Czy wartości graniczne potencjałów ZP w odniesieniu do ich sposobu oddziaływania z fagiem T4 są rzeczywiście takie ostre, czy są to wartości „umowne”;
2. Czy na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że sposób oddziaływania dowolnego typu nanocząstek (o ustalonej wartości ZP) z dowolnym fagiem jest przewidywalny?

W obydwu przypadkach chodzi o krótki komentarz/opinię Doktorantki, absolutnie nie oczekuję dogłębnej analizy tych zagadnień.

W przypadku kolejnych dwóch prac Pani mgr inż. Stachurska skupiła się na badaniu interakcji pomiędzy fagami i ekstraktami uzyskanymi z roślin trzech wybranych gatunków (jeżówki purpurowej, ruty i stewii). Na podstawie uzyskanych wyników przygotowano manuskrypty dwóch publikacji:

[D-3] Stachurska, X., Mizielińska, M., Ordon, M., Nawrotek, P. (2023) Combinations of echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*) plant extracts with lytic phages: a

study on interactions. *Applied Sciences*, 13, 4575, DOI: 10.3390/app13074575. IF2023 – 2,838; 100 pkt. MEiN – praca opublikowana

[B-1] Stachurska, X., Mizielińska, M., Ordon, M., Nawrotek, P. The use of plant extracts and bacteriophages as an alternative therapy approach in combating bacterial infections: the study of lytic phages and *Stevia rebaudiana*. DOI: 10.1101/2023.06.27.546765 – praca w trakcie oceny

W wyniku przeprowadzonych badań (bardzo dobrze zaplanowanych) we wszystkich przypadkach Doktorantka zaobserwowała efekt antagonistyczny. Odnoszę wrażenie, że Pani mgr inż. Stachurska jest nieco zawiedziona tym faktem. Moim zdaniem zupełnie niepotrzebnie. Po pierwsze jest to bardzo ciekawa informacja o dużym znaczeniu poznawczym i aplikacyjnym. W przyszłości może być cenną wskazówką przy ustalaniu diety dla osób leczonych za pomocą bakteriofagów. Poza tym w literaturze, wysoką aktywność lityczną fagów zwykle klasyfikuje się jako istotną zaletę. Moim zdaniem nie do końca słusznie. Należy pamiętać, że w warunkach *in vivo* duża liczba komórek bakteryjnych skutkuje bardzo szybkim uwalnianiem do organizmu/krwioobiegu gospodarza (np. człowieka lub zwierzęcia) dużej ilości czynników prozapalnych (np. fragmentów peptydoglikanu) co z kolei może spowodować bardzo intensywną (niepożądaną) reakcję układu immunologicznego. Uważam, że w przyszłości substancje/produkty częściowo hamujące aktywność lityczną bakteriofagów także mogą znaleźć ciekawe zastosowania w praktyce klinicznej. Żałuję, że Doktorantka nie zamieściła w pracy manuskryptu („preprintu”) ostatniej z prac. Analizowałem tą pracę i uważam, że podobnie jak pozostałe prace stanowiące podstawę powyższej dysertacji jest to bardzo dobra publikacja naukowa.

Opis Dorobku Doktorantki

Wyniki, które Doktorantka uzyskała w trakcie realizacji swojej pracy doktorskiej zostały już opublikowane w postaci trzech artykułów, które ukazały się renomowanych czasopismach naukowych o wysokich wartościach IF:

[D-1] Stachurska, X., Roszak, M., Jabłońska, J., Mizielińska, M., Nawrotek, P. (2021) Double-layer agar (DLA) modifications for the first step of the phage-antibiotic synergy (PAS) identification. *Antibiotics*, 10, 1306. DOI: 10.3390/antibiotics10111306. IF2021 – 5,222; 70 pkt. MEiN

(D-2) Stachurska, X., Cendrowski, K., Pachnowska, K., Piegat, A., Mijowska, E., Nawrotek, P. (2022) Nanoparticles influence lytic phage T4-like performance *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7179, DOI: 10.3390/ijms23137179. IF2022 – 6,208; 140 pkt. MEiN

[D-3] Stachurska, X., Mizielińska, M., Ordon, M., Nawrotek, P. (2023) Combinations of echinacea (*Echinacea purpurea*) and rue (*Ruta graveolens*) plant extracts with lytic phages: a study on interactions. *Applied Sciences*, 13, 4575, DOI: 10.3390/app13074575. IF2023 – 2,838; 100 pkt. MEiN

Kolejna praca jest aktualnie w trakcie oceny:

[B-1] Stachurska, X., Mizielińska, M., Ordon, M., Nawrotek, P. The use of plant extracts and bacteriophages as an alternative therapy approach in combating bacterial infections: the study of lytic phages and *Stevia rebaudiana*. DOI: 10.1101/2023.06.27.546765

Zgodnie z informacją przedstawioną na stronie nr 3 sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) tych prac wynosi 14,268, natomiast ogólna liczba punktów wg wykazu czasopism naukowych MEiN z dnia 1 grudnia 2021 r. wynosi 310. Są to parametry

bardzo dobre, osiągnięcie to należy zaklasyfikować jako duży sukces Doktorantki jak i promotora Pana dr hab. inż. Pawła Nawrotka. Z przeprowadzonej przez mnie analizy wynika, że prace te cieszą się dużą popularnością i były już cytowane 12 razy (od opublikowania pierwszej z prac upłynęły tylko dwa lata).

Na stronach 2 i 3 Pani mgr inż. Xymena Stachurska przedstawiła deklaracje (poparte stosownymi oświadczeniami współautorów, Załącznik nr 3, końcowa część rozprawy strony nienumerowane), z których wynika, że miała ona wiodący udział zarówno w zakresie realizacji prac badawczych jak i przygotowaniu manuskryptów publikacji. Przy czym, chciałbym zaznaczyć, że w mojej ocenie udziały procentowe 80 czy 85%, wydają się trochę przeszacowane, oznacza to udział pozostałych współautorów na poziomie maksymalnie 5% (czyli bardzo niewielkim). Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich prac stanowiących podstawę pracy doktorskiej a ponadto w przypadku prac D-1, D-2 i D-3 jest także autorem korespondencyjnym (dość rzadka sytuacja). W przypadku czwartej z prac Doktorantka także jest pierwszym autorem, natomiast kwestia autora korespondencyjnego nie jest dla mnie jednoznaczna. Z przeprowadzonej przez mnie analizy „preprintu” tej publikacji wnioskuję, że także w tym przypadku Pani mgr inż. Xymena Stachurska jest autorem korespondencyjnym, ale formalnie nie jest to potwierdzone w tekście tego opracowania.

Bez wątplenia świadczy to o dużym zaangażowaniu Pani mgr inż. Xymeny Stachurskiej w realizację projektu badawczego dotyczącego jej pracy doktorskiej.

Natomiast analizując dorobek naukowy Doktorantki byłem pozytywnie zaskoczony jej dużym zaangażowaniem w badania nie związane bezpośrednio z przygotowywaną pracą doktorską. Pani mgr inż. Xymena Stachurska jest współautorem 11 publikacji (w dwóch przypadkach pierwszym autorem) i 3 zgłoszeń patentowych, które nie zostały uwzględnione w cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską. Dziewięć z tych prac opublikowano w czasopiśmie z listy JCR. W Załączniku nr 4 (brak numeru strony) Doktorantka przedstawiła podsumowanie całości swojego dorobku, sumaryczny IF wynosi 48,046, liczba punktów wg wykazu MEiN 1170, H-indeks – 6, prace były cytowane 84 razy (na dzień złożenia pracy, do dnia 10.11.2023 liczba cytowań tych prac wzrosła do 118 a wartość indeksu H do 7). Ponadto Pani mgr inż. Stachurska jest współautorką trzech monografii naukowych, chętnie i aktywnie uczestniczyła w różnego rodzaju szkoleniach, warsztatach, praktykach i stażach, co także jest ważnym elementem jej aktywności naukowej. W tekście dysertacji Autorka wymienia 5 doniesień konferencyjnych i udział w kolejnych 13 konferencjach. Prosiłbym o krótkie wyjaśnienie dlaczego rozróżniono te dwie grupy (Doniesienia konferencyjne/Udział w konferencjach). Bez wątplenia jest to imponujący dorobek naukowy, który świadczy o dużym zaangażowaniu Doktorantki w działalność naukową Katedry, w której miała możliwość pracować.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Xymeny Stachurskiej pt.: „Wpływ wybranych czynników przeciwdrobnoustrojowych na aktywność bakteriolityczną bakteriofagów” jest oryginalną, cenną zarówno pod względem naukowym jak i aplikacyjnym, rzetelnie i starannie przygotowaną pracą naukową, która spełnia wszystkie wymogi formalne i merytoryczne stawiane pracom doktorskim 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 (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789), zgodnie z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669). W związku z powyższym zwracam się do Rady Dyscypliny Naukowej Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie z

wniośkiem o dopuszczenie Pani mgr. inż. Xymeny Stachurskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość poznawczą uzyskanych wyników oraz fakt ich opublikowania w postaci trzech artykułów w renomowanych czasopismach naukowych (ponadto jedna praca jest w trakcie oceny) wnioskuje o wyróżnienie rozprawy.

dr hab. inż. Piotr Szweda, prof. PG

Piotr Szweda