



Łódź, 19 stycznia 2023 r.

Katedra Biologii Bakterii

Prof. dr hab. Antoni Różalski

Sz. Pan

Prof. dr hab. Andrzej Gamian

Dyrektor

Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej

Polskiej Akademii Nauk im. Ludwika Hirszfelda

we Wrocławiu

Szanowny Panie Profesorze,

Przesyłam recenzję dorobku naukowego i innych osiągnięć dr Marzanny Łusiak Szelachowskiej w związku z postępowaniem habilitacyjnym.

Z wyrazami szacunku

A. Różalski



WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA
Uniwersytet Łódzki

Prof. dr hab. Antoni Różalski

Katedra Biologii Bakterii

Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii

Recenzja

osiągnięcia naukowego, dorobku naukowego, dydaktycznego i popularyzatorskiego

w postępowaniu habilitacyjnym

dr Marzanny Łusiak-Szelachowskiej

z Laboratorium Bakteriofagowego

Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda

Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Dr Marzanna Łusiak-Szelachowska jest zatrudniona w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu od 1996 r. W latach 1996-2000 pracowała w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej w Zakładzie Immunologii Chorób Zakaźnych tego Instytutu na stanowisku asystenta. W latach 2000-2010 pracowała w IITD PAN we Wrocławiu na stanowisku adiunkta w Laboratorium Bakteriofagowym. Pracę w tym Laboratorium kontynuuje do dzisiaj na stanowisku specjalisty badawczo-technicznego.

Kandydatka do stopnia naukowego doktora habilitowanego uzyskała w 1994 r. na Uniwersytecie Wrocławskim, na Wydziale Nauk Przyrodniczych tytuł magistra biologii specjalności mikrobiologia na podstawie pracy „Spektrofotometryczna analiza anormalnego składnika widma cytochromowego mutantu oddechowego *Saccharomyces cerevisiae*”, (promotor pracy prof. dr hab. Andrzej Morawiecki). Stopień naukowy doktora nauk biologicznych uzyskała w 1999 r. w IITD PAN r. we Wrocławiu na podstawie rozprawy pt.

„Zdolność komórek krwi obwodowej pacjentów chorych na kiłę do wytwarzania niektórych cytokin” (promotor w przewodzie doktorskim doc. dr hab. Jadwiga Podwińska).

Ocena osiągnięcia naukowego stanowiącego podstawę habilitacji

Dr Marzanna Łusiak-Szelachowska wskazała, zgodnie z obecnie obowiązującą ustawą „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” jako osiągnięcie naukowe, stanowiące znaczny wkład autora w rozwój określonej dyscypliny naukowej, cykl publikacji składający się z 5 prac, 4 oryginalnych doświadczalnych i 1 rozdziału w książce. Tytuł osiągnięcia „Aktywność antyfazowa surowic chorych poddanych terapii fagowej”.

Prace wchodzące w skład zbioru stanowiącego osiągnięcie naukowe zostały opublikowane w latach 2014-2019. Wszystkie prace zostały opublikowane w języku angielskim, prace oryginalne w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, ujętych w wykazie JCR, z ustalonym IF i punktacją MNiSW. Rozdział opublikowano w książce wydanej przez Springer Nature Switzerland. Prace te wymieniam dalej w recenzji. Łączny IF tych prac- 10,811, punkty MNiSW - 205 (1 praca - 15 pkt. MNiSW; 2 prace – 35 pkt.; 1 - 40 pkt.; 1 - 80 pkt.) Habilitantka jest pierwszą autorką w 3 publikacjach, w 2 jest na drugim miejscu wśród autorów, w 2 jest także autorką do korespondencji, co świadczy o jej istotnym udziale w ich przygotowaniu. W tych wieloautorskich pracach dr M. Łusiak-Szelachowska określiła go jako „wiodący”. W oświadczeniach podaje na czym ten wiodący udział polegał, wymieniła planowanie badań, ustalanie współczynnika K (współczynnik inaktywacji fagów przez surowice), analizę danych i przygotowanie manuskryptu publikacji, krytyczną ocenę manuskryptu oraz poprawianie publikacji do druku. Z oświadczeń współautorów publikacji wynika podział prac przy ich powstawaniu. Wskazano w tych oświadczeniach udział w realizacji części doświadczalnej, jak i analizie jej wyników, ocenie terapii fagowej pacjentów oraz przygotowaniu manuskryptu prac.

Terapia fagowa jest coraz częściej stosowana. Powodem tego jest wzrastająca oporność szczepów bakteryjnych na antybiotyki. Stosuje się nie tylko fagi, ale też fagi razem z antybiotykami, co nieraz daje lepsze efekty terapeutyczne. Trzeba jednak zaznaczyć, iż skuteczność działania fagów może obniżać ich interakcja z układem odpornościowym chorych, której efektem jest wytwarzanie antyfagowych przeciwciał. Są one zdolne do

neutralizacji działania fagów, co przekłada się na zmniejszoną ich zdolność do eliminacji bakterii. Potwierdzono to w badaniach doświadczalnych na zwierzętach. Mała liczba danych o przeciwciałach antyfagowych w surowicach pacjentów poddanych terapii antyfagowej skłoniły Ośrodek Terapii Fagowej IITD PAN we Wrocławiu do podjęcia szerszych badań tego problemu. Dr M. Łusiak Szelachowska była jedną z osób uczestniczących w tych badaniach, których wyniki wykorzystwała w osiągnięciu habilitacyjnym.

Celem tych badań było nie tylko wykrycie przeciwciał antyfagowych w surowicach pacjentów poddanych terapii fagowej, ale też powiązanie aktywności surowic z rodzajem infekcji, stanem układu obronnego pacjenta oraz drogą podania fagów w różnej dawce, a także czasem terapii. Badaniami objęto pacjentów poddanych terapii fagowej w latach 2010-2019 w ww. Ośrodku. Wybrano do badania chorych z różnymi infekcjami (zakażenia układu moczowego, tkanek miękkich, układu oddechowego), którym fagi aplikowano różnymi drogami (doustnie, miejscowo, doustnie i miejscowo, doodbytniczo).

W pierwszej pracy osiągnięcia habilitacyjnego (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, 27(6), 295-304) zbadano działanie antyfagowe surowic 122 pacjentów i 30 zdrowych osób. Pacjenci otrzymali różną drogą pojedyncze fagi *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *M. morgani* lub koktajl fagowy *S. aureus*. Poziom neutralizacji fagów przez surowice określano wyznaczając współczynnik inaktywacji fagów (K). Przyjęto trzy poziomy neutralizacji: niski - $K < 5$, średni - $K = 5-18$ i wysoki - $K > 18$. Niskie wartości K odnotowano dla surowic od osób zdrowych i pacjentów przed terapią. Podobnie niskie wartości tego współczynnika stwierdzono dla surowic osób, którym podano fagi doustnie, wysokie zaś dla surowic pacjentów, którym fagi podano miejscowo lub miejscowo i doustnie, dotyczyło to m.in. pacjentów z zakażeniami kości. Wysokie wartości K stwierdzono w odniesieniu do surowic pochodzących do pacjentów leczonych niektórymi fagami *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *E. faecalis*. Wysoka zdolność surowic do neutralizacji fagów spadała po terapii. Wyniki tych badań wskazują na znaczenie drogi podania fagów oraz ich typu w kontekście antyfagowego

działania surowic. Aktywność antyfazowa przeciwciał nie wyklucza pozytywnego efektu terapii.

W drugiej pracy osiągnięcia (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) przedstawiono wyniki badań odpowiedzi immunologicznej na obecność fagów gronkowcowych u pacjentów poddanych doświadczalnej terapii fagowej. Badano poziom przeciwciał IgG, IgA i IgM. Porównano poziomy przeciwciał antyfazowych u pacjentów przed terapią i w trakcie terapii z poziomem takich przeciwciał u osób zdrowych. Stwierdzono wzrost w trakcie terapii poziomu przeciwciał ww. klas oraz korelację pomiędzy wyższym poziomem IgG i IgM i współczynnikiem inaktywacji fagów K w surowicach chorych. Nie wpłynęło to jednak na pozytywny wynik terapii. Wykazano też przypadki niskiego poziomu przeciwciał antyfazowych w surowicach pacjentów w trakcie terapii i pomimo tego jej niepowodzenie. Potwierdzono więc, iż indukcja w trakcie terapii odpowiedzi immunologicznej pacjenta przez fagi, nie musi być przeszkodą w jej stosowaniu, bowiem jej powodzenie nie zależy w decydującym stopniu od poziomu neutralizujących fagi przeciwciał.

W trzeciej pracy (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, Feb, 12(2), 109-117) badaniami objęto 62 pacjentów poddanych terapeutycznemu działaniu fagów pojedynczych i koktajli fagowych *S. aureus* i *E. faecalis* oraz nie wymienionych gatunków bakterii Gram-ujemnych oraz kontrolnie 30 zdrowych osób. Pacjenci otrzymywali fagi doustnie, doustnie i miejscowo, doodbytniczo lub miejscowo. Ustalono, iż nie ma korelacji pomiędzy działaniem neutralizującym fagi przez przeciwciała antyfazowe obecne w surowicach pacjentów, a wynikiem terapii fagowej.

W czwartej publikacji zbioru osiągnięcia (Łusiak-Szelachowska M., Międzybrodzki R., Fortuna W., Borysowski J., Górski A. Anti-phage serum antibody responses and the outcome of phage therapy. *Folia Microbiol.* 2021, 66(1), 127-131) opublikowano wyniki

kontynuowanych badań znaczenia odpowiedzi immunologicznej u pacjentów poddanych terapii fagowej. W tej pracy badaniami objęto surowice 25 chorych z przewlekłym zapaleniem zatok, kontrolę stanowiły zaś surowice 30 osób zdrowych. Analizowano poziom neutralizacji fagów przez surowice pacjentów poddanych terapii fagowej i wpływ czasu terapii. Stosowano fagi *S. aureus* oraz *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* lub *E. coli* miejscowo lub doustnie i miejscowo. Potwierdzono wcześniejsze ustalenia przedstawione wyżej w moim streszczeniu publikacji osiągnięcia Habilitantki. U 30 % pacjentów z ww. schorzeniem i niskim poziomem przeciwciał antyfagowych w surowicach uzyskano pozytywny wynik terapii fagowej. Podobnie odnotowano taki sam procent chorych z przewlekłym zapaleniem zatok, ale wysokim poziomem przeciwciał antyfagowych w surowicach i pozytywnym efektem terapii fagowej. Tak więc nie stwierdzono korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał antyfagowych w surowicach pacjentów w czasie terapii oraz jej wynikiem.

Praca piąta - rozdział w książce (Żaczek M., Łusiak-Szelachowska M., Weber-Dąbrowska B., Międzybrodzki R., Fortuna W., Rogóż P., Letkiewicz S., Górski A. Humoral immune response to phage based therapeutics. In: Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J (ed) Phage Therapy: A Practical Approach, Springer Nature Switzerland; 1st edn. 2019, 123-143), to przegląd i podsumowanie problematyki stosowania terapii fagowej w kontekście odpowiedzi immunologicznej pacjentów na obecność fagów w organizmie. Autorzy zwracają uwagę na ograniczenia badań w Ośrodku Terapii Fagowej IITD PAN we Wrocławiu zależności efektów tej terapii od działania przeciwciał antyfagowych w surowicach pacjentów. Głównym problemem jest ograniczona możliwość monitorowania dynamiki wytwarzania takich przeciwciał u pacjentów, którzy w Ośrodku nie są stale, ale pojawiają się w określonych odstępach czasowych. Autorzy tej pracy przeanalizowali takie czynniki mające wpływ na efekt terapii fagowej, jak poziom pojawiających się przeciwciał i ich neutralizujący wpływ na lityczne działanie fagów na bakterie, znaczenie rodzaju infekcji, stanu układu obronnego pacjenta, rodzaju zastosowanych fagów, dawki i drogi ich podania oraz czasu terapii fagowej. Wszystkie wymienione czynniki wpływają w różnym stopniu na produkcję przeciwciał antyfagowych, ale nie można stwierdzić korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał antyfagowych w surowicach pacjentów w czasie terapii fagowej, a wynikiem tej terapii.

Podsumowując osiągnięcie naukowe dr M. Łusiak-Szelachowskiej należy stwierdzić, iż wyniki w nim przedstawione są oryginalne, uzyskane w trakcie kompleksowych i wieloaspektowych badań, z wykorzystaniem różnorodnego materiału badawczego. Mają nie tylko znaczenie czysto poznawcze, bardzo ważne dla poznania mechanizmów oddziaływania fagów z makroorganizmem, ale też praktyczne, są zapewne wykorzystywane w ustalaniu strategii terapii fagowej dla kolejnych grup pacjentów Ośrodka Terapii Fagowej IITD PAN we Wrocławiu. Nie mam zastrzeżeń odnośnie do merytorycznego wyboru publikacji do zbioru stanowiącego osiągnięcie badawcze Habilitantki, a wyniki badań stanowiące osiągnięcie naukowe dr M. Łusiak-Szelachowskiej oceniam bardzo dobrze. Habilitantka w kilku miejscach Autoreferatu używa niewłaściwie określenia „rozprawa habilitacyjna”. Szczerze mówiąc, chciałbym, aby rozprawa habilitacyjna jeszcze wróciła w miejsce osiągnięcia naukowego, ale pewnie tego nie doczekam. Muszę więc odnieść się do terażniejszości, stąd moja uwaga.

Aktywność naukowa we współpracy z ośrodkami naukowymi zewnętrznymi

Habilitantka przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora prowadziła badania podjęte we współpracy Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych, Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej IITD PAN we Wrocławiu z Katedrą i Kliniką Dermatologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Zajęła się badaniem zdolności komórek krwi obwodowej pacjentów z kiłą do wytwarzania niektórych cytokin. Wyniki tych analiz znalazły się w jej doktoracie, a tematyka dotycząca roli cytokin i tlenku azotu w odporności przeciwiłkowej została przedstawiona w 3 pracach oryginalnych, wieloautorskich z jej udziałem. Po doktoracie, już jako pracownik Laboratorium Bakteriofagowego IITD, podjęła współpracę z Kliniką Gastroenterologii i Hepatologii Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu i Kliniką Gastroenterologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w Warszawie. Badała obecności fagów *E. coli* w kale ludzi zdrowych i pacjentów z chorobami przewodu pokarmowego (polipy jelit, choroba Leśniowskiego-Crohna, wrzodziejące zapalenie jelita grubego). Wyniki tych badań znalazły się w jednej wieloautorskiej, oryginalnej publikacji. Współpracowała też z Katedrą Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz z Instytutem Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego. Wyniki tych wspólnych badań zebrano w 2 wieloautorskich, oryginalnych publikacjach. W ramach współpracy z Uniwersytetem Przyrodniczym we

Wrocławiu z Katedrą Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności powstało zgłoszenie patentowe, którego współautorką jest Habilitantka.

Ocena pozostałego dorobku naukowego

Przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora Habilitantka zajmowała się badaniami nad zdolnością komórek krwi obwodowej pacjentów z kiłą do wytwarzania niektórych cytokin. Wymieniłem tę jej aktywność wyżej, w poprzednim podrozdziale recenzji. Po doktoracie jej zainteresowania ogniskują się na badaniach oddziaływania bakteriofagów z układem obronnym ludzi poddanych terapii fagowej. Ich wyniki i wnioski z tych badań są wykorzystywane w monitorowaniu pojawiania się przeciwciał neutralizujących w surowicach pacjentów w trakcie tej terapii. Zajmowała się również badaniami obecności fagów *E. coli* w kale ludzi zdrowych i pacjentów z chorobami przewodu pokarmowego. O tym też wspomniałem wyżej w recenzji. Brała też udział w badaniach wpływu czynników fizykochemicznych na aktywność niektórych fagów. Badania miały na celu optymalizację przygotowania preparatów fagowych do celów terapeutycznych. Objęto nimi 10 fagów *Stenotrophomonas maltophilia* i 10 fagów *Citrobacter freundii*. Ma też udział w przygotowaniu prac przeglądowych ma temat bakteriofagów i ich lizyn w zwalczaniu biofilmu bakteryjnego oraz stosowania w skojarzeniu bakteriofagów i antybiotyków w terapii zakażeń bakteryjnych.

Habilitantka odbyła staż naukowy na Uniwersytecie Wrocławskim w Zakładzie Biologii Patogenów i Immunologii. Celem stażu było poszerzenie wiedzy z zakresu badań nad bakteriofagami. Nie znalazłem informacji o stażu badawczym Habilitantki w ośrodku naukowym za granicą. Ma udział w grantach realizowanych we współpracy z innymi jednostkami naukowymi (Grant POIG „Optymalizacja charakterystyki i przygotowania preparatów fagowych do celów terapeutycznych“. Zadanie: „Odnowa banku fagowego, poszukiwanie nowych fagów i ich charakterystyka [*Streptococcus, Citrobacter, Serratia, Proteus, Stenotrophomonas*]”; Projekt NCBiR „Biologiczna stabilizacja wody przeznaczonej do spożycia“). Habilitantka brała udział łącznie w realizacji 11 grantów finansowanych przez różne podmioty (10 po doktoracie).

Podsumowanie dorobku naukowego

Dr M. Łusiak-Szelachowska jest współautorką łącznie 52 prac, w tym 23 oryginalnych i 29 poglądowych, wliczając w to publikacje zebrane jako osiągnięcie. Większość – 43 prace opublikowała w języku angielskim. Pierwszym autorką była w 7 pracach oryginalnych i 6 poglądowych. Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora była współautorką większości prac oryginalnych - 21 publikacji oryginalnych doświadczalnych i wszystkich 29 poglądowych. Habilitantka jest też współautorką 19 komunikatów zjazdowych przedstawionych w kraju w formie plakatów i 35 komunikatów zjazdowych zaprezentowanych, także jako plakaty, za granicą. Wygłosiła 2 referaty na konferencjach krajowych. Ma 1 zgłoszenie patentowe międzynarodowe i 2 krajowe zgłoszenia patentowe; nie podała, czy uzyskano patenty. Otrzymała 4 nagrody naukowe – jedną National Geographic i 3 Dyrektora IITD PAN we Wrocławiu.

Dane naukometryczne osiągnięć Kandydatki: łączny IF prac po uzyskaniu stopnia naukowego doktora - 106,991 w tym prac oryginalnych – 26,62 i poglądowych 80,381. Liczba cytowań w Scopus - 1135, bez autocytowań – 1048; w Web of Science – 1081, bez autocytowań 991. Liczba punktów MNSW prac po uzyskaniu stopnia naukowego doktora – 1354, w tym prac oryginalnych 319 i poglądowych 1036. Indeks Hirscha – 17 (Scopus), - 18 (Web of Science).

Podsumowując aktywność badawczą i dorobek naukowy dr M. Łusiak-Szelachowskiej (poza przedstawionym w osiągnięciu naukowym) należy stwierdzić, iż jest on bogaty, wartościowy i w moim przekonaniu spełnia wymagania dotyczące ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego. Zwraca uwagę duży dorobek współautorski Habilitantki po doktoracie w formie artykułów przeglądowych lub rozdziałów w książkach. Wskazuje to nie tylko na jej dużą aktywność na tym polu, ale też na pozycję zespołu w którym pracuje i znaczenie tematyki prezentowanej w tych pracach.

Dorobek dydaktyczny i popularyzatorski

Dr M. Łusiak-Szelachowska w latach 2011-2016 była opiekunką 3 prac magisterskich i 1 pracy inżynierskiej. 11 osób z wrocławskich uczelni odbyło pod jej kierunkiem praktyki studenckie w latach 2005-2019.

W zakresie popularyzacji nauki - brała udział w 2 wykładach i 7 pokazach w ramach Dolnośląskiego Festiwalu Nauki w latach 2001-2010.

Podsumowanie i Wniosek końcowy

Dr Marzanna Łusiak-Szelachowska przedstawiła osiągnięcie naukowe stanowiące znaczny wkład autora w rozwój badań na temat przeciwciał antyfagowych w surowicach pacjentów poddanych terapii fagowej. Prace składające się na to osiągnięcie są merytorycznie wartościowe i zostały opublikowane w czasopismach z IF o międzynarodowym zakresie dostępności. Podjęte badania opisane w tych publikacjach mają charakter kompleksowy, dotyczą ważnego problemu medycznego, wnoszą do wiedzy o fagach i ich wykorzystaniu ważne oryginalne dane, mające wartość nie tylko czysto poznawczą, ale i praktyczną, możliwą do zastosowania w praktyce leczniczej. Pozostały dorobek naukowy Habilitantki jest też bogaty i wartościowy. Skromniejszy dorobek dydaktyczny oraz osiągnięcia w zakresie działalności popularyzatorskiej wynikają zapewne ze specyfiki instytutu w którym pracuje. Habilitantka wykazała się też współpracą z ośrodkami naukowymi poza macierzystym instytutem. Z przedstawionego dorobku naukowego dydaktycznego i organizacyjnego Kandydatki wynika, iż jest osobą niezwykle pracowitą, potrafiącą dobrze pracować w zespołach badawczych i efektywnie wykorzystywać rezultaty wspólnej pracy. W moim przekonaniu Dr M. Łusiak-Szelachowska wypełnia wymogi stawiana habilitantom zawarte w Ustawie z dnia 20.07.2018 „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”. Biorąc to pod uwagę przedstawiam pozytywną opinię w sprawie nadania jej stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Antoni Neriański

Łódź, 13 stycznia 2023 r.