

## **Autoreferat**

dr n. biol. lek. Ryszard Międzybrodzki

**Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda  
Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu**

**Warszawski Uniwersytet Medyczny**

**Wrocław, 26 kwietnia 2019 roku**

**1. Imię i nazwisko:** Ryszard Międzybrodzki

**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe**

1995 r. *Dyplom lekarza*  
Wydział Lekarski Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

1999 r. *Lekarz chorób wewnętrznych*  
Egzamin na I stopień specjalizacji w zakresie chorób wewnętrznych  
(zdany z wyróżnieniem).

2003 r. *Stopień doktora nauk biologicznych*  
Zakres: biologia. Specjalność: immunologia.  
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.  
Tytuł rozprawy doktorskiej: „*Badanie aktywności i mechanizmu działania przeciwwzapalnego nowych pochodnych izotiazolu*”.  
Promotor: doc. dr hab. Stanisław Szymaniec.  
Praca doktorska wyróżniona przez Radę Naukową Instytutu.

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

1996 r. – 2003 r. Asystent, Laboratorium Immunofarmakologii,  
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

2003 r. – 2005 r. Asystent, Zakład Immunologii Lekarskiej,  
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

2005 r. – 2007 r. Adiunkt, Zakład Immunologii Lekarskiej,  
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

2005 r. – 2006 r. Zastępca kierownika ds. medycznych NZOZ,  
Ośrodek Terapii Fagowej,  
NZOZ przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we  
Wrocławiu

2006 r. – 2008 r. Zastępca kierownika NZOZ i p.o. Zastępcy kierownika ds. medycznych  
NZOZ,  
Ośrodek Terapii Fagowej,  
NZOZ przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we  
Wrocławiu,

2007 r. – 2013 r. Adiunkt, Samodzielne Laboratorium Bakteriofagowe,  
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

- 2008 r. – 2015 r. Zastępca kierownika NZOZ (od 2013 roku zastępca kierownika Centrum Medycznego IITD PAN) i Zastępca kierownika ds. medycznych NZOZ (od 2013 roku zastępca kierownika ds. Medycznych Centrum Medycznego IITD PAN),  
Ośrodek Terapii Fagowej,  
NZOZ przy Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu (od 2012 r.: Centrum Medyczne Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu)
- 2013 r. – obecnie Adiunkt, Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Transplantologii,  
Warszawski Uniwersytet Medyczny
- 2014 r. – obecnie Asystent, Samodzielne Laboratorium Bakteriofagowe,  
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu
- 2015 r. – obecnie Zastępca kierownika ds. medycznych i administracyjnych,  
Ośrodek Terapii Fagowej,  
Centrum Medyczne Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu

**4. Osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)**

**a) Tytuł osiągnięcia naukowego:**

**„Badania nad możliwościami i nowymi kierunkami terapeutycznego zastosowania bakteriofagów”**

**b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego (tworzące w myśl ww. ustawy cykl publikacji powiązanych tematycznie)\*:**

1. **Międzybrodzki R**, Światała-Jeleń K, Fortuna W, Weber-Dąbrowska B, Przerwa A, Kurzępa A, Łusiak-Szelachowska M, Dąbrowska K, Boratyński J, Syper D, Ługowski C, Poźniak G, Górski A. (2008). Bacteriophage inhibition of reactive oxygen species generation by endotoxin-stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Virus Res.* 131(2):233-242. IF: **2,429** / MNiSW: **20** / liczba cytowań: **43**.
2. **Międzybrodzki R**, Fortuna W, Weber-Dąbrowska B, Górski A. (2009). A retrospective analysis of the changes in inflammatory markers in patients treated with bacterial viruses. *Clin Exp Med.* 9(4):303-312. IF: **1,581** / MNiSW: **20** / liczba cytowań: **30**.
3. Górski A, **Międzybrodzki R**, Borysowski J, Dąbrowska K, Wierzbicki P, Ohams M, Korczak-Kowalska G, Olszowska-Zaremba N, Łusiak-Szelachowska M, Kłak M, Jończyk E, Kaniuga E, Gołaś A, Purchla S, Weber-Dąbrowska B, Letkiewicz S, Fortuna W, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogoż P, Kłosowska D. (2012). Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Adv Virus Res.* 83:41-71. IF: **2,844** / MNiSW: **40** / liczba cytowań: **75**.
4. **Międzybrodzki R**, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogoż P, Kłak M, Wojtasik E, Górski A. (2012). Clinical aspects of phage therapy. *Adv Virus Res.* 83:73-121. IF: **2,844** / MNiSW: **40** / liczba cytowań: **105**.
5. **Międzybrodzki R**, Kłak M, Jończyk-Matysiak E, Bubak B, Wójcik A, Kaszowska M, Weber-Dąbrowska B, Łobocka M, Górski A. (2017). Means to facilitate the overcoming of gastric juice barrier by a therapeutic staphylococcal bacteriophage A5/80. *Front Microbiol.* 8:467. IF: **4,019** / MNiSW: **35** / liczba cytowań: **6**.
6. **Międzybrodzki R**, Borysowski J, Kłak M, Jończyk-Matysiak M, Obmińska-Mrukowicz B, Suszko-Pawłowska A, Bubak B, Weber-Dąbrowska B, Górski A. (2017). *In vivo* studies on the influence of bacteriophage preparations on the autoimmune inflammatory process. *Biomed Res Int.* 2017:3612015. IF: **2,583** / MNiSW: **25** / liczba cytowań: **7**.

Sumaryczny *Impact Factor* (IF) cyklu publikacji: **16,300**.

Sumaryczna punktacja MNiSW cyklu publikacji: **180**.

\* Poza danymi bibliograficznymi dla każdej publikacji podano: **IF** – współczynnik wpływu czasopisma wg *Journal Citation Reports*; **MNiSW** – punkty za publikację w czasopiśmie według Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego; **liczbę cytowań** z uwzględnieniem autocytowań wg bazy *Web of Sciences (core collection)* z dn. 09.10.2018 r.

**c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

Bakteriofagi (określane również jako fagi), czyli wirusy bakterii, stanowią najliczniejszą grupą mikroorganizmów. Występują powszechnie w przyrodzie zasiedlając środowisko naturalne (woda, gleba, ścieki), w żywności oraz w organizmach zwierząt i ludzi (np. przewodzie pokarmowym). W roku 1919, czyli wkrótce po ich niezależnie dokonanych odkryciach przez Fredericka Williama Tworta (w 1915 roku) i przez Felixa d'Hérelle'a (w 1917 roku) bakteriofagi zostały po raz pierwszy zastosowane w leczeniu czerwonki bakteryjnej – szigelozy (zał. 4, pkt II D, poz. 2.13). Dwa lata później, w 1921 roku, opublikowany został pierwszy raport prezentujący wyniki terapeutycznego zastosowania bakteriofagów, który dotyczył leczenia zakażeń skóry wywołanych przez gronkowce. Fagoterapia ma także długie tradycje w Polsce – z dostępnej literatury wynika, że już w 1922 roku stosowano fagi do leczenia czerwonki. Do czasu wprowadzenia do stosowania pierwszych antybiotyków fagoterapia była dość powszechna i traktowana jako jedna z ważnych metod zwalczania infekcji bakteryjnych. Profesor Ludwik Hirszfild w podręczniku do immunologii z 1949 roku pisał: „Bakteriofagi działają w tak nieprawdopodobnej małej ilości, niszczą bakterie tak doszczętnie, siła ich przewyższa możliwości odpornościowe organizmu” (Hirszfild, *Immunologia ogólna*, Czytelnik, Warszawa 1949). Wysoka skuteczność antybiotyków doprowadziła jednak do zahamowania prac nad dalszym rozwojem terapii fagowej (TF). Obecny kryzys spowodowany narastaniem antybiotykoodporności bakterii doprowadził do renesansu TF i podejmowania coraz liczniejszych starań o powszechne uznanie jej jako alternatywy dla antybiotyków, szczególnie w walce z wielolekoopornymi patogenami.

Badania w tym zakresie od wielu lat prowadzone są w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu (IITD PAN). Profesor Hirszfild prowadził badania nad ich zastosowaniem w epidemiologii. Profesor Stefan Ślpek rozpoczął prace nad zastosowaniem preparatów fagowych w leczeniu infekcji bakteryjnych u ludzi. Zorganizowana przez niego kolekcja fagów terapeutycznych jest stale powiększana przez dr Beatę Weber-Dąbrowską. W 2015 roku staraniami profesora Andrzeja Górskiego zostało zorganizowane w Instytucie centrum medyczne z Ośrodkiem Terapii Fagowej (OTF), w którym możliwe jest prowadzenie eksperymentalnej terapii fagowej zgodnie z obowiązującymi przepisami. Praca w tym unikalnym ośrodku, możliwość dokładnego śledzenia odpowiedzi klinicznej indywidualnych chorych na stosowane u nich różne preparaty fagowe i wynikające z tego obserwacje skierowała moje zainteresowania naukowe w kierunku zagadnień badawczych związanych z kluczowymi aspektami terapeutycznego zastosowania fagów obejmującymi:

- możliwości zastosowania fagów w leczeniu zakażeń bakteryjnych u ludzi (biodostępność i bezpieczeństwo stosowania fagów),
- nowe kierunki klinicznego zastosowania bakteriofagów (działanie przeciwzapalne i immunomodulujące fagów).

Cykl publikacji, które wybrałem do przewodu habilitacyjnego jest rezultatem moich badań nad tymi zagadnieniami i przedstawia dane uzyskane w Samodzielnym Laboratorium

Bakteriofagowym i Ośrodkiem Terapii Fagowej IITD PAN oraz w Zakładzie Immunologii Klinicznej Instytutu Transplantologii Uniwersytetu Medycznego w Warszawie.

*Primum non nocere* – ta fundamentalna zasada działalności lekarza jest szczególnie istotna w terapii fagowej, która w wielu krajach świata (np. w Polsce i innych krajach Unii Europejskiej, Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej) wciąż ma formę terapii eksperymentalnej. Dotychczasowe doniesienia prezentujące wyniki TF w niewielkim aspekcie prezentowały szczegółowe dane dotyczące bezpośredniego wpływu fagów i ich preparatów na organizm człowieka. **Publikacja 4** stanowi praktycznie pierwsze w światowym piśmiennictwie doniesienie potwierdzające bezpieczeństwo TF nie tylko na podstawie analizy danych klinicznych (informacje o obserwowanych możliwych działaniach niepożądanych preparatów fagowych), lecz także danych laboratoryjnych dotyczących monitorowania podstawowych parametrów funkcji szpiku kostnego, nerek, wątroby, trzustki. Obserwacje te w pełni potwierdzają m.in. nieco później opublikowane wyniki Sarkera i współpr. (*Virology* 2012;434:222-232) oraz McCallina i współpr. (*Virology* 2013;443:187-196), którzy badali bezpieczeństwo doustnego stosowania preparatów fagów *E. coli* u dorosłych zdrowych ochotników. Co więcej, moje najnowsze wyniki prezentowane na konferencji *EMBO Workshop Viruses of Microbes V* w 2018 roku potwierdzają również odległe bezpieczeństwo TF (zał. 4 pkt. III B, poz. 1.33).

Ważne wnioski dotyczące bezpieczeństwa TF przedstawiłem również w **pracach 1, 2, 3 i 6** z załączonego cyklu. W **publikacji 3** przedstawione zostały wyniki monitorowania części chorych analizowanych w publikacji 4 pod kątem wpływu TF na odpowiedź proliferacyjną limfocytów T i B na mitogeny, na funkcje granulocytów (aktywność fagocytarną i produkcję wolnych rodników), na zmiany populacji limfocytów T, limfocytów NKT i komórek NK, a także na aktywność komórek NK. Wykazały one, że TF może powodować modyfikację odpowiedzi immunologicznej, jednakże poza poprawą fagocytozy mogącą pozytywnie korelować z dobrymi wynikami TF, pozostałe parametry nie ulegają zmianom, którym można by przypisywać istotne znaczenie kliniczne. W **publikacji 2** zaprezentowane zostały natomiast dane świadczące o tym, że TF stosowana z powodu przewlekłej infekcji bakteryjnej nie nasila procesu zapalnego mimo, że stosowane preparaty fagowe mogą zawierać czynniki o potencjalnym działaniu stymulującym układ immunologiczny (wirusy, antygeny bakteryjne) oraz prowadzić do uwolnienia produktów rozpadu bakterii niszczonej przez zastosowane fagi. Przeciwnie, u chorych obserwowano w przebiegu TF istotne zmniejszenie takich markerów zapalenia jak poziom białka C-reaktywnego (CRP) w surowicy i liczby leukocytów we krwi. Co więcej, w toku przedstawionych w **publikacji 6** badań nad wpływem fagów na zapalenie stawów indukowane kolagenem (CIA) u myszy potwierdziłem, że ogólnoustrojowe stosowanie lizatów fagowych bakterii Gram-dodatnich (*S. aureus* i *E. faecalis*) jak i Gram-ujemnych (*P. aeruginosa*) nie zaostrza przebiegu klinicznego CIA. Stanowi to pozytywne przesłanki w zakresie bezpieczeństwa stosowania TF także u osób z takimi towarzyszącymi chorobami autoimmunologicznymi jak reumatoidalne zapalenie stawów, którego modelem jest właśnie CIA. Z kolei wykazana w **publikacji 1** zdolność fagów do hamowania produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) przez granulocyty stymulowane endotoksyną sugeruje ich potencjalne działanie ochronne w przypadku nadprodukcji RFT prowadzącej do uszkodzenia tkanek.

**Publikacja 5**, chociaż prezentuje wyniki badań na zwierzętach ma również bardzo ważne znaczenie dla stosowania fagów w praktyce klinicznej. Dotychczas ogólnie zakładano, że doustna droga podania bakteriofagów może być stosowana nie tylko w leczeniu infekcji bakteryjnych przewodu pokarmowego (np. biegunek) w celu uzyskania ich miejscowego działania, ale również w leczeniu zakażeń układowych (np. sepsy), czy narządowych (np. infekcje dolnych dróg oddechowych i układu moczowego), mimo że dane dotyczące penetracji fagów do krwi ludzi po podaniu doustnym są bardzo skąpe (Weber-Dąbrowska i współpr. *Arch Immunol Ther Exp* 1987;35:563-568; Pagava i współpr., *Georgian Med News* 2012;211:60-66). Badania na zwierzętach prezentowały z kolei pozytywne wyniki penetracji z przewodu pokarmowego do krwi tylko dla pojedynczych fagów. Dlatego w latach 2006-2010 prowadziłem w ramach projektu wykazanego w zał. 4, pkt. II I na poz. 8 badania nad biodostępnością i penetracją tkankową fagów terapeutycznych (pochodzących z kolekcji Samodzielnego Laboratorium Bakteriofagowego IITD PAN) podawanych różnymi drogami oraz sposobami jej poprawy. Część uzyskanych całkowicie oryginalnych wyników dotyczących właśnie stosowania doustnego fagów opublikowałem we wspomnianej wyżej **pracy 5**. Potwierdziłem, że nie tylko węglan dihydroksyglinowo-sodowy stosowany u pacjentów OTF w celu zobojętniania kwasu solnego w żołądku (według obowiązującego w tym czasie protokołu eksperymentalnej terapii fagowej) może silnie chronić bakteriofagi (w większości bardzo wrażliwych na niskie pH) przed ich inaktywacją przez sok żołądkowy umożliwiając ich pasaż do dalszych odcinków przewodu pokarmowego szczurów. Takie działanie wykazałem również w przypadku antagonistów receptora histaminowego H<sub>2</sub>, (ranitydyna) i inhibitorów pompy protonowej (omeprazol), a nawet naturalnego jogurtu. Wyniki te mogą mieć ważne znaczenie w dalszym rozwoju klinicznej TF – zarówno do celów zwalczania zakażeń bakteryjnych jak i ewentualnej immunomodulacji – umożliwiając wybór różnych środków wspomagających skuteczność doustnej TF. Mimo stosowania wyżej wymienionych środków nie obserwowałem, aby bakteriofagi w znaczącej ilości penetrowały z przewodu pokarmowego szczurów do krwi. Dopiero badania, które wykonałem na myszach wykazały taką możliwość, ale nie dla wszystkich badanych fagów. Sugeruje to, że jedną z zasadniczych przyczyn niepowodzenia doustnej TF u części pacjentów może być problem z wchłanianiem fagów z przewodu pokarmowego do ustroju.

Wyniki i wnioski zaprezentowane w **pracach 1, 2 i 6** wskazują również na możliwość zastosowania TF poza jej znanym standardowym działaniem przeciwbakteryjnym. Ta nowa, oryginalna koncepcja została przedstawiona w opublikowanej w 2016 roku pracy, której jestem współautorem (zał. 4, pkt. II A, poz. 2.7), a w której zwrócono uwagę na zarysowujące się perspektywy ewolucji TF od obecnego leczenia powikłań (np. pooperacyjne bądź pourazowe zakażenia bakteryjne) w kierunku leczenia przyczynowego stanów zapalnych i immunopatii. Zwrócono w niej m.in. uwagę na fakt, że u niektórych chorych leczonych fagami obserwuje się znaczący spadek wskaźników procesu zapalnego (np. CRP) nawet przy braku eradykacji zakażenia bakteryjnego. W istocie właśnie to przeciwzapalne oddziaływanie fagów w przebiegu TF mogą sugerować dane zaprezentowane uprzednio w **publikacji 2** z 2009 roku. Są one zgodne z wynikami przedstawionymi w 2008 roku w **publikacji 1**, w której wykazałem, że obserwowane przeciwzapalne oddziaływanie fagów może zależeć od ich zdolności do hamowania produkcji RFT przez granulocyty, i to zarówno w odpowiedzi na bakterie niezależnie od swoistości wobec faga, jak i izolowaną endotoksynę. Potwierdzają je

również wyniki badań innych autorów. Obserwowano na przykład hamowanie przez faga T4 aktywacji jądrowego czynnika- $\kappa$ B (biorącego udział regulacji ekspresji wielu cytokin prozapalnych i cząsteczek adhezyjnych) w komórkach nabłonkowych stymulowanych *in vitro* wirusem zapalenia opryszczki pospolitej (HSV-1) oraz tworzenia nacieku komórkowego w allogenicznym przeszczepie skóry u myszy (Górski i współprac., *Transplant Proc* 2006;38:331-333). W 2016 roku wykazano, że rekombinowane białko gp12 będące adhezyną krótkiego włókna ogonka faga T4 podawane dootrzewnowo myszom może osłabiać produkcję interleukiny 1 i interleukiny 6 oraz zmniejszać naciek komórkowy w wątrobie i śledzionie zwierząt w odpowiedzi na stymulację lipopolisacharydem (Miernikiewicz i współprac., *Front Microbiol* 2016;7:1112). W 2017 roku opublikowano z kolei wyniki badań, które wskazują, że pod wpływem fagów w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej człowieka dochodzi do aktywacji genów kodujących różne cytokiny oraz inne mediatory przeciw- i prozapalne (Van Belleghem i współprac., *Sci Rep* 2017;7:8004). Autorzy podkreślają, dyskutując wzajemne powiązania między tymi czynnikami, że wypadkową ich działania powinno być osłabienie procesu zapalnego. Bardzo ważnym potwierdzeniem działania przeciwwzapalnego fagów, wskazującym na ich potencjalne nowe zastosowanie terapeutyczne są wyniki eksperymentów *in vivo*, które przedstawiłem w **publikacji 6**. Wykazały one silne działanie przeciwwzapalne faga T4 na mysim modelu reakcji typu autoimmunizacji odpowiadającej reumatoidalnemu zapaleniu stawów u człowieka.

### **Szczegółowe umówienie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**

1. Międzybrodzki R, Światała-Jeleń K, Fortuna W, Weber-Dąbrowska B, Przerwa A, Kurzępa A, Łusiak-Szelachowska M, Dąbrowska K, Boratyński J, Syper D, Ługowski C, Poźniak G, Górski A. (2008). Bacteriophage inhibition of reactive oxygen species generation by endotoxin-stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Virus Res.* 131(2):233-242.

W pracy tej po raz pierwszy wykazano, że oczyszczony preparat faga T4 może hamować tworzenie reaktywnych form tlenu przez granulocyty stymulowane endotoksyną. Do oceny produkcji RFT przez granulocyty zastosowano metodę opartą na pomiarze chemiluminescencji luminolu (stosowałem ją wcześniej w badaniach prowadzonych w ramach mojej pracy doktorskiej). Wyselekcjonowanie szczepów *E. coli* podatnych i opornych na zakażenie fagiem T4, których lipopolisacharydy (LPS) mogły efektywnie pobudzać granulocyty do produkcji RFT pozwoliło na stworzenie układu doświadczalnego, w którym zaobserwowano wiele interesujących zależności.

Przede wszystkim wykazano, że fag T4 może hamować tworzenie RFT przez granulocyty pobudzane nie tylko lipopolisacharydem pochodzącym od bakterii wrażliwych na tego faga (*E. coli* B i *E. coli* J5), ale również lipopolisacharydem bakterii opornych na jego infekcję (*E. coli* R4). Efekt ten był zależny od dawki faga, ale niezależny od zastosowanej dawki LPS, przy czym fag hamował tworzenie RFT nawet gdy LPS zastosowano w dawce, która teoretycznie znacznie przekraczała zdolność jego całkowitego związania przez faga. Sugeruje to, że fag T4 może hamować tworzenie RFT nie tylko poprzez proste wiązanie LPS, który jest dla niego receptorem na powierzchni bakterii (trzydziestominutowa preinkubacja faga z LPS *E. coli* J5 zwiększała efekt hamowania chemiluminescencji pobudzonych



komórek), ale również przez inne mechanizmy związane z jego bezpośrednią interakcją z granulocytami (w pracy przedstawiono wyniki eksperymentu, które potwierdziły, że granulocyty mogą wiązać/pochłaniać faga T4). Dodatkowo przemawiają za tym wyniki doświadczenia, w którym fag był zdolny do hamowania tworzenia RFT niezależnie od tego, czy granulocyty były preinkubowane z LPS czy też LPS i fag były dodane do zawiesiny jednocześnie. Brak hamującego wpływu faga na tworzenie RFT przez granulocyty stymulowane octanem mirystynianu forbolu (*phorbol 12-myristate 13-acetate* – PMA) wskazuje, że efekt ten jest zależny od drogi aktywacji, gdyż LPS bakterii Gram-ujemnych pobudza granulocyty do tworzenia RFT poprzez aktywację receptorów Toll-podobnych (TLR4 i CD14), podczas gdy PMA pobudza ich tworzenie przez aktywację kinazy białkowej C (*protein kinase C* – PKC) a następnie oksydazy NADPH.

Ponadto w pracy tej nie tylko potwierdziliśmy nasze wcześniejsze obserwacje (zał. 4, pkt. II A, poz. 1.7), że fag może hamować tworzenie RFT przez komórki stymulowane bakteriami podatnymi na jego infekcję (*E. coli* B i *E. coli* J5), ale wykazaliśmy również, że może hamować ich tworzenie pod wpływem bakterii, które nie są przez niego infekowane (*E. coli* R4). Co więcej, w przypadku *E. coli* B i *E. coli* J5 zawiesina bakterii po trzydziestominutowej preinkubacji z fagiem znacznie słabiej stymulowała tworzenie RFT niż bakterie i fag dodane do komórek bezpośrednio przed dodaniem luminolu, natomiast taka preinkubacja nie powodowała zmniejszenia jego chemiluminescencji w tym eksperymencie w przypadku bakterii niewrażliwej na faga T4 (*E. coli* R4). Tak skonstruowany układ doświadczalny pozwolił po raz pierwszy na stwierdzenie, że hamowanie przez fagi tworzenia RFT przez granulocyty w obecności żywych bakterii może być wynikiem lizy tych bakterii przez bakteriofaga, jak również innych nieswoistych mechanizmów (interakcji fag-granulocyt) podobnie jak to wykazano w przypadku LPS.

2. Międzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dąbrowska B, Górski A. (2009). A retrospective analysis of the changes in inflammatory markers in patients treated with bacterial viruses. *Clin Exp Med.* 9(4):303-312.

W pracy tej przedstawiono retrospektywną analizę zmian poziomów białka C-reaktywnego w surowicy, wskaźnika opadania erytrocytów (OB) i liczby leukocytów we krwi u chorych z przewlekłymi, objawowymi, opornymi na antybiotykoterapię zakażeniami bakteryjnymi, którzy zostali zakwalifikowani do eksperymentalnej terapii fagowej prowadzonej w Ośrodku Terapii Fagowej Centrum Medycznego IITD PAN. Analizie poddano dane zebrane łącznie od 37 chorych z zapaleniem kości i szpiku (z lub bez obecności metalowych implantów i endoprotez), skóry, tkanek miękkich i dolnych dróg oddechowych. U większości pacjentów (n=30) zakażenie było wywołane przez *S. aureus*. Żaden z nich nie stosował antybiotyków w okresie, gdy były zbierane analizowane dane. Preparaty fagowe (w formie lizatów) zawierające swoiste, czyli dobrane na podstawie wyniku typowania fagowego patogennej bakterii, fagi były stosowane doustnie (10 ml trzy razy dziennie po neutralizacji soku żołądkowego 10 ml węglanem dihydroksyglinowo-sodowym) i/lub miejscowo (dwa razy dziennie mokre opatrunki lub płukanie przetoki). U ponad 40% z nich obserwowano dobrą odpowiedź kliniczną w czasie leczenia.

Analizowano szczegółowo m.in. zmiany badanych markerów zapalnych w zależności od takich czynników jak: wiek, rodzaj infekcji, sposób stosowania preparatu fagowego, obecność chorób towarzyszących takich jak schorzenia sercowo-naczyniowe, zaburzenia endokrynne i metaboliczne, stosowanie niskich dawek kwasu acetylosalicylowego i stabilnych dawek niesterydowych leków przeciwzapalnych jako leków przeciwbólowych (pacjenci stosujący leki sterydowe o działaniu ogólnym nie byli włączeni do analizy). Poza wyższym średnim poziomem CRP przed rozpoczęciem leczenia u chorych z zakażeniami okołoprotezowymi oraz istotną różnicą w zmianie wartości OB po 5-8 dniach leczenia w zależności od obecności choroby endokrynnej i/lub metabolicznej, nie obserwowano zasadniczo istotnego wpływu tych czynników na zmianę markerów zapalnych w analizowanej grupie chorych.

Najważniejsza analiza wykazała, że po 5-8 dniach od rozpoczęcia TF średni poziom CRP w surowicy chorych nie zmienił się istotnie ( $38,6 \pm 10,8$  mg/l przed leczeniem względem  $35,3 \pm 9,5$  mg/l po 5-8 dniach,  $n = 11$ ). Jednakże w późniejszym okresie terapii, po 9-32 dniach stosowania fagów, nastąpił znaczący spadek średniego poziomu CRP w surowicy chorych (z  $23,3 \pm 5,7$  mg/l przed terapią do  $16,1 \pm 3,9$  mg/l po 9-32 dniach,  $n = 26$ ,  $p < 0.05$ ). Podobną tendencję obserwowano dla średniej liczby leukocytów we krwi (spadek z poziomu  $7,8 \pm 0,5$  tys./ $\mu$ l przed terapią do  $7,1 \pm 0,4$  tys./ $\mu$ l po 9-32 dniach,  $n = 26$ ,  $p < 0.05$ ). Natomiast średnie wartości OB ani we wczesnej, ani w późniejszej fazie terapii nie odbiegały istotnie od wartości wyjściowych, co mogło wynikać z tego, że nie jest to marker wykazujący szczególnie silną korelację z intensywnością procesu zapalnego towarzyszącego infekcji bakteryjnej.

Wyniki te potwierdziły, że TF nie nasila procesu zapalnego mimo, że stosowane preparaty fagowe zawierają czynniki o potencjalnym działaniu stymulującym układ immunologiczny (wirusy, antygeny zlizowanych bakterii) a także mogą powodować uwolnienie a bakterii takich nowych produktów w trakcie fagoterapii. Przeciwnie, jest to pierwsze doniesienie potwierdzające, że stosowanie preparatów fagowych może hamować proces zapalny w przebiegu zakażenia bakteryjnego. Zwrócono w nim uwagę na to, że może to wynikać nie tylko z bezpośredniego działania przeciwbakteryjnego stosowanych preparatów fagowych, ale również mechanizmów niezwiązanych z tym działaniem.

3. Górski A, Międzybrodzki R, Borysowski J, Dąbrowska K, Wierzbicki P, Ohams M, Korczak-Kowalska G, Olszowska-Zaremba N, Łusiak-Szelachowska M, Kłak M, Jończyk E, Kaniuga E, Gołaś A, Purchla S, Weber-Dąbrowska B, Letkiewicz S, Fortuna W, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogoż P, Kłosowska D. (2012). Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Adv Virus Res.* 83:41-71.

Praca ta ma charakter oryginalno-przeglądowy. Przedstawiono w niej różne aspekty interakcji fagów z komórkami układu odpornościowego oraz opisano wpływ białek fagowych na układ immunologiczny. Opisano m.in. działanie immunogenne fagów, czyli ich zdolność do indukcji odpowiedzi immunologicznej, a w szczególności indukcji przeciwciał. W tej części zaprezentowano oryginalne wyniki inaktywacji swoistych fagów przez surowice chorych poddanych TF prowadzonej w Ośrodku Terapii Fagowej Centrum Medycznego IITD PAN. W części pracy poświęconej aktywności immunomodulacyjnej bakteriofagów, czyli ich

nieswoistemu działaniu na różne funkcje komórek układu odpornościowego biorących udział w odpowiedzi wrodzonej i nabytej, omówiono m.in. ich wpływ na fagocytozę, wybuch tlenowy fagocytów, produkcję cytokin, tworzenie przeciwciał przeciwko innym antygenom i działanie immunomodulacyjne lizatów fagowych. Przedstawiono w niej oryginalne wyniki badania wpływu przeciwciał monoklonalnych przeciwko integrynom  $\beta 1$  i  $\beta 3$  oraz VLA-4 i ALV-5 na adhezję komórek T do białka gp24 faga T4. Zaprezentowano również unikalne oryginalne wyniki monitorowania immunologicznego chorych poddanych TF prowadzonej w Ośrodku Terapii Fagowej Centrum Medycznego IITD PAN.

Analiza ta obejmowała dane uzyskane od 70 pacjentów (44 mężczyzn, 26 kobiet, mediana wieku 46,5 lat) leczonych preparatami fagowymi z powodu przewlekłych zakażeń bakteryjnych opornych na antybiotykoterapię. Oceniano zmiany w zakresie następujących parametrów: odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów T na stymulację przeciwciałem przeciwko antygenowi CD3 (OKT3) i fitohemaglutyniną (PHA), odpowiedzi proliferacyjnej limfocytów B stymulowanych *Staphylococcus aureus* Covan I (SAC), aktywności komórek NK (*natural killer*), odsetka populacji limfocytów T, komórek NKT (*natural killer T-cells*) i komórek NK, fagocytozy zymosanu oraz spontanicznej i stymulowanej octanem mirystynianu forbolu (PMA) produkcji wolnych rodników przez granulocyty. U ponad połowy analizowanych chorych wyjściowe wartości tych parametrów, czyli przed rozpoczęciem TF były poniżej normy. Porównywano je z wynikami uzyskanymi po 7-20 dniach, 21-48 dniach i 49-84 dniach terapii.

Jakkolwiek obserwowano pewne fluktuacje w zakresie badanych partnerów układu odpornościowego, nie można było wykazać znaczącego wpływu TF na większość z nich. Stwierdzono statystycznie istotne podwojenie odsetka pacjentów (z 34% do 69%) z normalną lub podwyższoną odpowiedzią na SAC po 49-84 dniach terapii. Jednakże nie obserwowano istotnych zmian gdy analizowano liczbę pacjentów z wartościami tych parametrów poniżej i powyżej normy, co świadczy, że stosowane lizaty fagowe nie powodowały nadmiernej stymulacji układu odpornościowego. Poza tym analizując wyniki w poszczególnych podgrupach pacjentów stwierdzono m.in., że:

- znaczący wzrost fagocytozy zymosanu stwierdzany w okresie od 7 do 20 dnia terapii był związany z dobrą odpowiedzią na TF, którą obserwowano u prawie 50% analizowanych chorych;
- stosowanie preparatów fagów innych niż gronkowcowe, tj. enterokokowych lub przeciwko bakteriom Gram-ujemnym powodowało osłabienie odpowiedzi limfocytów T na OKT3;
- stosowanie preparatów fagowych przeciwko bakteriom Gram-ujemnym powodowało istotne zmniejszenie odsetka komórek  $CD3^+CD56^+$  (limfocyty NKT) między 21 a 48 dniem stosowania fagów;
- u chorych stosujących tylko fagi enterokokowe obserwowano znaczący wzrost przeciętnej wartości (mediany) fagocytozy zymosanu po 21-48 dniach terapii;
- podanie doodbytnicze fagów (także w połączeniu z innymi drogami podania) może zmniejszać liczbę krążących komórek NK po 49-84 dniach terapii;
- u pacjentów stosujących tylko preparaty fagów gronkowcowych (n=31) nie obserwowano żadnych zmian w zakresie analizowanych parametrów.

Wyniki badań przedstawionych w tej pracy pozwoliły na stwierdzenie, że TF może powodować modyfikację odpowiedzi immunologicznej, jednakże poza możliwością korekty fagocytozy pozostałe parametry nie ulegają zmianom, którym można by przypisywać istotne znaczenie kliniczne. Skojarzenie znamiennego wzrostu zdolności granulocytów do fagocytozy w trakcie TF z jej pomyślnym przebiegiem, wskazuje, że parametr ten może mieć znaczenie rokownicze w terapii. Obserwacja ta sugeruje również, że efekt dobroczynny TF zależy zarówno od jej zdolności do eliminacji patogenów, jak i synergistycznego działania z fagocytami pacjentów, które odzyskują zdolność do bardziej skutecznego działania. Ten synergizm terapii fagowej i oddziaływania układu fagocytarnego został ostatnio w pełni potwierdzony przez innych autorów (Roach i współpr., *Cell Host Microbe* 2017;22:38-47.e4).

4. Międzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B, Fortuna W, Letkiewicz S, Szufnarowski K, Pawełczyk Z, Rogóż P, Kłak M, Wojtasik E, Górski A. (2012). Clinical aspects of phage therapy. *Adv Virus Res.* 83:73-121.

W pracy przedstawiono retrospektywną analizę wyników TF prowadzonej w Ośrodku Terapii Fagowej Centrum Medycznego IITD PAN w ramach eksperymentu leczniczego pt. „Eksperymentalna terapia fagowa infekcji bakteryjnych opornych na antybiotykoterapię, w tym zakażeń MRSA”.

Analizowano dane kliniczne i laboratoryjne 153 pacjentów (68 kobiet, 85 mężczyzn, mediana wieku – 46 lat) z przewlekłymi zakażeniami bakteryjnymi opornymi na antybiotykoterapię, dla których były dostępne dane z ogółu 157 osób zakwalifikowanych do terapii fagowej w latach 2008-2010. Badana grupa obejmowała chorych z zakażeniami układu moczowo-płciowego mężczyzn (19,1% przypadków) i kobiet (14,0%), zakażeniami tkanek miękkich (19,1% - głównie zakażenie rany pooperacyjnej i owrzodzenia podudzia), skóry (6,4%), układu kostno-stawowego (24,2%) oraz dróg oddechowych (15,3%). Inne rodzaje zakażeń stanowiły 1,3% przypadków. Były one wywołane przez bakterie z rodzaju/gatunku *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Salmonella* i *Stenotrophomonas*, przy czym monoinfekcja występowała u 80% chorych (z czego u 50% stwierdzano zakażenie *S. aureus*), a infekcje mieszane u 20%. Mediana czasu trwania choroby przed rozpoczęciem terapii fagowej wynosiła 43 miesiące (zakres: 4-600 mies.). W terapii stosowano lizaty fagowe zawierające fagi zdolne do swoistej lizy patogennego szczepu bakteryjnego w dawce 10-20 ml trzy razy dziennie przy podawaniu drogą doustną (po uprzedniej neutralizacji kwasu żołądkowego Alugastrinem), 10-20 ml dwa razy dziennie w postaci wlewek doodbytniczych i 2 razy dziennie miejscowo (w postaci okładów, przymoczek, kropli do ucha i nosa, nasiadówek oraz do płukania gardła, do przepłukiwania ropni i przetok, do płukania pochwy, a także w postaci inhalacji aerozolu). Do oceny wyników TF u tak zróżnicowanej grupy pacjentów opracowano oryginalną, uniwersalną siedmiostopniową skalę, która pozwalała również na sklasyfikowanie wyników w dwóch kategoriach – jako dobra i niewystarczająca odpowiedź na leczenie.

Przeprowadzona analiza wykazała, że u 39,9% ogółu chorych wystąpiła dobra odpowiedź na terapię, przy czym eradykację patogenu lub wyleczenie obserwowano u 18,3% ogółu chorych. Nie obserwowano istotnej różnicy między grupą pacjentów, którzy stosowali wyłącznie bakteriofagi (n=109) a tymi, u których w trakcie terapii zastosowano także

antybiotyki lub inne środki przeciwbakteryjne (n=44). W poszczególnych grupach chorych dobrą odpowiedź na terapię uzyskano w następującym odsetku: mężczyźni z zakażeniami układu moczowo-płciowego (w tym z przewlekłym bakteryjnym zapaleniem gruczołu krokowego) – 48,3% (w tej grupie osiągnięto też największy odsetek eradykacji/wyleczenia – 37,9%), chorzy z zakażeniami układu kostno-stawowego (w tym zakażenia okołoprotezowe) – 45,9%, osoby z zakażeniami tkanek miękkich (głównie zakażenie rany pooperacyjnej i owrzodzenia podudzia) – 36,7%, kobiety z zakażeniami dróg moczowych lub płciowych – 36,4%, pacjenci z zakażeniami skóry – 30%, pacjenci z zakażeniami dróg oddechowych – 29,2%.

Analizowano zmiany wrażliwości najczęściej występujących u chorych szczepów bakteryjnych (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* i *P. aeruginosa*) na stosowane w terapii bakteriofagi. Najmniejszy (17,0%) odsetek pacjentów, u których wystąpiła oporność bakterii na faga stosowanego w czasie TF obserwowano w przypadku zakażeń *S. aureus*, a największy (85,7%) w przypadku *E. coli*.

Oceniano również zmiany w zakresie podstawowych parametrów hematologicznych (poziom hemoglobiny we krwi, hematokryt, liczba erytrocytów, płytek krwi, leukocytów z podziałem na limfocyty, monocyty, granulocyty, eozynofile i bazofile), OB, badania ogólnego moczu i podstawowych parametrów biochemicznych w surowicy (poziomu glukozy na czczo, kreatyniny, białka całkowitego i bilirubiny całkowitej oraz aktywności transferazy asparaginowej, transferazy alaninowej, gamma-glutamyl transpeptydazy, fosfatazy zasadowej i amylazy). Nie obserwowano aby stosowanie preparatów fagowych istotnie modyfikowało funkcje układu krwiotwórczego ani innych narządów takich jak nerki, wątroba i trzustka, chociaż u niektórych chorych obserwowano w trakcie terapii fagowej odchylenia od normy w zakresie pojedynczych parametrów. Najczęściej miały one charakter przejściowy lub były klinicznie nieistotne i nie wymagały leczenia.

Szczegółowe wyniki oceny bezpieczeństwa stosowania lizatów fagowych w leczeniu przewlekłych zakażeń bakteryjnych wykazały, że do najczęstszych działań niepożądanych, których prawdopodobną przyczyną mogło być stosowanie preparatów fagowych należały reakcje miejscowe (18,4% chorych), które występowały w okolicy gdzie był stosowany preparat fagowy (miejscowo i/lub doodbytniczo). Obejmowały one uczucie dyskomfortu przy stosowaniu dopochwowym, ból, świąd, zaczerwienienie i podrażnienie skóry, wysychanie/podrażnienie błon śluzowych górnych dróg oddechowych, pojawienie się bąbli pokrzywkowych i pęcherzyków ropnych, zaostrzenie atopowego zapalenia skóry. W większości przypadków dolegliwości były krótkotrwałe (do kilkudziesięciu minut) lub ustępowały po kilku dniach stosowania preparatu albo jego zamianie na inny. Wzrost temperatury ciała (stan podgorączkowy lub gorączka bez objawów choroby przeziębieniowej) zanotowano u 6,5% chorych, przy czym gorączka występowała u połowy z nich. Z reguły wzrost temperatury ciała obserwowano po podaniu kilku pierwszych dawek preparatu fagowego. Temperatura wracała do normy w ciągu kilku dni: samoistnie, po podaniu leków przeciwgorączkowych lub zmianie preparatu na preparat zawierający innego faga. Nadkażenie wymagające modyfikacji leczenia (przerwania terapii lub zastosowania antybiotyków lub leków przeciwgrzybiczych) wystąpiło u 4,6% chorych. Najczęściej pojawiało się w przypadku miejscowego stosowania preparatów fagowych. Trzech pacjentów (7,9%) stosujących preparaty fagowe drogą doustną zgłaszało nudności po ich zastosowaniu.

W pracy wymieniono również inne rzadziej występujące objawy niepożądane, które potencjalnie mogłyby wiązać się ze stosowaniem preparatów fagowych. Ogółem u 6 chorych (3,9%) wystąpiły objawów niepożądanych o charakterze lub nasileniu wymagającym przerwania terapii.

Otrzymane wyniki wskazują nie tylko na bezpieczeństwo terapii fagowej i prawdopodobieństwo jej skuteczności (przynajmniej w określonych rodzajach zakażeń lub jednostkach chorobowych, takich jak bakteryjne zapalenie gruczołu krokowego u mężczyzn, czy zakażenia w obrębie układu kostno-stawowego). Prezentują także szereg obserwacji, które mogą być cennymi przesłankami i ważnymi informacjami przy planowaniu standardowych badań klinicznych w zakresie terapii fagowej w celu formalnego potwierdzenia jej skuteczności.

5. Międzybrodzki R, Kłak M, Jończyk-Matysiak E, Bubak B, Wójcik A, Kaszowska M, Weber-Dąbrowska B, Łobocka M, Górski A. (2017). Means to facilitate the overcoming of gastric juice barrier by a therapeutic staphylococcal bacteriophage A5/80. *Front Microbiol.* 8:467.

Podawanie preparatów bakteriofagowych drogą doustną w czasie TF jest jednym z najwygodniejszych sposobów ich stosowania. Droga ta może być wykorzystana, gdy istnieje potrzeba miejscowego działania fagów w leczeniu infekcji bakteryjnych przewodu pokarmowego, jak i w celu ogólnoustrojowego działania fagów w przypadku infekcji rozwijających się poza układem pokarmowym. Mimo tego istnieją tylko nieliczne dane kliniczne i doświadczalne dotyczące możliwości penetracji różnych bakteriofagów z przewodu pokarmowego do krwi i narządów u ssaków. Ponieważ wiele fagów jest inaktywowanych w kwaśnym środowisku bariera, którą tworzy sok żołądkowy (jego pH u człowieka wynosi ok. 1,7, podczas gdy pH w dalszych częściach przewodu pokarmowego jest bliskie 6) może skutecznie zapobiegać ich transferowi do jelit po podaniu doustnym. Dlatego w praktyce klinicznej stosuje się różne sposoby poprawy tego transferu stosując np. węglan dihydroksyglinowo-sodowy do neutralizacji soku żołądkowego (Alugastrin).

Celem w tej pracy było zweryfikowanie efektywności zastosowania różnych sposobów neutralizacji soku żołądkowego lub ograniczenia jego wytwarzania w pokonywaniu bariery soku żołądkowego przez bakteriofaga A5/80 i zbadanie możliwości ich zastosowania w celu poprawy jego przenikania przez błonę śluzową do krwi u zwierząt (szczury i myszy). A5/80 (jego pełny symbol zgodnie z obowiązującą nomenklaturą Międzynarodowego Komitetu Taksonomii Wirusów to: vB\_SauM\_A5/80) jest fagiem gronkowcowym o szerokim spektrum litycznym, bardzo często stosowanym w TF u pacjentów Ośrodka Terapii Fagowej Centrum Medycznego IITD PAN. Sekwencja genetyczna i ultrastruktura faga A5/80 zostały dobrze poznane. Należy on do rodzaju *Kayvirus* podrodziny *Spounavirinae* rodziny *Myoviridae*. Jego wirion zbudowany jest z dwudziestościennej kapsydu (zawierającego cząsteczkę dsDNA o wielkości 146-bp) o średnicy 71,5 nm i kurczliwego ogonka o długości 214,5 nm. Dlatego do porównania został użyty modelowy fag *E. coli* T4 należący również do *Myoviridae* i cechujący się podobnymi wymiarami co A5/80 (średnica kapsydu – 85 nm, długość ogonka – 215 nm). Przeprowadzone kompleksowe badania biodostępności fagów uwzględniały również wykonanie wielu badań kontrolnych mających na celu wykluczenie

wpływu mikrobiomu zwierząt (wrażliwość bakterii w przewodzie pokarmowym zwierząt na badane fagi) i innych czynników (wrażliwość badanych fagów na niskie pH, adsorpcja fagów do treści jelitowej, wpływ środków stosowanych do neutralizacji soku żołądkowego na aktywność fagów, inaktywacja fagów przez surowicę i pełną krew) na interpretację uzyskanych wyników.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że modyfikacja środowiska w żołądku szczura może chronić podanego doustnie faga A5/80 przed inaktywacją przez sok żołądkowy w stopniu wystarczającym do przejścia jego znaczącej frakcji do jelit. Po raz pierwszy wykazano, że nie tylko Alugastrin (dla którego optymalny czas podania w celu uzyskania jak najsilniejszej ochrony fagów przez inaktywację w żołądku wynosił 1-15 min. przed dawką fagów), może istotnie poprawiać pasaż żołądkowo-jelitowy podawanych drogą doustną fagów, ale również zastosowanie antagonistów receptora histaminowego H<sub>2</sub> (ranitydyna) lub inhibitorów pompy protonowej (omeprazol). Wyniki doświadczeń wykonanych na szczurach potwierdziły, że ranitydyna w dawce 2-50 mg/kg m.c. *i.p.* oraz omeprazol w dawce 1-10 mg/kg m.c. *i.p.* podane 2 godz. przed fagami znacząco zwiększają ich przetrwanie w kwaśnym środowisku żołądka i przechodzenie do jelit. Ranitydyna zastosowana drogą doustną zwiększała transfer fagów do jelit, ale tylko w dużej dawce (75 mg/kg m.c.). Ponadto wykazano, że podanie jogurtu lub mleka 1-10 min. przed dawką fagów również, chociaż w mniejszym stopniu, może wywierać taki efekt. Mimo tego nie obserwowano, aby po podaniu doustnym którykolwiek z badanych fagów mógł penetrować do krwi szczurów.

Eksperymenty przeprowadzone na myszach wykazały natomiast, że podany doustnie fag A5/80 był wykrywany we krwi (oraz wątrobie) w znaczących ilościach po zastosowaniu Alugastrinu, podczas gdy fag T4 podany w dawce tysiąc razy większej był wykrywany jedynie w śladowych ilościach (nawet po podaniu Alugastrinu). Ten nieoczekiwany wynik dowodzi, że dwa fagi o podobnej budowie i wrażliwości na kwaśne środowisko (oba fagi były całkowicie inaktywowane po 60 min. inkubacji w temp. 37°C w buforze o pH 4,0) mogą znacząco różnić się w zdolności do translokacji z przewodu pokarmowego do krwi. Ponadto wskazuje, że penetracja fagów z przewodu pokarmowego do krwi może zależeć od gatunku zwierzęcia.

6. Międzybrodzki R, Borysowski J, Kłak M, Jończyk-Matysiak M, Obmińska-Mrukowicz B, Suszko-Pawłowska A, Bubak B, Weber-Dąbrowska B, Górski A. (2017). *In vivo* studies on the influence of bacteriophage preparations on the autoimmune inflammatory process. *Biomed Res Int.* 2017:3612015.

Celem tej pracy było zbadanie wpływu lizatów fagowych stosowanych w eksperymentalnej terapii fagowej zawierających faga *Pseudomonas* 119x, faga enterokokowego 15/P, faga gronkowcowego A3/R, faga gronkowcowego phi200 oraz mieszanki MS-1 zawierającej fagi gronkowcowe A5/80, P4 i 676/Ż na przebieg zapalenia stawów indukowanego kolagenem (*collagen-induced arthritis* – CIA). W badaniu użyto również faga *E. coli* T4 w postaci lizatu oraz preparatu oczyszczonego (zawierającego przede wszystkim znacznie mniej endotoksyn niż wyjściowy lizat). Preparaty fagowe podawano myszom dootrzewnowo raz dziennie w dawkach, które w przeliczeniu na masę ciała ponad dziesięciokrotnie przekraczały dawki stosowane w eksperymentalnej terapii fagowej

w Ośrodku Terapii Fagowej Centrum Medycznego IITD PAN. Zapalenie stawów indukowane było u myszy śródskórnym podaniem kolagenu typu II w pełnym (I dawka) i niepełnym (II dawka) adjuwancie Freund'a w odstępie 21 dni. Jest to uznany i często stosowany zwierzęcy model reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) będącego jedną z najczęściej występujących u ludzi chorób autoimmunologicznych, która prowadzi nie tylko do destrukcji stawów i tkanek okołostawowych, ale również zajęcia innych narządów i układów (np. płuc, serca i naczyń krwionośnych, nerek, układu nerwowego), czy też wtórnej amyloidozy. Obserwacje objawów klinicznych zapalenia stawów prowadzono do 56 dnia od pierwszej immunizacji kolagenem (zwykle pierwsze objawy zapalenia stawów pojawiają się około 28 dnia). W przypadku stosowania mieszanki MS-1 badano również jej wpływ na narządy układu odpornościowego i wybrane populacje komórek (materiał do badań był pobierany od myszy w 63 dniu od pierwszej immunizacji kolagenem).

Analiza wpływu lizatu fagów gronkowcowych na wagę, liczbę komórek i populacje limfocytów ( $CD8^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD4^+CD8^+$ ,  $CD4^-CD8^-$ ) grasicy, śledziony i węzłów chłonnych otrzewnowych po 21 dniach od zakończenia „terapeutycznego” stosowania preparatu MS-1 nie wykazała zasadniczo istotnych różnic badanych parametrów (masa narządu, współczynnik masy narządu do masy ciała, całkowita liczba wyizolowanych komórek) w porównaniu do grupy kontrolnej poza wzrostem całkowitej średniej liczby splenocytów o 29,4%. Obserwowano także wzrost populacji limfocytów  $CD4^+$  o 39% w porównaniu do kontroli, ale nawet nieco wyższy wzrost tej populacji (o 47%) obserwowano w przypadku grupy otrzymującej równoważną mieszankę zawiesiny zabitych (za pomocą sonikacji) gronkowców używanych do produkcji preparatu MS-1. Zmiany te mogą być odzwierciedleniem zjawiska immunizacji badanych zwierząt bakteriofagami i tworzenia przeciwciał przeciwko bakteriofagom.

Wyniki przeprowadzonych badań sugerowały, że dootrzewnowe podawanie lizatów fagowych zarówno bakterii Gram-dodatnich (preparat faga phi200) jak i Gram-ujemnych (preparat faga 119x) w schemacie profilaktycznym (czyli od pierwszej do drugiej immunizacji kolagenem) zmniejszyło intensywność indukcji CIA, jednak jak wykazały badania kontrolne ten niespodziewany efekt mógł być raczej wynikiem działania nie samych bakteriofagów lecz innych składników lizatu fagowego. Stosowanie lizatów fagowych bakterii Gram-dodatnich (preparaty 15/P, A3/R i MS-1), Gram-ujemnych (preparaty T4, 119x) jak i oczyszczonego preparatu faga T4 w schemacie terapeutycznym, czyli codziennie od 22 do 42 dnia od pierwszej immunizacji kolagenem nie nasilało CIA. Pomimo że endotoksyny będące integralnym składnikiem ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych nasilają CIA, ogólnoustrojowe podanie lizatu fagowego pałeczki *Pseudomonas aeruginosa*, który zawiera produkty jej rozpadu powstałe w procesie namnażania fagów, nie nasilało zapalenia stawów w przeciwieństwie do równoważnej zawiesiny zabitych bakterii. Co więcej, oczyszczony preparat faga T4 podawany w schemacie terapeutycznym wykazał nawet pewną aktywność przeciwzapalną w tym modelu – w 56 dniu badania nasilenie objawów CIA było o 37,5% niższe w grupie otrzymującej tego faga w porównaniu do grupy kontrolnej (w grupie myszy otrzymującej metotreksat było ono wtedy niższe o 25,5%).

Podsumowując, zaprezentowane w tej pracy wyniki sugerują, że fagi nie zaostrzają objawów RZS. Przeciwnie, fag T4 może nawet wywierać działanie immunosupresyjne.



**Za najważniejsze osiągnięte rezultaty uważam:**

1. Wykazanie, że zbliżone strukturalnie bakteriofagi mogą znacząco różnić się w ich zdolności penetracji z przewodu pokarmowego do krwi i narządów wewnętrznych.
2. Potwierdzenie w badaniach na zwierzętach, że zastosowanie zarówno węgłanu dihydroksyglinowo-sodowego neutralizującego sok żołądkowy, jak i antagonistów receptora histaminowego H<sub>2</sub> lub inhibitorów pompy protonowej może istotnie poprawiać pasaż żołądkowo-jelitowy fagów podawanych drogą doustną.
3. Wykazanie, że naturalny jogurt może również poprawiać pasaż żołądkowo-jelitowy fagów podawanych drogą doustną.
4. Wykazanie, że fag T4 niezależnie od swoistości wobec bakterii może wpływać na proces zapalny poprzez hamowanie tworzenia reaktywnych form tlenu (będących jednymi z głównych mediatorów tego procesu) przez granulocyty pobudzane zarówno bakteriami *Escherichia coli*, jak i izolowaną z nich endotoksyną.
5. Wykazanie, że w hamującym działaniu faga T4 na tworzenie reaktywnych form tlenu przez granulocyty mogą brać udział nie tylko mechanizmy związane z wiązaniem lipopolisacharydu przez faga i jego działaniem litycznym na bakterię, ale również mechanizmy związane z bezpośrednim oddziaływaniem fagów na funkcje granulocytów, przy czym efekt ten może zależeć od rodzaju bodźca użytego do stymulacji produkcji reaktywnych form tlenu przez te komórki.
6. Wykazanie, że terapeutyczne zastosowanie oczyszczonego preparatu faga T4 zmniejsza intensywność zapalenia stawów indukowanego kolagenem u myszy, co sugeruje działanie przeciwzapalne tego faga.
7. Wykazanie, że preparaty fagowe zawierające czynniki o potencjalnym działaniu immunostymulującym (wirusy, antygeny bakteryjne) nie nasilają objawów klinicznych zapalenia stawów indukowanego kolagenem u myszy.
8. Potwierdzenie, że stosowanie preparatów fagowych u chorych z zakażeniami bakteryjnymi powoduje istotne zmniejszenie nasilenia procesu zapalnego mimo, że preparaty te mogą zawierać czynniki o potencjalnym działaniu immunostymulującym (wirusy, antygeny bakteryjne) oraz powodować uwolnienie takich antygenów z komórek bakteryjnych w miejscu infekcji.
9. Wykazanie, że terapia fagowa prowadzona przy użyciu lizatów fagowych nie powoduje ogólnej stymulacji układu odpornościowego u chorych, może natomiast zwiększać zdolność granulocytów do fagocytozy, co sprzyja pomyślnemu przebiegowi tej terapii.
10. Potwierdzenie ogólnego bezpieczeństwa terapii fagowej.

## Potencjalne wykorzystanie wyników prac / omówienie ewentualnego wykorzystania

Dane potwierdzające ogólne bezpieczeństwo TF mogą być wykorzystane przy planowaniu przyszłych badań klinicznych, których celem będzie potwierdzenie skuteczności terapii fagowej w leczeniu zakażeń bakteryjnych i określaniu konieczności przeprowadzania przedklinicznych badań toksyczności badanych preparatów fagowych na zwierzętach.

Badanie zmian zdolności fagocytarnych granulocytów izolowanych od chorych w czasie terapii fagowej przewlekłych zakażeń bakteryjnych mogłoby być wykorzystane jako parametr rokowniczy tej terapii.

Wyniki badań potwierdzających poprawę biodostępności doustnie podawanych fagów po zastosowaniu antagonistów receptora histaminowego H<sub>2</sub>, inhibitorów pompy protonowej i jogurtu wskazują na możliwość poszerzenia repertuaru środków, które mogą być użyte w celu ochrony fagów przed inaktywacją w żołądku. Wyniki te mogą być wykorzystane nie tylko w eksperymentalnej TF, ale w przyszłości również w standardowej TF z doustnym stosowaniem fagów w celu wyboru najwłaściwszego dla danego pacjenta (np. ze względu na wiek, przeciwwskazania, stosowane już leki, potrzebę poprawy smaku preparatu fagowego) środka do ochrony fagów przed inaktywacją w żołądku. Odpowiednio wyselekcjonowane fagi o potencjalnym działaniu immunomodulującym zdolne do eliminacji patogennych bakterii i jogurt o właściwościach probiotycznych zastosowane jednocześnie mogłoby wspomagać wzajemnie swoje działanie immunomodulujące i regulujące skład flory bakteryjnej w przewodzie pokarmowym.

Potencjalne wykorzystanie przeciwzapalnego działania niektórych fagów opisane zostało w opublikowanej w latach 2017-2018 serii prac poglądowych, których jestem współautorem (zał. 4, pkt. II A, poz. 2.13-2.15, 2.17 i 2.18). Przedstawiono w nich możliwości terapeutycznego zastosowania fagów w leczeniu nieswoistych zapaleń jelit (zał. 4, pkt. II A, poz. 2.14), autoimmunologicznego zapalenia wątroby (zał. 4, pkt. II A, poz. 2.15), chorób alergicznych (zał. 4, pkt. II A, poz. 2.17), czy też choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (zał. 4, pkt. II A, poz. 2.18). Innym nowym kierunkiem terapeutycznym, wynikającym bezpośrednio z zaprezentowanych przeze mnie badań, jest zastosowanie fagoterapii jako leczenia wspomagającego w reumatoidalnym zapaleniu stawów.

Zdolność fagów do obniżania produkcji wolnych rodników tlenowych, przez granulocyty stymulowane lipopolisacharydem mogłaby być wykorzystana do opracowania nowego leku biologicznego chroniącego tkanki przed uszkodzeniem spowodowanym przez RFT uwalniane w nadmiarze w przebiegu sepsy (zał. 4, pkt. II A, poz. 2.13) i ostrego zespołu niewydolności oddechowej wywołanych przez bakterie Gram-ujemne. Można tu rozważyć bezpośrednie zastosowanie wyselekcjonowanych fagów lub izolowanych z nich białek fagowych. Słuszność powyższych założeń została już częściowo potwierdzona przez Miernikiewicz i współpr. we wspomnianej wcześniej publikacji dotyczącej właściwości białka gp12 faga T4 (*Front Microbiol* 2016;7:1112).

Jak wynika z powyższego rezultaty badań przedstawione w wybranych przeze mnie pracach wchodzących w skład mojego osiągnięcia naukowego mogą mieć istotne znaczenie praktyczne dla rozwoju klinicznej terapii fagowej.

## 5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze

### *Przebieg pracy naukowej przed uzyskaniem stopnia doktora*

Pracę naukową rozpocząłem w 1996 roku w Laboratorium Immunofarmakologii IITD PAN pod kierunkiem doc. dr hab. Stanisława Szymańca. Byłem bezpośrednio zaangażowany w wiele kierunków badań prowadzonych w tym laboratorium, dzięki czemu mogłem rozwijać swój warsztat badawczy w zakresie różnych metod badań *in vitro* (w szczególności izolacji różnych komórek eukariotycznych, badania ich aktywności i oceny ekspresji antygenów powierzchniowych, prowadzenia hodowli pierwotnych i linii komórkowych) i *in vivo* (testy farmakologiczne na myszach i szczurach) oraz analizy statystycznej danych biomedycznych. W roku 1997 odbyłem krótki staż naukowy w Zakładzie Immunologii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie pod opieką prof. dr hab. n. med. Ewy Skopińskiej-Różewskiej, gdzie poznawałem metody badania angiogenezy *in vivo*.

Brałem m.in. udział w badaniach nad patogenezą endometriozy i niepłodności niejasnego pochodzenia realizowanych we współpracy z II Kliniką Ginekologii i Położnictwa Akademii Medycznej we Wrocławiu. Ich wyniki (opublikowane jako prace oryginalne wymienione w zał. 4, pkt. II D na poz. 1.1 i 1.4 oraz jako praca w suplemencie czasopisma oraz wymieniona w zał. 4, pkt. II D na poz. 3.1) wykazały m.in., że u kobiet z niepłodnością niejasnego pochodzenia nie występują immunologiczne cechy stanu zapalnego w miednicy małej tak jak to obserwowano w przypadku kobiet z endometriozą, u których stwierdzano znacząco podwyższone poziomy interleukiny 6 (IL-6) i czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) w płynie otrzewnowym. Sugerowały one jednak, że płyn otrzewnowy może hamować aktywność komórek NK (*natural killers*) i charakteryzować się podwyższonym poziomem naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) nie tylko u kobiet z endometriozą, ale i niepłodnością niejasnego pochodzenia.

Byłem zaangażowany w badania aktywności biologicznej laktoferyny, które wykazały, że może ona hamować ostry proces zapalny na modelu obrzęku łapy szczura indukowanym karageniną oraz hamować ekspresję antygeny 1 związanego z funkcją limfocytów (LFA-1 – integryny obecnej na limfocytach i innych leukocytach biorącej udział w mechanizmie ich przechodzenia z krwi do tkanki łącznej) na ludzkich komórkach jednojądrzastych izolowanych z krwi obwodowej stymulowanych endotoksyną (wyniki opublikowano jako prace oryginalne wykazane w zał. 4, pkt. II D na poz. 1.2 i 1.3).

W tym okresie brałem również udział w realizacji pięciu różnych projektów badawczych finansowanym ze środków Komitetu Badań Naukowych (zał. 4, pkt. II I, poz. 1-5). Jednym z ich najważniejszymi osiągnięć było m.in. zsyntetyzowanie nowych analogów nocyceptyny – neuropeptydu działającego przez własny receptor w wielu przypadkach przeciwnie do opioidów i powodującego np. nadwrażliwość na ból po podaniu domózgowym. Niektóre z nich wykazywały znaczące działanie antagonistyczne (osłabiały odczuwanie bólu przez myszy indukowanego przez bodziec termiczny), przez co mogą być interesującymi wyjściowymi peptydami do prac nad nowymi lekami przeciwbólowymi (wyniki opublikowane w pracy oryginalnej wykazanej w zał. 4, pkt. II A na poz. 1.4). Badania nad wykorzystaniem inhibitorów endopeptydazy cysteinowej znakowanych izotopem promieniotwórczym do oceny rozległości nacieku nowotworowego raków języka i krtani (wyniki opublikowano w pracy oryginalnej wykazanej w zał. 4, pkt. II A na poz. 1.5)

zaowocowały uzyskaniem ochrony patentowej dla zastosowania tych inhibitorów (pozyskiwanych np. białka jaja kurzego) do oznaczania *in vitro* komórek wolnych lub wchodzących w skład tkanek nowotworowych w badaniach cytologicznych lub histopatologicznych.

W 1997 roku rozpocząłem staż specjalizacyjny (zakończony w roku 2004) w zakresie chorób wewnętrznych na Oddziale Chorób Wewnętrznych i Reumatologii Okręgowego Szpitala Kolejowego we Wrocławiu, kierowanym przez prof. dr hab. n. med. Jacka Szechińskiego, który jednocześnie kierował Zakładem Reumatologii (przekształconym później w Klinikę Reumatologii) Akademii Medycznej we Wrocławiu mającym siedzibę na terenie tego Szpitala. Współpraca z Zakładem Reumatologii zaowocowała realizacją projektu badawczego (zał. 4, pkt. II I, poz. 5), którego celem było określenie wpływu metotreksatu (MTX) *in vitro* na apoptozę aktywowanych fitohemalglutyniną limfocytów z krwi obwodowej pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów przed rozpoczęciem terapii i porównanie z kliniczną odpowiedzią na MTX. Oryginalne wyniki tych badań, w których wykazano m.in., że dobra odpowiedź pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) na leczenie MTX nie koreluje z odpowiedzią ich limfocytów na MTX *in vitro*, zostały opublikowane w 2004 roku (list do redakcji: zał. 4, pkt. II A, poz. 4.1).

Jednym z wiodących tematów badań statutowych realizowanych w Laboratorium Immunofarmakologii we współpracy z Laboratorium Immunochemii IITD PAN kierowanym przez prof. dr hab. Czesława Ługowskiego było badanie aktywności biologicznej różnych endotoksyn i roli swoistych przeciwciał antylipopolisacharydowych w doświadczalnym zapaleniu gałki ocznej. Te badania oraz doświadczenie z pracy ze zwierzętami i znakowaniem komórek izotopami promieniotwórczymi zainspirowały mnie do napisania (jako kierownik) grantu „dla młodego pracownika nauki”, którego celem było badanie wpływu przeciwciał anty-LPS na retencję komórek w płucach indukowaną przez endotoksynę (zatrzymanie komórek zapalnych w płucach odgrywa ważną rolę w patomechanizmie zespołu ostrej niewydolności oddechowej – ARDS). Wyniki, które uzyskałem w trakcie jego realizacji potwierdziły m.in., że preinkubacja lipopolisacharydu izolowanego z *E. coli* O1 z surowicą uzyskaną dla koniugatu oligosacharydu rdzeniowego *E. coli* typu R4 z toksoidem tężcowym (OS R4-TT) znacząco hamuje retencję komórek YAC-1 (komórki mysiego chłoniaka typu T) w płucach myszy stymulowaną przez ten lipopolisacharyd. Zostały one opublikowane w pracy, w której wykazano również wysoką aktywność anty-endotoksynową tych przeciwciał *in vitro* (zał. 4, pkt. II A, poz. 1.5).

Pracę doktorską pt. „*Badanie aktywności i mechanizmu działania przeciwzapalnego nowych pochodnych izotiazolu*” wykonaną pod kierunkiem doc. dr hab. Stanisława Szymańca obroniłem w 2003 r. z wyróżnieniem nadanym przez Radę Naukową IITD PAN. Jej przedmiotem było zbadanie aktywności biologicznej 44 nowych związków, o potencjalnym działaniu przeciwzapalnym, zsyntetyzowanych w Katedrze Chemii Organicznej Akademii Medycznej we Wrocławiu przez zespół pod kierownictwem prof. dr hab. Zdzisława Machonia. Związki te należały do grupy pochodnych kwasu 3-metylo-4-izotiazolokarboksyłowego i kwasu 5-amino-3-metylo-4-izotiazolokarboksyłowego (pochodne  $N^2$ -fenylo- $N^1$ -(4-karboksy-3-metylo-5-izotiazolo)-benzamidyny i pochodne kwasu 5-benzoiloamino-3-metylo-4-izotiazolo-karboksyłowego) w tym pochodnych nowego otrzymanego układu (4*H*)-izotiazolo[5,4-*d*]-1,3-oksazyny. Aktywność przeciwzapalną

związków badałem *in vivo* na gryzoniach w teście hamowania obrzęku indukowanego karageniną, w teście hamowania tworzenia ziarniny oraz w modelu zapalenia indukowanego karageniną w „poduszce powietrznej”. W teście gorącej płytki badałem ich działanie przeciwbólowe. W doświadczeniach *in vitro* badałem działanie cytotoksyczne związków oraz ich wpływ na aktywność izoenzymów cyklooksygenazy (COX-1 i COX-2), stabilizację błony erytrocytów oraz na tworzenie cytokin zapalnych (TNF- $\alpha$  i IL-6), tlenku azotu oraz chemiluninescencję komórek krwi obwodowej pobudzanych PMA. Do najważniejszych wyników uzyskanych przeze mnie podczas realizacji pracy doktorskiej było: wyselekcjonowanie czterech najsilniej działających przeciwzapalnie *in vivo* związków (N<sup>2</sup>-(4-trifluorofenylo)-N<sup>1</sup>-(4-karboksy-3-metylo-5-izotiazolio)-benzamidyny, N<sup>2</sup>-(4-etoksyfenylo)-N<sup>1</sup>-(4-karboksy-3-metylo-5-izotiazolio)-benzamidyny, (4-chlorofenylo)-amidu kwasu 5-(4-chlorobenzoilo)amino-3-metylo-4-izotiazolokarboksyowego i (4-trifluorometylo-fenylo)-amidu kwasu 5-(4-chloro-benzoilo)amino-3-metylo-4-izotiazolokarboksyowego), które zostały zarekomendowane do dalszych badań przedklinicznych; wskazanie kierunku modyfikacji badanych struktur w celu otrzymania związków o jeszcze większej aktywności przeciwzapalnej; wykazanie, że niektóre z aktywnych przeciwzapalnie związków mogą działać przeciwbólowo. Zaobserwowane rozbieżności w aktywności *in vitro* i *in vivo* niektórych ze związków cechujących się największą aktywnością (N<sup>2</sup>-(4-trifluoro-fenylo)-N<sup>1</sup>-(4-karboksy-3-metylo-5-izotiazolio)-benzamidyny i N<sup>2</sup>-(4-etoksy-fenylo)-N<sup>1</sup>-(4-karboksy-3-metylo-5-izotiazolio)-benzamidyny) pozwoliły na postawienie hipotezy o tym, że ulegają one *in vivo* metabolicznemu przekształceniu do aktywnych pochodnych odpowiedzialnych za ich działanie przeciwzapalne. Część wyników uzyskanych w trakcie realizacji mojej pracy doktorskiej została opublikowana w pracy oryginalnej wykazanej w zał. 4, pkt. II A na poz. 1.8). Ponieważ inne badania (również z moim udziałem) wykazały niską toksyczność ostrą i korzystnie słabe działanie ulcerogenne N<sup>2</sup>-(4-etoksy-fenylo)-N<sup>1</sup>-(4-karboksy-3-metylo-5-izotiazolio)-benzamidyny związek ten oraz inne fenylobenzamidynowe pochodne 3-metylo-5-amino-4-karboksyizotiazolu i sposób ich wytwarzania został opatentowany (zał. 4, pkt. II B, poz. 1).

### ***Przebieg pracy naukowej po uzyskaniu stopnia doktora***

Od 2003 roku prowadziłem działalność naukową w Zakładzie Immunologii Lekarskiej a od roku 2007 prowadzę ją bezpośrednio w Samodzielnym Laboratorium Bakteriofagowym IITD PAN (kierowanymi przez prof. dr hab. n. med. Andrzeja Górskiego), którego wiodącym tematem naukowym są badania nad biologią bakteriofagów i ich wykorzystaniem w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Od roku 2013 działalność naukową prowadzę również w Zakładzie Immunologii Klinicznej Instytutu Transplantologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, w którym jestem zatrudniony w niepełnym wymiarze etatu. W roku 2012 odbyłem krótki staż naukowy w *Laboratory for Molecular and Cellular Technology* i *Burn Wound Centre* w *Queen Astrid Military Hospital* w Brukseli gdzie zapoznawałem się z prowadzonymi tam badaniami nad biologią bakteriofagów, przygotowaniem preparatów fagowych i ich zastosowaniem klinicznym u chorych z zakażonymi ranami oparzeniowymi.

Najważniejsze uzyskane przeze mnie wyniki zostały zawarte w cyklu publikacji naukowych, wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, wyszczególnionych w punkcie 4.b i szczegółowo opisane w punkcie 4.c niniejszego autoreferatu. Zostały one uzyskane m.in. w wyniku realizacji projektów naukowych wykazanych w zał. 4, pkt. II I na poz. 7-9. Bardzo dużą rolę w prowadzonych przeze mnie badaniach odegrała praca w Ośrodku Terapii Fagowej Centrum Medycznego IITD PAN i zaangażowanie w realizację projektu „Eksperymentalna terapia fagowa infekcji bakteryjnych opornych na antybiotykoterapię, w tym zakażeń MRSA”, którego celem jest umożliwienie chorym z przewlekłymi zakażeniami bakteryjnymi skorzystania z tej formy terapii na zasadzie eksperymentu leczniczego. W pracy tej bardzo użyteczne okazało się doświadczenie, które zdobywałem jako członek zespołu badawczego w różnych badaniach klinicznych wymienionych w zał. 4, pkt. III Q na poz. 3.1-3.6. Poniżej przedstawiłem najważniejsze zagadnienia badawcze, którymi się zajmowałem lub zajmuję wykraczające poza ten cykl.

#### Badania nad pojawianiem się przeciwciał antyfagowych u chorych w trakcie terapii fagowej

Zaangażowanie w ten temat badawczy wynikało m.in. bezpośrednio ze wspomnianej wyżej działalności w OTF. Jak ogólnie wiadomo wirusy patogenne mogą silnie indukować odpowiedź humoralną u ssaków. Ich układ immunologiczny może podobnie wytwarzać przeciwciała przeciwko wirusom bakteryjnym, które są zbudowane z białek różniących się antygenowo od białek zwierzęcych. Pojawianie się przeciwciał antyfagowych jest jednym z ważnych dla TF problemów ponieważ może wpływać na efekt leczenia. Ich obecność można wykrywać w teście ELISA lub pośrednio badając neutralizujące działanie surowicy na swoistego faga i określając tzw. współczynnik K (współczynnik inaktywacji faga). Celem prowadzonych badań jest dostarczenie bardziej szczegółowych niż dotychczas dostępne danych w tym zakresie. Wykazały one m.in., że przed rozpoczęciem TF stwierdza się raczej słabą aktywność antyfagową badanych surowic pobieranych od chorych (u osób zdrowych inaktywacja fagów gronkowcowych jest również na niskim poziomie). Natomiast w trakcie TF obserwuje się istotny wzrost aktywności neutralizującej surowicy we wszystkich grupach chorych, tj. stosujących fagi doustnie, miejscowo, doustnie i miejscowo oraz doodbytniczo. Najslabiej powstawanie przeciwciał antyfagowych indukuje stosowanie fagów drogą doustną. Po zakończeniu TF aktywność antyfagowa surowic utrzymuje się na podobnym poziomie jak w trakcie terapii bądź ulega obniżeniu. Stosowanie mieszanek różnych bakteriofagów znacznie częściej indukuje silną aktywność antyfagową surowicy u pacjentów niż stosowanie preparatów zawierających pojedyncze fagi. Bardzo interesującym jest stwierdzenie, że wysoka aktywność antyfagowa surowic nie zawsze koreluje ze złą odpowiedzią na leczenie fagami. Te unikalne wyniki (opublikowane w serii oryginalnych prac wykazanych w zał. 4, pkt. II A na poz. 1.16, 1.20, 1.22 oraz w rozdziale wykazanym w zał. 4, II D na poz. 4.4) mają bardzo ważne praktyczne znaczenie kliniczne. Są m.in. istotnymi wskazówkami do podejmowania decyzji terapeutycznych u chorych leczonych w OTF, u których metoda oceny aktywności neutralizującej swoistego faga przez surowicę jest obecnie standardowo wykorzystywana do monitorowania występowania przeciwciał antyfagowych o działaniu neutralizującym.

### Badania nad działaniem przeciwwirusowym bakteriofagów

W 2005 roku opublikowałem pracę pogładową (zał. 4, pkt. II A, poz. 2.1), w której opisałem różne możliwe interakcje między fagami a wirusami patogennymi dla człowieka oraz przedstawiłem wyniki badań *in vitro* i dane kliniczne uzyskane przez różnych autorów sugerujące możliwość potencjalnego wykorzystania bakteriofagów w terapii zakażeń wywołanych przez wirusy patogenne. W ramach projektu badawczego wykazanego w zał. 4, pkt. II I na poz. 7 prowadziłem w latach 2003-2006 wraz z dr Wojciechem Fortuną niezależne badania nad wpływem bakteriofagów na zdolność wirusów do zakażenia komórek nabłonkowych człowieka. Wykazały one, m.in. że preinkubacja komórek A549 (linia ludzkich komórek nabłonka płucnego) z fagiem T4 znacząco osłabiała działanie cytopatyczne adenowirusa typu 5 (często powodującego u ludzi np. ostre zakażenia górnych dróg oddechowych) na te komórki oceniane po 24 godzinach od ich zakażenia (komunikat wykazany w zał. 4, pkt. III B na poz. 1.29). Potwierdzało to wcześniejsze obserwacje Kleinschmidta i współpr. (*Nature*, 1970;228:27-30) sugerujące, że ten bakteriofag może hamować proces namnażania wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) w pierwotnych komórkach nabłonkowych izolowanych z kanalików krętych I rzędu nerki królika (*primary rabbit kidney cells*).

Temat ten kontynuowałem w latach 2014-2018 biorąc udział w projekcie badawczym wykazanym w zał. 4, pkt. II I na poz. 11 (projekt realizowany w konsorcjum utworzonym przez Warszawski Uniwersytet Medyczny i IITD PAN). W ramach tego projektu po raz pierwszy przeprowadzono badania, w których oceniano wpływ preparatów fagowych (faga T4 infekującego *E. coli* i faga gronkowcowego A5/80) na syntezę DNA, ekspresję genów wczesnych i późnych oraz syntezę i lokalizację białek adenowirusa typu 5. Ich wyniki wykazały hamujący wpływ tych dwóch różnych preparatów fagowych na przebieg zakażenia adenowirusowego, wyrażający się obniżeniem poziomu replikacji DNA adenowirusa, zmniejszeniem poziomu ekspresji wybranych genów adenowirusowych oraz zaburzaniem transportu białek wirusowych w komórkach. Stwierdzono również hamujący wpływ preparatu bakteriofaga T4 na poziom syntezy białka strukturalnego adenowirusa. Zostały one zaprezentowane na kilku konferencjach naukowych (m.in. wykazanych w zał. 4, pkt. III B. poz. 1.30, 1.31 i 2.9). Ponadto wykazano w badaniach z użyciem metody ilościowej RT-qPCR, że preparaty fagowe mogą istotnie wpływać na ekspresję niektórych genów ważnych w indukcji i regulacji odporności przeciwdrobnoustrojowej w linii komórek eukariotycznych, w szczególności na indukcję interleukiny 2 (IL-2), co może być istotne w aktywacji i ekspansji komórek NK o znanym działaniu przeciwwirusowym (dane nieopublikowane). Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały, że mechanizm przeciwwirusowej aktywności bakteriofagów jest złożony: składa się na niego nie tylko stymulacja produkcji cytokin oraz innych białek immunomodulujących, hamowanie syntezy DNA i białek adenowirusa, ale również hamowanie transportu wewnątrzkomórkowego białek adenowirusowych. Stanowiły one inspirację do napisania m.in. pracy pogładowej o perspektywach zastosowania bakteriofagów w leczeniu zakażenia wirusem Epsteina-Barr (zał. 4, pkt II A, poz. 2.16).

Badania właściwości biologicznych komórek gleju węchowego i możliwości ich zastosowania w leczeniu urazów rdzenia kręgowego

Komórki osłaniające pochodzenia glejowego (ang. *olfactory ensheathing cells*) znajdujące się w blaszce właściwej błony węchowej nosa, wokół wypustek nerwów węchowych oraz w zewnętrznych warstwach opuszki węchowej, zwane w skrócie komórkami gleju węchowego (KGW) wspomagają u ssaków odnawianie się neuronów węchowych oraz ich regenerację w przypadku uszkodzenia (zał. 4, pkt. II D, poz. 2.11). Jest to zjawisko wyjątkowe, ponieważ zachodzi w tkance nerwowej pochodzenia centralnego, w której po zakończeniu okresu dojrzewania zanikają mechanizmy umożliwiające regenerację uszkodzonych neuronów – w przeciwieństwie do nerwów obwodowych, które mogą regenerować i powodować powrót funkcji np. w przeszczepionych kończynach. Te unikalne właściwości KGW zostały odkryte w roku 1985 przez Geoffrey'a Raismana. Późniejsze jego badania na zwierzętach oraz wyniki prezentowane przez innych badaczy potwierdziły możliwość uzyskania efektywnej regeneracji uszkodzonych aksonów w rdzeniu kręgowym dzięki przeszczepieniu KGW w miejsce urazu (zał. 4, pkt. II D, poz. 2.6).

W 2003 roku rozpocząłem badania jako członek wspólnego kilkusobowego zespołu badawczego utworzonego przez Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu i Klinikę Neurochirurgii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, którego celem było poznanie właściwości biologicznych ludzkich KGW i opracowanie warsztatu umożliwiającego ich przygotowanie do transplantacji (badania prowadzone m.in. w ramach projektu wykazanego w zał. 4, pkt. II I na poz. 6). Informacje dotyczące biologii ludzkich KGW były wtedy bardzo skąpe. Nasze obserwacje wskazywały na istotne różnice między komórkami ludzkimi a zwierzęcymi. Izolowane przez nas ludzkie KGW miały inną morfologię i znacznie mniejszy potencjał proliferacyjny niż komórki szczurze, co w konsekwencji wymagało zmodyfikowania metod ich izolacji i hodowli. Poszukiwania efektywnego źródła do izolacji ludzkich KGW do badań *in vitro* (ich źródłem do pierwszych badań były opuszki węchowe pochodzące od chorych, u których doszło do całkowitego uszkodzenia nerwu węchowego na skutek urazu lub przez naciekający guz przedniego dołu czaszki) zaowocowały potwierdzeniem, że KGW można wyhodować z opuszek węchowych i błony węchowej pobieranych od zmarłych dawców narządów, przy czym efektywność ich izolacji koreluje z czasem ciepłego niedokrwienia (zał. 4, pkt. II A, poz. 1.9). Opracowaliśmy i opatentowaliśmy (zał. 4, pkt. II B, poz. 2) sposób pozyskiwania KGW z opuszek węchowych i błony węchowej od zmarłych dawców narządów, co umożliwia przeszczepienie tych komórek (allotransplantacja) w dowolnie wybranym przez lekarza momencie po urazie rdzenia, nie narażając pacjenta na powikłania mogące wyniknąć gdy pobierane są jego własne tkanki do izolacji tych komórek, albo w przypadku gdy pobranie tkanek do hodowli KGW nie jest możliwe. Patent ten obejmował również własną metodę, polegającą na zapobieganiu adhezji KGW do podłoża, która umożliwia uzyskanie częściowo oczyszczonych hodowli KGW, tzn. pozbawionych innych rodzajów komórek np. komórek nabłonka, śródbłonka i fibroblastów, w proporcji (w odniesieniu do innych komórek) uważanej za korzystnie warunkującą ich działanie neurotroficzne po przeszczepieniu do uszkodzonego rdzenia kręgowego. Przetestowaliśmy możliwość ich długotrwałego przechowywania w celu utworzenia banku KGW do allogenicnej transplantacji.



Po przeprowadzeniu serii doświadczeń na szczurach, w których testowaliśmy skompletowany przez nas system do dordzeniowej mikroiniekcji KGW oraz różne aspekty związane z bezpieczeństwem przeszczepiania syngenicznych KGW, w tym oceny miejscowej reakcji zapalnej po ich wszczępieniu do rdzenia kręgowego (zał. 4, pkt. III A, poz. 14) zespół przeprowadził 26 czerwca 2008 roku w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym we Wrocławiu pierwszą w Polsce operację dordzeniowej transplantacji autogenicznych KGW u chorego z zespołem całkowitego uszkodzenia rdzenia kręgowego w odcinku piersiowym (Th10/Th11). Do końca 2010 roku podobne zabiegi przeprowadziliśmy jeszcze u dwóch pacjentów. Potwierdziły one bezpieczeństwo opracowanych metod pozyskiwania, izolacji, hodowli i podania KGW izolowanych z błony węchowej pacjenta (odstęp między zabiegiem pobrania błony węchowej a przeszczepieniem komórek wynosił do 2 do 3 tygodni). Ich wyniki zostały opublikowane w pracy wykazanej w zał. 4, pkt. II A na poz. 1.14.

28 kwietnia 2012 roku zespół wykonał kolejny zabieg transplantacji KGW, którego wyniki opublikowane zostały w pracy wykazanej w zał. 4, pkt. II A na poz. 1.17. Do bezpośredniej współpracy przy jego przeprowadzeniu został zaproszony sam profesor Geoffrey Raisman wraz z grupą swoich współpracowników z University College of London. W tym przypadku KGW wyizolowano nie z błony a z opuszki węchowej pacjenta (uzyskanej przez wykonanie specjalnej kraniotomii) z całkowitym przerwaniem rdzenia kręgowego. Był to pierwszy tego typu zabieg na świecie. Po 12 dniach hodowli przygotowano zawiesinę KGW do transplantacji w okolicę uszkodzenia rdzenia (dodatkowo uzupełnioną wszczepami z nerwu skórniego pacjenta). Po 21 miesiącach intensywnej rehabilitacji pacjent uzyskał powrót czucia i zależnej od woli ruchomości w wybranych mięśniach kończyn dolnych. Wyniki specjalistycznych badań neurologicznych i neurofizjologicznych wskazywały na możliwość uzyskania regeneracji aksonów dróg eferentnych i aferentnych przez obszar uszkodzenia rdzenia kręgowego, który został poddany operacji rekonstrukcyjnej. Obserwowana klinicznie poprawa umożliwiła zmianę stopnia uszkodzenia rdzenia kręgowego u pacjenta z „A” (całkowite) na „C” (czuciowo I ruchowo niecałkowite) według pięciostopniowej skali ASIA. Za to osiągnięcie zespół został uhonorowany przez Prezesa Rady Ministrów trzecią nagrodą za osiągnięcia naukowo-techniczne (zał. 4, pkt. II J, poz. 2).

### ***Działalność dydaktyczna***

Byłem opiekunem prac magisterskich trzech studentek Politechniki Wrocławskiej i jednej studentki Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu (zał. 4, pkt. III J, poz. 1). W Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu opiekowałem się pięcioma studentami odbywającymi praktyki zawodowe, studentką z USA – stypendystką Programu Fulbright Student Award (jako „faculty Mentor”) oraz doktorantką Duńskiego Uniwersytetu Technicznego w czasie jej pobytu naukowego (zał. 4, pkt. III J, poz. 2).

Od roku 2013 jestem pracownikiem naukowo-dydaktycznym w Zakładzie Immunologii Klinicznej Instytutu Transplantologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, gdzie prowadzę różne zajęcia dla studentów I i II Wydziału Lekarskiego, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej oraz studentów English Division. Opracowałem szereg materiałów dydaktycznych do seminariów i ćwiczeń

z immunologii klinicznej oraz zajęć fakultatywnych pt. „Bakteriofagi w medycynie” (zał. 4, pkt. III I, poz. 1.8, 1.10). Wygłosiłem łącznie 6 wykładów z zakresu immunologii i transplantologii na kursach specjalizacyjnych dla lekarzy, mikrobiologów oraz diagnostów laboratoryjnych (zał. 4, pkt. III I, poz. 3).

Wygłosiłem ponad 20 wykładów (głównie dla lekarzy) na konferencjach naukowo-szkoleniowych, posiedzeniach towarzystw naukowych i seminariach w różnych ośrodkach naukowych. Większość z nich dotyczyła tematyki związanej z podstawami, regulacjami prawnymi, zasadami prowadzenia i wynikami terapii fagowej (zał. 4, pkt. III I, poz. 4-7).

W maju 2013 roku prowadziłem (wspólnie z prof. dr hab. Andrzejem Górskim) szkolenie podyplomowe w zakresie terapii fagowej dla lekarzy w *National Institute for Infectious Diseases „Prof. Dr. Matei Bals”* w Bukareszcie na zaproszenie jego kierownika prof. Adriana Strejnu-Cercel (zał. 4, pkt. III I, poz. 2.1).

Recenzowałem 2 publikacje w czasopismach krajowych i 6 publikacji w czasopismach międzynarodowych (zał. 4, pkt. III P, poz. 1-2).

Byłem redaktorem (wspólnie z dr. Janem Borysowskim i prof. dr hab. Andrzejem Górskim) pierwszej monografii poświęconej terapii fagowej (zał. 4, pkt. II E, poz. 1.1) wydanej przez czołową światową oficynę *Springer Nature*, za co zostałem uhonorowany w 2015 r. zespołową nagrodą dydaktyczną I stopnia JM Rektora Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (zał. 4, pkt. II J, poz. 3).

### **Działalność organizacyjna**

Do moich najważniejszych osiągnięć organizacyjnych zaliczam współudział w utworzeniu i organizacji pracy Ośrodka Terapii Fagowej (jako komórki NZOZ, a obecnie Centrum Medycznego Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN) we Wrocławiu kierowanego przez prof. dr hab. n. med. Andrzeja Górskiego (zał. 4, pkt. III Q, poz. 2.1). Jest to wciąż unikatowe w skali europejskiej centrum, w którym od roku 2005 w ramach projektu „Eksperymentalna terapia fagowa infekcji bakteryjnych opornych na antybiotykoterapię, w tym zakażeń MRSA” prowadzona jest na zasadach eksperymentu leczniczego terapia antybiotykkoopornych zakażeń bakteryjnych przy użyciu bakteriofagów. Od roku 2005 konsultuję i prowadzę leczenie zgłaszających się do Ośrodka pacjentów, pełnię również funkcję zastępcy Kierownika Centrum Medycznego IITD PAN. Brałem udział w utworzeniu filii Ośrodka w Krakowie i Częstochowie, opracowywaniu i aktualizacji protokołu eksperymentalnej terapii fagowej, formularzy i informacji dla pacjentów o terapii fagowej oraz przygotowaniu wniosków do komisji bioetycznych związanych z prowadzeniem tej terapii.

W roku 2015 organizowałem (jako Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego) międzynarodową konferencję naukową *Clinical Phage Therapy 2015* we Wrocławiu (zał. 4, pkt. III C, poz. 4). Konferencja była organizowana przez IITD PAN we współpracy z Wydziałem Zdrowia i Spraw Społecznych Urzędu Miejskiego Wrocławia w setną rocznicę odkrycia bakteriofagów przez F. W. Tworta oraz z okazji 10-lecia Ośrodka Terapii Fagowej. Współorganizowałem również pięć konferencji naukowo-szkoleniowych dla lekarzy

dotyczących terapii fagowej organizowanych przez OTF w latach 2006-2016 we Wrocławiu, Krakowie i Warszawie (zał. 4, pkt. III C, poz. 1-3 i 5-6).

### ***Działalność popularyzująca naukę***

W roku 2017 prowadziłem w Centrum Nauki Kopernik w Warszawie wykład popularnonaukowy pt. „Jak zregenerować uszkodzony rdzeń kręgowy – cz. I” w ramach w cyklu „Drogi do Życia” na zaproszenie prof. dr hab. Magdaleny Fikus. Przedstawiłem w nim podstawy biologii komórek osłaniających gleju węchowego i wyniki badań, które umożliwiły opracowanie warsztatu służącego do ich eksperymentalnego zastosowania w leczeniu całkowitego urazu rdzenia kręgowego (zał. 4, pkt. III I, poz. 8.1).

### ***Podsumowanie***

Mój dorobek wg analizy bibliometrycznej z dn. 18.04.2019 r. jest następujący:

#### ***Punkty za publikacje***

---

	<b>Przed doktoratem</b>		<b>Po doktoracie</b>	
	IF	MNiSW	IF	MNiSW
Oryginalne pełnotekstowe prace naukowe	4,346	73	58,148	619
Opisy przypadków	-	-	0,978	20
Prace pogładowe	-	10	79,396	706
<b>RAZEM</b>	<b>4,346</b>	<b>83</b>	<b>139,062</b>	<b>1345</b>

---

#### ***Informacje dodatkowe***

---

	<b>Przed doktoratem</b>		<b>Po doktoracie</b>	
	IF	MNiSW	IF	MNiSW
Publikacje pełnotekstowe w suplementach czasopism	-	-	-	-
Opisy przypadków	-	-	3,916	-
Publikacje z udziałem autora w badaniach wieloosrodkowych	-	-	-	-
<b>RAZEM</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>3,916</b>	<b>-</b>

---

Łączny *Impact Factor* (IF): **143,408**.

Łączna punktacja MNiSW: **1428**.

Liczba cytowań z bazy Web of Science z dn. 18.04.2019 r. (bez autocytowań): **1071**.

Indeks Hirscha z bazy Web of Science z dn. 18.04.2019 r.: **19**.

Jestem autorem/współautorem **40** (włączając 6 publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego) oryginalnych pełnotekstowych publikacji naukowych o łącznym IF = **62,494** (w tym pierwszym autorem i jednocześnie autorem korespondującym **8** publikacji o łącznym IF = **18,469**) oraz **36** prac poglądowych o łącznym IF = **79,396** (w tym pierwszym autorem lub autorem korespondującym **8** publikacji o łącznym IF = **5,733**). Jestem również współautorem **5** rozdziałów w międzynarodowych monografiach/podręcznikach akademickich (w przypadku jednej z tych monografii jednym byłem jednym z trzech redaktorów naczelnych), jednego opisu przypadku, jednego listu do redakcji czasopisma i jednej publikacji pełnotekstowej w suplemencie czasopisma.

Poza tym jestem współautorem **5** udzielonych patentów polskich i jednego patentu zastrzeżonego w USA. Byłem współautorem **49** doniesień naukowych, których streszczenia zostały opublikowane w materiałach z konferencji międzynarodowych (**16** z nich było prezentowane w formie referatów) i **21** doniesień, których streszczenia zostały opublikowane w materiałach z konferencji krajowych (**12** z nich było prezentowane w formie referatów).

Wrocław, 26 kwietnia 2019 r.

