Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia 03-09-2024
L.dz. 388

Prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska
Zakład Mikrobiologii
Wydział Nauk Biologicznych
Uniwersytet Wrocławski

30.08.2024

Recenzja rozprawy doktorskiej
Mgr Anny Zuzanny Chudzik

Tytuł rozprawy: „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i lipidomy *Cutibacterium* spp. o potencjale terapeutycznym i diagnostycznym"

promotor: dr hab. Mariola Paściak, prof. IITD PAN
Rozprawa doktorska wykonana w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk.

Podstawa prawna:
niniejszą recenzję sporządzono w oparciu o uchwałę Rady Naukowej Instytutu, z dnia 13 czerwca 2024 r. dotyczącą powołania na recenzenta rozprawy doktorskiej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne mgr Anny Chudzik.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska opiera się na zbiorze trzech publikacji wieloautorskich, w których Doktorantka jest pierwszą Autorką. Publikacje stanowią spójną tematyczną całość. Wyniki, które są podstawą oceny w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w czasopismach indeksowanych w ministerialnym wykazie czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych tj. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (IF=0,2); *International Journal of Molecular Sciences* (IF=4,9) oraz *mSphere* (IF=3,7). Prace zostały opublikowane w latach: 2020-2024. W skład dokumentacji rozprawy doktorskiej włączone są: *Streszczenie*, *Abstract*, *Omówienie*, *Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy*, *Oświadczenia współautorów*, *Publikacje wchodzące w skład rozprawy*, *Wnioski* oraz *Osiągnięcia*. Podkreślić należy bardzo czytelne opracowanie dokumentacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej. W

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | *www.uni.wroc.pl*

opinii Recenzentki, rozdział pt. *Cele pracy* powinien w dokumentacji rozprawy doktorskiej być wyszczególniony jako osobny rozdział.

W swoich osiągnięciach naukowych mgr Anna Chudzik wskazała na współautorstwo w 7 publikacjach naukowych, uczestnictwo w dwóch projektach naukowych, a także uczestnictwo w 5 krajowych konferencjach naukowych.

Autorka rozprawy dołączyła do dokumentacji rozprawy doktorskiej oświadczenia współautorów prac. Ich analiza wskazuje, iż Pani mgr Anna Chudzik w pierwszej pracy (przeglądowej, opublikowanej w języku polskim w *Postępach Higieny i Medycyny Doświadczalnej*) dokonała przeglądu literatury, wykonała ryciny, przygotowała pierwszą wersję manuskryptu, brała także udział w odpowiedzi na recenzje. W drugiej pracy, opublikowanej w *International Journal of Molecular Sciences*, opublikowano już wyniki badań eksperymentalnych. Autorka rozprawy oświadcza, iż brała udział w opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzaniu znaczącej części eksperymentów, opracowywaniu wyników, przygotowywaniu rycin, pisaniu manuskryptu oraz dokonała przeglądu literatury i współtworzyła odpowiedzi na recenzje. Zatem wkład Pani mgr Anny Chudzik w opublikowaną pracę uznać należy za wiodący i znaczący. Oświadczenie dotyczące trzeciej pracy opublikowanej w czasopiśmie *mSphere* wskazuje, iż Doktorantka była odpowiedzialna m.in. za planowanie badań, prowadzenie hodowli bakteryjnych, metodykę analizy kwasów tłuszczowych, opracowywanie wyników, przegląd literatury, przygotowanie manuskryptu, jego korekty oraz odpowiedzi na recenzje. Zatem także i w tej publikacji udział Doktorantki należy ocenić jako znaczący.

Tematyka podjęta w rozprawie doktorskiej jest niezwykle interesująca, nie tylko ze względu na wybór obiektu biologicznego do badań, tj. bakterii z rodzaju *Cutibacterium*, ale także ze względu na postawienie sobie ambitnego celu badawczego: kompleksowej analizy lipidomu tych bakterii. Istotnym celem pracy doktorskiej było poszukiwanie specyficznych markerów lipidowych o potencjale diagnostycznym mogących mieć zastosowanie w identyfikacji bakterii z rodzaju *Cutibacterium* i filotypów *C. acnes*.

W pierwszym etapie badań Doktorantka postawiła sobie za cel wyizolowanie i określenie składu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki różnych filotypów *C. acnes*, następnie zaplanowała analizę porównawczą kwasów tłuszczowych i lipidów bakterii z rodzaju *Cutibacterium*, aby finalnie

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | *www.uni.wroc.pl*

porównać ich lipidomy celem wskazania potencjalnych markerów charakterystycznych dla rodzaju *Cutibacterium*, ale także dla filotypów *C. acnes.* Cele, jakie postawiła sobie Doktorantka zostały przez Nią w pełni zrealizowane.

Wybór bakterii z rodzaju *Cutibacterium* (dawniej *Propionibacterium*) postrzegam jako interesujący, gdyż bakterie te z jednej strony wchodzą w skład mikrobiomu skóry czy błon śluzowych, a z drugiej mogą wywoływać zakażenia oportunistyczne. Co istotne, bakterie *C. acnes* mogą być przyczyną bakteriemii czy bakteryjnego zapalenia wsierdzia. Biorąc pod uwagę powyższe uważam, że tematyka podjętej rozprawy jest aktualna i ma aspekty ważne dla diagnostyki mikrobiologicznej, mikrobiologii lekarskiej, ale także dla szeroko rozumianych badań podstawowych w dyscyplinie nauki biologiczne. Analizując dostępne dane należy zaznaczyć, iż prac naukowych z zakresu lipidomiki bakterii jest obecnie stosunkowo niewiele, natomiast zauważalny wzrost zainteresowania badaczy tą tematyką widoczny jest po roku 2015. Praca doktorska wpisuje się zatem w bardzo aktualne światowe nurty badawcze.

W rozdziale umieszczonym na początku rozprawy doktorskiej, zatytułowanym: *„Omówienie"*, Doktorantka przedstawia informacje o klinicznym znaczeniu bakterii z rodzaju *Cutibacterium*, omawia także rolę biologiczną i potencjał terapeutyczny bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz rolę i potencjał diagnostyczny lipidów bakteryjnych.

Pytania do tej części pracy doktorskiej:

- Jakie czynniki wirulencji bakterii z rodzaju *Cutibacterium* są zaangażowane w przebieg reakcji zapalnej powodowanej przez te bakterie?
- Biorąc pod uwagę wzrost oporności na antybiotyki *C. acnes*, jakie inne możliwości terapeutyczne widzi Doktorantka, możliwe do zastosowania w leczeniu schorzeń powodowanych przez te bakterie?

W pierwszej publikacji, będącej pracą przeglądową, Autorka rozprawy doktorskiej przedstawia zagadnienia dotyczące charakterystyki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako mediatorów komunikacji międzykomórkowej. Warto podkreślić, iż pracę poświęcono pamięci Pani prof. Haliny Mordarskiej, wybitnej ekspertce w zakresie biologii, klasyfikacji i diagnostyki promieniowców. Stwierdzić należy, iż praca przeglądowa przygotowana jest bardzo starannie i szczegółowo, oparta jest na analizie 117 pozycji literatury. Na szczególne wyróżnienie zasługują wykonane przez Doktorantkę ryciny, które bardzo wzbogacają pracę. W publikacji omówiono historię odkrycia bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, biogenezę ich tworzenia zarówno przez bakterie Gram-ujemne jak i Gram-dodatnie. W pracy opisano także chemiczne składy pęcherzyków ze szczególnym uwzględnieniem lipidów, białek oraz kwasów nukleinowych. Za szczególnie interesujący rozdział w publikacji uważam ten omawiający udział pęcherzyków

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

zewnątrzkomórkowych w oddziaływaniach między komórkami bakterii oraz między komórkami eukariotycznymi.
Pytanie do publikacji:

- Czy znane są Doktorantce przykłady oddziaływania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych bakterii z białkami kaskady układu dopełniacza?

Drobna uwaga dotyczy nomenklatury ujętej w rozdziale pt. „Biogeneza bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych", gdzie powinno się używać określenia „rzęska", a nie „wić komórkowa" u bakterii.
Opracowanie pracy przeglądowej, ale także części teoretycznych w pracach oryginalnych, ujętych w rozprawie doktorskiej, świadczą o bardzo dobrej znajomości tematyki pracy doktorskiej. Także rozdziały poświęcone na dyskusję wyników, w opublikowanych pracach oryginalnych są interesujące i poprowadzone prawidłowo.

W drugiej publikacji, będącej pracą oryginalną, opublikowano wyniki prac eksperymentalnych dotyczących charakterystyki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych *C. acnes* porównując ich profile białkowe oraz lipidowe. W pracy dokonano obserwacji pęcherzyków badanych szczepów *C. acnes* z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Na podkreślenie zasługuje szczegółowo omówione zagadnienie prowadzenia hodowli bakterii oraz procedura izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Doktorantka wskazuje, iż dokonała optymalizacji warunków hodowli bakterii. Do publikacji dołączono obszerny *Supplementary material*.

Pytanie do publikacji:

- Jak Doktorantka tłumaczy uzyskane różnice pomiędzy szczepami *C. acnes* w profilach białkowych, zwizualizowane na Fig.3 w publikacji?

W trzeciej pracy Doktorantka wykonała analizę porównawczą lipidomów *C.acnes, C.granulosum, C.avidum* oraz *C.namnetense.* Podkreślić należy, iż uzyskane wyniki pozwoliły na wytypowanie związków o charakterze markerów charakterystycznych dla poszczególnych filotypów *C. acnes.*

Pytanie do publikacji:

- Jakie cechy, w opinii Doktorantki powinien wykazywać potencjalny marker mogący mieć zastosowanie do celów diagnostyki mikrobiologicznej?

Wykonując prace eksperymentalne Doktorantka wykazała się znajomością technik mikrobiologicznych ze szczególnym uwzględnieniem technik hodowlanych, technik elektroforetycznych, chromatografii cienkowarstwowej, chromatografii

Uniwersytet Wrocławski

WYDZIAŁ NAUK BIOLOGICZNYCH

ZAKŁAD MIKROBIOLOGII
ul. S. Przybyszewskiego 63
51-148 Wrocław
tel. +48 71 375 63 23
zmik@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas, chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz MALDI-TOF.

Finalnie, Doktorantka sformułowała 5 wniosków z pracy, które oceniam jako zasadniczo trafne. Za cenny wynik pracy doktorskiej uważam opisanie po raz pierwszy dla rodzaju *Cutibacterium* lipidów należących do amidów kwasów tłuszczowych - N-acyloetanoloamin i kardiolipin, oraz wskazanie na nowe markery lipidowe *Cutibacterium* o potencjale diagnostycznym. Moja drobna uwaga dotyczy wniosku nr 3, który jest zbyt ogólny.

W podsumowaniu chciałabym zapytać Doktorantkę:

- Jak ocenia możliwy wpływ zmiennych warunków środowiska, w jakim żyją bakterie na ich lipidomy?
- Czy w ocenie Doktorantki, lipidomika jest obecnie tylko uzupełnieniem innych metod diagnostycznych w bakteriologii, w tym proteomiki, czy jednak biorąc pod uwagę jej potencjał diagnostyczny dla identyfikacji niektórych rodzajów/gatunków bakterii, może stać się wiodącą techniką diagnostyczną?

Podsumowując recenzję stwierdzam, iż praca doktorska mgr Anny Chudzik jest interesująca, bardzo dobrze przygotowana, a mgr Anna Chudzik wykazała się znajomością nowoczesnych technik badawczych, wykonała szereg zaawansowanych eksperymentów, przeprowadziła poprawne wnioskowanie oraz w dojrzały sposób przedyskutowała własne wyniki z innymi badaczami. Doktorantka wykazała się także cenną umiejętnością pisania prac naukowych i publikowania własnych wyników.

W konkluzji końcowej stwierdzam, iż rozprawa doktorska pt. „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i lipidomy *Cutibacterium* spp. o potencjalne terapeutycznym i diagnostycznym" mgr Anny Chudzik, spełnia warunki określone w art.187 ust.1-4 Ustawy Prawo szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz.U.2023 poz. 742 z późn. zm.).

Biorąc pod uwagę bardzo aktualną tematykę badawczą, wysoki poziom merytoryczny prowadzonych badań, a także cenne wyniki uzyskane w pracy doktorskiej wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy.

Gabriela Bugla-Płoskońska

Zakład Mikrobiologii
KIEROWNIK
prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska

Prof. dr hab. Gabriela Bugla-Płoskońska