



Warszawa, 12.05.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Darii Kowalskiej

pt.: „*Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mikroorganizmów niepatogennych – charakterystyka oraz wpływ na komórki ludzkie*”

wykonanej pod kierunkiem:

dr hab. Jolanty Mierzejewskiej, prof. Uczelni oraz dr Małgorzaty Milner-Krawczyk

Podstawą opracowania niniejszej recenzji jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej z dnia 18 marca 2025 r.

Dobór i znaczenie tematu

Pani mgr inż. Patrycja Daria Kowalska podjęła w ramach rozprawy doktorskiej bardzo istotną tematykę jaką jest możliwość wykorzystania mikrobiologicznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako nośników substancji biologicznie aktywnych o udokumentowanych właściwościach przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych, immunomodulujących i przeciwnowotworowych. Liczne badania podstawowe wskazują na ich potencjał aplikacyjny zarówno w przemyśle biotechnologicznym jak i diagnostyce medycznej. Większość do tej pory opublikowanych prac dotyczy roli pęcherzyków wydzielanych przez komórki ssacze oraz pęcherzyków wydzielanych przez mikroorganizmy patogenne oraz ich roli w patogenezie wielu chorób, w tym progresji nowotworów, chorób autoimmunologicznych, a także infekcji bakteryjnych. Z związku z tym znacząca rola pęcherzyków w wirulencji różnych zagrażających życiu patogenów została szeroko udokumentowana a ich potencjał jako nośników wirulentnych do komórek gospodarza został potwierdzony zarówno na modelach in vitro jak i in vivo.

Natomiast, korzystne efekty zdrowotne związane z uwalnianymi pęcherzykami przez niepatogenne mikroorganizmy, w tym o potwierdzonych właściwościach probiotycznych, są mniej znane. Tak więc, rola pęcherzyków mikrobiologicznych wydzielanych przez szczepy mikroorganizmów probiotycznych lub potencjalnie probiotycznych oraz bakteryjnych szczepów niepatogennych wzbudza obecnie coraz większe zainteresowanie naukowców.

Dlatego też uważam, że wybór modelu badawczego jaki wybrała Doktorantka został starannie przemyślany. Biorąc pod uwagę, że dotychczas pojawiły się nieliczne publikacje naukowe pokazujące, że klasyczne drożdże piekarnicze *S. cerevisiae* wydzielają zewnątrzkomórkowe pęcherzyki membranowe zawierające różnorodne białka, można założyć, że produkcja i wydzielanie pęcherzyków wśród różnych gatunków drożdży jest powszechna. Zbadanie pod kątem drożdży, które są na co dzień spożywane wraz z pokarmem, tj. suplementy diety, produkty mleczne czy kiszonki warzywne, jest w pełni uzasadnione i nowatorskie. Ponadto, zastosowanie niepatogennego szczepu bakterii *Janthinobacterium lividum* KP16 wyizolowanej przez zespół naukowy Politechniki Warszawskiej o potwierdzonych właściwościach produkcji wiolaceiny jako metabolitu o stwierdzonych właściwościach przeciwbakteryjnych,



immunomodulacyjnych i przeciwnowotworowych do badań nad możliwością wykorzystania produkowanych pęcherzyków jako nośników tego metabolitu w sposób istotny podnosi innowacyjność przeprowadzonych badań.

Ocena formalna rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa napisana jest w formie dysertacji naukowej, liczącej 213 stron. Zawiera 21 tabel, 58 rysunków, 4 załączniki, wykaz skrótów oraz 260 pozycji literatury, z których większość pochodzi z ostatniego dziesięciolecia. W części pierwszej praca zawiera cel oraz hipotezę badawczą, natomiast w części drugiej zamieszczono wstęp z przeglądem literatury tematycznie związanej, w której doktorantka przedstawia oraz uzasadnia istotność podjętych badań. W trzeciej części pracy doktorantka szczegółowo opisuje użyty materiał biologiczny oraz metodykę badań, zarówno w formie opisowej, jak i poprzez schematy oraz rysunki. W rozdziale czwartym rozprawy doktorskiej doktorantka umieściła obszerny rozdział poświęcony omówieniu wyników połączony z dyskusją opatrzoną dokumentacją fotograficzną, rysunkami, diagramami oraz tabelami. W ostatniej części pracy doktorantka podsumowała uzyskane wyniki badań odnosząc się do postawionego celu. Całość pracy kończy się opisem przyszłych perspektyw terapeutycznego wykorzystania pęcherzyków mikrobiologicznych jako mediatorów w komunikacji międzykomórkowej oraz nośników związków biologicznie aktywnych, w tym transporterów leków ukierunkowanych na patogenezę chorób cywilizacyjnych.

Zaproponowany układ dysertacji jest typowy dla rozpraw doktorskich, niemniej jednak istnieje rozbieżność dotycząca kolejności rozdziału dotyczącego wprowadzenia (rozdział 2) czytelnika w obszar badań i celowości ich podjęcia oraz na tej podstawie postawionej hipotezy badawczej i celu pracy, który rozwiązuje problem badawczy (rozdział 1). Zdecydowanie bardziej czytelne byłoby przedstawienie tych rozdziałów w odwrotnej kolejności. Polszczyzna w rozprawie doktorskiej jest poprawna, precyzyjna, unikająca żargonu laboratoryjnego. Nie mniej jednak pojawiły się nieliczne, „nienaukowo” przedstawione sformułowania, np.: strona 28 „muszą produkować odpowiednie białka”, strona 61 „niestety osad nie był widoczny okiem nieuzbrojonym”, strona 106 „zupełnie nie nadaje się do izolacji”, strona 121 „które można posądzić o zdolność”, strona 125 „które bez problemu można zaobserwować”.

Ocena merytoryczna pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi formę dysertacji naukowej podzielonej na poszczególne rozdziały. **Pierwszy rozdział** dotyczy celu oraz hipotezy badawczej pracy. Głównym celem badań postawionym przez Doktorantkę była „weryfikacja bezpieczeństwa pęcherzyków w potencjalnych terapiach przeciwnowotworowych”. Na tej podstawie zweryfikowano hipotezę badawczą – „brak toksycznego wpływu mikropecherzyków wytwarzanych przez mikroorganizmy, takie jak drożdże probiotyczne i bakterie niepatogenne na komórki ludzkie (na przykładzie modelu komórek jelitowych człowieka) oraz możliwość ich wykorzystania jako nośników związków biologicznie czynnych do tworzenia DDS-EVs” (system dostarczania leków). W odniesieniu do tytułu rozprawy doktorskiej uważam, że tytuł „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mikroorganizmów niepatogennych – charakterystyka oraz wpływ na komórki ludzkie” nie uwzględnia wszystkich istotnych aspektów wynikających z



przeprowadzonych badań a przede wszystkim sformułowanego przez Doktorantkę celu badawczego. W mojej opinii cel badań należało by również zmodyfikować poprzez dodanie celów szczegółowych, które zdefiniowałyby szczegółowe zadania badawcze na podstawie których została by zweryfikowana hipoteza badawcza.

Drugi rozdział rozprawy doktorskiej – **wstęp pracy (wprowadzenie)**, zawiera przegląd literatury naukowej stanowiącej solidną podstawę teoretyczną, umożliwiającą sformułowanie przez Doktorantkę celu pracy oraz hipotezy badawczej. W poszczególnych podrozdziałach stanowiących zwartą całość wynikającą jasno z poprzednich, Doktorantka szczegółowo przedstawiła charakterystyką zewnątrzkomórkowych pęcherzyków mikrobiologicznych jako potencjalnych nośników związków biologicznie czynnych do komórek ludzkich oraz możliwości ich aplikacyjnego wykorzystania w terapii i diagnostyce. Poruszyła bardzo ważne zagadnienia dotyczące trudności ich prawidłowej izolacji i zaznaczając brak dotychczas opracowanych standardowych protokołów izolowania prowadzących do rozbieżnych danych i trudności w porównywaniu badań. Zaznaczyła w ten sposób potrzebę opracowania i optymalizacji jednolitych i uproszczonych metod izolacji pęcherzyków z zachowaniem ich jakości i potencjału terapeutycznego. Opisała rolę pęcherzyków mikrobiologicznych jako mediatorów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Podkreśliła również wysoki potencjał terapeutycznych pęcherzyków bakteryjnych w tym pochodzących ze szczepów probiotycznych. Wstęp pracy zamyka rozdział podsumowujący aktualne badania dotyczące potencjału zewnątrzkomórkowych pęcherzyków mikrobiologicznych jako nośników związków bioaktywnych w tym możliwości ich praktycznego wykorzystania do tworzenia systemów przenoszenia leków. W oparciu o literaturę Doktorantka skutecznie zweryfikowała luki w wiedzy, które jej praca ma na celu wyjaśnić. Wybór literatury jest nie tylko aktualny, ale także zróżnicowany, co pozwala na wieloaspektowe spojrzenie na omawiane zagadnienia oraz wskazuje na dokładność i rzetelność w podejściu badawczym Doktorantki. Stwierdzam, że wstęp pracy został opracowany prawidłowo, poruszając i wprowadzając w najważniejsze zagadnienia ujęte w rozprawie.

W **części metodycznej** rozprawy doktorskiej stanowiącej trzeci rozdział, Doktorantka zawarła opis wykorzystanego materiału biologicznego oraz zastosowanych metod badawczych. Rozdział ten został wzbogacony w ryciny oraz tabele, co znacząco ułatwiło zrozumienie przedstawianych informacji. Doktorantka zamieściła bardzo szczegółową listę używanych odczynników i buforów wraz z opisem ich przygotowania oraz wykaz wykorzystanej aparatury. Ponadto, każdy etap badania został starannie opisany, co pozwala na replikację przeprowadzonych eksperymentów przez innych badaczy w tej dziedzinie i podkreśla solidność naukowego podejścia Doktorantki. Należy również podkreślić, że dobór materiału biologicznego stanowił solidną podstawę dla zaplanowanych eksperymentów. Wiedza na temat zewnątrzkomórkowych pęcherzyków wydzielanych przez drożdże klasyfikowane jako GRAS lub potencjalnie probiotyczne jest ograniczona do zaledwie kilku naukowych publikacji. Również dobór linii komórkowych jako ludzkiego modelu nabłonka jelita grubego, zarówno pochodzenia nowotworowego jak i prawidłowych komórek, a także komórek tucznych został starannie przemyślany, co umożliwiło kompleksową analizę interakcji pęcherzyków z różnymi typami komórek. Stwierdzam, że rozdział „Materiał i metody” został bardzo dobrze przygotowany, co potwierdza doskonale przygotowanie Doktorantki w zakresie doboru technik badawczych wykorzystanych podczas prowadzonych badań.



Omówienie wyników wraz z dyskusją zostało przedstawione przez Doktorantkę w rozdziale czwartym rozprawy doktorskiej. Opisy wyników w treści rozprawy przedstawiono rzeczowo i syntetycznie z podziałem na etapy zgodnie z układem przyjętym w części metodycznej. Szczegółowe omówienie wyników zostało poprzedzone graficznym schematem podziału pracy badawczej na poszczególne etapy co pozwoliło czytelnikowi na szybką analizę kluczowych informacji przed przystąpieniem do analizy częściowych wyników.

Omówione wyniki badań zostały podzielone 3 główne etapy:

- 1) izolację oraz charakterystykę morfologiczną i proteomiczną zewnątrzkomórkowych pęcherzyków z hodowli drożdży oraz hodowli bakteryjnej;
- 2). ocenę ich zdolności do interakcji z komórkami ludzkimi oraz zbadanie ich wpływu na cytotoksyczność i odpowiedź metaboliczną eksponowanych na nie komórek na modelu in vitro;
- 3). ocenę potencjału badanych pęcherzyków w celu ich wykorzystania jako nośników biologicznie aktywnych substancji, tj. wiołaceiny i doksorubicyna, a następnie zbadanie krótko i długoterminowej ekspozycji komórek na egzogennie załadowanej substancji w pęcherzykach.

Opis wyników jest niezwykle szczegółowy i wsparty odpowiednią dokumentacją w postaci zdjęć, wykresów i tabel, co podkreśla rzetelność przeprowadzonych badań oraz umożliwia ich łatwiejszą interpretację. Tak złożony model badawczy oraz mnogość zastosowanych w badaniach metod jest atutem recenzowanej rozprawy doktorskiej i świadczy o rzetelności prowadzonych prac badawczych i dużym zaangażowaniu Doktorantki.

Omawiając wyniki badań dotyczące charakterystyki proteomicznej mikropęcherzyków mikrobiologicznych Doktorantka zacytowała dwie oryginalne prace zespołu (publikacja numer 21 oraz 105). W jednej pracy jest autorem wiodącym (publikacja numer 105), a w drugiej drugim współautorem (publikacja numer 21). Szkoda, że Doktorantka na wstępie rozprawy doktorskiej nie umieściła informacji o publikacji tych prac, tym bardziej, że prace dotyczyły zagadnień rozprawy doktorskiej i zostały opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR. Tak więc przeszły przez proces krytycznej recenzji przez ekspertów z tej dziedziny, co istotnie podwyższa rzetelność uzyskanych wyników oraz wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej, która mogła by przyjąć formę hybrydową.

W mojej ocenie prowadzona równolegle dyskusja dotycząca uzyskanych wyników jest najsłabszą stroną tego rozdziału. Doktorantka jedynie zasygnalizowała uzasadnienie uzyskanych wyników na tle dostępnych danych literaturowych, co w konsekwencji może prowadzić do niedostatecznego zrozumienia ich znaczenia. Zawężenie dyskusji polega na tym, że nie została ona w pełni rozwinięta, co uniemożliwia czytelnikowi pełne docenienie kontekstu badań. W rezultacie czytelnik czuje potrzebę sięgnięcia do dodatkowych materiałów źródłowych, aby zgłębić złożoność omawianych zagadnień. Biorąc pod uwagę bogaty zasób literatury dotyczącej pęcherzyków mikrobiologicznych oraz ich wpływu na komórki ludzkie, bardziej szczegółowa i krytyczna analiza dostępnych danych byłaby niezwykle korzystna. Umożliwiłaby ona nie tylko lepsze zrozumienie wyników, ale także umiejscowienie ich w szerszym kontekście badawczym, co jest istotne dla podkreślenia innowacyjności i wartości naukowej przeprowadzonych badań.



Zasadniczą część rozprawy zamyka rozdział 5 - „**Podsumowanie i perspektywy przyszłych badań**”, podsumowujący poszczególne etapy badań wraz z otrzymanymi wynikami, które umożliwiły realizację celu pracy doktorskiej oraz weryfikację postawionej hipotezy. Doktorantka nie postawiła jednoznacznych, wypunktowanych wniosków ani końcowych stwierdzeń wynikających z przeprowadzonych badań, które w sposób klarowny odniosłaby się do zweryfikowanej hipotezy oraz postawionego celu badań. Niemniej jednak, poprawnie zinterpretowała i podsumowała osiągnięte wyniki, łącząc je ze stwierdzeniami dotyczącymi przyszłych badań, co potwierdza jej zdolność do krytycznej analizy i refleksji dotyczących uzyskanych wyników.

Podsumowując, tematyka podjętych badań, ich wielokierunkowość oraz innowacyjny i aplikacyjny charakter, jak również czytelny, logiczny sposób ich analizy wskazuje na dużą wartość naukową przedstawionej dysertacji. Jednak każda bardzo dobra rozprawa doktorska pobudza do stawiania pytań, które wynikają z ciekawości naukowej czytelnika. Nie inaczej jest w przypadku rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Patrycji Darii Kowalskiej. W związku z tym prosiłabym, aby Doktorantka odniosła się w trakcie obrony publicznej do następujących zagadnień:

1. Czy przeprowadzenie jednego powtórzenia izolacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków z materiału biologicznego jest wystarczające do wyboru efektywnej ich izolacji ?
2. Czy zamrażanie i przechowywanie pęcherzyków w temperaturze -80°C nie wpłynęło na ich aktywność biologiczną w kontekście eksperymentów na liniach komórkowych ?
3. Czy warunki hodowli mogą wpływać na skład białkowy wewnątrz mikropęcherzyka? Jeżeli tak, to który parametr jest najbardziej krytyczny ?
4. Czy może Doktorantka wyjaśnić dlaczego użycie barwników fluorescencyjnych barwiących błonę lipidową pęcherzyków zwiększa ich stężenie i średnią wielkość.
5. W ramach przeprowadzonych badań dotyczących charakterystyki wyizolowanych pęcherzyków został określony ich potencjał błonowy określany jako potencjał zeta, który w kontekście terapii i dostarczania leków jest kluczowym parametrem definiującym stabilność i skuteczność zawiesin koloidalnych, w tym pęcherzyków. Podczas dyskusji uzyskanych wyników Doktorantka wskazała, że „za stabilne struktury, które nie ulegają agregacji uznaje się cząsteczki o ładunku bliskim -20 mV i niższym”. Badane w pracy pęcherzyki charakteryzowały się ładunkiem pomiędzy $-3,53$ a $-5,68\text{ Z [mV]}$, co jak zauważyła doktorantka będą bardzo łatwo ulegały agregacji. Czy takie parametry mogą świadczyć, że uzyskane pęcherzyki mogą być problematyczne w ich aplikacyjnym wykorzystaniu jako skutecznych nośników związków biologicznych czynnych w terapii DDS ? Czy niski potencjał zeta jest skorelowany z ich biodostępnością i efektywnością wchłaniania ładunku przez docelowe komórki ? Czy warunki i/lub okres przechowywania może wpływać na ich potencjał do agregacji czy jest to cecha szczepowo-zależna ?
6. Jakie mechanizmy mogą wyjaśniać różnice w wydzielaniu reaktywnych form tlenu (ROS) między liniami komórkowymi HT-29 i HCT116 w odpowiedzi na obecność pęcherzyków drożdżowych?
7. Jak zinterpretuje Doktorantka zróżnicowany wzór ekspresji metaloproteinaz i ich inhibitorów w badanych liniach nowotworowych pod wpływem ekspozycji na badane pęcherzyki ?



Podsumowanie i wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzowanej pracy doktorskiej Pani mgr inż. Patrycji Darii Kowalskiej stwierdzam, że Doktorantka we właściwy sposób zaplanowała i przeprowadziła prace eksperymentalne z wykorzystaniem innowacyjnego warsztatu metodycznego do kompleksowej oceny zewnątrzkomórkowych pęcherzyków mikrobiologicznych produkowanych przez mikroorganizmy niepatogenne, w tym probiotyczne szczepy drożdży, pod względem ich interakcji z komórkami eukariotycznymi oraz potencjału do wchłaniania i transportowania związków biologicznie aktywnych. Wyniki otrzymane w ramach realizacji poszczególnych etapów pracy doktorskiej potwierdzają, że pęcherzyki wydzielane przez probiotyczne szczepy drożdży oraz niepatogeny szczep bakteryjny posiadają potencjał biologiczny, który może być wykorzystany w przyszłości do opracowania nowych strategii ukierunkowanych na wykorzystaniu ich jako nośników związków bioaktywnych. Należy podkreślić, że Doktorantka w swojej pracy doktorskiej skupiła się na kompleksowej charakterystyce pęcherzyków mikrobiologicznych, co istotnie podkreśla innowacyjny charakter prowadzonych badań. Należy zaznaczyć, że większość dotychczas opublikowanych badań skupia się na roli pęcherzyków pochodzących z komórek ludzkich lub ssaczych oraz mikropęcherzyków wydzielanych przez bakterie patogenne, jako nośników czynników wirulentnych do komórek gospodarza pośredniczących w patogenezie zakażeń bakteryjnych a nawet w promowaniu rozwoju i progresji raka poprzez indukcję stanu zapalnego gospodarza.

W przeciwieństwie do tego, zewnątrzkomórkowe pęcherzyki produkowane przez probiotyczne szczepy grzybów pozostają niemal nietkniętym obszarem badań, mimo że wykazują obiecujące właściwości biologiczne a także potencjalne ich bezpieczeństwo. Ich potencjał w transporcie związków bioaktywnych, a także w terapeutycznym wykorzystaniu w nowoczesnych strategiach przeciwnowotworowych, zasługuje na kompleksowe badania. W związku z rosnącym zainteresowaniem biotechnologią pęcherzyków mikrobiologicznych oraz poszukiwaniem innowacyjnych metod leczenia, badania nad pęcherzykami mikroorganizmów probiotycznych mogą otworzyć nowe perspektywy w leczeniu chorób jelitowych w tym terapii nowotworowej. Dlatego też, podjęcie tematu pracy doktorskiej uważam za nowatorskie, celowe i uzasadnione, a uzyskane i przedstawione wyniki mają istotne znaczenie poznawcze.

Reasumując, rozprawa doktorska Pani Patrycji Darii Kowalskiej spełnia wymagania Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.) konieczne do uzyskania stopnia doktora. Zatem wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pani mgr inż. Patrycji Darii Kowalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony. **Wnioskuję również o wyróżnienie rozprawy.** Uzasadnienie przyznania wyróżnienia rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Patrycji Darii Kowalskiej przedstawiam w odrębnym wniosku.

dr hab. Edyta Juszcuk-Kubiak, prof. IBPRS-PIB