

Rzeszów, dn. 29.04.2025 r.

dr hab. Małgorzata Kus-Liśkiewicz, prof. UR
Wydział Biotechnologii Collegium Medicum
Uniwersytet Rzeszowski

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Patrycji Kowalskiej
pt. „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mikroorganizmów niepatogennych – charakterystyka
oraz wpływ na komórki ludzkie”
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Jolanty Mierzejewskiej, prof. uczelni
zrealizowanej w Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej**

Podstawą formalną wykonania recenzji jest pismo pana Prof. dr hab. inż. Michała Chudy, przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia z dnia 18 marca 2024 roku, które informuje o powierzeniu mi obowiązków recenzentki wspomnianej wyżej rozprawy doktorskiej.

Przewód doktorski procedowany jest na podstawie ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668). Zgodnie z art. 187 ustawy, w niniejszej recenzji ocenione zostanie czy rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w dyscyplinie biotechnologia i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej oraz czy praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Rozprawa doktorska mgr inż. Patrycji Kowalskiej przygotowana została według klasycznego opracowania monograficznego i posiada typowy układ z poszczególnymi częściami wyodrębnionymi jako rozdziały: Streszczenie i Abstract (w j. ang), Cel pracy wraz z określoną hipotezą badawczą, Wstęp teoretyczny, Materiały i metody, Wyniki i Dyskusja, Podsumowanie i perspektywy przyszłych badań, Bibliografia (260 pozycji), Wykaz skrótów, Spis rysunków i tabel oraz dołączone są załączniki. Łącznie rozprawa doktorska liczy 213 stron i zawiera 58 rycin oraz 21 tabel. Przedstawione wyniki badań powstały w trakcie realizacji kilku projektów: (i) OPUS 25 „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe drożdży probiotycznych jako nośniki biologicznie aktywnych molekuł przekazywanych do komórek ludzkich w przewodzie pokarmowym” (NCN 2023/49/B/NZ9/03663), którego kierownikiem jest dr hab. prof. uczelni Jolanta Mierzejewska; (ii) BIOTECHMED-2 Advanced „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe drożdży probiotycznych jako nośniki biologicznie aktywnych substancji” (finansowany w ramach

projektu *Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza*), kierownikiem była dr hab. prof. uczelni Jolanta Mierzejewska; (iii) *MINIATURA-5 „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe *Janthinobacterium lividium* jako nośniki wiołaceiny – substancji o udowodnionym działaniu terapeutycznym”* (NCN 2021/05/X/NZ1/01372), którego kierownikiem była dr Małgorzata Milner-Krawczyk.

Ocena merytoryczna recenzowanej rozprawy doktorskiej

W rozprawie doktorskiej podjęto próbę scharakteryzowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych syntetyzowanych przez niepatogenne mikroorganizmy, bakterie i drożdże, i ocenę dalszego ich wpływu na komórki ludzkie. Ponadto, dokonano oceny przydatności izolowanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako potencjalnych nośników związków biologicznie czynnych celem zaproponowania strategii systemu dostarczania leków.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (extracellular vesicles, EVs) odgrywają rolę w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych, pełniąc kluczową rolę w komunikacji między komórkami. Biorą między innymi udział w hamowaniu reakcji zapalnych, modulowaniu funkcji komórkowych i regeneracji uszkodzeń tkanek, modulowaniu układu odpornościowego i niezbędne są do zachowania komórkowej homeostazy. W związku tym, że EVs znajdują się w większości płynów ustrojowych, i dodatkowo biorąc pod uwagę fakt, że pełnią rolę w procesach nowotworzenia, szeroko badana jest ich rola jako nośników potencjalnych biomarkerów i nowych celów terapeutycznych. Badania jednak dotąd prowadzone dotyczą przede wszystkim EVs wydzielanych przez komórki ludzkie. Z tego względu, podjęty przez Doktorantkę temat badawczy skupiający się na ocenie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, ale produkowanych przez mikroorganizmy niepatogenne jest nowatorskim podejściem. Niezależnie jednak od podjętego tematu badawczego i udziału pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, należy zaznaczyć, że stosunkowo mała jest liczba opublikowanych prac badawczych zawierających charakterystykę identyfikowanych i izolowanych EVs. Stąd wartym podkreślenia jest też, że w pracy Doktorantka bardzo szeroko prezentuje wyniki dotyczące charakterystyki izolowanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, dodatkowo syntetyzowanych przez różne modele badawcze mikroorganizmów. Zaproponowana przez Autorkę analiza ich budowy, zawartości i interakcji z komórkami ludzkimi stanowi podstawę do uzupełnienia luki w obecnym stanie wiedzy i ma duży potencjał odkrywczy.

W pierwszej części dysertacji opisane zostały cel główny pracy oraz sformułowano hipotezę badawczą, co umożliwi Czytelnikowi punkt odniesienia i pełni kluczową rolę zarówno dla struktury pracy, jak i dalszego jej odbioru. Doktorantka, w rozdziale „Wstęp” umiejętnie wprowadziła Czytelnika w prezentowaną tematykę badawczą. Przedstawione zostały wiadomości ogólne dotyczące EVs i jednocześnie zaprezentowano, dokonując przeglądu baz danych, braki i niedosyt informacji dotyczących szczególnie EVs izolowanych z mikroorganizmów, w tym niepatogennych. To wskazuje na właściwy wybór tematu

badawczego dokonanego przez Doktorantkę. Cenne zagadnienia, które znalazły się w tej części pracy, min. mechanizmy pobierania EVs przez komórkę, metody izolacji EVs, czy opis natywnego ładunku pęcherzyków i możliwości ich modyfikacji są świetnym wstępem teoretycznym i pozwalają w następstwie zrozumieć, dlaczego zostały przeprowadzone określone rodzaje badań w dalszej części pracy. Ponadto, zaproponowany opis szczepów probiotycznych i warunki probiotyczności, a w szczególności zaprezentowanie roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako potencjalnych nowych „postbiotyków” wskazuje na duży zasób wiedzy teoretycznej jaki prezentuje Doktorantka oraz umiejętność poszukiwania nowych rozwiązań dla postawionego celu badawczego. Pragnę też podkreślić, że cały rozdział wstępny jest napisany we właściwy sposób, opisane są ważne i kluczowe zagadnienia dla zrozumienia całej dysertacji. Warto zaznaczyć również, że praca jest ubogacona wieloma rycinami i schematami, nie tylko zresztą zaprezentowanymi w tym rozdziale.

W pracy do badań wykorzystano trzy modele szczepów mikrobiologicznych do oceny i charakterystyki wydzielanych przez nie pęcherzyków. Co ważne, znalazły się tu zarówno drożdże *Saccharomyces boulardii* i *Kluveromyces marxianus*, jak i bakterie *Janthinobacterium lividium*. O ile wśród przedstawicieli drożdży znajdują się szczepy zaliczane do probiotycznych, o tyle być może dla celów porównawczych do analizy EVs bakteryjnych, warto byłoby dodać szczep również probiotyczny, na przykład z rodzaju *Lactobacillus*. Z drugiej jednak strony, rozumiem, że wybór *Janthinobacterium lividium* podyktowany był jego zdolnością do produkcji wiołaceiny, która w następstwie była charakteryzowana w dalszej części pracy.

Warto zauważyć, że znaczną część recenzowanej pracy doświadczalnej stanowią eksperymenty związane z doborem i optymalizacją układu badawczego, w tym szczególnie z procesami odzysku EVs oraz dalszego ich przechowywania. Często, w tego typu pracach obserwuje się odwzorowanie zastosowanego przez innych autorów modelu eksperymentalnego, choć nie zawsze jest to podejście właściwe. W trakcie wielu eksperymentów Doktorantka zastosowała kilka wariantów do ich przeprowadzenia; dla przykładu były to różne metody separacji (ExoPrism, ExoDisc, strącanie), różne techniki oceny dystrybucji wielkości (DLS i NTA), czy różne metody przechowywania (mrożenie, DMSO, FBS). Użycie tak wielu wariantów metodycznych w pracy, pozwala twierdzić, że zaprezentowane wyniki nie są obarczone błędem, choćby metodologicznym. Co więcej, takie podejście Kandydatki wskazuje na umiejętność samodzielnego prowadzenia i organizacji pracy naukowo-badawczej. Każdy bowiem ciąg otrzymanych wyników podsumowany był odpowiednim opisem, w tym zawarte były też krytyczne uwagi Autorki co do wyboru odpowiedniej metody i braku możliwości uzyskania wiarygodnych wyników przy jej zastosowaniu. Dowodzi to zdolności Doktorantki do właściwego podejmowania decyzji i wyciągania wniosków z przeprowadzonych analiz.

Osobną częścią pracy były badania dotyczące wpływu EVs na komórki jelita grubego człowieka. W tym układzie bardzo właściwie dobrano modelowe linie komórkowe, zestawiając wyniki dla komórek prawidłowych (CRL-1790 i CRL-1459) oraz nowotworowych (HT-29 i HCT116). Co więcej, przy wybranych typach eksperymentów, na przykład w badaniu odpowiedzi długoterminowej komórek na obecność doksorubicyny niesionej przez EVs, zaproponowano zastosowanie w przyszłości dodatkowego modelu badawczego jakim powinny być komórki odporne na ten związek. To dopiero pozwoliłoby w pełni zinterpretować otrzymane wyniki. Ważnym podkreślenia jest też fakt, że w tej części badań, zastosowano podejście wielowątkowe, które polegało na ocenie wpływu EVs na stan komórek poprzez oddziaływanie krótko- i długoterminowe, w tym poprzez przeprowadzenie urozmaiconych typów analiz; np. ocena aktywności metabolicznej, generowanie reaktywnych form tlenu, ocena całkowitej liczebności komórek, produkcja interleukin. Takie podejście, jak pokazały wyniki, było bardzo ważne i dowodzi dojrzałości naukowej Doktorantki. Wszystkie przedstawione dotąd badania wpisują się w nurt badań podstawowych. Natomiast część omawiająca potencjał izolowanych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako materiał nośnikowy dla substancji aktywnych (drug delivery system, DDS) wpisuje się w nurt badań aplikacyjnych, co ubogaca całą dysertację i stanowi w przyszłości punkt odniesienia dla zastosowań nowych terapii. Może to stanowić o potencjale praktycznego wykorzystania przeprowadzonych badań i ich dalszego wpływu na rozwój dyscypliny naukowej biotechnologii.

Podsumowując ocenę merytoryczną, uważam, że Autorka trafnie wybrała temat przewodni swojej pracy badawczej, biorąc pod uwagę istniejące braki stanu wiedzy na ten temat. Następnie, Doktorantka właściwie sformułowała hipotezę badawczą oraz cele pracy. Pragnę podkreślić, że Kandydatka celem weryfikacji hipotezy zastosowała szeroki wachlarz metod badawczych, co więcej eksperymentów o charakterze badań interdyscyplinarnych. W kolejnych częściach rozprawy Autorka sprawnie interpretuje wyniki, osadzając je w kontekście istniejącej literatury. A w zakończeniu Kandydatka przedstawia perspektywy przyszłych badań, co pokazuje potencjał, w tym aplikacyjny przeprowadzonych analiz.

Ocena metodologiczna recenzowanej rozprawy doktorskiej

Dysertacja została poprawnie skonstruowana, zawiera wszystkie wymagane elementy rozprawy doktorskiej. Od strony językowej recenzowaną pracę oceniam pozytywnie; tylko kilkakrotnie pojawiły się błędy literowe czy stylistyczne (np. „*są coraz bardzo*”, „*badanie, które są planowane*”). Pragnę zaznaczyć, że w żadnym wypadku nie wpływają one na jakość merytoryczną pracy. Zdarza się w kilku miejscach używanie przez Autorkę tzw. slangu laboratoryjnego, na przykład przytaczane słowo „*medium*”, które w mojej ocenie powinno zostać zastąpione po prostu słowem „*pożywka*”. Z drugiej jednak strony tłumaczę to tym, że

Autorka jest cytowana w publikacjach anglojęzycznych, stąd dosłownie zaczerpnęła i użyła takiego słowa. To jednak również nie umniejsza wartości całej pracy.

Zastosowana metodologia w pracy jest jak najbardziej właściwa a jej wielowątkowość zasługuje na docenienie i podkreślenie. Doktorantka wykonała szereg zaawansowanych analiz; w tym praca ze szczepami mikrobiologicznymi oraz liniami komórkowymi, analizy chromatograficzne, wizualizacja elektronowa, elektroforeza SDS-PAGE oraz metoda Western blot, analiza ekspresji genów, wizualizacja z wykorzystaniem mikroskopii fluorescencyjnej, cytometria przepływowa czy pomiary DLS, NTA oraz zeta-potencjału. Dowodzi to na posiadanie przez Doktorantkę bogatego warsztatu badawczego i umiejętności interpretacji wyników badań interdyscyplinarnych. Wskazuje to również na zdolność do współpracy i prowadzenia badań w grupie. Uważam też za bardzo właściwe połączenie części prezentującej wyniki i prowadzoną równocześnie dyskusję. Jest to pomocne w interpretacji i zestawianiu wyników z innymi autorami, szczególnie przy tak wielu przeprowadzonych typach eksperymentów.

Wartym jest podkreślenia, że na początku części prezentującej otrzymane wyniki, Autorka opisuje w jaki sposób są one uorganizowane w dalszej części rozdziału, co zdecydowanie ułatwia odbiór. Szkoda jednak, że w końcowej części dysertacji nie znalazło się podsumowanie w postaci zbiorczego zestawienia wniosków. To zdecydowanie ułatwiłoby ocenę zrealizowania postawionych celów szczegółowych w pracy.

Po zapoznaniu się z dysertacją, obok wskazanych wyżej niewielkich uchybień, miałabym kilka pytań do Doktorantki, i jeśli jest to możliwe, prosiłabym o odpowiedź podczas publicznej obrony:

- W pracy zastosowano trzy modelowe szczepy mikrobiologiczne: *S. boulardii* i *K. marxianus*, *J. lividium*. O ile zestawienie dwóch modelowych szczepów drożdżowych, w tym probiotycznych jest uzasadnione, to dlaczego nie dodano jako modelu bakteryjnego również szczepu probiotycznego?
- Proszę Doktorantkę o wyjaśnienie i rozwinięcie stwierdzenia, że „EVs mogą wywoływać niepożądane reakcje immunologiczne i tym samym trudne do przewidzenia skutki uboczne” (str. 34).
- Czy przeprowadzone zostały badania, lub wiadomo jest to z doniesień innych autorów, w jaki sposób stopień produkcji EVs jest zależny od fazy wzrostu szczepu. Szczepy drożdży bowiem hodowano zdecydowanie krócej niż szczep bakteryjny, stąd być może wynika też różnica w stężeniu otrzymanych EVs. Jaki może to mieć wpływ na „jakość” otrzymanych EVs?
- Czy dobór rozmiaru filtra 0,2 μm we wstępnym etapie filtrowania nie powodował pozbycia się pęcherzyków o nieco większych rozmiarach? Dlaczego dobrano taki rozmiar filtra, a nie nieco większy?

- Czy celowo ominięto procedurę mrożenia EVs w glicerolu, tak jak ma to miejsce przy przechowywaniu szczepów w tradycyjny sposób w trakcie mrożenia? Czym podyktowany był wybór DMSO i FBS?
- Czy w przypadku pomiarów DLS i otrzymanych wyników rozmiarów powyżej 260 nm, może być to wynik błędnie dobranej procedury czy może proces agregacji? Czy badano stabilność EVs w roztworze, na przykład poprzez określenie współczynnika polidispersyjności?
- W związku z trudną preparatyką dla wizualizacji EVs metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej, czy rozważano wykonanie analiz identyfikacji z wykorzystaniem alternatyw, takich jak SEM, AFM?
- Autorka wskazuje na otrzymane różnice w wynikach dotyczących poziomu białek reakcji zapalnych z dostępnymi wynikami innych autorów (str. 151). Czy Doktorantka może zaproponować metodologię dalszych badań wyjaśniającą wpływ EVs na czynnik transkrypcyjny NF- κ B?

Podsumowując, chciałabym podkreślić, że recenzowana przeze mnie praca doktorska prezentuje wysoki poziom merytoryczny oraz niesie istotny wkład w rozwój wiedzy na temat roli pęcherzyków zewnątrzkomórkowych mikroorganizmów niepatogennych. Autorka wykazała się dużą samodzielnością badawczą, umiejętnie dobierając nowoczesne metody analityczne i interpretując wyniki w szerokim kontekście biologii komórki i mikrobiologii jednocześnie wskazując na potencjał aplikacyjny swoich badań. Dowodzi to posiadania przez Doktorantkę wiedzy teoretycznej w dyscyplinie biotechnologia. Biorąc pod uwagę rodzaj i ilość wykonanych eksperymentów w celu zweryfikowania postawionej hipotezy badawczej, uważam, że Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenia badań. Z uwagi na przedstawiony stan wiedzy, należy stwierdzić, że zaproponowana tematyka będąca podstawą dysertacji, stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Warto podkreślić, że dowodem na posiadanie umiejętności prowadzenia badań i interpretacji otrzymanych wyników jest wyróżniający dorobek naukowy Kandydatki. Pani mgr inż. Patrycja Kowalska jest współautorką 14 publikacji (w tym w dwóch jest „pierwszym autorem”), 11 wystąpień na konferencjach międzynarodowych, 1 patentu. Kandydatka była też finalistką w konkursie StRuNa w kategorii Projekt Roku, otrzymała finansowanie w ramach Grantu Rektora Politechniki Warszawskiej oraz finansowanie od Dziekana Wydziału Chemicznego. Doktorantka czynnie brała również udział w realizacji projektów naukowych, o czym wspomniałam we wstępie niniejszej recenzji. Zwraca uwagę również bogate doświadczenie zawodowe Doktorantki, które – jak można wnioskować z treści rozprawy – przełożyło się na wysoką jakość interpretacji wyników, umiejętnie prowadzoną dyskusję oraz trafne formułowanie wniosków.

Opinia końcowa

Mając na względzie przedstawioną przez mnie powyżej opinię, uważam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr inż. Patrycji Kowalskiej spełnia wszystkie warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów procedowania przewodu doktorskiego. Zwracam się też do Wysokiej Rady o wyróżnienie niniejszej rozprawy, jednocześnie składając osobny wniosek z argumentacją.



dr hab. Małgorzata Kus-Liśkiewicz, prof. UR
Uniwersytet Rzeszowski