WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY
ŚRODOWISKA
Uniwersytet Łódzki

UNIC

Łódź, dnia 10.09.2024 r.

Prof. dr hab. Katarzyna Lisowska
Katedra Mikrobiologii Przemysłowej
i Biotechnologii
Uniwersytet Łódzki

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Łupkowskiej

„Bakterie przetrwałe *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* powstałe w warunkach stresowych "

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska została wykonana pod kierunkiem promotora, prof. dr hab. Ewy Laskowskiej z Katedry Biochemii Ogólnej i Medycznej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Promotorem pomocniczym jest dr inż. Karolina Stojowska-Swędrzyńska z tej samej jednostki.

Celem badań podjętych w pracy było ustalenie czy agregaty powstające podczas wysuszania i rehydratacji *Escherichia coli* zawierają glikowane białka oraz czy w hodowlach *Klebsiella pneumoniae* istnieje korelacja między agregacją białek a pojawianiem się bakterii przetrwałych. Antybiotykooporność jest jednym z najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia publicznego. Liczne badania wskazują, że poza opornością na antybiotyki, istotnym problemem są także bakterie przetrwałe, które tolerują wysokie stężenia antybiotyków. Bakterie przetrwałe stanowią niewielką subpopulację i charakteryzują się zahamowanym lub wyjątkowo powolnym metabolizmem. W przeciwieństwie do bakterii opornych, bakterie przetrwałe nie rozmnażają się w obecności antybiotyku, a ich materiał genetyczny jest identyczny z materiałem bakterii wrażliwych, z których się wywodzą. Po zakończeniu terapii antybiotykowej, komórki znajdujące się w tego typu subpopulacji mogą ponownie rozpocząć podziały, co prowadzi do nawrotu infekcji. Bakterie przetrwałe są trudne do wykrycia, gdyż

(048) 042 635 45 00
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
katarzyna.lisowska@biol.uni.lodz.pl

ze względu na zahamowany metabolizm i niezdolność do podziałów nie ma możliwości namnażania ich na standardowych podłożach mikrobiologicznych. Szacuje się, że bakterie przetrwałe mogą powstawać w nieoptymalnych warunkach środowiskowych, w wyniku działania cząsteczek sygnałowych, w środowisku biofilmu, wewnątrz makrofagów lub też spontanicznie. Molekularne mechanizmy indukujące stan przetrwały bakterii obejmują odpowiedź ścisłą, odpowiedź SOS, systemy toksyna-antytoksyna, jednak to proces tworzenia agregatów białkowych zasługuje na szczególną uwagę. Tworzące się agregaty zawierają białka zaangażowane w kluczowe procesy metaboliczne, których inaktywacja może prowadzić do spowolnienia metabolizmu i wprowadzenia komórek w stan uśpienia. Bakterie przetrwałe zawierają wczesne stadium agregatów, których powstawanie może być indukowane przez glikację. Biorąc pod uwagę narastający problem antybiotykooporności, podjęte przez Doktorantkę badania dotyczące poszukiwania nowych związków skierowanych przeciwko bakteriom przetrwałym są celowe i w pełni uzasadnione. Mgr Adrianna Łupkowska podjęła się realizacji tematu ważnego nie tylko w aspekcie poznawczym, ale i praktycznym. Warto podkreślić, że tematyka podjęta w Dysertacji wymagała zastosowania szerokiego warsztatu metodycznego, z czym Doktorantka doskonale sobie poradziła.

Rozprawa doktorska mgr Adrianny Łupkowskiej jest napisana w języku polskim i liczy 129 stron. Dysertacja jest podzielona na rozdziały zgodnie z typowym układem prac o charakterze doświadczalnym. Praca ilustrowana jest licznymi rycinami i tabelami i zawiera cytaty z 294 pozycji literaturowych. Ponadto, Doktorantka przedstawiła dorobek naukowy w postaci artykułów naukowych i doniesień konferencyjnych, jak również wskazała źródło finansowania badań dotyczących *K. pneumoniae*.

Przedstawiona do oceny dysertacja rozpoczyna się **Streszczeniem** w języku angielskim i polskim, w którym Autorka w sposób zwięzły podsumowała najważniejsze wyniki uzyskane w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej, jak również podkreśliła ich znaczenie naukowe i zasugerowała potencjalne kierunki badań.

Wstęp pracy jest prawidłowo zaplanowany i oparty na dobrze dobranym, aktualnym piśmiennictwie naukowym obejmującym najnowsze doniesienia (także te z bieżącego roku), na podstawie których Autorka omówiła aktualny stan wiedzy w obszarze realizowanych badań. Warto podkreślić, że Doktorantka w sposób przekonujący uzasadniła celowość prowadzenia badań dotyczących pojawiania się bakterii przetrwałych w warunkach stresowych, precyzyjnie zdefiniowała pojęcie bakterie przetrwałe, jak również krótko opisała warunki sprzyjające

(048) 042 635 45 00
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
katarzyna.lisowska@biol.uni.lodz.pl

powstawaniu tego typu form bakteryjnych. Szczególny nacisk położyła na przedstawienie najważniejszych molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za tworzenie bakterii przetrwałych, jak również przedstawiła główne strategie eliminacji tych drobnoustrojów. Pragnę zaznaczyć, że Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą w zakresie przedstawionej problematyki badawczej, a zagadnienia przedstawione we wstępie są bardzo dobrą bazą teoretyczną uzasadniającą konieczność przeprowadzenia badań w ramach pracy doktorskiej.

Cele pracy zostały przez Doktorantkę przedstawione bardzo przejrzyście i sformułowane w czterech punktach. Dwa pierwsze z nich mają charakter pytań badawczych, koncentrujących się na ustaleniu (1) czy agregaty białek, które powstają podczas wysuszania i rehydratacji *E. coli* zawierają glikowane białka? (2) czy podobnie jak u *E. coli*, istnieje korelacja pomiędzy poziomem zagregowanych białek a liczbą bakterii przetrwałych w hodowlach *K. pneumoniae* poddawanych wysuszaniu i rehydratacji? Dwa kolejne cele zmierzają do scharakteryzowania subpopulacji obecnych w makrokoloniach *K. pneumoniae* (poprzez m. in. porównanie proteomu i wrażliwości na antybiotyki), oraz zweryfikowania, czy wybrane związki o potencjalnym działaniu antybakteryjnym (sulforafan i eutektyk *Reline*) zapobiegają powstawaniu lub całkowicie eliminują bakterie przetrwałe *K. pneumoniae*.

Następny rozdział **Materiały i metody** jest przedstawiony w bardzo czytelny sposób i zawiera pełen wykaz badanych szczepów bakteryjnych, odczynników, podłóż i sprzętu oraz opis stosowanych technik badawczych. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka zastosowała w swoich badaniach różnorodne techniki z zakresu analizy biochemicznej oraz elektroforezy, co świadczy zarówno o jej wszechstronnym podejściu do badanego problemu, jak i o wysokich umiejętnościach.

Zasadniczy rozdział pracy **Wyniki** zawiera liczne dane eksperymentalne, które zostały dobrze przedstawione graficznie lub tabelarycznie i wyczerpująco omówione. W pierwszej części badań Doktorantka wykazała, że wysuszanie i rehydratacja *E. coli* indukują agregację białek oraz powstawanie bakterii przetrwałych. Za istotny wynik uważam wykazanie, że przyczyną utraty żywotności *E. coli* była w większym stopniu glikacja niż agregacja białek. Ponadto, uzyskane przez mgr Łupkowską dane eksperymentalne dostarczyły niezwykle cennej informacji wskazującej na funkcję ochronną agregatów w warunkach stresowych.

W drugiej części rozprawy Doktorantka skupiła się na zbadaniu związku pomiędzy agregacją białek a powstawaniem bakterii przetrwałych u *K. pneumoniae*. W pierwszej części eksperymentów, mgr Łupkowska zoptymalizowała warunki indukujące powstawanie bakterii

(048) 042 635 45 00
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
katarzyna.lisowska@biol.uni.lodz.pl

przetrwałych podczas zróżnicowanych warunków stresowych. W przeprowadzonych badaniach Doktorantka wykazała, że izolaty kliniczne *K. pneumoniae* były zdolne do tworzenia większej liczby bakterii przetrwałych w porównaniu do szczepu z kolekcji ATCC 13883. Niestety, w toku prowadzonych prac eksperymentalnych nie udało się wyizolować agregatów białkowych z *K. pneumoniae*, co może być powiązane z budową tych drobnoustrojów. Badając makrokolonie izolatów klinicznych *K. pneumoniae* Doktorantka zaobserwowała występowanie dwóch subpopulacji – mukoidalnej i niemukoidalnej. Subpopulacja centrum charakteryzowała się wyższym poziomem bakterii przetrwałych, bakterii niehodowalnych (ang. VBNC) i heteroopornych na kolistynę, oraz większą zawartością produktów glikacji w porównaniu z subpopulacją pierścienia. Dodatkowo przeprowadzone badania proteomiczne za pomocą spektrometrii mass i analizy SWATH dostarczyły nowych, cennych informacji wskazujących, że komórki bakterii pochodzące z centrum kolonii zawierają mniejszą ilość białek rybosomalnych i znacznie więcej czynnika promującego hibernację rybosomów (YhbH/Hpf), co może wpływać na zwiększoną tolerancję tej populacji na antybiotyki.

W ostatnim etapie pracy Doktorantka wykazała, że wpływ dwóch substancji: sulforafanu (jednego z najlepiej opisanych związków, pod względem klinicznym, należących do izotiocyjanianów) oraz eutektyku *Reline* (mieszanina głęboko eutektyczna złożona z chlorku choliny i mocznika) na bakterie przetrwałe *K. pneumoniae* jest zależny od użytego stężenia, izolatu klinicznego i czasu inkubacji.

W mojej opinii, **Dyskusja** w ocenianej rozprawie doktorskiej jest kompleksowa, wyczerpująca i dobrze skonstruowana. Doktorantka wnikliwie analizuje uzyskane wyniki, starannie odnosi się do postawionych hipotez i porównuje swoje wyniki z aktualnym stanem wiedzy przedstawionym w literaturze. W sposób logiczny i spójny interpretuje rezultaty, podkreślając ich znaczenie oraz potencjalne implikacje badawcze. Dyskusja ta świadczy o głębokim zrozumieniu tematu i umożliwia szerokie spojrzenie na badany problem.

Literatura w rozprawie doktorskiej jest bogata, kompletna i starannie dobrana. Doktorantka zgromadziła szeroki zakres źródeł, obejmujących zarówno klasyczne prace, jak i najnowsze publikacje, co świadczy o gruntownej znajomości tematu. Dobór literatury jest dobrze przemyślany i odpowiednio zorganizowany, a źródła są precyzyjnie powiązane z tematyką badania. Całość piśmiennictwa stanowi solidną podstawę teoretyczną dla przeprowadzonych badań i wzbogaca dyskusję na temat postawionych hipotez.

(048) 042 635 45 00
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
katarzyna.lisowska@biol.uni.lodz.pl

Mgr Adrianna Łupkowska uzyskała w swoich badaniach wiele bardzo interesujących wyników, w podsumowaniu zwrócę uwagę tylko na najważniejsze osiągnięcia Doktorantki:

1. Wykazanie, że w trakcie procesu wysuszania i rehydratacji *E. coli* dochodzi do agregacji wewnątrzkomórkowych białek, co jest związane ze zwiększeniem liczby bakterii przetrwałych.
2. Stwierdzenie, że podczas stresu wywołanego procesem wysuszania i rehydratacji wzrasta poziom produktów glikacji w komórkach *E. coli*, jednak większość z tych produktów pozostaje w frakcji rozpuszczalnej i nie tworzy agregatów, co nie potwierdza wcześniej stawianych hipotez.
3. Wskazanie na możliwość, że agregaty białkowe prawdopodobnie pełnią rolę ochronną w komórkach *E. coli* podczas warunków stresowych;
4. Wykazanie, że środowiskiem szczególnie sprzyjającym powstawaniu bakterii przetrwałych u *E. coli* i *K. pneumoniae* są makrokolonie, a izolaty kliniczne *K. pneumoniae* mogą tworzyć dwie odrębne subpopulacje w makrokoloniach, które różnią się poziomem bakterii tolerujących antybiotyki i heteroopornych, poziomem produktów glikacji oraz profilem białkowym.
5. Udowodnienie dzięki badaniom proteomicznym, że większa ilość bakterii przetrwałych i bakterii niehodowalnych (VBNC) w makrokoloniach w porównaniu z hodowlą płynną (oraz w subpopulacji centrum w porównaniu z subpopulacją pierścienia) może być związana z mniejszą liczbą rybosomów i nadprodukcją czynnika hibernacji rybosomów Hpf.
6. Wykazanie, że wpływ sulforafanu i *Reline* na bakterie przetrwałe *K. pneumoniae* jest zależny od użytego stężenia, izolatu klinicznego i czasu inkubacji.

Podczas lektury rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka pytań, uwag oraz komentarzy, które chciałbym przedstawić w celu dalszego doprecyzowania i rozwinięcia omawianych zagadnień.

1. W tabeli 1 (str. 33) podano wyniki lekowrażliwości stosowanych w pracy szczepów *K. pneumoniae*. Dlaczego tabela została zamieszczona w rozdziale „Materiały i metody" nie w części wynikowej?

(048) 042 635 45 00
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
katarzyna.lisowska@biol.uni.lodz.pl

2. Na str. 31 (Cel pracy) Autorka pisze, że „W przypadku *K. pneumoniae* w makrokoloniach można w było wyróżnić co najmniej dwie subpopulacje,...". Czy w hodowlach *E. coli* nie zaobserwowano występowania subpopulacji?
3. W rozdziale 6.14 Doktorantka pisze, że przeprowadzała „Oznaczenie poziomu komórek przetrwałych". Czy nie bardziej poprawne byłoby użycie sformułowania „Oznaczenie odsetka lub liczby komórek przetrwałych"?
4. Tytuł rozdziału „Warunki wzrostu bakterii; stres cieplny, wysuszanie i rehydratacja, makrokolonie" jest zbyt lakoniczny.
5. W pracy opisano tworzenie się agregatów białkowych podczas stresu suszenia i rehydratacji *E. coli*. Czy można odróżnić agregaty korzystne dla przetrwania bakterii od tych, które mogą działać w przeciwny sposób? Jakie kryteria zastosowano do oceny wpływu tych agregatów na żywotność komórek?
6. Jakie eksperymenty można wykonać w przyszłości, aby lepiej zrozumieć rolę agregatów białkowych *E. coli* w komórkach przetrwałych?
7. W pracy Doktorantka opisuje pojawianie się zjawiska heteroooporności względem kolistyny w szczepach klinicznych *K. pneumoniae*. Proszę o zasugerowanie kierunków przyszłych badań, które można wykonać w celu pogłębienia wiedzy dotyczącej tego zjawiska.
8. Czy wyniki uzyskane przez Doktorantkę w badaniach nad heteroopornością *K. pneumoniae* mogą wpłynąć na stosowanie metod terapeutycznych?
9. Czy istnieje możliwość zastosowania uzyskanych w pracy wyników w dziedzinach takich jak bezpieczeństwo żywności czy biotechnologia?

W tym miejscu pragnę podkreślić, że wszystkie zamieszczone uwagi i komentarze do dysertacji pani mgr Adrianny Łupkowskiej wskazują wyłącznie na potrzebę dodatkowego wyjaśnienia lub uzupełnienia pewnych zagadnień, ale przede wszystkim rozwinięcia dyskusji, nad niektórymi w moim odczuciu bardzo interesującymi wątkami pracy, nie umniejszają natomiast wysokiego poziomu badań i wartości uzyskanych wyników.

(048) 042 635 45 00
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
katarzyna.lisowska@biol.uni.lodz.pl

PODSUMOWANIE:

Na podstawie przedstawionej do recenzji dysertacji stwierdzam, że tematyka pracy Pani mgr Adrianny Łupkowskiej jest niezwykle istotna, gdyż dotyka problemu pojawiania się bakterii przetrwałych w warunkach stresowych. Stwierdzam ponadto, że rozprawa doktorska potwierdza bardzo dobrą wiedzę teoretyczną mgr Adrianny Łupkowskiej w dyscyplinie nauki biologiczne. Uważam również, że Doktorantka posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej a rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa spełnia wymogi określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Adrianny Łupkowskiej do dalszych etapów postepowania o nadanie stopnia doktora.

(048) 042 635 45 00
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
katarzyna.lisowska@biol.uni.lodz.pl