



Dr hab. Lidia Piechowicz, prof. Uczelni
Zakład Mikrobiologii Lekarskiej,
Katedra Mikrobiologii
Gdański Uniwersytet Medyczny
ul. Dębowa 25, 80-204 Gdańsk,
tel. 58 349 18 31, fax 58 349 18 29

Gdańsk, 05 września 2024 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgr Adrianny Łupkowskiej
pt. „Bakterie przetrwałe *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*
powstałe w warunkach stresowych”

Formalna podstawa przygotowania recenzji

Przedstawioną poniżej recenzję sporządziłam w oparciu o powołanie przez Radę Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego z dnia 5 lipca 2024r., zgodnie z wymaganiami określonymi w art. 187 ust.1 i 2, Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 roku.

Znaczenie podjętych badań

Rozprawa doktorska mgr Adrianny Łupkowskiej dotyczy komórek przetrwałych, które ze względu na znacznie zredukowany metabolizm, nie reagują na działanie antybiotyków. Według wielu autorów, uznawane są za główną przyczynę niepowodzeń w antybiotykoterapii. Komórki przetrwałe pojawiają się spontanicznie lub pod wpływem działania czynników stresowych, a przykładem ich występowania u ludzi jest biofilm bakteryjny. Silne zróżnicowanie warunków tlenowych i odżywczych panujących w jego strukturze, sprzyja powstaniu tego typu komórek. Zdolność do tworzenia biofilmu jest ważnym czynnikiem wirulencji wielu mikroorganizmów. Szacuje się, że zakażenia z jego udziałem stanowią ok. 65% - 80% wszystkich zakażeń bakteryjnych u ludzi. Spośród pałeczek Gram – ujemnych, gatunki takie jak: *Klebsiella pneumoniae* i *Escherichia coli* najczęściej wytwarzają biofilm. Biofilmy pokrywają głównie cewniki, wszczepione urządzenia, przez co mogą być przyczyną uporczywych, nawracających infekcji. Walka z zakażeniami przebiegającymi z formowaniem biofilmu jest szczególnie trudna, ze względu na obecność komórek przetrwałych. Sytuację pogarsza fakt, że niektóre kliniczne szczepy *K. pneumoniae* czy *E. coli* wykazują wielolekooporność, stąd znalazły się na liście „alert patogenów”. Oznacza to, że wyizolowanie ich od pacjenta wiąże się z włączeniem i przestrzeganiem

zaostrzonych procedur sanitarnych. Walka z zakażeniami przebiegającymi z wytworzeniem biofilmu wymaga dokładnego poznania zmian zachodzących u bakterii w czasie tworzenia biofilmu, a więc również komórek przetrwałych oraz testowania związków, które by inaktywowały komórki przetrwałe. Prace badawcze w tym obszarze są intensywnie prowadzone, niektóre aspekty nie do końca zostały jednak wyjaśnione, dlatego podjęcie przez Doktorantkę badań, których głównym przedmiotem była populacja komórek przetrwałych u *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae* oraz zmiany zachodzące u bakterii, w czasie ich tworzenia są wysoce uzasadnione, bardzo aktualne i służą pogłębieniu wiedzy w obszarze nauk biologicznych.

Mgr. Adrianna Łupkowska w swojej rozprawie doktorskiej zajęła się głównie:

- sprawdzeniem, czy agregaty białek powstające podczas wysuszenia i rehydratacji bakterii *Escherichia coli* zawierają glikolowane białka
- sprawdzeniem, czy istnieje korelacja między agregacją białek a pojawieniem się komórek przetrwałych w hodowli *Klebsiella pneumoniae*, podobnie jak u *E.coli* oraz
- scharakteryzowaniem subpopulacji obecnych w makrokoloniach *K. pneumoniae* oraz
- sprawdzeniem, czy wybrane związki o potencjalnym działaniu antybakteryjnym (sulforafan i eutetyk Reline) zapobiegają powstaniu lub całkowicie eliminują bakterie przetrwałe *K. pneumoniae*.

Ocena merytoryczna

Przedstawiona do recenzji rozprawa cechuje się starannością edytorską, transparentnością i poprawnością językową. Posiada klasyczną konstrukcję, liczy ogółem 129 stron, 41 rycin i 12 tabel, które właściwie ilustrują omawiane zagadnienia. Praca została podzielona na 9 rozdziałów z ponad 25 podrozdziałami. Cel badań oraz Metodyka zostały szczegółowo i wyczerpująco opisane. Obszerne analizy wyników przeprowadzone przy użyciu rycin i tabel pozwalają stwierdzić przygotowanie mgr Adrianny Łupkowskiej do prowadzenia badań, projektów badawczych. Dyskusja została szczegółowo przeprowadzona, a wnioski zostały przedstawione w postaci sześciu stwierdzeń, które powinny być odpowiedzią na cele zawarte w temacie rozprawy. Piśmiennictwo zawiera 254 pozycje literaturowe. W przeważającej większości są to artykuły anglojęzyczne, cytowane prawidłowo. Streszczenie napisane w języku polskim i angielskim stanowi kompendium pracy i zostało poprawnie napisane. Umieszczenie przez Doktorantkę wykazu skrótów stosowanych w pracy, znacznie ułatwia odbiór prezentowanych treści. Do rozprawy doktorskiej została dołączona publikacja:

– Adrianna Łupkowska, Soroosh Monem, Janusz Dębski, Karolina Stojowska-Swędryńska, Dorota Kuczyńska-Wiśnik, Ewa Laskowska. **Protein aggregation and glycation in *Escherichia coli* exposed to desiccation-rehydration stress.** *Microbiological Research*, 270 (2023): 127335 (IF = 6,7; 100 punktów MNiSW), w której Doktorantka umieściła część wyników rozprawy doktorskiej, które dotyczyły agregacji i glikacji białek u szczepów *E. coli*, a więc zostały poddane recenzji i zakwalifikowane do publikacji.

We **wstępie**, Doktorantka naświetliła aktualny stan wiedzy w zakresie bakterii przetrwałych, warunków i mechanizmów odpowiedzialnych za ich powstanie oraz w zakresie metod zwalczania tego typu komórek bakteryjnych. Ponadto, przedstawiła istotne dane dotyczące bakterii z gatunku *Klebsiella pneumoniae*, a w szczególności czynniki wirulencji, mechanizmy oporności na antybiotyki i problemy w leczeniu zakażeń wywołanych wielolekoopornymi szczepami tego gatunku. Szerokie i szczegółowe

opisanie przez Doktorantkę dotychczasowych doniesień w tym temacie dowodzi, że posiada należytą ogólną wiedzę teoretyczną, adekwatną do dyscypliny jaką są nauki biologiczne.

Aby zrealizować cel mgr Adrianna Łupkowska przeprowadziła badania według zaplanowanej **metodyki**, z użyciem dobrze sprawdzonych metod badawczych (spektrofluorymetria, densytometria, immunoblotting, spektrometria mas). W tym miejscu należy zaznaczyć, że komórki przetrwałe są szczególnie trudnym obiektem badań *in vitro*, gdyż uzyskanie tej populacji komórek o powtarzalnych i trwałych właściwościach, wymaga dużej wprawy i doświadczenia. Doktorantka dokładnie opisała etapy przeprowadzanych doświadczeń, jednak pewnym niedociągnięciem pracy jest fakt, że w rozdziale Materiały i metody nie zostały umieszczone odnośniki literaturowe.

Wyniki badań zostały szczegółowo opracowane i opisane. Umieszczenie czytelnych wykresów oraz zdjęć obrazujących rezultaty uzyskane w przebiegu doświadczeń, pomagają w ich zrozumieniu. Doktorantka, wykazała, że w czasie stresu spowodowanego wysuszeniem i rehydracją szczepów *E. coli*, białka ulegają agregacji, którym towarzyszył wzrost poziomu komórek przetrwałych. Ponadto, powstałe w tym procesie produkty glikacji pozostały we frakcji rozpuszczalnej i nie ulegały agregacji. Dokładna analiza poziomu agregatów i glikolowanych białek w różnych subpopulacjach *E. coli* pozwoliła na stwierdzenie, że agregaty białkowe mogą pełnić funkcję ochronną w komórce bakteryjnej podczas stresu. Ponadto, agregacji białek towarzyszył wzrost poziomu bakterii przetrwałych.

W przypadku szczepów klinicznych *K. pneumoniae*, Doktorantka wyróżniła w makrokolonii dwie subpopulacje komórek, z których ta mukoidalna, z centrum zawierała wyższy poziom bakterii przetrwałych, VBNC i heteroopornych na kolistynę oraz większą zawartość produktów glikacji niż subpopulacja pierścienia (niemukoidalna). Dokładne badania proteomiczne przeprowadzone przez Doktorantkę wykazały więcej czynników promujących hibernację rybosomów w centrum makrokolonii, co może tłumaczyć zwiększoną tolerancję tej subpopulacji na antybiotyki.

W związku z tym, że komórki przetrwałe są przyczyną niepowodzenia w terapii zakażeń i brakuje danych w literaturze o działaniu związków z grupy izotiocyanianów czy eutektyków na komórki przetrwałe, istotnym elementem doświadczeń jakie prowadziła Doktorantka, były badania wpływu izotiocyanianu o nazwie sulforafan oraz eutektyku *Reline*, na powstanie oraz eliminację bakterii przetrwałych u *K. pneumoniae*. Wykazała ona, że oba te związki były skuteczne w zabijaniu komórek przetrwałych izolowanych z makrokolonii, po zadziałaniu antybiotyku meropenemu, ale znosiły jego działanie powodując wzrost bakterii przetrwałych, po ich dodaniu do hodowli wraz z meropenemem.

W rozdziale **Dyskusja**, mgr Adrianna Łupkowska szczegółowo omówiła w odrębnych sekcjach rezultaty swoich badań. Dotyczyły one: agregacji i glikacji białek u *E. coli*, powstania i zwalczania bakterii przetrwałych *K. pneumoniae*, heterooporności szczepów tego gatunku oraz zróżnicowania struktury makrokolonii wraz z analizą danych proteomicznych subpopulacji makrokolonii i hodowli płynnej *K. pneumoniae*. Doktorantka odniosła wyniki swoich badań do wyników innych autorów. Ponadto, w kilku miejscach tego rozdziału zaproponowała dalsze kierunki badań, zmierzające m. in. do dokładniejszego stwierdzenia oddziaływań na bakterie przetrwałe różnych stężeń związków z grup: izocyanianów lub eutektyków z antybiotykami (synergizm, antagonizm czy addycji). Jest to bardzo dobre rozwiązanie, służące pogłębieniu wiedzy w tym obszarze. Ta część pracy z pewnością potwierdza dużą wiedzę, umiejętność logicznej interpretacji wyników oraz dojrzałość naukową Doktorantki.

Wnioski sformułowane przez Kandydatkę mają charakter stwierdzeń, które podsumowują główne wyniki badań. Powinny odnosić się do stawianych na wstępie rozprawy celów badań. W rozdziale tym, nie dopatrzyłam się odpowiedzi na pytanie zawarte w celach pracy tj. czy podobnie jak u *E. coli*, istnieje korelacja pomiędzy poziomem zagregowanych białek a liczbą bakterii przetrwałych w hodowlach *K. pneumoniae* poddawanych wysuszeniu i rehydratacji? – proszę o ustosunkowanie się do tej uwagi.

Bibliografia zamieszczona w pracy zawiera 254 pozycje literaturowe. W większości są to artykuły anglojęzyczne, cytowane prawidłowo i pochodzące głównie z ostatnich 15 lat.

Staranne przygotowanie rozprawy wpłynęło na edycję całego tekstu, który jest napisany poprawnym językiem naukowym. Zauważyłam jednak kilka błędów:

- w tab. 10 (Dyskusja, str. 96) brakuje pod tabelą opisu oznaczenia „+?”
- tytuł podrozdziału 7.2.1. (Wyniki, str. 46) powinien być dopasowany formą do tytułów pozostałych podrozdziałów (7.2.), chociażby ze względów stylistycznych i precyzji objaśnień. Tytuł „Izolacja bakterii przetrwałych *K. pneumoniae*”, można więc zastąpić „Środowisko makrokolonii sprzyja powstaniu bakterii przetrwałych *K. pneumoniae* i umożliwia ich izolację”
- w kilku miejscach pracy pojawiły się drobne błędy techniczne (tzw. „literówki”) powstałe przy pisaniu pracy (str.52 – powinno być kolistynę, str. 54 – powinno być heteroopornych itp.)

Niezależnie od wskazanych błędów, które nie umniejszają wartości pracy, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska charakteryzuje się odpowiednim poziomem merytorycznym i zawiera elementy służące pogłębieniu wiedzy z zakresu biologii drobnoustrojów..

Podsumowanie

Na podstawie analizy przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej mgr Adrianny Łupkowskiej pt. „Bakterie przetrwałe *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae* powstałe w warunkach stresowych” stwierdzam, że rozprawa ma charakter oryginalnej pracy naukowej, która dostarcza nowe informacje istotnie poszerzające wiedzę z zakresu biologii komórek przetrwałych oraz ich zwalczania u szczepów bakterii z gatunków *E. coli* oraz *K. pneumoniae*. Doktorantka, podejmując się badań, wykazała się wiedzą teoretyczną z zakresu podjętej tematyki badawczej, uzasadniła celowość przeprowadzonych badań, odpowiednio je zaplanowała i zrealizowała. Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymagania Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce art.187 ust.1 i 2 z dnia 20 lipca 2018 roku i wnioskuję do Rady Nauk Biologicznych Gdańskiego Uniwersytetu o dopuszczenie mgr Adrianny Łupkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na opublikowanie przez Doktorantkę części wyników rozprawy doktorskiej w 2023 roku:

- w ramach czasopisma *Microbiological Research* o współczynniku IF = 6.7; 100 punktów MNiSW
- jako pierwszy autor artykułu naukowego i duży udział w realizacji pracy.

wnioskuję o jej wyróżnienie.

Gdańsk, 05 września 2024 r.