

Gdańsk, 2022-09-13

Recenzja

rozprawy doktorskiej autorstwa mgr inż. Karoliny Anny Mielko zatytułowanej „*Badania metabolomiczne bakterii Pseudomonas aeruginosa*”

Dynamiczny rozwój cywilizacji, prowadzi do pojawiania się nowych, często trudnych wyzwań w medycynie. Do tych wyzwań należą odkrywane nowe czynniki chorobotwórcze, zjawiska wykształcania się leko- a szczególnie antybiotykooporności, ciągle wysokie poziomy zachorowalności i umieralności na choroby nowotworowe.

Koncepcja badań systemowych zakłada, że skala i złożoność stosowanych narzędzi i rozwiązań powinna ściśle odpowiadać zakresowi i stopniu skomplikowania postawionego problemu badawczego. Procesy biologiczne to jeden z najciekawszych, najbardziej skomplikowanych i przez to najbardziej wymagających obiektów badawczych. Dlatego w badaniach nad dynamicznymi systemami biologicznymi niezbędna wydaje się zmiana zainteresowań z pojedynczych czynników na związki między wieloma czynnikami oraz z pojedynczych parametrów na zestawy zmiennych lepiej opisujących rzeczywisty stan badanego układu biologicznego. W praktyce, oznacza to bardziej całościowe spojrzenie na procesy biologiczne i rządzące nimi reguły. Do tego celu służy metabolomika, która jest narzędziem dość już powszechnie wykorzystywanym we współczesnej bioanalityce a która razem z proteomiką i genomiką stanowią podstawy tzw. biologii systemowej.

Przedmiot badań niniejszej pracy doktorskiej Pani mgr inż. Karoliny Mielko, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Młynarza z Zakładu Biochemii, Biologii Molekularnej i Biotechnologii,

Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej i prof. dr hab. inż. Marcina Łukaszewicza, z Zakładu Biotransformacji, Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Wrocławskiego, perfekcyjnie wpisuje się w wyżej wymienioną problematykę i szeroko pojęty obszar badawczy. Obaj Promotorzy pracy doktorskiej, to wybitni specjaliści bądź to chemii analitycznej w obszarze magnetycznego rezonansu jądrowego bądź też biotechnologii w zakresie mikrobiologii przemysłowej. Potwierdza to także interdyscyplinarny charakter wykonanej pracy doktorskiej. Praca doktorska jest podsumowaniem kilku lat badań nad zastosowaniem analiz metabolomicznych, z wykorzystaniem techniki ^1H NMR, do charakteryzowania szczepów bakteryjnych i rozróżniania ich pod kątem wrażliwości na działanie chemioterapeutyków. Wyniki badań eksperymentalnych Doktorantki dotyczące bezpośrednio ocenianej dysertacji opublikowane zostały w trzech artykułach oryginalnych w renomowanych czasopismach naukowych z listy *Journal Citation Reports (JCR): Scientific Reports, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* oraz *International Journal of Molecular Sciences*, a także pracy poglądowej w również prestiżowym *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Wszystkie wyżej wymienione prace ukazały się w okresie od 2019 do 2021 roku. Sumaryczna wartość współczynnika wpływu (*Impact Factor, IF*) tych publikacji wynosi 16,7. We wszystkich wyżej wymienionych artykułach Pani mgr Karolina Mielko jest pierwszym autorem. Całkowity dorobek publikacyjny mgr inż. Karoliny Mielko, razem z pracami stanowiącymi podstawę osiągnięcia naukowego opisywanego w pracy doktorskiej, na dzień składania rozprawy doktorskiej, to w sumie 15 publikacji z czego 13 opublikowanych w prestiżowych czasopismach z listy JCR o łącznym współczynniku wpływu wynoszącym ponad 62. Merytoryczny opis wkładu pracy Doktorantki, wyraźnie wskazany w Oświadczeniu współautora, potwierdzają istotną rolę oraz wiodące zaangażowanie mgr inż. Karoliny Mielko w realizację badań oraz powstawanie prac. Jej zaangażowanie w badania naukowe jak i powstawanie publikacji odnoszą się zarówno do etapu koncepcji i projektowania eksperymentów, ale także przygotowania i przeprowadzenia hodowli mikrobiologicznych, przeprowadzenia pomiarów ^1H NMR, wykonania analiz statystycznych pozyskanych danych, oraz ostatecznie pisanie

manuskryptów prac. Tak szerokie podejście jest oczywiście oczekiwane w przypadku doktorantów, ale trzeba też przyznać, że Pani mgr Karolina Mielko wywiązała się z postawionych zadań znakomicie. Brała także udział w licznych konferencjach naukowych podczas których wygłaszała prezentacje ustne (w sumie 15) oraz przedstawiała prezentacje plakatowe (9). Brała udział w 3-miesięcznym stażu badawczym na Uniwersytecie w Sienie, Włochy. Wybitna aktywności naukowa Doktorantki została doceniona w postaci stypendiów, w tym 3-krotnie Rektora Politechniki Wrocławskiej dla najlepszych doktorantów oraz nagród Dziekana Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej i Pierwszej Nagrody na konferencji *Metabolomic Circle* w 2020 roku.

Rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Mielko jest napisana w języku polskim i ma charakter zbioru czterech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych. We wstępie teoretycznym obejmującym ok. 16 stron przedstawione są podstawowe informacje z zakresu charakterystyki właściwości, występowania i chorobotwórczości bakterii pałeczki ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* z uwzględnieniem problematyki antybiotykooporności. Skrótowno omówiono zagadnienia metabolomiki, obszaru biologii systemowej aktualnego trendu nowoczesnej bioanalitiky oraz bardziej szczegółowo przedstawiono zagadnienia dotyczące spektroskopii magnetycznej rezonansu jądrowego (NMR) w tym konkretnie przygotowania danych uzyskanych techniką ^1H NMR do statystycznych i chemometrycznych analiz metabolomicznych. Następnie w zwięzły sposób przedstawiony został cel pracy doktorskiej z wyszczególnieniem konkretnych etapów niezbędnych do osiągnięcia zamierzonego celu prowadzonych badaniach a następnie w ramach omówienia metodologii szczegółowo opisano kolejne etapy prowadzenia badań. W skrótowny sposób przedstawione zostały wyniki oraz wnioski stanowiąc niejako podsumowanie każdej z trzech prac oryginalnych będących podstawą osiągnięcia doktorskiego a w całości załączonych na końcu dysertacji. Jest to bardzo dobre podejście, ponieważ pozwala całościowo spojrzeć na problematykę badawczą podejmowaną w badaniach i przedstawioną w publikacjach, a także kompleksowo ocenić efekty oraz jakość realizowanych badań. Rozprawę uzupełniają streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz

skrótów, oświadczenie współautora, kandydata do stopnia doktora oraz zestawienie dorobku naukowego Doktorantki. Całość dysertacji, wraz z cyklem publikacji to 120 stronicowe opracowanie.

Podstawowym celem przeprowadzonych w pracy badań było wykorzystanie analiz metabolomicznych do charakterystyki różnych szczepów bakterii *Pseudomonas aeruginosa* a w konsekwencji poznanie nowych charakterystycznych szlaków biochemicznych i metabolitów, które umożliwią lepsze zrozumienie procesów adaptacji mikroorganizmu do zmienionych warunków środowiskowych czy mechanizmów stojących za pojawiającym się zjawiskiem lekooporności.

Do wymiernych efektów prowadzonych badań Doktorantki opisanych w rozprawie oraz w załączonych publikacjach stanowiących podstawę dysertacji należą:

- opracowanie efektywnej metody przygotowania próbek do analizy, gdzie kluczowym etapem jest dezintegracji komórek bakteryjnych w celu ich dalszych analiz metabolomicznych;

- wykazanie potencjału wykorzystania w badaniach przesiewowych techniki ^1H NMR poprzez przeanalizowanie i otrzymanie specyficznych profili metabolomicznych dla różnych rodzajów szczepów bakterii: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *B. cereus* oraz *C. glutamicum*;

- określenie różnic w metabolomie szczepów *P. aeruginosa* pochodzących ze środowiska naturalnego i izolowanych od pacjentów chorych na mukowiscydozę, oraz wykazanie że podwyższone poziomy metabolitów świadczą o zwiększonej intensywności przemian aminokwasów i zmniejszonej intensywności cyklu TCA;

- scharakteryzowanie wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych profili metabolomicznych dla szczepów pałeczki ropy błękitnej, które wykazują oporność lub wrażliwość na działanie na antybiotyków, i zasugerowanie, które procesy biochemiczne odgrywają największą rolę.

Za najbardziej wartościowe poznawczo wnioski z wykonanych badań, uważam wykazanie różnic w profilach metabolomicznych u szczepów *P. aeruginosa* charakteryzujących się wrażliwością i

będących opornymi na działanie antybiotyków. Wyniki badań sugerują, że szczep oporny na działanie antybiotyków w bardziej efektywny sposób wykorzystuje metabolizm aminokwasów w porównaniu do szczepu wrażliwego na działanie leków.

Czytając dysertację oraz załączone publikacje nasunęły mi się następujące pytania i komentarze. Jaki był faktyczny 'fold change' metabolitów wymienionych w Tabeli 1 w publikacji nr 3 [K.A. Mielko et al. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 188 (2020)]. Trudno mi jest się zgodzić z opisem wyników na stronie 56 dysertacji i w publikacji nr 2 [*Scientific Reports*, 2021, 11:20859], że wyniki przedstawione na rysunku nr 5 publikacji prezentującym wyniki analizy PCA, „pokazują grupowanie się próbek, co świadczy o wpływie zastosowanych metod niszczenia błon komórkowych na efektywność uzyskanych wyników”. Poza jednym przypadkiem, bakterii *E. coli*, grupowanie wyników pod kątem różnych metod dezintegracji nie jest specjalnie wyraźnie zaznaczone na wykresie przedstawianym przez dwie pierwsze główne składowe PC1 i PC2. Czy planowane są, poza analizą celowaną pod kątem oznaczeń ilościowych wybranych paneli metabolitów technikami LC-MS i GC-MS, także badania walidacyjne na szczepach pochodzących od innych grup pacjentów bądź z innych hodowli mikrobiologicznych z wykorzystaniem techniki ^1H NMR?

Powyższe uwagi i pytania nie wpływają na ogólną wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Praca doktorska mgr Karoliny Mielko ma znaczące walory nowości i oryginalności naukowej. Dysertacja potwierdza wysoką wiedzę i umiejętności Kandydatki do stopnia naukowego doktora nauk chemicznych. Rozprawa doktorska mgr Karoliny Mielko spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.).

Biorąc powyższe pod uwagę wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Mielko do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne. Jednocześnie mając na uwadze bardzo duże zaangażowanie Doktorantki w pracę badawczą, wyrażone m.in. w postaci pierwszego autorstwa wszystkich prac eksperymentalnych przedstawionych jako cykl doktoratu oraz pracy pogłądowej, rangę problematyki i potencjał innowacyjny uzyskanych wyników oraz znaczący dotychczasowy dorobek naukometryczny Doktorantki, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.


KIEROWNIK ZAKŁADU
Biofarmacji i Farmakokinetyki
prof. dr hab. Michał J. Markuszewski