

Recenzja pracy magister Karoliny Mielko
pt. „Badania metabolomiczne bakterii *Pseudomonas aeruginosa*”
na stopień doktora nauk chemicznych

Przedmiotem pracy doktorskiej mgr Karoliny Mielko jest porównanie profili metabolomicznych szczepów *Pseudomonas aeruginosa* o różnych fenotypach lekowrażliwości oraz wywodzących się z różnych źródeł w celu wyjaśnienia procesów adaptacji tego drobnoustroju do zmieniających się warunków bytowania. Podjęty problem jest bardzo istotny z klinicznego punktu widzenia, ponieważ *P. aeruginosa* jest groźnym drobnoustrojem oportunistycznym wywołującym ciężkie zakażenia u pacjentów hospitalizowanych (zwłaszcza w oddziałach intensywnej terapii i oparzeniowych) oraz u chorych na mukowiscydozę, a jego naturalnie wysoka i dynamicznie narastająca na skutek m.in. presji selekcyjnej lekooporność powoduje, że terapia tych infekcji staje się coraz trudniejsza. W związku z powyższym poznanie procesów metabolicznych wykorzystywanych przez bakterię w różnych sytuacjach, w tym przy nabywaniu mechanizmów oporności może mieć znaczenie dla poszukiwania nowych strategii zapobiegania i leczenia zakażeń.

Praca doktorska stanowi spójny tematycznie cykl 4 publikacji (1 poglądowej i 3 oryginalnych) i składa się z następujących części: spisu treści, wykazu skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wprowadzenia, celów, metodologii, piśmiennictwa, oświadczenia Doktorantki o zaangażowaniu w przygotowanie poszczególnych artykułów wchodzących w skład cyklu, kopii opublikowanych prac, z których każda poprzedzona jest skrótowym omówieniem oraz podsumowania i wniosków. Dodatkowo, do rozprawy dołączono informacje o działalności naukowej Doktorantki (wykaz publikacji, informacje o czynnym i biernym udziale w konferencjach oraz stypendiach, stażach i nagrodach naukowych).

We wprowadzeniu Kandydatka scharakteryzowała pałeczkę ropy błękitnej (jej właściwości, występowanie, chorobotwórczość i lekooporność) oraz opisała istotę i zasady badań metabolomicznych (w tym stosowane techniki analityczne oraz sposoby obróbki i analizy danych).

Wprowadzenie stanowi dobre uzasadnienie celowości podjętych badań, jednak Kandydatka nie ustrzegła się pewnych nieścisłości:

- Pisząc o chorobotwórczości *P. aeruginosa* Doktorantka wymienia zakażenie ucha wewnętrznego (tzw. ucho pływaka). W rzeczywistości chodzi o zapalenie ucha zewnętrznego. Wspomina także o zakażeniu przewodu pokarmowego (gorączce Shanghai), która w naszych warunkach występuje

bardzo rzadko, pomija natomiast najczęstszą postać szpitalnych zakażeń wywoływanych przez ten drobnoustrój, tj. zapalenie płuc związane z mechaniczną wentylacją (tzw. respiratorowe zapalenie płuc u chorych w oddziałach intensywnej terapii).

- Pisząc o lekooporności bakterii, Doktorantka powołując się na artykuł w Lancecie (w piśmiennictwie pomija nazwę cytowanego czasopisma) twierdzi, że w 2019 roku zakażenia bakteryjne były powodem śmierci 4,95 mln ludzi na świecie, z czego prawie 1,5 mln to zgony spowodowane zakażeniami szczepami wielolekoopornymi. W rzeczywistości, wg danych w/w artykułu 4,95 mln zgonów miało związek z lekoopornością bakterii, a 1,27 mln zgonów było przez nią spowodowanych.

- Pisząc o leczeniu zakażeń *P. aeruginosa*, Kandydatka wskazuje, że wybór leku zależy od zjadliwości szczepu. W rzeczywistości kluczowe znaczenie ma postać zakażenia (w trakcie typowej diagnostyki zakażeń nie ocenia się zjadliwości drobnoustrojów). Wśród stosowanych w terapii antybiotyków Doktorantka wymienia cyt. „penicyliny (najczęściej z inhibitorami β -laktamaz, np. piperacylina), karbapenemy (meropenem, imipenem) oraz cefalosporyny IV i V generacji (np. cefepim i ceftazydym)”. Stosowaną w leczeniu penicyliną z inhibitorem β -laktamaz jest piperacylina-tazobaktam, natomiast ceftazydym jest cefalosporyną III generacji. Ponadto Kandydatka zwraca uwagę, że coraz częściej pojawiają się szczepy odporne na wszystkie antybiotyki (pandrug resistant, PDR), co cyt. „w przypadku osób z obniżoną odpornością prowadzi do zwiększonej śmiertelności”. Zakażenia PDR, ze względu na brak możliwości skutecznego leczenia, zwiększają ryzyko zgonu u wszystkich, nie tylko u pacjentów z obniżoną odpornością.

- Charakteryzując mechanizmy oporności *P. aeruginosa* mgr Mielko wskazuje, że podstawowym mechanizmem są enzymy zdolne do dezaktywacji antybiotyków: cyt. „najpowszechniejsze są β -laktamazy, hydrolizujące wiązania w cząsteczkach antybiotyków β -laktamowych, ale są to również cefalosporynazy czy penicylinazy”. Penicylinazy i cefalosporynazy są przedstawicielami β -laktamaz.

Na uznanie zasługuje natomiast bardzo przejrzyste przedstawiony przed Kandydatką opis skomplikowanego zagadnienia badań metabolomicznych, w tym czytelny schemat eksperymentu metabolomicznego.

Doktorantka postawiła sobie ambitne zadanie scharakteryzowania metabolomu różnych szczepów *P. aeruginosa* i sformułowała 4 cele szczegółowe, tj. opracowanie najlepszej metody dezintegracji bakterii do eksperymentów metabolomicznych, porównanie profili metabolomicznych *P. aeruginosa* z innymi gatunkami bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich oraz określenie różnic w metabolomie *P. aeruginosa* w zależności od pochodzenia izolatu (środowisko naturalne versus drogi oddechowe chorych na mukowiscydozę) i jego lekowrażliwości.

Sposób realizacji w/w celów został zaprezentowany w pracach oryginalnych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Na cykl publikacji składają się 3 prace oryginalne: "Comparison of bacteria disintegration methods and their influence on data analysis in metabolomics", opublikowana w Scientific Reports (IF 4,38), "Possible metabolic switch between environmental and pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* strains: 1 H NMR based metabolomics study" zaprezentowana w Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (IF 3,94) oraz „Metabolomics comparison of drug-resistant and drug-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* strain (intra- and extracellular analysis)" przedstawiona w International Journal of Molecular Science (IF 5,92), a także praca poglądowa „Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*" opublikowana w World Journal of Microbiology and Biotechnology (IF 2,48). We wszystkich publikacjach mgr K. Mielko jest pierwszym autorem, a jej wkład został szczegółowo opisany w załączonym przez nią oświadczeniu. Szkoda, że Kandydatka nie załączyła oświadczeń pozostałych współautorów o ich zaangażowaniu oraz zgód na wykorzystanie w/w prac do Jej rozprawy doktorskiej.

W swoich badaniach opublikowanych w w/w pracach oryginalnych mgr Mielko wykazała m.in., że na wyniki badań metabolomicznych ogromny wpływ ma zastosowana metoda dezintegracji komórek bakteryjnych. Powyższa obserwacja ma bardzo istotne znaczenie praktyczne, wskazuje bowiem na ważne ograniczenia metodologiczne tych badań, zwłaszcza w kontekście porównywania rezultatów uzyskiwanych w różnych eksperymentach. Wyniki badań Doktorantki sugerują także, że analiza profili metabolomicznych przy użyciu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego, po utworzeniu odpowiednich baz danych metabolomów, będzie mogła być w przyszłości wykorzystana jako narzędzie do identyfikacji drobnoustrojów. Ponadto Kandydatka dowiodła, że szczepy *P. aeruginosa* izolowane z różnych miejsc mają odmienne profile metabolomiczne – izolaty pochodzące od chorych na mukowiscydozę charakteryzowały się szybszym metabolizmem aminokwasów w porównaniu do szczepów środowiskowych. Podobnie, wykazała, że szczep odporny na antybiotyki bardziej efektywnie metabolizował aminokwasy w porównaniu do szczepu lekowrażliwego.

W/w prace wpisują się w nowe kierunki badań wykorzystujące analizę metabolomów w celu wyjaśnienia mechanizmów leżących u podstaw adaptacji drobnoustrojów do zmieniających się warunków środowiska (w tym obecności antybiotyków).

W skład cyklu wchodzi także bardzo ciekawie i klarownie napisany artykuł poglądowy, w którym Doktorantka przedstawiła aktualne informacje nt badań metabolomicznych u *P. aeruginosa*, zwracając uwagę zarówno na potencjał metabolomiki jak i jej ograniczenia.

Doktorantka zrealizowała wszystkie założone cele badawcze, a uzyskane wyniki podsumowała w 5 w pełni uprawnionych wnioskach. W rozprawie zabrakło dyskusji i krytycznej analizy uzyskanych

wyników. Wprawdzie każda z prac oryginalnych wchodzących w skład cyklu zawiera tę część, tym niemniej jej całościowe ujęcie w rozprawie byłoby bardzo wartościowe.

Wszystkie powyższe uwagi i sugestie mają charakter porządkujący i nie wpływają na ocenę merytoryczną rozprawy.

W podsumowaniu stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska mgr K. Mielko spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.). Wchodzące w jej skład publikacje są spójne tematycznie, zostały zaprezentowane w czasopismach zagranicznych o wysokim współczynniku oddziaływania, a przedstawione w nich wyniki mają dużą wartość poznawczą i praktyczną – pogłębiają wiedzę na temat możliwości zastosowania badań metabolomicznych w szeroko rozumianej mikrobiologii klinicznej. Składam zatem wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie mgr Karoliny Mielko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie ze względu na znaczne walory naukowe i aplikacyjne pracy prezentującej nowe informacje na temat aspektów technicznych eksperymentów metabolomicznych oraz możliwości wykorzystania analiz metabolomów do identyfikacji drobnoustrojów i oceny ich adaptacji do środowiska składam wniosek do Wysokiej Rady o jej wyróżnienie. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania stanowią przyczynek do poszukiwania nowych strategii diagnostyki, zapobiegania i leczenia zakażeń, w tym wywoływanych przez trudne do eradykacji drobnoustroje lekooporne. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że wyniki badań Kandydatki zostały opublikowane w dobrych czasopismach naukowych, o wysokim współczynniku oddziaływania, co świadczy o ich wysokiej jakości i odzwierciedla wagę poruszanych zagadnień.