

PAN - Instytut Immunologii
Wpł. dnia <u>27.08.2024</u>
L.dz.

Lublin, 20.08.2024

dr hab. Iwona Komaniecka, prof. UMCS
Katedra Genetyki i Mikrobiologii
Instytut Nauk Biologicznych
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie
ul. Akademicka 19
20-033 Lublin
e-mail: iwona.komaniecka@mail.umcs.pl

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Chudzik,
pt.: „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i lipidomy *Cutibacterium* spp. o potencjale
terapeutycznym i diagnostycznym”**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Anny Chudzik została wykonana w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu, pod kierunkiem dr hab. Marioli Paściak, prof. IITD.

Rozprawę doktorską tworzą trzy spójne tematycznie publikacje naukowe, wśród których znalazły się dwie prace eksperymentalne: jedna z roku 2022, opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (wydawnictwo MDPI) oraz druga, z roku 2024, która ukazała się w *mSphere* (wydawnictwo ASM). Obie prace eksperymentalne poprzedza praca przeglądowa opublikowana roku 2020, w czasopiśmie *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, wydawanym przez IITD PAN we Wrocławiu. Pełni ona rolę obszernego wprowadzenia w tematykę badawczą rozprawy, ale należy zaznaczyć, że praca przeglądowa nie stanowi jednak sama z siebie osiągnięcia naukowego. Wszystkie czasopisma, w których ukazały się w/w publikacje znajdują się na liście JCR, o aktualnym współczynniku oddziaływania IF odpowiednio: 5.6 pkt., 4.8 pkt. oraz 0.27 pkt (praca przeglądowa).



Zamieszczone w rozprawie kopie ww. artykułów poprzedza kilkunastostronicowe Omówienie, które w zwięzły sposób przybliży czytelnikowi tematykę rozprawy i stanowi podsumowanie całego osiągnięcia.

Prace eksperymentalne, wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, są wieloautorskie, przy czym publikacja nr 2. ma trzech autorów, zaś nr. 3 - czterech. Praca przeglądowa (nr 1.) jest pracą dwuautorską, sygnowaną przez Doktorantkę i Panią Promotor. We wszystkich pracach Pani mgr A. Chudzik jest pierwszym autorem, co wskazuje, że była Ona głównym wykonawcą opisanych badań oraz wiodącą autorką pracy przeglądowej. W pracy nr 3, wg deklaracji w niej zawartej, Doktorantka ma równy udział z drugim autorem, dr Mariuszem Bromke z Wrocławskiego Uniwersytetu Medycznego. We wszystkich tych pracach autorem korespondującym jest Pani Promotor, dr hab. Mariola Paściak, prof. IITD.

Według zapisu zawartego w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023, poz. 742 z późn. zm., art. 187 ust. 2 i 3) „Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego...” oraz „...rozprawę doktorską może stanowić praca pisemna, w tym monografia naukowa, zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych”. W myśl tej Ustawy, zaprezentowana przez Doktorantkę Annę Chudzik rozprawa doktorska, stanowiąca zbiór spójnych tematycznie artykułów naukowych, w których zawarto oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, jakim było poznanie i opisanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i lipidomów *Cutibacterium* spp., spełnia zawarte w niej wymogi. Doktorantka do rozprawy załącza oświadczenia wszystkich Współautorów, z których wynika, że Jej wkład w powstanie tych prac był znaczący. Doktorantka odegrała dominującą rolę w wykonaniu badań opisanych w pracach eksperymentalnych, a także miała znaczący udział w analizie i interpretacji wyników. Biorąc pod uwagę powyższe informacje, należy uznać, że włączenie tych prac do rozprawy było uprawnione.

Ocena struktury rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z ośmiu rozdziałów i są to: 1. Streszczenie; 2. Abstrakt; 3. Omówienie (składające się z kilku podrozdziałów oraz z Piśmiennictwa, których tytuły nie zostały ujęte w wykazie „Zawartość rozprawy doktorskiej” pełniącym rolę spisu treści); 4. Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy; 5. Oświadczenia współautorów; 6. Publikacje wchodzące w skład rozprawy; 7. Wnioski; 8. Osiągnięcia. Ten ostatni rozdział jest wykazem dorobku naukowego Doktorantki, który zasadniczo nie podlega ocenie, ale stanowi przydatną informację o dotychczasowej aktywności naukowej Pani mgr Anny Chudzik. W tym

miejsu należy podkreślić doskonały dorobek naukowy Doktorantki, obejmujący 7 artykułów naukowych, aktywny udział w 3 konferencjach wraz z prezentacją ustną oraz prezentacją dwóch plakatów i współautorstwo w kolejnych dwóch doniesieniach zjazdowych. Pani mgr Anna Chudzik była wykonawcą w dwóch projektach grantowych. Przedstawiona do oceny rozprawa liczy 102 strony, została napisana zwięźle, poprawnym językiem, bardzo starannie opracowana edytorsko.

Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Tematyka rozprawy została zarysowana wokół zjawiska zaobserwowanego już w latach 60. ubiegłego wieku u bakterii Gram-ujemnych, a mianowicie ich zdolności do wydzielania pęcherzyków zewnątrzłonowych (OMVs). Przez długi czas uważano, że z powodu grubej, wielowarstwowej mureiny i braku błony zewnętrznej bakterie Gram-dodatnie nie wydzielają pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Dopiero w latach 90. XX w., przy pomocy techniki TEM oraz analiz proteomicznych, stwierdzono zdolność do uwalniania pęcherzyków, tzw. EVs, u *Staphylococcus aureus*. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska dotyczy m. in. charakterystyki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez bakterie należące do rodzaju *Cutibacterium* (dawniej klasyfikowane do rodzaju *Propionibacterium*). Najbardziej znanym gatunkiem należącym do tego rodzaju jest *Cutibacterium acnes*, który jest identyfikowany jako czynnik etiologiczny trądziku pospolitego oraz innych zakażeń tkanek miękkich (np. zapalenia prostaty, zapalenia wsierdza, zakażenia endoprotez). Poszczególne szczepy należące do tego gatunku klasyfikuje się do filotypów: IA1, IA2, IC, IB, II i III. Filotypy IA1 oraz IA2 dominują w skórze trądzikowej, podczas gdy pozostałe są charakterystyczne dla skóry zdrowej. Zostało już wcześniej dowiedzione, iż wydzielane przez *C. acnes* metabolity komórkowe stymulują odpowiedź odpornościową gospodarza i powodują uwolnienie cytokin prozapalnych, co prowadzi do nasilenia zmian zapalnych w skórze.

Celem pracy doktorskiej była szczegółowa analiza pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki *C. acnes*, wraz z ich charakterystyką morfologiczną oraz analizą porównawczą białek i lipidów, co pozwoliło na przygotowanie platformy badawczej dla potencjalnego zastosowania tych struktur w szczepionkach. Dokonano również kompleksowej analizy lipidomu bakterii należących do rodzaju *Cutibacterium* w celu poszukiwania specyficznych markerów lipidowych o potencjale diagnostycznym, które mogłyby posłużyć do rozróżniania poszczególnych gatunków i filotypów *Cutibacterium*.

Doktorantka zarysowując w „Omówieniu” cel pracy i zadania badawcze nie zamieściła niestety opisu hipotezy badawczej, która była punktem wyjścia dla zaplanowanych badań.

Publikacja nr 1 to praca przeglądowa zatytułowana: „Bakteryjne pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako mediatory komunikacji międzykomórkowej”. Została w niej pokrótce opisana historia odkrycia bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, scharakteryzowano mechanizmy biogenezy pęcherzyków u bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich z wyodrębnieniem *Mycobacterium*, które zostały scharakteryzowane osobno. Opisano metody izolacji i techniki analityczne stosowane w analizie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Zaprezentowano skład pęcherzyków, z uwzględnieniem budujących je lipidów, tworzących błonę pęcherzyka, oraz białek i kwasów nukleinowych znajdujących się wewnątrz pęcherzyka. Scharakteryzowano poznane do tej pory mechanizmy regulacji genetycznej wydzielania pęcherzyków przez bakterie. Opisano udział pęcherzyków w oddziaływaniach między bakteriami, wraz z podaniem ich potencjalnej roli w życiu bakterii: funkcji ochronnej, funkcji w pozyskiwaniu substancji odżywczych, roli w oddziaływaniach antagonistycznych pomiędzy mikroorganizmami. Ponadto, scharakteryzowano udział pęcherzyków w rozprzestrzenianiu się bakteriofagów oraz w funkcjonowaniu biofilmu. Opisano też „Udział pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w oddziaływaniach między komórkami eukariotycznymi”. Z treści rozdziału wynika, że chodzi tu raczej o oddziaływania pomiędzy bakteriami a komórkami eukariotycznymi. Autorki wskazują, iż mikroorganizmy patogenne, poprzez wydzielanie pęcherzyków wewnątrz organizmu gospodarza/żywiciela, zawierające czynniki wirulencji lub inne modulatory komórkowe, mogą oddziaływać pro- lub przeciwzapalnie na jego układ odpornościowy. Ostatni rozdział to bardzo interesujące rozważania na temat możliwości medycznego zastosowania bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, np. do projektowania i podawania szczepionek (bardzo duży potencjał), jako nośniki substancji terapeutycznych oraz do transportu enzymów terapeutycznych.

W pracy zacytowano 117 pozycji bibliograficznych i zamieszczono 3 autorskie ryciny/schematy oraz jedną tabelę. Wg Doktorantki, „przygotowanie manuskryptu pracy przeglądowej umożliwiło Jej poszerzenie wiedzy dotyczącej bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, poznanie metod stosowanych w badaniach nad nimi oraz przygotowanie metodyki hodowli, izolacji czy oczyszczania, niezbędnych w kolejnych etapach realizacji projektu”.

W **publikacji nr 2** zatytułowanej: „Different *Cutibacterium acnes* phylotypes release distinct extracellular vesicles” została przeprowadzona charakterystyka morfologiczna pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs), wydzielanych przez komórki trzech szczepów *C. acnes* reprezentowanych przez trzy filotypy: IA1, IB i II (DSM 1897 – filotyp IA1; DSM 16379 – filotyp

IB; PCM 2334 – filotyp II). Obserwacji pęcherzyków dokonano poprzez zastosowanie transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), natomiast średnicę pęcherzyków mierzono przy pomocy analizatora cząstek wykorzystującego dynamiczne rozpraszanie światła (technika DLS). Otrzymane wyniki zostały zaprezentowane w formie mikrografii elektronowych oraz histogramów obrazujących dystrybucję wielkości pęcherzyków dla poszczególnych szczepów bakterii i potwierdzających obecność w preparatach sferycznych struktur o zróżnicowanej średnicy, mieszczącej się w zakresie ok. 80 – 94 nm. W pracy dokonano porównania profili białkowych i lipidowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez badane szczepy *C. acnes*. Profile białkowe EVs *C. acnes* analizowano z wykorzystaniem techniki elektroforezy SDS-PAGE. Jako materiał porównawczy posłużyły frakcje białkowe uzyskane z komórek *C. acnes* poszczególnych szczepów, i były to: pełny lizat komórkowy, białka powierzchniowe, białka ściany komórkowej oraz białka cytozolu. W suplemencie zamieszczono zdjęcie żelu SDS-PAGE ekstraktu białkowego uzyskanego z czystego podłoża hodowlanego użytego do badań. Brak prążków elektroforetycznych w ścieżkach z ekstraktem z podłoża świadczył o nieobecności białek w analizowanym preparacie. Takie podejście pozwoliło Doktorantce nie tylko na porównanie między sobą składu białkowego pęcherzyków otrzymanych z różnych filotypów *C. acnes*, ale także na przybliżone określenie lokalizacji komórkowej poszczególnych składowych ekstraktu. Zostały wskazane znaczące różnice pomiędzy poszczególnymi preparatami, zarówno w odniesieniu do szczepu *C. acnes* jak i w odniesieniu do lokalizacji poszczególnych frakcji. Otrzymane wyniki zostały obszernie przedyskutowane z danymi otrzymanymi przez innych autorów.

Kolejnym aspektem poruszonym w pracy było uzyskanie frakcji lipidowych z poszczególnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, jak i z całych komórek trzech filotypów *C. acnes*. Ekstrakty te poddano następnie analizie z wykorzystaniem klasycznej techniki dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (2D-TLC) oraz spektrometrii mas z wykorzystaniem techniki MALDI-TOF. W pracy przedstawiono chromatogramy TLC uzyskane dla frakcji EVs oraz lipidów komórkowych uzyskanych z badanych szczepów. Poszczególne plamy na chromatogramach zostały opatrzone analogicznymi numerami, nadanymi prawdopodobnie w oparciu o współczynniki R_f (analogiczne plamy na chromatogramach mają te same numery). Szkoda, że Doktorantka nie wykonała przyporządkowania poszczególnych frakcji lipidowych do odpowiednich klas lipidów, poprzez np. ich selektywną detekcję. Pozwoliłoby to na wzbogacenie pracy o dodatkowe informacje na temat klas lipidów wykrytych w badanych filotypach *C. acnes*. W pracy podkreślono istnienie wyraźnych różnic w profilach lipidowych zarówno między ekstraktami pozyskanymi z pęcherzyków jak i między ekstraktami pozyskanymi z liofilizatów komórkowych, w zależności od filotypu.

Stwierdzono, że ekstrakty komórkowe były bogatsze w lipidy niż ekstrakty z pęcherzyków, co wskazuje, że skład pęcherzyków jest regulowany przez komórki bakteryjne. Preparaty lipidowe analizowano także z wykorzystaniem spektrometrii mas MALDI-TOF. Analizy porównawcze zostały wykonane wyłącznie na podstawie widm masowych uzyskanych w jonizacji dodatniej, ponieważ, jak stwierdzono w publikacji, ich jakość była dużo lepsza niż widm uzyskanych w jonizacji ujemnej. Rzeczywiście, widma masowe lipidów błonowych uzyskane w trybie jonizacji dodatniej może być bogatsze, zwłaszcza w sytuacji, gdy preparat zawiera te klasy lipidów, które łatwiej przyjmują ładunek dodatni, jak np. fosfatydyloetanolamina, czy lipidy aminokwasowe. Niestety, takie podejście spowodowało fakt wyeliminowania z tej analizy puli lipidów, które łatwiej ulegają jonizacji w trybie jonów ujemnych (np. fosfatydyloglicerol czy kardiolipina). W tych analizach porzeczano na podaniu wartości m/z dla poszczególnych lipidów, nie przeprowadzając ich identyfikacji. Rozumiem, że celem pracy nie było dokładne opisanie poszczególnych klas lipidów, lecz odnalezienie różnic pomiędzy poszczególnymi szczepami i ekstraktami (EVs i komórkowymi). W materiałach dodatkowych zostały natomiast zamieszczone obszerne tabele, zawierające wykazy sygnałów m/z uzyskanych dla poszczególnych preparatów (dla każdego szczepu podano zestawienie dla preparatu EVs oraz lipidów komórkowych), włączając w to ekstrakt z podłoża hodowlanego o raz sygnały uzyskane dla samej matrycy. W tabelach zostały zaznaczone sygnały pochodzące od matrycy i od podłoża. W ten sposób wyeliminowano z rozważań porównawczych sporą ilość sygnałów, wspólnych dla wszystkich preparatów, a pochodzących od matrycy bądź z podłoża. W zestawieniach zamieszczonych w publikacji podano liczbę sygnałów o jednakowej wartości m/z wspólnych dla preparatów EVs oraz puli lipidów wspólnych zarówno dla pęcherzyków i ekstraktów komórkowych. Dlaczego nie podano puli lipidów unikalnych dla EVs? To jednoznacznie wskazałoby, że „balast lipidowy” niesiony przez pęcherzyki jest zarezerwowany wyłącznie dla nich. Wg opisu zamieszczonego w części wstępnej rozprawy, porównanie pozyskanych techniką MALDI-TOF MS widm mas oraz wygenerowanych na ich podstawie wartości m/z , pozwoliło Doktorantce na wyselekcjonowanie zarówno lipidów wspólnych jak i specyficznych dla poszczególnych ekstraktów pęcherzykowych. Uzyskane wyniki analiz „jednoznacznie potwierdziły, że ekstrakty pęcherzykowe różnią się w zależności od filotypu, z którego są izolowane” oraz, że „bogatsze w lipidy komórki bakteryjne selektywnie „upakowują” ich zawartość”. Doktorantka słusznie zauważyła, że „profilowanie lipidów za pomocą techniki MALDI-TOF może stanowić precyzyjną metodę uzupełniającą do technik analizy EVs opartych na analizie białek i umożliwia różnicowanie szczepów bakterii nawet na poziomie filotypów”. Pojawia się więc pytanie, czy Doktorantka widzi możliwość szerszego zastosowania profilowania lipidów w diagnostyce i terapii zakażeń *C. acnes* w warunkach klinicznych?

Publikacja nr 3. pt. „Comprehensive lipidomic analysis of the genus *Cutibacterium*” dotyczy porównawczej analizy lipidomicznej ośmiu szczepów należących do rodzaju *Cutibacterium*, w tym czterech filotypów *C. acnes*: (szczep DSM 1897 należący do filotypu IA1, DSM 16379 – filotyp IB, PCM 2334 – filotyp II i NCTC 13655 – filotyp III), dwóch szczepów *C. granulosum* (szczepy PCM 2401 i PCM 2462), *C. avidum* (szczep DSM 4901) i *C. namnetense* (szczep DSM 29427). Zatem, do uprzednio badanych trzech szczepów doszło pięć nowych, a do gatunku *C. acnes* sklasyfikowano aż 4 z nich, po jednym przedstawicielu z każdego filotypu. W pracy zaprezentowano wyniki analizy porównawczej kwasów tłuszczowych w formie estrów metylowych, dla wszystkich badanych szczepów. Zastosowana technika analizy preparatów (GC-MS) pozwoliła na identyfikację oprócz nasyconych kwasów tłuszczowych z prostym łańcuchem alifatycznym (piętnasto-, szesnasto- i siedemnastowęglowym), również kwasów tłuszczowych rozgałęzionych typu *iso* oraz *anteiso*. Brak jest niestety informacji o kwasach tłuszczowych nienasyconych, które pojawiają się później w zidentyfikowanych klasach lipidów. W związku z tym bardzo proszę Doktorantkę o komentarz. Wyniki analiz zostały zaprezentowane w postaci wykresów oraz map cieplnych. Zastosowanie techniki grupowania opartego na pomiarze odległości euklidesowej pozwoliło na rozróżnienie trzech głównych grup w obrębie analizowanych szczepów *Cutibacterium*, biorąc pod uwagę profile komórkowych kwasów tłuszczowych. Pierwszy klaster stanowiły dwa szczepy *C. acnes* (DSM 1897 i NCTC 13655), *C. granulosum* PCM 2401 oraz *C. avidum* DSM 4901. Drugi klaster reprezentowały 3 szczepy: *C. acnes* DSM 16369, *C. acnes* PCM 2334 oraz *C. granulosum* PCM 2462. Natomiast szczep *C. namnetense* DSM 29427 pozostawał na uboczu, ponieważ legitymował się bardzo wysoką zawartością rozgałęzionych kwasów tłuszczowych i ogólną bardzo wysoką pulą komórkowych kwasów tłuszczowych. Proszę o wyjaśnienie, czy te różnice mogły przynajmniej częściowo wynikać z zastosowanego przelicznika ilości kwasów tłuszczowych podanej w $\mu\text{g} / \text{OD}$, przy czym wartość OD_{600} dla poszczególnych hodowli była bardzo zróżnicowana, a w przypadku tego szczepu wynosiła zaledwie 0.64, podczas gdy np. dla szczepu *C. avidum* było to aż 1.3? Czy badane szczepy miały tendencję do wytwarzania śluzu, który mógłby zaburzać (zawyżać) odczyty wartości OD nie odzwierciedlając realnej liczby żywych komórek w zawiesinie?

Zastosowanie wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HDMS), w trybie jonizacji dodatniej i ujemnej, wraz z rozdziałem preparatów lipidowych na poszczególne frakcje przy zastosowaniu ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej (UPLC), wraz z analizą głównych składowych (PCA), umożliwiło wykonanie pełnych analiz lipidomicznych otrzymanych preparatów. Zidentyfikowano 90 lipidów w trybie jonizacji dodatniej (w tym 52 glicerolipidów (triacyloglicerole), 8 glicerofosfolipidów, 25 sfingolipidów i 5 amidów kwasów tłuszczowych) oraz

38 rodzajów lipidów w trybie jonizacji ujemnej (wśród nich były obecne kwasy tłuszczowe i glicerofosfolipidy, głównie kardiolipiny). Spośród zidentyfikowanych klas lipidów możliwe było wyselekcjonowanie związków markerowych, w tym charakterystycznych dla poszczególnych filotypów *C. acnes*. Według Doktorantki należą do nich: fosfatydylocholina (PC 30:0), występująca w znacznych ilościach jedynie w komórkach *C. acnes* IB, sfingomieliny (SM 33:1), zidentyfikowana w komórkach *C. acnes* II i *C. namnetense*; SM 35:1, obecna w komórkach *C. acnes* II i III) oraz fosfatydyloglicerol z podstawnikiem alkiloeterowym (PG O-32:0), charakterystyczny dla komórek *C. acnes* IB. Warto zaznaczyć, że w tej pracy po raz pierwszy wykazano obecność lipidów należących do klasy amidów kwasów tłuszczowych – *N*-acyloetanolamin (NAE), w których reszta acylowa jest połączona z atomem azotu etanolaminy, a także po raz pierwszy u tych bakterii odnotowano obecność fosfolipidów należących do kardiolipin. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że na podstawie przeprowadzonych analiz MS-MS określono dystrybucję kwasów tłuszczowych w kardiolipinach.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów dowiedziono, że profilowanie lipidów przy zastosowaniu techniki LC-MS jest użytecznym narzędziem, służącym do rozróżniania poszczególnych gatunków i filotypów, w obrębie grup szczepów bakterii patogennych i oportunistycznych. Analiza głównych składowych (PCA), w warunkach uzyskania dużej ilości dosyć zróżnicowanych wyników, jest narzędziem, przy pomocy którego jest możliwe wskazanie, które z opisanych lipidów miały szczególny wpływ na grupowanie szczepów i mogą być potencjalnymi markerami diagnostycznymi. Jest to bardzo istotne w precyzyjnej identyfikacji mikroorganizmów.

Podsumowanie

Najważniejsze osiągnięcia Doktorantki zawarte w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej:

- Na podstawie badań opisanych w Publikacji nr 2 możliwe było wykazanie, iż odmienność genotypowa i fenotypowa filotypów *C. acnes* znajduje odzwierciedlenie w składzie białek i lipidów budujących pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Natomiast różnice obserwowane w profilach lipidowych komórek *C. acnes* i pęcherzyków zewnątrzkomórkowych są pochodną selektywnego kierowania lipidów do pęcherzyków.
- Na podstawie analiz lipidomu ośmiu szczepów należących do rodzaju *Cutibacterium*, przedstawionych w Publikacji nr 3, wykazano, że profilowanie lipidomiczne umożliwia precyzyjne różnicowanie bakterii na poziomie gatunków oraz filotypów. Po raz pierwszy w rodzaju *Cutibacterium* opisano lipidy należące do podklas amidów kwasów tłuszczowych

i kardiolipin. Ponadto, w lipidomach badanych bakterii wykryto markery lipidowe o potencjale diagnostycznym, którymi były: fosfatydylocholina (PC 30:0), sfingomieliny (SM 33:1 i SM 35:1) oraz fosfatydyloglicerol z podstawnikiem alkiloeterowym (PG O-32:0).

Stwierdzam, że badania przedstawione w rozprawie doktorskiej Pani mgr Anny Chudzik prezentują wysoki poziom naukowy i niewątpliwie wnoszą cenny wkład w poznanie morfologii i składu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych bakterii z rodzaju *Cutibacterium* oraz złożoności ich lipidomów. Doktorantka wykazała, że badania lipidomiczne pozwalają na uzyskanie precyzyjnego „odcisku palca” dla izolatów należących do rodzaju *Cutibacterium* oraz na selekcję nowych markerów lipidowych o potencjale diagnostycznym. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż Pani mgr Anna Chudzik w swoich badaniach zastosowała zawansowane techniki instrumentalne (GC-MS, MALDI-TOF, LC wraz z wysokorozdzielczą spektrometrią mas) oraz metody statystycznej obróbki i prezentacji danych (mapy cieplne, PCA).

Wnioski końcowe:

Przedstawiona do oceny praca spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (t.j. Dz.U. 2023 poz. 742 z późn. zm.) i stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. W związku z powyższym, wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda PAN we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anny Chudzik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze wysoką wartość naukową uzyskanych wyników, jej wkład w przeprowadzone badania oraz opublikowanie wyników badań zawartych w rozprawie w formie dwóch oryginalnych prac badawczych, wnoszę o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Chudzik stosowną nagrodą.



dr hab. Iwona Komanecka, prof. UMCS