



Politechnika Łódzka



Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Prof. dr hab. Adriana Nowak
Katedra Biotechnologii Środowiskowej
Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
ul. Wólczańska 171/173
90-530 Łódź

Łódź, 08.05.2025 r.

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr inż. Patrycji Kowalskiej
pt.: „Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mikroorganizmów
niepatogennych – charakterystyka oraz wpływ na komórki ludzkie”
wykonanej w Katedrze Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków
Wydziału Chemicznego Politechniki Warszawskiej,
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie biotechnologia,
pod kierunkiem promotor dr hab. Jolanty Mierzejewskiej, prof. uczelni
oraz promotor pomocniczej dr Małgorzaty Milner-Krawczyk

Podstawa opracowania recenzji

Ocenę pracy doktorskiej wykonano na podstawie decyzji Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej podjętej na posiedzeniu 18 marca 2025 r.

Uzasadnienie podjęcia tematu

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. *extracellular vesicles*, EVs) odgrywają coraz większą rolę w badaniach nad terapią przeciwnowotworową. Ich zdolność do przenoszenia białek, lipidów i kwasów nukleinowych między komórkami sprawia, że są one potencjalnymi nośnikami leków, biomarkerami oraz narzędziami do modulacji odpowiedzi immunologicznej. EVs mogą być wykorzystane jako naturalne nanonośniki do dostarczania leków przeciwnowotworowych, takich jak doksorubicyna lub paklitaksel. Ich niewątpliwą zaletą jest możliwość dostarczania leków do specyficznych komórek nowotworowych. Wyzwania i ograniczenia w stosowaniu EVs to standaryzacja metod ich izolacji oraz charakterystyki, niska

wydajność produkcji na skalę przemysłową oraz potencjalna immunogenność i bezpieczeństwo kliniczne. Badania nad EVs u drożdży do tej pory skupiały się głównie na patogenach, takich jak *Candida albicans*, ale coraz więcej uwagi poświęca się drożdżom o znaczeniu przemysłowym, w tym *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* oraz *Kluyveromyces marxianus*. Mimo że badania nad EVs *K. marxianus* znajdują się nadal na wczesnym etapie, istniejące dowody sugerują, iż gatunek ten może być źródłem EVs o potencjale biotechnologicznym i terapeutycznym. Z kolei EVs *S. boulardii* wykazują korzystne cechy jako bezpieczne i efektywne nośniki bioaktywnych cząsteczek, z potencjałem zastosowania w medycynie, w tym w terapii nowotworów, modulacji odpowiedzi immunologicznej oraz terapii genowej. EVs produkowane przez bakterie *Janthinobacterium lividum* stanowią obiecujący obszar badań ze względu na ich zdolność do transportu bioaktywnych związków, takich jak wiolaceina oraz potencjalne zastosowania terapeutyczne. Niniejsza rozprawa doktorska koncentruje się na EVs produkowanych przez mikroorganizmy niepatogenne (drożdże *S. boulardii* i *K. marxianus* oraz bakterie *J. lividum*), które nie były pod tym kątem charakteryzowane w warunkach hodowli oraz w modelu badawczym zastosowanym przez Doktorantkę – Panią Patrycję Kowalską.

Badania podjęte w niniejszej pracy wpisują się w trend poszukiwania nowych, skutecznych leków przeciwnowotworowych, w tym nośników bioaktywnych cząsteczek w terapii różnych schorzeń, który jest wciąż rozwijającym się i wiodącym kierunkiem badań na świecie. **Podjęcie analiz w niniejszym zakresie uważam za wysoce uzasadnione.**

Formalna ocena pracy

Praca doktorska mgr inż. Patrycji Kowalskiej to opracowanie obejmujące 213 stron maszynopisu, zawierające 58 rysunków (wykresów, fotografii i schematów), 21 tabel oraz dodatkowo 2 rysunki i 2 tabele dołączone do załącznika. Układ rozprawy jest właściwy dla prac eksperymentalnych i zawiera następujące rozdziały: streszczenie i słowa kluczowe w języku polskim i angielskim, cel oraz hipoteza badawcza pracy, wstęp, materiały i metody, wyniki i dyskusja, podsumowanie i perspektywy dalszych badań, bibliografia, wykaz skrótów, spis rysunków, spis tabel, spis załączników, załączniki.

Tytuł rozprawy został sformułowany właściwie. Cel i zakres pracy oraz hipoteza badawcza zostały przedstawione prawidłowo. Doktorantka zacytowała w pracy 260 aktualnych, anglojęzycznych pozycji literaturowych o tematyce ściśle związanej z rozprawą, z których ok. 52% pochodzi z lat 2020-2025.

Ocena merytoryczna pracy

We „*Wstępie*” liczącym 19 stron Doktorantka szczegółowo opisała EVs: biogenezę ich powstawania, mechanizmy pobierania ze środowiska, metody izolacji, charakterystykę i możliwości modyfikacji. Krótko omówiła również probiotyki oraz bakterie niepatogenne i produkowane przez nie EVs. W rozdziale tym Doktorantka uzasadniła podjęcie tematu niniejszej pracy. Część teoretyczna jest bardzo dobrym wprowadzeniem do części doświadczalnej. Została ona wzbogacona starannie opracowanymi schematami graficznymi (rysunkami 1-6).

Rozdział „*Materiały i metody*” przedstawia bardzo szczegółowo opisane materiały oraz zastosowane metody badawcze i liczy aż 34 strony. Doktorantka wykorzystwała w badaniach drobnoustroje z 3 rodzajów (drożdże oraz bakterie) oraz 5 linii komórkowych (prawidłowych i nowotworowych). Pani Patrycja Kowalska w sposób wręcz recepturalny i encyklopedyczny opisała poszczególne metody, wiele zagadnień ujęła w postaci przejrzystych 7 tabel oraz 5 schematów. **Techniki badawcze zastosowane przez Doktorantkę oceniam bardzo wysoko**, są one nowoczesne, powszechnie uznane i stosowane w badaniach biotechnologicznych. Obejmowały one m.in.: różne metody izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz oszacowanie wydajności ich produkcji, analizę ich wielkości i liczby z zastosowaniem NTA (ang. *nanoparticle tracking analysis*), NTA z barwnikami fluorescencyjnymi oraz DLS (ang. *dynamic light scattering*), obrazowanie pęcherzyków przy użyciu mikroskopii elektronowej, mikroskopię fluorescencyjną, wykorzystanie sondy fluorescencyjnej dcFDA do określania ROS, cytometrii przepływowej oraz qPCR (ang. *quantitative polymerase chain reaction*). Prawidłowo dobrane metody badawcze umożliwiły realizację celów i założeń prac eksperymentalnych będących częścią rozprawy doktorskiej przedstawionej do oceny.

Kolejny rozdział to „*Wyniki i dyskusja*” obejmujący 57 stron maszynopisu. Bardzo przydatnym w recenzji okazał się schemat wraz z komentarzem na str. 103-104 przedstawiający kolejne etapy badań realizowane w niniejszej dysertacji. Rozdział ten podzielony jest na 3 podrozdziały. W pierwszym z nich przedstawiono m.in. wyniki dotyczące różnych metod izolacji, warunków przechowywania, wydajności produkcji, charakterystyki oraz morfologii EVs z hodowli drożdży *S. boulardii* i *K. marxianus* oraz bakterii *J. lividum*. W podrozdziale drugim zawarto wyniki dotyczące wpływu mikrobiologicznych EVs na 4 linie komórkowe jelita człowieka, takie jak m.in.: zdolności EVs do interakcji z komórkami ludzkimi, wpływ EVs na kondycję hodowli komórkowych (w testach MTT, ROS i CV) po 24h hodowli, indukcja odpowiedzi długotrwałej (po 168h) w różnych wariantach, wpływ EVs na potencjał nowotworowy komórek oraz produkcja interleukin indukowana obecnością EVs pochodzenia

mikrobiologicznego. Podrozdział trzeci to wyniki dotyczące EVs jako nośników leków dotyczący egzogenego ładowania związków do EVs oraz testowania ich jako nośników do opracowania DDS-EVs (ang. *EVs-based drug delivery system*). Spośród wszystkich przetestowanych przez Doktorantkę metod izolacji EVs z płynnych hodowli mikroorganizmów wybrano ultrafiltrację, a najwydajniejszym producentem EVs okazały się bakterie *J. lividum*. Na podstawie przeprowadzonych testów wykazano, iż 24-godzinna inkubacja EVs drożdżowych nie wpływała negatywnie na żadne spośród badanych linii komórkowych. Natomiast po wydłużeniu czasu hodowli komórek do 7 dni po 1-krotnej ekspozycji na EVs zaobserwowano spadek liczebności komórek nowotworowych w hodowli oraz wzrost liczebności komórek prawidłowych. Spośród różnych metod ładowania związków do pęcherzyków wybrano ładowanie pasywne w obecności związku, minimalizujące stratę pęcherzyków. Doktorantka wykazała również pozytywny wpływ badanych drożdży na komórki prawidłowe oraz ich zdolność do hamowania rozwoju komórek nowotworowych. Rozdział ten jest wzbogacony o 10 rysunków, które są bardzo dobrej jakości zdjęciami z obrazowania mikroskopowego (TEM, STEM, barwienie fluorescencyjne, zdjęcia przyżyciowe z hodowli). Wyniki zostały omówione w sposób prawidłowy, zrozumiały, spójny i logiczny. Pani Patrycja Kowalska przeprowadziła zwięzłą analizę i dyskusję wyników własnych w świetle badań innych autorów, **która świadczy o wiedzy Doktorantki w dyscyplinie biotechnologia oraz jej umiejętności do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.**

Ostatni rozdział dysertacji zatytułowany „*Podsumowanie i perspektywy przyszłych badań*” przedstawia zwięzły opis podjętych badań oraz wskazuje na przyszłe możliwe do zrealizowania cele badawcze z nim związane.

Chciałam podkreślić, iż badania wykonane przez Doktorantkę w różnych układach doświadczalnych są niezwykle obszerne, czasochłonne i pracochłonne. Tego typu eksperymenty z liniami komórkowymi oraz mikroorganizmami wymagają procesjonalnego warsztatu badawczego oraz odpowiedniego przygotowania i umiejętności planowania. Uważam, że **niniejsza rozprawa doktorska prezentuje bardzo wysoki poziom wiedzy merytorycznej i praktycznej Doktorantki w dyscyplinie biotechnologia.**

Badania realizowane przez Panią Patrycję Kowalską były prowadzone m.in. z: Instytutem Biochemii i Biofizyki Państwowej Akademii Nauk, Instytutem Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego Polskiej Akademii Nauk, Wydziałem Biologii Uniwersytetu Warszawskiego, a także Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT

Politechniki Warszawskiej, co świadczy o umiejętności współpracy Doktorantki z różnymi zespołami badawczymi.

Źródła finansowania niniejszych badań pochodziły z projektów: OPUS 25 NCN („*Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe drożdży probiotycznych jako nośniki biologicznie aktywnych molekuł przekazywanych do komórek ludzkich w przewodzie pokarmowym*”); BIOTECHMED-2 Advanced („*Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe drożdży probiotycznych jako nośniki biologicznie aktywnych substancji*” finansowane w ramach projektu IDUB) oraz MINIATURA-5 NCN („*Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe *Janthinobacterium lividum* jako nośniki wiołaceiny - substancji o udowodnionym działaniu terapeutycznym*”), w których Doktorantka brała udział.

Doktorantka może pochwalić się bogatym doświadczeniem zawodowym. W latach 2018-2020 pracowała w Fundacji Badań i Rozwoju Nauki jako technik naukowiec w projekcie, Następnie do 2023 r. w Polskim Banku Komórek Macierzystych S.A., a do 2024 r. w Copernicus Diagnostics Sp. Z o. o. Obecnie pracuje w LabFarm Sp. Z o. o. Doktorantka odbyła również praktyki zawodowe w 4 placówkach związanych z przemysłem biotechnologicznym oraz uczestniczyła w 4 kursach i szkoleniach. Dorobek naukowy Doktorantki obejmuje 14 publikacji naukowych w czasopismach z listy JCR, w dwóch z nich jest pierwszą autorką. Pani Patrycja Kowalska brała również udział w 4 projektach badawczych.

Reasumując, badania wykonane przez Panią Patrycję Kowalską oraz uzyskane **wyniki dostarczają innowacyjnej wiedzy** dotyczącej charakterystyki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wytwarzanych przez wybrane szczepy mikroorganizmów niepatogennych oraz ich wpływie na komórki ludzkie prawidłowe i nowotworowe. Pracę oceniam wysoko, a uzyskane wyniki są wartościowe pod względem poznawczym. Posiadają również silny potencjał aplikacyjny i stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Według mojej opinii cel naukowy został zrealizowany. **Rozprawę doktorską oceniam pozytywnie.**

Uwagi i pytania

Praca doktorska została napisana starannie, choć zawiera usterki, które w mojej opinii nie wpływają na wartość badań oraz rozprawy przedstawionej do oceny. Niemniej jednak, zgodnie z zaleceniami zawartymi w „*Dobrych praktykach w recenzjach rozpraw doktorskich*”, które otrzymałam od Politechniki Warszawskiej jestem zobowiązana o nich napisać:

1. W podrozdziale „2.2.1. *Warunki probiotyczności mikroorganizmów*” (str. 28)

Doktorantka podaje nie do końca prawidłową definicję probiotyków: „*Probiotykami*

nazywa się żywe mikroorganizmy, które przynoszą korzyści zdrowotne dla gospodarza” bez powołania się na źródło. Tymczasem powinna przytoczyć definicję probiotyków według *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* z 2014 roku: „żywe mikroorganizmy, które podane w odpowiednich ilościach przynoszą korzyści zdrowotne dla gospodarza” (Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514).

2. We „Wstępie” (str. 29) Doktorantka wymienia „m.in. bakterie z rodzajów (...), a także *Escherichia coli*...”. *E. coli* to gatunek. W kolejnym zdaniu „Przykładem mikroorganizmu zaliczanego do tej ostatniej grupy jest *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii*”, mając na myśli drożdże z rodzaju (nie z grupy) *Saccharomyces* z poprzedniego zdania. Ponadto widnieje nieprawidłowa nazwa gatunkowa „*difficile*”, zamiast „*difficile*”.
3. Na str. 30 Doktorantka dwukrotnie używa terminu „*mikroflora*” w odniesieniu do mikrobioty jelitowej, co nie jest poprawne. W dalszej części pracy Doktorantka używa już prawidłowego sformułowania tj. „*mikrobiota*”.
4. Zdanie na str. 16 „Co więcej pęcherzyki pośredniczą także w komunikacji pomiędzy komórkami różnego rodzaju, np. EVs komórek prokariotycznych i odbierające je komórki eukariotyczne (m.in. podczas modulacji odpowiedzi immunologicznej)” jest niejasne.
5. Zdanie na str. 17 „Badania nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi z roku na rok są coraz bardzo szybko postępują...” jest niepoprawne.
6. W podtytule 2.1.3. czy powinno być „przez”?
7. Na str. 22 Doktorantka używa żargonu laboratoryjnego „pod posiadaną próbkę”. Żargon laboratoryjny jest również obecny w kilku innych miejscach tekstu, np. na str. 54 i 55: „...oglądano je pod mikroskopem z obiektywem...” lub „...oglądano preparat pod obiektywem...”; na str.80 „...oglądano na mikroskopie fluorescencyjnym...”; str.84 „...wysiano na butelki hodowlane...”.
8. Na str. 30-31 zdanie „Wykazano w nich, że bakterie mogą dostarczać bakteriocyny za pośrednictwem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i w ten sposób zabijać inne bakterie” zawiera sformułowania nie brzmiące naukowo.

9. Na str. 31 zdanie „*Natomiast pęcherzyki z *Lactobacillus druckerii* nie tylko przyspieszają gojenie się zapobiegają tworzeniu się blizn*” jest niepoprawnie sformułowane.
10. Doktorantka stosuje nową nomenklaturę bakterii z rodzaju „*Lactobacillus*”, ale niekonsekwentnie; na str. 31 używa „*Lactobacillus plantarum*” zamiast „*Lactiplantibacillus plantarum*”.
11. Na str. 31 wyrażenie „...*EVs pokonały nie tylko cały organizm...*” jest nie do końca poprawne i można je zrozumieć dwuznacznie.
12. Na str. 31, czy zdanie „*Na podstawie przytoczonych przykładów można zakładać, że badania nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi produkowanymi przez drożdże probiotyczne również będą wykazywały bardzo różnorodny i pozytywny wpływ na organizm*” nie powinno brzmieć następująco: „*Na podstawie przytoczonych przykładów można zakładać, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe produkowane przez drożdże probiotyczne również będą wykazywały bardzo różnorodny i pozytywny wpływ na organizm*”?
13. Na str. 55: czy pisząc „...*poniższe równanie (1)...*” Doktorantka ma na myśli równanie podane na str. 53?
14. Podpis do Tabeli 3 na str. 61 nie powinien zaczynać się od frazy „*W poniższej tabeli zestawiono...*”.
15. Pkt. 3.3.24. na str. 77. Na jakiej podstawie wybrano stężenie 100 μM dla kontroli pozytywnej (t-BHP) oraz 5 mM dla kontroli negatywnej (GSH)? Czy były wcześniej wyznaczane stężenia np. IC_{80} , IC_{50} , IC_{20} ?
16. Pkt. 3.3.25. na str. 78: czy w zdaniu „*Płytki z komórkami po spektrofotometrycznym odczycie fluorescencji (punkt 3.3.23.)...*” nie powinien być „*punkt 3.3.24*”? Punkt 3.3.23 dotyczy testu MTT i odczytu absorbancji.
17. W pkt. 3.3.25. na str. 78 Doktorantka używa nieprecyzyjnego określenia „*liczebność hodowli*”. Zamiast tego powinna stosować „*liczebność komórek w hodowli*”. Później w opisie wyników również stosuje to pojęcie.
18. Drożdże *K. marxianus*, choć posiadają status GRAS, nie są klasyfikowane jako probiotyki w takim sensie, jak szczep drożdży *S. boulardii* CNCM I-745 lub niektóre szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Gatunek *K. marxianus* wykazuje pewne właściwości probiotyczne, które sprawiają, że jest przedmiotem badań w tym kontekście. *K. marxianus* WUT240 zastosowany przez Doktorantkę nie jest szczepem probiotycznym według wytycznych FAO/WHO, ponieważ nie ma w pełni

- udokumentowanego, potwierdzonego klinicznie działania prozdrowotnego u ludzi. Z uwagi na powyższe poprawnie jest używać wobec takich mikroorganizmów terminu „*potencjalnie probiotyczne*”. Proszę o komentarz.
19. W metodyce brak jest podrozdziału z opisem zastosowanych analiz statystycznych. Rozumiem, że takowa analiza była przeprowadzona, wynika to z podpisów pod wieloma wykresami, np. nr 35-39 lub z opisów w tekście. Jakie testy były używane w tym celu? Czy analiza była przeprowadzana tylko na jednym poziomie istotności? Dlaczego?
20. Na str. 128 Doktorantka pisze: „*Przy najwyższej zastosowanej ilości pęcherzyków ($1,8 \cdot 10^5$ EVs/komórkę) zaobserwowano produkcję ROS na poziomie o 31% wyższym niż w hodowli kontrolnej (Rys. 36. b.)*”. Czym może to być spowodowane?
21. Na str. 130 Bacteroidetes oraz Firmicutes to *phylum* (typ), którego nie używa się razem z „spp.”.
22. Tytuł osi Y na rys. 39 (str. 134) powinien być „*liczebność komórek w hodowli testowej...*”.
23. Na str. 137 w odniesieniu do komórek ssących powinno się używać pojęcia „wodniczki”, a nie „wakuole”.
24. Rozumiem, iż zwięzła dyskusja wyników jest spowodowana brakiem lub małą liczbą publikacji w obszarze niniejszego tematu, zgodnie z informacjami przedstawionymi na rysunku 1. Proszę o komentarz.
25. Ograniczenia w stosowaniu EVs to niska wydajność produkcji na skalę przemysłową. Proszę Doktorantkę o komentarz w świetle otrzymanych wyników.
26. W pracy nie znalazłam rozdziału pt. „*Wnioski*”. Jakie wnioski szczegółowe i ogólne może Pani wyciągnąć z przeprowadzonych badań?
27. Według mojej oceny podpisy pod rysunkami 2, 3, 4, 6, 15, 16, 17 oraz 19 nie powinny zaczynać się od wyrazu „*Schemat...*”. Z kolei podpisy pod rysunkami 23, 35, 47 oraz 48 nie powinny zaczynać się od frazy „*Wyniki (...) przedstawiające...*”, a podpis rysunku 56 od „*Zdjęcia...*”.
28. Doktorantka wielokrotnie stosuje styl osobowy wobec przedmiotów martwych, np. „*wiolaceina ma*” (str. 32), „*mediatory mają*” (str. 33), podczas gdy styl naukowy wymaga raczej stosowania stylu bezosobowego (np. wykazuje, itp.).
29. W pracy obecne są drobne błędy stylistyczne, gramatyczne, edytorskie i interpunkcyjne.

Wnioski końcowe

W mojej opinii przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska **spełnia wymagania** merytoryczne i formalne stawiane pracom doktorskim zgodnie z ustawą z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, art. 187 (tekst jednolity: Dz.U. z 2024 r., poz. 1571 ze zm.).

Zwracam się do Rady Naukowej Dyscypliny Biotechnologia Politechniki Warszawskiej z wnioskiem o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie Pani mgr inż. Patrycji Kowalskiej do dalszych etapów w postępowaniu doktorskim.



Prof. dr hab. Adriana Nowak