



Prof. dr hab. Teresa Olczak
 Tel. 71 3752 612
 E-mail: teresa.olczak@uwr.edu.pl

Wrocław, 22.08.2023 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Anety Zegar pt. „Chemeryna jako czynnik antybakteryjny w patofizjologii skóry i tkanki tłuszczowej”

Rozprawa doktorska mgr Anety Zegar została zrealizowana w Zakładzie Immunologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Joanny Cichy. Tematyka pracy doktorskiej wpisuje się w nurt badań prowadzonych w zespole prof. dr hab. Joanny Cichy, ale również w najnowsze trendy badań nad mechanizmami odpowiedzi na obecność patogennych drobnoustrojów.

Rozprawa doktorska liczy 133 strony i posiada układ typowy dla tego typu prac. Doktorantka przedstawiła w niej wszystkie wymagane rozdziały, prezentujące kompletną zawartość rozprawy doktorskiej, w odpowiedniej kolejności.

Doktorantka wprowadza czytelnika w tematykę swojej pracy doktorskiej ciekawym wstępem. Jest ona współautorem 2 prac przeglądowych (opublikowane w *Cytokine Growth Factor Rev* i *Antioxidants [Basel]*), a w jednej z nich równorzędnym pierwszym autorem, z których dane częściowo wchodzi w skład wstępu. Doktorantka zaprezentowała obecny stan wiedzy obejmujący tematykę podjętą w rozprawie doktorskiej. Szczegółowa charakterystyka peptydów antybakteryjnych oraz chemeryny, z uwzględnieniem jej roli w skórze i tkance tłuszczowej, a także jej oddziaływania z receptorem, daje dobre podstawy do zrozumienia wyników przedstawionych w dalszej części rozprawy doktorskiej.

Uważa się, że chemeryna jest zaangażowana w kontrolę mikrobiologiczną i metaboliczną tzw. tkanek barierowych, ale jej funkcja w tych procesach nie jest jeszcze wyjaśniona. Dotychczasowe badania w tej dziedzinie obejmowały głównie doświadczenia *in vitro*, przede wszystkim w odniesieniu do zakażeń wywołanych przez *Staphylococcus aureus*. Dodatkowo, mało poznany, a obecnie intensywnie badany, jest udział chemeryny w procesach zachodzących w tkance tłuszczowej. Dlatego też, celem pracy doktorskiej była dalsza charakterystyka chemeryny w tych procesach. Szczegółowe cele obejmowały określenie znaczenia antybakteryjnego potencjału endogennej chemeryny oraz uzyskanego z niej peptydu p4 w modelu *in vivo* (powierzchniowa infekcja skóry u myszy), określenie antybakteryjnego potencjału chemeryny i udziału jej receptora w modelu *in vivo* (podskórna

infekcja skóry u myszy) oraz określenie wpływu chemeryny i jej receptora na przebieg ostrej termogenezy w tkance tłuszczowej indukowanej zimnem u myszy. Założone cele pracy doktorskiej zdaniem Recenzenta zostały całkowicie zrealizowane.

Rozdział Materiały i metody zawiera bardzo szczegółowy, klarowny opis stosowanych technik i metod, z uwzględnieniem bardzo jasnego opisu odczynników i materiałów. Może on stanowić bardzo dobrą podstawę do pracy w laboratorium dla młodszych studentów. Na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej Recenzent stwierdza, że w ramach prowadzonych badań mgr Aneta Zegar nabyła imponujące doświadczenie w różnorodnych metodach i technikach, w tym w technikach biologii molekularnej, metodach biochemicznych, mikrobiologicznych, mikroskopowych, a zwłaszcza w bardzo trudnych modelach z wykorzystaniem zwierząt. Gwarantuje to szeroki wachlarz nabytych umiejętności (metody *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*), które mogą być wykorzystane z dużym powodzeniem w kontynuacji pracy badawczej.

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawia uzyskane wyniki, których ilość jest imponująca. I chociaż w przypadku wielu uzyskanych wyników w podsumowaniu Doktorantka stwierdza, że nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie, to wartość uzyskanych wyników jest duża. Opublikowanie tzw. „negatywnych” wyników również wnosi wiele do nauki, gdyż pozwala innym badaczom w oparciu o takie wyniki na wybranie kolejnych podejść badawczych. Na pozytywną uwagę zasługuje także bardzo szczegółowy opis wyników, który istotnie powiększa zawartość rozprawy doktorskiej, ale jest to bardzo pomocne w ich zrozumieniu. Bardzo dobrze są także opisane rysunki (zarówno na samych wykresach, jak i w opisach) oraz tabele, co znacznie ułatwia zapoznanie się z tak ogromną liczbą doświadczeń i uzyskanych z nich wyników.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w pracy doktorskiej Recenzent zalicza wykazanie, że:

- 1) będący częścią chemeryny peptyd p4 wykazuje właściwości antybakteryjne w badaniach *ex vivo* i *in vivo* wobec *S. aureus* i jego szczepu opornego na metycylinę (MRSA);
- 2) peptyd p4 zmniejsza odpowiedź zapalną ograniczając leukocyty migrujące do skóry objętej procesem zapalnym;
- 3) endogenna chemeryna bierze udział w rozprzestrzenianiu się bakterii poprzez wiązanie do receptora CMKLR1;
- 4) endogenna chemeryna bierze udział w procesie produkcji reaktywnych form tlenu w brązowej tkance tłuszczowej oraz w nasilonej lipolizie w białej tkance tłuszczowej.

W podsumowaniu tych osiągnięć można stwierdzić, że realizacja pracy doktorskiej pozwoliła Doktorantce na uzyskanie nowych wyników, które poszerzają aktualną wiedzę w tej dziedzinie. Co więcej, jak sugeruje Doktorantka "...chemeryna może zostać wykorzystana do celów terapeutycznych, zarówno w schorzeniach dotyczących skóry (atopowe zapalenie skóry) jak i związanych z chorobami metabolicznymi (otyłość)." Jest to tym bardziej ważne, że obydwa schorzenia i wynikające z nich powikłania są bardzo popularne i trudne do leczenia.

W rozdziale Dyskusja, Doktorantka wskazuje na znaczenie uzyskanych wyników, krytycznie odnosi się do uzyskanych wyników, koreluje je z wiedzą dostępną w literaturze, a także wskazuje na konieczność dalszych badań. Każdy z głównych aspektów badań zakończony jest podsumowaniem, a w podsumowaniu całej rozprawy doktorskiej Doktorantka krótko przedstawia swoje najważniejsze osiągnięcia.

Piśmiennictwo obejmuje 254 pozycje literaturowe, z których większość to doniesienia z ostatnich lat, świadczące o wysokiej wartości i aktualności badanego problemu naukowego.

Pod względem edytorskim oraz merytorycznym praca doktorska jest napisana bardzo dobrze, praktycznie bezbłędnie. W pracy pojawiają się bardzo nieliczne niedoskonałości, które nie wpływają na poziom merytoryczny rozprawy doktorskiej, a Recenzent wskazuje je tylko z obowiązku (m.in. str. 46 jest "przechowywano w -80°C ", a powinno być "przechowywano w temperaturze -80°C "; str. 47 jest "1x stężonego", a powinno być "1× stężonego"; niezrozumiałe i będące żargonem laboratoryjnym jest stwierdzenie "paski do testu ELISA" na str. 47; naprzemiennie stosowany jest zapis PBS i sól fizjologiczna; str. 53 jest "...myszy z deficytem chemeryny (Chem KO)...", a powinno być z brakiem, gdyż zakładamy, że KO powoduje brak aktywności genu, a nie zmniejszoną aktywność genu). Niepotrzebne wydaje się także powtarzanie opisu niektórych wyników w rozdziale Dyskusja (np. str. 98, 101, 102).

Pomimo bardzo dobrego przedstawienia uzyskanych wyników, Recenzent prosi o dodatkowe, krótkie ustosunkowanie się Doktorantki do kilku pytań nasuwających się po lekturze ocenianej pracy doktorskiej, głównie w celu wyjaśnienia i poszerzenia dyskusji:

- 1) Str. 53 "Myszy kontrolne dla powyższych myszy transgenicznych pochodziły z tych samych miotów, aby wyeliminować wpływ różnic w mikroflorze skóry na badany parametr." Recenzent, jako osoba bez doświadczenia w pracy z myszami transgenicznymi, prosi o bardziej szczegółowe wyjaśnienie takiego procesu. W rozprawie jest tylko wzmianka o instytucjach, z których otrzymano myszy.

- 2) Wyniki z przeprowadzonej analizy histochemicznej (str. 58, Ryc. 11) wykazały "znacznie większą ilość gronkowca na powierzchni naskórka u myszy WT...". Dalej Doktorantka pisze: "Na skórze kontrolnej, gdzie został podany PBS, nie zaobserwowano innych bakterii Gram-dodatnich, ..." Czy ilość i rodzaj bakterii analizowano tylko z wykorzystaniem barwienia na obecność bakterii Gram-dodatnich? Czy wykonano w tym przypadku także inne analizy identyfikacji?
- 3) Jeśli chemeryna i jej receptor nie wykazują wpływu na proces eliminacji *S. aureus* w modelu powierzchniowej infekcji skóry (str. 53), to dlaczego peptyd p4 ma takie właściwości? Część badań przedstawionych w tym rozdziale (7.1.2.) nie wykazała takich właściwości również dla peptydu p4?
- 4) Główna rola chemeryny, najlepiej do tej pory zbadana, to jej udział odpowiedzi immunologicznej – Doktorantka dodaje nowe dane w tym zakresie. Ostatnie badania wskazują także na udział chemeryny w procesach metabolicznych – i tutaj też Doktorantka dodaje nowe dane. Badania przeprowadzone na myszach wskazują na znaczenie chemeryny w procesie termogenezy. Jak ten proces może wyglądać u człowieka i jak miałby wyglądać potencjalny proces leczenia, np. u chorych z otyłością w przebiegu cukrzycy? Jakie dalsze badania proponuje Doktorantka w tym zakresie? W rozprawie doktorskiej Doktorantka podejmuje ten wątek, ale Recenzent prosi o jego rozszerzenie.

Zasadniczo zadaniem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku mgr Anety Zegar nie można pominąć faktu, że częściowo wyniki uzyskane przez Doktorantkę w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały już przedstawione w 3 opublikowanych pracach w renomowanych czasopismach (Front Microbiol, J Biol Chem, PLoS ONE), a także faktu, że Doktorantka w tych pracach jest pierwszym, drugim lub trzecim autorem, co sugeruje jej istotny wkład w powstanie tych prac. Dodatkowo, Doktorantka jest współautorem 4 opublikowanych prac, niezwiązanych bezpośrednio z zakresem rozprawy doktorskiej (J Interferon Cytokine Res, J Leukoc Biol, Exp Dermatol, Postępy Biochemii). Dlatego też, cały dorobek naukowy Doktorantki oceniam wysoko.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Anety Zegar pod względem naukowym spełnia zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Także pod względem formalnym rozprawa ta spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011 r. Nr 84, poz. 455). Dlatego też,

wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki biologiczne Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne.

Ze względu na szeroki zakres prowadzonych badań oraz wysoką wartość naukową wyników, w części już opublikowanych w renomowanych czasopismach, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Anety Zegar stosowną nagrodą.

Teresa Olczak