



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

Wrocław, 31.08.2023 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Piotra Brzozy pt. „Patofizjologia naskórka w kontekście infekcji gronkowcowej i zmian atopowych”

Rozprawa doktorska mgr Piotra Brzozy 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 zakres badań prowadzonych w zespole prof. dr hab. Joanny Cichy, ale również w najnowsze trendy badań nad mechanizmami odpowiedzi na infekcje wywołane przez gronkowce. Celem pracy doktorskiej była charakterystyka odpowiedzi keratynocytów na kontakt z gronkowcami *Staphylococcus aureus* (jako przykład patogennej bakterii) i *S. epidermidis* (jako przykład komensalnej bakterii) oraz charakterystyka oddziaływania enzymów z grupy kalikrein z chemeryną. Szczegółowe cele obejmowały: 1) zbadanie zmian w ekspresji genów w keratynocytach – analiza ekspresji genów na poziomie transkryptu; 2) wykazanie różnic pomiędzy szczepami *S. aureus* o różnej zjadliwości – analiza ekspresji wybranych genów; 3) analiza porównawcza fenotypu keratynocytów traktowanych *S. aureus* z keratynocytami pochodzącymi z naskórka chorych z atopowym zapaleniem skóry i łuszczycą; 4) określenie znaczenia enzymów z grupy kalikrein w tworzeniu aktywnych izoform chemeryny.

Rozprawa doktorska liczy 150 stron i posiada układ typowy dla tego typu prac. Doktorant przedstawił w niej wszystkie wymagane rozdziały, prezentujące kompletną zawartość rozprawy doktorskiej, zamieszczone w odpowiedniej kolejności.

We wstępie rozprawy Doktorant wprowadza czytelnika w tematykę swojej pracy doktorskiej, opisując najpierw strukturę i funkcje naskórka. Następnie charakteryzuje dwa wybrane gatunki gronkowca i ich znaczenie w fizjologii i patologii człowieka. Część wstępu została poświęcona opisowi chorób skóry o podłożu zapalnym (atopowe zapalenie skóry, łuszczycą). Doktorant jest współautorem 2 prac przeglądowych (Cytokine Growth Factor Rev i Curr Microbiol), z których częściowo wykorzystano materiał do wstępu rozprawy doktorskiej. W dalszej części rozprawy Doktorant przedstawia obecny stan wiedzy obejmujący metody sekwencjonowania nowej generacji, włączając w to opis przygotowania próbek i wykaz

narzędzi bioinformatycznych stosowanych w analizie danych. Szczegółowa charakterystyka chemeryny i kalikreiny uzupełnia wstęp.

Rozdział Materiały i metody zawiera bardzo szczegółowy, klarowny opis stosowanych technik i metod. Może on stanowić bardzo dobrą podstawę do pracy w laboratorium dla młodszych studentów. Do realizacji celów swojej pracy Doktorant wykorzystał m.in. typowe hodowle komórkowe oraz organotypowe hodowle naskórka ludzkiego (model 3D), co wiązało się z izolacją keratynocytów z próbek biopsyjnych skóry. Dużą część pracy Doktorant poświęcił także na analizę wyników uzyskanych z sekwencjonowania transkryptomu keratynocytów, na podstawie której wybrał do dalszej analizy 15 genów. Na podstawie tego opisu Recenzent stwierdza, że w ramach prowadzonych badań mgr Piotr Brzoza nabył doświadczenie w różnorodnych technikach biologii molekularnej, hodowlach bakteryjnych i komórkowych, metodach mikrobiologicznych, biochemicznych, bioinformatycznych.

W kolejnym rozdziale Doktorant przedstawia uzyskane wyniki. Na pozytywną uwagę zasługuje podział badań i uzyskanych z nich wyników na odrębne rozdziały oraz szczegółowy opis wyników. Bardzo dobrze są opisane rysunki (zarówno na samych wykresach, jak i w opisach) oraz tabele, co znacznie ułatwia zapoznanie się z doświadczeniami i dużą ilością uzyskanych wyników.

Do najważniejszych i najciekawszych osiągnięć przedstawionych w pracy doktorskiej Recenzent zalicza wykazanie:

- 1) różnic w profilu transkryptomu w keratynocytach w odpowiedzi na stymulację bakteriami, zależną od gatunku i szczepu gronkowca;
- 2) że po stymulacji *S. aureus*, różnice w ekspresji genów obejmują geny kodujące proteazy serynowe, głównie te kodujące enzymy z grupy kalikrein i ich inhibitory;
- 3) udziału enzymu KKL 14 w generowaniu aktywnych izoform chemeryny (Chem 156F i Chem 158K) w stężeniach uznawanych za fizjologiczne;
- 4) że po stymulacji *S. aureus*, różnice w ekspresji genów obejmują geny kodujące białka biorące udział w metabolizmie lipidów.

W podsumowaniu tych osiągnięć można stwierdzić, że realizacja pracy doktorskiej pozwoliła Doktorantowi na uzyskanie nowych wyników, które nie tylko poszerzają aktualną wiedzę w tej dziedzinie, ale m.in. dzięki przeprowadzeniu globalnej analizy wskazują na dalsze cele i kierunki badawcze. Co istotne, część wyników została zamieszczona w opublikowanej już pracy (Antioxidants), czyli pozytywnie oceniona przez ekspertów, a pozostałe wyniki już są przypisane do 2 kolejnych manuskryptów (1 w recenzji i 1 w trakcie przygotowania).

W rozdziale Dyskusja Doktorant wskazuje na znaczenie uzyskanych wyników, krytycznie odnosi się do uzyskanych wyników, koreluje uzyskane dane z wiedzą dostępną w literaturze, a także wskazuje na konieczność dalszych badań. Ułatwieniem zrozumienia tak dużej ilości wyników jest podział dyskusji na rozdziały, zakończone podsumowaniami, a także ogólne podsumowanie efektów całej pracy doktorskiej.

Piśmiennictwo obejmuje 231 pozycji literaturowych, 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. W pracy pojawiają się nieliczne niedoskonałości, które nie wpływają na poziom merytoryczny rozprawy doktorskiej, a Recenzent wskazuje z obowiązku kilka z nich (m.in. zamiast „medium” powinno być „pożywka”; w opisie rozdziału białek z wykorzystaniem systemu HPLC na str. 49 nie podano rodzaju złoża, a jedynie nazwę kolumny; na str. 98 i innych stosowane są zwroty „...przeprowadzono analizę HPLC...” – HPLC to jest tylko system, a nie analiza, czy też metoda rozdziału; zamiast np. „75x” powinno być „75×”; str. 116 jest „...stężeń fizjologicznych – rzędu nanomoli.”, a powinno być „...stężeń fizjologicznych – rzędu wartości nanomolowych.”).

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

- 1) Głównym modelem badawczym w rozprawie doktorskiej, wskazanym przez Doktoranta jest model „sztucznego naskórka” i jego odpowiedź na poziomie transkryptu na stymulację bakteriami. Doktorant na str. 102 pisze „Ten model odpowiedzi keratynocytów „sztucznego naskórka” na bakterie pozwala na ocenę wpływu gronkowców oraz ich czynników wirulencji tylko na keratynocyty.” Czy rzeczywiście możliwe jest uzyskanie z wycinków biopsyjnych homogennej struktury 3D zbudowanej wyłącznie z keratynocytów? Czy istnieją metody na potwierdzenie takiej homogenności?
- 2) W celach poznawczych, jak stwierdza Doktorant, wykorzystanie organotypowych hodowli keratynocytów jest lepsze, gdyż „Przy nieobecności elementów układu immunologicznego oznacza to, iż keratynocyty są w stanie odróżniać od siebie i specyficznym reagować na obecność konkretnych gatunków bakterii.” Jak więc może być zmieniona odpowiedź bardziej skomplikowanej struktury, jaką jest naskórek u człowieka, zbudowany również z innych komórek i eksponowany na odpowiedź układu immunologicznego? Jak można „przenieść” wyniki uzyskane z prostego modelu

badawczego (prawidłowo wykorzystywanego w celach poznawczych) na złożony organizm człowieka i w ten sposób wykazać istotność uzyskanych w pracy doktorskiej wyników ?

- 3) Obydwa gatunki gronkowca w zastosowanym modelu badawczym stymulują ekspresję IL-20, cytokiny charakterystycznej dla keratynocytów. Czy jest to rzeczywiście cytokina produkowana *in vivo* wyłącznie przez keratynocyty ? Jeśli obydwaj gatunki gronkowca stymulują podobną jej ekspresję, to czy jej badanie u chorych (zwiększoną ekspresję stwierdzono u chorych z łuszczycą) może mieć rzeczywiście istotne znaczenie ? Czy oprócz łuszczycy, także w innych chorobach skóry obserwuje się jej zwiększoną ekspresję ? W paragrafie zamieszczonym na str. 108 Doktorant podaje pewne fakty, ale głównie odnosi się do literatury, nie poszerzając dyskusji.
- 4) Jak wskazuje Doktorant, zmiany w profilu transkryptomu spowodowane były „kontaktem keratynocytów z elementami biofilmu bakteryjnego bądź białkami adhezyjnymi. Identyfikacja specyficznego komponentu odpowiedzialnego za te różnice w ekspresji może stanowić istotny cel dalszych badań.” Czy wiadomo już może, jakie są potencjalne cele takich badań ?

Zasadniczo zadaniem Recenzenta jest ocena rozprawy doktorskiej. W przypadku mgr Piotra Brzozy nie można pominąć faktu, że częściowo wyniki uzyskane przez Doktoranta w ramach realizacji pracy doktorskiej zostały już przedstawione w 1 opublikowanej pracy (Antioxidants), w której to Doktorant jest pierwszym autorem. Pozostałe wyniki zostały zamieszczone w pracy recenzowanej w redakcji czasopisma oraz będą zamieszczone w przygotowywanej pracy. W obydwu pracach Doktorant będzie pierwszym autorem. Dodatkowo, Doktorant jest współautorem 6 prac opublikowanych w renomowanych czasopismach (Mol Biol Rep, Front Immunol, Sci Rep, J Invest Dermatol, J Biol Chem), w których zamieszczono wyniki niezwiązane bezpośrednio z zakresem rozprawy doktorskiej. Dlatego też, cały dorobek naukowy Doktoranta oceniam wysoko.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Piotra Brzozy pod względem naukowym spełnia zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. Także pod względem formalnym rozprawa ta spełnia warunki określone w artykule 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 Doktoranta 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, przygotowanie poprzez rozbudowaną analizę globalną dobrych podstaw do dalszych badań, wskazanie kierunku dalszych badań, częściowo już potwierdzonych, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Piotra Brzozy stosowną nagrodą.

Teresa Olach