



**Katedra i Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej
i Parazytologii
Uniwersytet Medyczny
im. Piastów Śląskich we Wrocławiu**
ul. Borowska 211a, 50 - 556 Wrocław
kierownik: prof. dr hab.n.med. Marzenna Bartoszewicz,
prof. nadw.
tel./fax (71) 784 05 10

Wrocław dn. 17.3.2023

Dr hab.n.med. Adam Junka, prof.UMW
KiZ Mikrobiologii Farmaceutycznej i Parazytologii
Pracownia Unikalnych Modeli Aplikacyjnych
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
Recenzent rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Kutuły
Zgodnie z pismem Dyrektora Instytutu Nauk Biologicznych
UMCS w Lublinie z dnia 27.01.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Kutuły pt.: „Biokataliza alkoholi terpenowych do nowych związków aktywnych biologicznie”

Tematyka rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Kutuły wpisuje się w dwa nurty koncepcyjno-metodologiczne jednocześnie, z których jeden określany jest mianem bio-mimetyki, a drugi mianem „re-purposingu”. Bio-mimetyka polega na naśladowaniu i wykorzystywaniu procesów opracowanych przez organizmy żywe do określonych celów, podczas gdy re-purposing opiera się na wykorzystaniu i transformacji już istniejących procesów czy substancji do celów innych niż pierwotne. W swojej pracy doktorskiej Mgr Mateusz Kutuła zastosował obie te koncepcje do stworzenia nowych substancji o aktywności biologicznej wykorzystując grzybnię o aktywności lipolitycznej oraz transformację fotokatalityczną. Mgr Mateusz Kutuła zoptymalizował również wzmiankowane procesy, mając na względzie ich potencjalne zastosowanie aplikacyjne, a także – poniekąd jako efekt uboczny głównego nurtu prac – zaproponował mechanizm fotoutleniania myrtenolu. Jako część wieńczącą pracę doktorską mgr Kutuła przebadał i opisał aktywność przeciwdrobnoustrojową *in vitro* oraz cytotoksyczną (względem komórek glejaka ludzkiego *in vitro*) produktów biotransformacji alkoholi terpenowych.

W mojej opinii zarówno koncepcja pracy, przeprowadzone badania z wykorzystaniem zróżnicowanej metodologii oraz uzyskane wyniki, w pełni spełniają wymogi stawiane pracom doktorskim. Nie ma jednak prac w pełni doskonałych, zawsze natomiast istnieje pole do ulepszenia określonych elementów dzieła oraz nauki. Poniższe uwagi, pytania oraz prośby o odniesienie się mają charakter życzliwy, jednakże proszę o ustosunkowanie się do tych, przy których jest to wprost wskazane. Pozostałe uwagi mają charakter rekomendacji.

STRESZCZENIE I WSTĘP: Struktura pracy doktorskiej mgr Kutyla ma charakter klasyczny i rozpoczyna się 1-stronnicowym streszczeniem. Jest ono czytelne i pozwala wprowadzić czytelnika w zakres i znaczenie wykonanych prac, aczkolwiek pragnę zwrócić uwagę na fakt, że zawarte w streszczeniu określenie „badania antymikrobiologiczne” nie jest prawidłowe, ponieważ oznacza ono – jeśli zapis rozumieć literalnie – „badania skierowane przeciwko nauce mikrobiologii”. Prawidłowa forma to „badania przeciwdrobnoustrojowe”. Pozwalam sobie przytoczyć tę nieścisłość, ponieważ pojawia się ona wielokrotnie w poszczególnych częściach pracy doktorskiej.

Wstęp pracy doktorskiej liczy 33 strony, zawarto w nim adekwatną i w zdecydowanej większości aktualną literaturę naukową oraz dotyczący tematu aktualny stan wiedzy, którego przedstawienie prowadzi do spójnej konkluzji manifestującej się celem pracy. Z obowiązku recenzenta pragnę zaznaczyć, że wstęp jest najsłabszą częścią niniejszej pracy doktorskiej. Istnieje niezwykle wysokie prawdopodobieństwo, że mgr Kutyla w ciągu najbliższych miesięcy zostanie doktorem nauk oraz że w przyszłości będzie nadzorował działania zespołu badawczego, pisał i autoryzował raporty badawcze oraz składał do druku publikacje. Pełne panowanie nad językiem i strukturą wypowiedzi jest umiejętnością konieczną dla przyszłego doktora, nie do końca natomiast zostało ono wykazane we wstępie recenzowanej pracy doktorskiej.

Mając na względzie publikacje, które zostaną stworzone na podstawie pracy doktorskiej, chciałbym zaznaczyć, że w przypadku gdy doktorant używa sformułowania „pomimo licznych badań...” (np. str.12) i pokrewnych, należałoby na końcu zdania umieścić więcej niż jeden odnośnik literaturowy. Zasadne jest również pamiętanie o umieszczaniu odnośników literaturowych na końcu zdań, w których znajdują się takie sformułowania jak np. „...który wykazał..., zostało wykazane” (str.17). W pracach naukowych nie powinno się używać sformułowań nieprecyzyjnie wartościujących (np. „bardzo często”, str.23 – budzi to naturalne pytanie „jak często?”; zasadniej używać w takim przypadku takich określeń jak np. „najczęściej”) czy też: „występują w ogromnych ilościach” (str. 32) – czyli jakie to są

ogromne ilości; „wydłużenie czasu życia kilku pacjentów” (str.42) – czy w publikacji nie napisano dokładnie ilu pacjentów żyło dłużej?, etc.

Tworząc wypowiedzi, powinno się również unikać skrótów myślowych, takich jak „terpenoidy są obecne we wszystkich organizmach żywych” (str.17), „mutanty gatunku owsa”(str.19), „proces opierał się na skonstruowanym mutancie *E.coli*...” (str.22). Zdania tego typu, jakkolwiek intrygujące (szczególnie pierwsze z przytoczonych), budzą konfuzję. Tego typu nieścisłości i skróty myślowe, jakkolwiek mogą wydawać się relatywnie nieistotne, mogą prowadzić do nieścisłości o poważniejszym charakterze. Dlatego pragnę poprosić Doktoranta, aby odpowiedział na pytania:

1. czy można postawić znak równości między fermentacją *de novo* a syntezą *de novo*? (tak wynika z zapisu na stronie 20, podrozdziału 1.2.Biokataliza)
2. dlaczego Doktorant uznał, że „istotne jest, że zaprojektowany szczep był z powodzeniem wykorzystywany w pięciu cyklach biokatalitycznych...”(str.23).
3. Jak należy rozumieć zdanie „Aktywność pinenu opierała się na zapobieganiu wpływowi antybiotyków z komórki bakteryjnej”, (str.32), co jest zastanawiające biorąc pod uwagę mechanizm działania pinenu na ściany komórkowe drobnoustrojów.
4. Dlaczego Doktorant przedstawiając i porównując aktywność biologiczną terpenów i terpenoidów na podstawie prac badawczych innych zespołów (poczynając od strony 32) stosuje wszelkie możliwe jednostki (mg/L, mg/mL, g/mL, μ M a nawet ppm) zamiast je uwspólnić? Proszę sobie wyobrazić płynącą z tej relatywnie prostej czynności korzyść dla czytelnika w przyswojeniu danych literaturowych i dla syntetycznego oglądu aktywności wykazywanej przez różne związki terpenowe.
5. Dlaczego przytaczając dane epidemiologiczne (str.32) dotyczące zapadalności na choroby infekcyjne, doktorant posłużył się raportami z roku 2019, a nie 2022? W okresie 2019-2022 zanotowano istotny przyrost zapadalności na choroby infekcyjne, nie tylko wirusowe, ale i te wywołane przez bakterie wielolekooporne, o których pisze Doktorant.
6. Czy konieczne było dokładne opisywanie fizycznych metod immobilizacji opartych na pułapkowaniu enzymów i późniejszych (str.24) biorąc pod uwagę rodzaj badań przedstawionych w kolejnych częściach pracy doktorskiej.

Inne uwagi:

1. Doktorant na stronie 24-25 manuskryptu wymieniając biopolimery wykorzystywane w immobilizacji enzymów powinien dołączyć do spisu bakteryjną celulozę oraz podać adekwatne odnośniki literaturowe, których brakuje w tej i kolejnej części manuskryptu, gdzie opisuje polimery nieorganiczne.
2. Co to jest linia komórkowa RAW 264,7? (str.34)
3. Lipaza, hemolizyna i stafyloksantyntyna – to są istotne, ale nie główne czynniki wirulencji *S.aureus* (za wyjątkiem hemolizyny), ewentualnie można napisać że są one wchodzące w skład głównych czynników wirulencji (str.43)
4. „Groźne patogeny...wywołujące groźne infekcje” (str.39). To wymaga poprawy.
5. Z pewnością na uwagę i pochwałę zasługuje fakt, że doktorant niejednokrotnie cytuje we wstępie prace swojego promotora.

CEL PRACY:

Następnie, Doktorant przechodzi do celu pracy – z wyróżnieniem celu nadrzędnego oraz wyszczególnieniem 6 jasno, prawidłowo dobranych celów szczegółowych. Nie mam zastrzeżeń.

MATERIAŁY I METODY: Część „Materiały i Metody” zaczynająca się od strony 47 jest klarowna. Nie powinna nastrożyć problemu innym zespołom badawczym mającym na celu odtworzenie eksperymentów przeprowadzonych przez Doktoranta. Chciałbym jedynie, żeby Doktorant ustosunkował się do:

1. podpunktu 3.4.13.5 dotyczącego zastosowania heksanu do przemywania grzybni. Czy i jaki potencjalny wpływ na ściany komórkowe grzyba może mieć zastosowany organiczny związek chemiczny?
2. Podpunktu 3.4.18.1.
 - a) czy tlenek myrtalu dodawano do podłoża (stałego), jak napisał doktorant, czy do pożywki (medium płynnego)?
 - b) W badaniu zastosowano próbę kontrolną (kontrolę wzrostu). Czy zastosowano kontrolę ujemną w celu oszacowania poziomu tła? Czy zastosowano kontrolę użyteczności metody (zastosowanie związku o potwierdzonej aktywności

cytotoksycznej)? Brak danych w materiałach i metodach. Warto zwrócić uwagę również przy pisaniu publikacji.

WYNIKI: Od strony 72 Doktorant przedstawia wyniki badań. Również ta część manuskryptu przedstawiona jest przeważająco klarownie i ściśle koreluje z danymi opisanymi w części Materiały i Metody.

Mam jednak następujące pytania do Doktoranta:

1. Na jakiej podstawie Doktorant uznał, że aktywność psychrofilnego grzyba jest względnie wysoka po 24h inkubacji? Czy Doktorant dysponował zakresem wartości umożliwiającym mu wskazanie, że aktywność jest wysoka czy zdecydował arbitralnie?
2. Rycina 15: skoro „wartości oznaczone literą „a” różnią się istotnie od pozostałych średnich w sposób istotny statystycznie”, to czy naprawdę te różnice np. na wykresie 15A są istotne jedynie dla stężenia Tween 0,7 oraz 0.9 w czwartym dniu hodowli względem wszystkich innych średnich? Poproszę Doktoranta o ustosunkowanie się do tej formy zapisu oraz do tego czy nie byłoby zasadne określenie istotności statystycznej w różnicach w wartościach średnich między rosnącymi stężeniami Tweenu w konkretnym dniu hodowli (czyli np. różnice dla dnia pierwszego przy zastosowaniu rosnących stężeń Tween; różnice dla dnia drugiego, etc.).
3. Jak doktorant zinterpretowałby opisywany spadek masy biokatalizatora na skutek obecności jonów żelaza i wapnia?
4. Str.84: Odnosząc się do wyników uzyskanych przez zastosowanie Skaningowego Mikroskopu Elektronowego Doktorant pisze „Największe usieciowienie strzępek występuje u biokatalizatorów z podłoża OM.....” Stwierdzenie to powtarza również w dyskusji swojej pracy doktorskiej. Byłbym ostrożny w formułowaniu tego typu wniosków na podstawie pojedynczych zdjęć z mikroskopu elektronowego. Założenie jednorodności usieciowania strzępek jest bardzo ryzykowne, biorąc pod uwagę fakt, że pole widzenia w mikroskopie elektronowym, przy zastosowanym powiększeniu, to kilka tysięcy mikrometrów kwadratowych, a sam badany materiał biologiczny jest makro-strukturą. Każdy operator mikroskopu SEM bez trudności znajdzie w tym samym materiale biologicznym pola widzenia, w którym usieciowanie strzępek będzie wysokie, średnie i niskie. W przypadku opisywania wyników z

tego typu analiz jakościowych zachęcam Doktoranta do tworzenia konstrukcji zdaniowych, w których najpierw przedstawi hipotezę, a potem przedstawi zdjęcia SEM na jej poparcie, zastrzegając jednak, że zdjęcia mają charakter przykładowy. Pozwoli to Doktorantowi na uniknięcie potencjalnych dysput z recenzentem publikacji, która zapewne powstanie na podstawie wyników uzyskanych w niniejszej pracy doktorskiej. Jeśli Doktorant pragnąłby określić ilościowo stopień usieciowania strzępek, powinien zebrać obrazy z kilkudziesiąt pól widzenia, a następnie przetworzyć je w programie do procesowania danych graficznych, np. ImageJ. Czy Doktorant mógłby udzielić mi odpowiedzi, dlaczego zdecydował się na stworzenie panelu z 6 zdjęć SEM, który to panel zajmuje zaledwie ok. 1/3 strony? Przy tym poziomie napylenia próbki i przy oglądaniu zdjęć w formie wydrukowanej (w manuskrypcie), zobaczenie strzępek a tym bardziej różnic w ich usieciowaniu staje się bardziej domeną wiary niż zmysłu wzroku.

5. Str 87. Rycina 25: Maksymalną wydajność reakcji uzyskano przy zastosowaniu 3% czy 3.5% w/v katalizatora? Proszę uściślić.
6. Szacunek budzi badanie, które wymagało przechowywania grzybni przez rok. Świadczy to o panowaniu nad czasem pracy i umiejętności dokładnego planowania analiz laboratoryjnych.

Dyskusja:

Od strony 121-ej, Doktorant rozpoczyna dyskusję nad uzyskanymi przez siebie wynikami i stwierdzam z uznaniem, że jest ona napisana w sposób znacznie dojrzały niż wstęp pracy. Doktorant wykazuje się wysoką zdolnością do syntetycznego opisu uzyskanych przez siebie danych, porównania ich z analogicznymi przypadkami opisanymi w literaturze przedmiotu, a następnie wyciągnięcia prawidłowych wniosków płynących z porównania. W przypadku, gdy dla uzyskanych wyników brak jest poparcia w literaturze przedmiotu, wysnuwa prawidłowe wnioski bądź stawia racjonalne hipotezy. Moje szczególne uznanie, jako mikrobiologa, zwrócił fragment, w którym Doktorant dochodzi, analizując wyniki swoich badań nad optymalizacją procesu, do znacznie ogólniejszego i prawidłowego wniosku (str.122) wskazującego na wagę zmienności wewnątrz- i międzygatunkowej drobnoustrojów

przejawiającej się zróżnicowaną odpowiedzią na bodźce i środowisko, w tym wypadku na skład podłoża do efektywnej syntezy enzymów lipolitycznych. Doktorant kończy swą pracę 16 prawidłowymi wnioskami (str.141-142), które podsumowują najważniejsze odkrycia płynące z jego pracy.

Po analizie rozprawy doktorskiej mgr Mateusza Kutyły stwierdzam, że przedmiot ocenianej rozprawy doktorskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a rozprawa prezentuje wysoką wiedzę Doktoranta w dyscyplinie nauki biologiczne oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska pana mgr Mateusza Kutyły spełnia warunki określone w art.187 ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z 20 lipca 2018 (Dz.U.z2018 r.poz.1668z późn.zmianami) i wnoszę o dopuszczenie pana mgr Mateusza Kutyły do dalszych etapów postępowania.

Z Wyrazami Szacunku,

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
z-ca przewodniczącego
Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych
dr hab. Adam Junka, prof. UMW

Dr hab.n.med. Adam Junka, prof. UMW we Wrocławiu