



Katowice, 28 lipca 2023 r.

dr hab. Agnieszka Babczyńska, prof. UŚ
agnieszka.babczynska@us.edu.pl

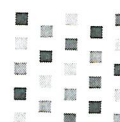
Zespół Biologii Stresu Środowiskowego
Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Bartłomieja Iwańskiego pt. Wybrane mechanizmy odpowiedzi immunologicznej barciaka większego (*Galleria mellonella*) po podaniu egzotoksyny A *Pseudomonas aeruginosa* wykonana pod kierunkiem dr hab. Marioli Andrejko, prof. UMCS w Instytucie Nauk Biologicznych, Wydziału Biologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie.

Przedmiot recenzji

Przedmiotem recenzji jest osiemdziesięciodwustronicowe opracowanie, w skład którego wchodzi: autoreferat, życiorys naukowy, 3 artykuły, w tym jeden przeglądowy, opublikowany w czasopiśmie Kosmos oraz dwa kolejne, przedstawiające wyniki badań naukowych, wydane w czasopiśmie Journal of Invertebrate Pathology. Opracowanie zamykają oświadczenia współautorów artykułów, świadczące o istotnym wkładzie Doktoranta w osiągnięcie przedstawione do recenzji. Na osiągnięcie poddane ocenie składają się następujące artykuły:

1. Iwański, B., Andrejko, M. 2022. Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy w badaniach biomedycznych. Kosmos, 72, 203-213. https://doi.org/10.36921/kos.2022_2878
2. Iwański, B., Andrejko, M. 2022. Host-pathogen interactions: The role of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in modulation of *Galleria mellonella* immune response. Journal of Invertebrate Pathology, 187, 107706, <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107706>
3. Iwański, B., Mizerska-Kowalska, M., Andrejko, M. 2023. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces apoptosis in *Galleria mellonella* hemocytes. Journal of Invertebrate Pathology, 197, 107884. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2023.107884>

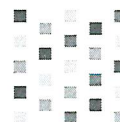




We wszystkich trzech artykułach Doktorant jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym, a jego wiodący udział w powstawaniu poszczególnych manuskryptów, na podstawie oświadczeń współautorów, nie budzi wątpliwości. Łączny IF załączonych manuskryptów wynosi 5,59; łączna punktacja wg MEiN – 280, co w mojej ocenie jest w zupełności wystarczające, aby ubiegać się o stopień doktora. Warto również zwrócić uwagę, iż dwa z tych artykułów doczekały się cytacji poza autocytacjami, co świadczy o zainteresowaniu, jakie wzbudza tematyka podjęta przez Doktoranta, zważywszy, że jeden z artykułów został opublikowany w bieżącym roku. Wszystkie artykuły zostały opublikowane w uznanych czasopismach naukowych, zostały zatem zweryfikowane przez ekspertów z dziedzin, jakich dotyczą badania, czego akceptacja nie podlega dyskusji. Chciałabym jednak, przyjmując rolę recenzenta, odnieść się do niektórych aspektów prac powierzonych mi do recenzji, w odniesieniu do aktualnych wymogów ustawowych oraz uchwały Senatu UMCS, jak również podjąć dyskusję z Doktorantem.

Treść rozprawy doktorskiej

Jak wspomniano wcześniej, na rozprawę doktorską składa się autoreferat oraz 3 publikacje bezpośrednio odnoszące się do jej tytułu i tematyki. Przedstawione do oceny osiągnięcie dotyczy, w ogólnym ujęciu, reakcji układu immunologicznego owada barciaka większego na kontakt z ludzkim patogenem, bakterią *P. aeruginosa* i produktem jej metabolizmu – egzotoksyną A. Temat podjęty przez mgra inż. Bartłomieja Iwańskiego jest znacznie bardziej złożony niż wynikałoby z powyższego, ogólnego sformułowania. Na stopień skomplikowania problemu badawczego składają się bowiem i, w moim odbiorze, wysuwają na pierwszy plan, następujące zagadnienia: (i) wybór barciaka większego jako gatunku modelowego i jego uzasadnienie, (ii) znajomość działania układu immunologicznego owadów, (iii) znalezienie i uzasadnienie analogii między owadzie i ssaczym mechanizmem odpowiedzi immunologicznych uprawniających do zastosowania organizmu modelowego. Kwestia wyboru barciaka większego zasadniczo nie podlega wątpliwości, gdyż jako gatunek modelowy *Galleria mellonella* sprawdza się w bardzo wielu układach eksperymentalnych i wykazuje wiele zalet, które Doktorant wymienia i uzasadnia. Nie sposób się z nimi nie zgodzić. Argumenty znajdują się zarówno w autoreferacie, jak i, znacznie szerzej, w opracowaniu przedstawionym w publikacji P1. Uzasadnienie zastosowania modelu owadziego w kontekście analogii immunologicznych w odporności znalazło się w ogólnych zdaniach w autoreferacie oraz, nieco szerzej, w publikacji P1. Już udowodnienie analogii między różnymi grupami bezkręgowców jest wyzwaniem, które staje się znacznie bardziej skomplikowane, gdy dochodzi do głosu porównanie z kręgowcami. Oceniam to jako ogromne wyzwanie, którego podjął się Doktorant, gdyż jest to zadanie bardzo niewdzięczne, dodatkowo



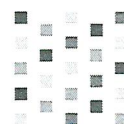
obarczone koniecznością posługiwania się dość szczegółową wiedzą na temat układu immunologicznego owadów. Tę z kolei kwestię dość szczegółowo Kandydat rozwinął w artykule przeglądowym (publikacja P1), analizując przykłady badań z użyciem barciaka w różnych układach eksperymentalnych. W tym miejscu chciałabym dla porządku naukowego zwrócić uwagę na użycie słów „nanocząsteczka srebra” – prawidłowo należałoby napisać „nanocząstka srebra”, zgodnie z definicją słowa cząsteczka i rozróżnienie: cząsteczka (molecule) vs cząstka (particle). Wracając do głównego wątku, należy stwierdzić, że nie ulega wątpliwości, że wiele mechanizmów odpornościowych ma jednak charakter konserwatywny, co w znacznym stopniu ułatwia rozważania na temat powyższych dylematów. Niezaprzeczalnie korzystanie z modeli zwierzęcych na wstępnych etapach badań biomedycznych jest niezbędne, jednak konieczna jest świadomość odmienności przy interpretowaniu wyników, wynikająca chociażby z koewolucji patogenów i gospodarzy, jaka miała miejsce w przykładowym, klasycznym układzie: człowiek - pałeczka ropy błękitnej. Ponieważ jednak Doktorant powołuje się na analogie, uzasadniając w autoreferacie i artykułach zastosowanie owadziego modelu, muszę zadać nurtujące mnie pytanie. Wspomniano, że jedną z zalet barciaka większego jest możliwość hodowania go w temperaturze odpowiadającej warunkom, w jakich optymalnie z punktu widzenia patogenu rozwija się infekcja. Jednak w eksperymentach Zespół nie zdecydował się na poprowadzenie hodowli barciaka w temperaturze 37°C, utrzymując, wg metodyki, temperaturę 30°C. **Chciałabym prosić o wyjaśnienie tej decyzji i odniesienie jej do uzyskanych wyników.**

Niezależnie od sugestii wiążących eksperymenty Doktoranta z medycyną, w przedstawionej do recenzji pracy nie popadł On jednak w pułapkę pokusy dostarczania prostych wniosków o medycznej aplikacyjności, choć części wprowadzające zarówno do autoreferatu i prac eksperymentalnych opublikowanych w artykułach P2 i P3 mogłyby to sugerować. Zamiast tego skupił się na interakcjach gospodarz – patogen (autoreferat oraz publikacja P2) oraz skutkach intoksykacji egzotoksyną na poziomie szlaków śmierci komórkowej hemocytów *Galleria mellonella* (autoreferat oraz publikacja P3). Podejście to nie budzi kontrowersji – przeciwnie, w rozwiązaniu przedstawionych problemów Autor wykazał się szeroką wiedzą teoretyczną, posłużył się wieloma różnorodnymi wskaźnikami immunologicznymi, uwzględniającymi przede wszystkim zjawiska obrony humoralnej. Godne uwagi jest w tej kwestii podejście uwzględniające badania wstępne śmiertelności owadów, pozwalające ustalić immunostymulującą subletalną dawkę toksyny. Wśród markerów odporności w eksperymentach zastosowano aktywność układu oksydazy fenolowej, aktywność przeciwbakteryjną hemolimfy, ocenę poziomu białek/peptydów przeciwdrobnoustrojowych, z kolei jako skutek intoksykacji w ocenie toksyczności egzotoksyny A zastosowano ocenę ilościową i jakościową śmierci komórkowej hemocytów. W mojej ocenie takie podejście daje bardzo kompleksowy ogólny obraz. Wyniki badań wspomnianych wyżej parametrów zostały opublikowane w renomowanym czasopiśmie *Journal of Invertebrate Pathology*.



Niezależnie od zewnętrznych recenzentów, którzy pozytywnie zaopiniowali artykuły, z recenzenckiego obowiązku, a także naukowej ciekawości chciałabym zagłębić się w ich treść i zainicjować dyskusję z Doktorantem. W odniesieniu do publikacji P2 chciałabym upewnić się co do własnego zrozumienia wyników i ich interpretacji. Mianowicie na rysunku 1C i 1D oraz 2A w publikacji P2 pojawia się In traktowana jako grupa kontrolna, iniekowana wodą apirogenną. Z nią następnie porównywane są kolejne grupy eksperymentalne zróżnicowane pod względem czasu, jaki upłynął od chwili iniekcji. Jednak w mojej ocenie nie jest to w pełni adekwatna kontrola, gdyż każdemu pomiarowi w grupie eksperymentalnej w kolejnych punktach czasowych powinien odpowiadać pomiar w odpowiadających im punktach czasowych wykonany z użyciem osobników z grupy kontrolnej. Innymi słowy, kontrola bez egzotoksyny A powinna być prowadzona równolegle z grupą eksperymentalną iniekowaną egzotoksyną A ze względu na to, że niezależnie od zakładanej nieszkodliwości roztworu kontrolnego skutki manipulacji mogą odzwierciedlać się w zmianach parametrów odpornościowych. **W tym miejscu proszę Doktoranta o komentarz w tej sprawie.** Zakładam przy tym, że igły użyte do iniekcji kontrolnych były sterylne. W przypadku publikacji P3 tego typu niepewności nie ma. Publikacja trzecia dostarcza kolejnych interesujących wyników na temat działania egzotoksyny A pośrednio na układ odpornościowy *Galleria mellonella*, a bezpośrednio na stan ilościowy i jakościowy hemocytów. Odnośnie tej publikacji również chciałabym zadać Doktorantowi kilka pytań. Pierwsze z nich dotyczy badania całkowitej liczby hemocytów w hemolimfie larw intoksykowanych i kontrolnych. Chciałabym się upewnić, czy zastosowana metoda pozwalała na zliczenie wszystkich hemocytów zarówno martwych i żywych, czy też tylko żywych. Jeżeli wszystkich, a rozróżnienie na żywe i martwe umożliwiła kolejna analiza cytometrii przepływowej, to **w jaki sposób można wyjaśnić zniknięcie z pola widzenia (w komorze Bürkera) większości hemocytów?** Niezależnie od spostrzeżeń i powyższych pytań, stwierdzić należy, że opublikowane prace przedstawione do recenzji są przemyślane, spójne i wzajemnie się uzupełniają.

Dodatkowo w autoreferacie znalazły się dane dotychczas nieopublikowane, powiązane z publikacją P2 tematyką apolipoforyny III w hemocytach i ciele tłuszczowym, oraz dane dotyczące stężenia białka całkowitego i egzotoksyny A w tkankach. Badania te znacząco uzupełniają wcześniej omówione wyniki. Prosiłabym jednak o wyjaśnienie zjawiska, które w moim oglądzie pojawia się w wynikach: zakładając, że źródłem apolipoforyny III w hemolimfie jest jej uwalnianie z hemocytów i ciała tłuszczowego, w jaki sposób można wytłumaczyć stosunkowo wysoki (choć, owszem, niższy niż w grupie kontrolnej) poziom izoformy 2 jeśli, zgodnie z załączonym wykresem, hemocyty mają nieporównywalnie niższy potencjał w uzupełnianiu jej poziomu? **Czy Doktorant ma pomysł na wyjaśnienie zapasu apoLp-III w hemolimfie?**

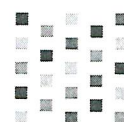




Na koniec rozważań na temat treści merytorycznej przedstawionych materiałów chciałabym zatoczyć pętlę, wracając do analogii owady – ssaki. Czy pomimo skupienia się już na samym gatunku modelowym oraz wnioskowaniu stricte w obrębie uzyskanych wyników, Pan Bartłomiej Iwański byłby skłonny, w ramach dyskusji, pokusić się o krótką **opinię, czy i w jakim stopniu uzyskane wyniki można by zaoferować medycynie. Czy wyborowi badanych parametrów przyświecała możliwość przeprowadzenia takich analogii?**

Podsumowując analizę treści pracy doktorskiej przedstawionej do recenzji stwierdzam, iż rozprawa doktorska w jednoznaczny sposób dokumentuje i dowodzi ogólnej wiedzy teoretycznej kandydata w dyscyplinie, zgodnie z wymogami obowiązującej ustawy oraz Regulaminem przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora w Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Jak wspomniałam we wstępnej części recenzji, Pan mgr inż. Bartłomiej Iwański posiadał gruntowne rozeznanie, które pozwoliło mu sformułować przesłanki, zaplanować eksperymenty, przeprowadzić pomiary, prawidłowo je zanalizować, przedyskutować i sformułować wnioski. W przedłożonym materiale Doktorant formułuje 7 wniosków łączących wszystkie przytoczone badania, zarówno opublikowane, jak i nieopublikowane. Należy przy tym podkreślić, że wnioski te są stonowane i adekwatnie odnoszą się do uzyskanych wyników, bez nadinterpretacji. Są spójne i treściwe.

Nie ulega również wątpliwości, że przedmiotem rozprawy doktorskiej jest **oryginalne rozwiązanie problemu naukowego**, polegającego na określeniu skutków intoksykacji gąsienic barciaka większego jedną z egzotoksyn bakterii patogennych dla człowieka, stanowiących ważny problem medyczny. Doktorant przeanalizował toksyczność egzotoksyny A na poziomie wybranych parametrów układu immunologicznego gąsienic barciaka. Problem badawczy został sformułowany w autoreferacie w rozdziale 2. „Hipoteza i cel badań” (choć w autoreferacie zabrakło jednak hipotezy badawczej, zapowiedzianej tytułem rozdziału). Treść zarówno autoreferatu, jak i opublikowanych artykułów odpowiada podjętym założeniom w sposób dokumentujący i dowodzący, że podjęto metodologicznie prawidłową próbę rozwiązania problemu badawczego, uzyskane wyniki poddano adekwatnej analizie statystycznej i czytelnie wyrażono graficznie. Następnie, jak wspomniałam wyżej, w sposób nie budzący zastrzeżeń przeprowadzono wnioskowanie. Odnosząc się do kolejnego kryterium zawartego w wymogach stawianych rozprawom doktorskim stwierdzam, że na podstawie treści materiałów można przyjąć, że Kandydat, mgr inż. Bartłomiej Iwański, posiadał umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.





Forma rozprawy doktorskiej

Stwierdzam, że zgodnie z wymogami ustawowymi oraz Regulaminem przeprowadzania postępowań w sprawie nadania stopnia doktora w Uniwersytecie Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie, rozprawę stanowi zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych opatrzonych autoreferatem oraz streszczeniem w języku angielskim. Materiał jest kompletny, uporządkowany, czytelny. Pozytywnie zwraca uwagę język autoreferatu: jest to dojrzały, elegancki język naukowy. Autor precyzyjnie wyraża swoje myśli, bez nadmiaru słów, w sposób skondensowany, ale przy tym jednoznaczny. Doktorant w logicznej kolejności wprowadza kolejne treści. Z punktu widzenia czytelnika – recenzenta doceniam, że pojawiające się wątpliwości, odnotowane jako warte wyjaśnienia, w zdecydowanej większości przypadków znajdowały je w dalszych zdaniach tekstu.

Forma rozprawy doktorskiej z formalnego punktu widzenia nie budzi zastrzeżeń.

Wniosek końcowy

Praca doktorska mgr inż. Bartłomieja Iwańskiego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Doktorant, w mojej ocenie, wykazał się dużym zaangażowaniem w realizację projektu doktorskiego, szeroką wiedzą wynikającą z czytania oraz umiejętnością zadawania nowych pytań na podstawie zdobywanego doświadczenia i odpowiedzi uzyskiwanych z wcześniej rozwiązywanych zagadnień. Ponadto posiadał umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam zatem, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia wymogi określone w art. 187 ust. 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. 2022 poz. 574 ze zm.). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Bartłomieja Iwańskiego do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Agnieszka Fabaryńska

