

Dr. hab. Elżbieta Czarniewska, prof. UAM
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii
Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt

Poznań, 23 sierpnia 2023 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr. Bartłomieja Iwańskiego

pt. „Wybrane mechanizmy odpowiedzi immunologicznej barciaka większego (*Galleria mellonella*) po podaniu egzotoksyny *A Pseudomonas aeruginosa*”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr. Bartłomieja Iwańskiego została wykonana pod kierunkiem dr hab. Marioli Andrejko, prof. UMCS w Instytucie Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. W skład rozprawy wchodzi zbiór trzech opublikowanych i powiązanych z sobą tematycznie artykułów wraz z dołączonym do nich autoreferatem przypominającym w formie rozprawę doktorską w postaci monografii wraz z streszczeniem osiągnięcia naukowego w języku polskim i angielskim. Artykuły są efektem badań przeprowadzonych przez Doktoranta i na ich podstawie Doktorant wskazuje w autoreferacie osiągnięcie naukowe będące podstawą rozprawy doktorskiej. W załączonych publikacjach mgr Bartłomiej Iwański jest pierwszym autorem i ma wiodący wkład w ich powstanie. Ten wkład jednoznacznie wynika z dołączonych do rozprawy oświadczeń Doktoranta i współautorów o ich udziale w powstanie tych artykułów.

Pierwsza z publikacji cyklu pt. „Barciak większy (*Galleria mellonella*) jako organizm modelowy w badaniach biomedycznych”, której autorami są Bartłomiej Iwański i Mariola Andrejko, jest publikacją o charakterze przeglądowym i została opublikowana w języku polskim w czasopiśmie naukowym Kosmos (20 pkt. MEiN). Doktorant w tej publikacji syntetycznie charakteryzuje zalety modelu owadziego, jakim jest barciak większy, *Galleria mellonella*. *G. mellonella* jest popularnym modelem w badaniach immunologicznych (np. badania interakcji patogen-gospodarz, identyfikacja i badanie mechanizmów działania czynników wirulencji wytwarzanych przez drobnoustroje), farmakologicznych (ocena skuteczności leków przeciwdrobnoustrojowych), czy też w badaniach biotechnologicznych. Doktorant wskazuje, że przyczyną zainteresowania tym owadziego modelem jest istnienie licznych komórkowych i molekularnych podobieństw w funkcjonowaniu wrodzonej odpowiedzi immunologicznej u owadów i ssaków, co sprawia, że *G. mellonella* jest modelem alternatywnym w stosunku do innych modeli zwierzęcych, których wykorzystanie w badaniach naukowych jest regulowane przepisami prawa krajowego i międzynarodowego. W tej pracy Doktorant charakteryzuje organizację układu odpornościowego owadów i dokonuje syntezy tego, co dzieje się w hemolimfie i ciele tłuszczowym owada po wniknięciu drobnoustrojów przez barierę anatomiczno-fizjologiczną do wnętrza owada (np. mechanizm identyfikacji wzorców molekularnych patogenów, indukcja komórkowej i humoralnej odpowiedzi komórkowej przez mikroorganizmy, indukowana patogenami synteza peptydów o

aktywności przeciwdrobnoustrojowej w ciele tłuszczowym i hemocytach). Następnie Autor podaje przykłady wykorzystania gąsienic *G. mellonella* w badaniach interakcji patogen-gospodarz ze szczególnym uwzględnieniem najgroźniejszych dla człowieka patogenów, takich jak: gronkowiec złocisty *Staphylococcus aureus*, pałeczka ropy błękitnej *Pseudomonas aeruginosa* i drożdżak *Candida albicans* oraz podaje przykłady na wykorzystanie tego modelu w badaniach nad poszukiwaniem nowych antybiotyków, chemioterapeutyków oraz opracowywania alternatywnych dla antybiotyków, pionierskich metod leczenia zakażeń. Ta publikacja wskazuje na dobre merytorycznie przygotowanie Doktoranta do realizacji zaplanowanych badań, zawiera opis zagadnień związanych z celem i częścią doświadczalną pracy, przedstawioną następnie w dwóch oryginalnych publikacjach, które zostały opublikowane w prestiżowym, specjalistycznym czasopiśmie naukowym *Journal of Invertebrate Pathology* (IF2,795; 140 pkt. MEiN). W tych artykułach Doktorant opisał wpływ najważniejszej chorobotwórczej toksyny wydzielanej przez pałeczki ropy błękitnej, egzotoksyny A, na odporność *G. mellonella*. Uprzednio inni autorzy wykazali u *Drosophila melanogaster* i *Bombyx mori*, że egzotoksyna A jest dla nich toksyczna. Z kolei badania prowadzone wcześniej przez promotora Doktoranta, Panią prof. Mariolę Andrejko wykazały, że po zakażeniu *G. mellonella* *P. aeruginosa* dochodzi do degradacji proteolitycznej peptydów odpornościowych i apolipoforyny III, natomiast lizozym był niewrażliwy na enzymy proteolityczne. Pani promotor poznała również inne subtelne zmiany u barciaka pod wpływem tej bakterii, ale dopiero oryginalne artykuły wchodzące w skład tej rozprawy doktorskiej dostarczają nowych, bardziej szczegółowych danych odnośnie działania egzotoksyny A na odporność *G. mellonella*.

W drugim artykule cyklu pt. "Host-pathogen interactions: the role of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in modulation of *Galleria mellonella* immune response", których autorami są Bartłomiej Iwański i Mariola Andrejko, Doktorant przedstawił nowe dowody na immunoinhibicyjne działanie egzotoksyny A u barciaka. W hemolimfie gąsienic, ten czynnik wirulencji iniekowany w subletalnych dawkach znacząco obniżał aktywność oksydazy polifenolowej w czasie od 4-15 godz. po immunizacji i lizozymu w czasie od 8-15 godz. od immunizacji oraz poziom apolipoforyny III, czyli hamował odporność humoralną owada związaną z aktywnością immunologiczną hemocytów. Z kolei w badaniach elektroforetycznych, Doktorant nie wykrył w ekstraktach hemolimfy immunizowanych egzotoksyną A prążków wskazujących na indukcję tą toksyną syntezy niskocząsteczkowych peptydów antybakteryjnych w ciele tłuszczowym gąsienic. Nie wykrył również aktywności peptydów antybakteryjnych w hemolimfie gąsienic immunizowanych egzotoksyną A za pomocą testu mikrobiologicznego. Otrzymane przez Doktoranta wyniki sugerują, że prawdopodobnie egzotoksyna A jest czynnikiem wirulencji bardziej aktywnym w hemocytach niż w ciele tłuszczowym owada.

Logiczne rozwinięcie tych badań Doktorant przedstawił w trzeciej pracy cyklu stanowiącego rozprawę doktorską pt. „*Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A induces apoptosis in *Galleria mellonella* hemocytes”, której autorami są Bartłomiej Iwański, Magdalena Mizerska-Kowalska i Mariola Andrejko, w której przedstawił dowody na upośledzenie komórkowej odpowiedzi immunologicznej u gąsienic immunizowanych subletalną dawką egzotoksyny A.

Doktorant wykonał serię uzupełniających się doświadczeń, za pomocą których wykazał, że u gąsienic immunizowanych (1) znacząco zmniejszyła się liczba hemocytów krążących w hemolimfie, (2) wyjaśnił, że zmiany te miały charakter jakościowy – Doktorant zaobserwował spadek całkowitej liczby plazmatocytów o 70% i granulocytów o 50% w stosunku do kontroli (3) i udowodnił, że były one spowodowane indukcją apoptozy i autofagii w eksponowanych na egzotoksynę A hemocytach. Doktorant udowodnił, że ta toksyna bakteryjna jest czynnikiem wirulencji ukierunkowanym na obniżenie odporności owada m.in. poprzez zmniejszenie liczby komórek krwi biorących udział w reakcjach odpornościowych. Jest to bardzo wartościowy wynik, który w mojej ocenie w przyszłości może mieć przełożenie na praktyczne zastosowanie tych badań.

Uwagi:

W związku z faktem opublikowania rozprawy doktorskiej w recenzowanych, dobrych czasopiśmie naukowych nie widzę potrzeby krytyki ocenionych wcześniej przez kompetentnych recenzentów badań. Co do autoreferatu w formie przypominającej monografię przygotowanego przez Doktoranta, to moim zdaniem w przypadku rozprawy złożonej z artykułów naukowych wystarczyłoby, aby Doktorant w autoreferacie skoncentrował się na jasnym sformułowaniu osiągnięcia naukowego – nie ma tu potrzeby np. opisu metod badawczych, przecież są one dostępne dla recenzenta w publikacjach wchodzących w skład rozprawy. W autoreferacie brakuje również jasno sformułowanej w jednym miejscu autoreferatu hipotezy badawczej, jest ona „ukryta” w różnych fragmentach autoreferatu. Sygnalizuję w tym miejscu to „niedociągnięcie”, nie ma ono jednak wpływu na moją ocenę, ponieważ oceniam osiągnięcie naukowe Doktoranta, które jest bezspeczne.

Po zapoznaniu się z treścią rozprawy chciałabym poprosić Doktoranta o odpowiedź na pytania, które nasunęły mi się podczas jej czytania:

1. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych przez Doktoranta mogą sugerować, że egzotoksyna A jest czynnikiem wirulencji bardziej aktywnym w hemocytach niż w ciele tłuszczowym owada. Czy taki tok rozumowania jest prawidłowy? Proszę o odpowiedź z pogłębionym merytorycznie wyjaśnieniem.
2. Proszę o wyjaśnienie dlaczego najpierw obserwuje się w eksponowanych na egzotoksynę hemocytach nekrozę, a później apoptozę?
3. Z wykresów całkowitej liczby krążących w hemolimfie (Fig. 1 i Fig. 2) i z obrazów otrzymanych w mikroskopie konfokalnym (Fig. 4 -druga praca badawcza) wynika, że subletalna dawka egzotoksyny A (20 ng toksyny na owada) wywiera bardzo silny efekt hemocytotoksyczny, wraz z upływem czasu wywołuje apoptozę prawie wszystkich hemocytów, co prawdopodobnie jest m. in. przyczyną obniżonej przeżywalności immunizowanych gąsienic (Fig. 1 A,B – pierwsza praca badawcza). Czy Doktorant wykonał dodatkowe analizy żywotności hemocytów eksponowanych na egzotoksynę w tej dawce u larw po dłuższym czasie ekspozycji niż 24 godziny? Interesuje mnie, czy mogła się pojawić w hemolimfie nowa pula prawidłowych hemocytów krążących w hemolimfie, co mogłoby pośrednio świadczyć o zachowaniu czynności narządów krwiotwórczych? Może warto obniżyć dawkę egzotoksyny i długookresowo

obserwować co się dzieje z pulą hemocytów krążących w hemolimfie, aby sprawdzić czy egzotoksyna zaburza hemopoezę? Ciekawa jestem opinii Doktoranta w tej sprawie.

4. Jakie immunokompetentne komórki człowieka są odpowiednikiem funkcjonalnym plazmatocytów i granulocytów owada? Z tym pytaniem związane jest kolejne pytanie adresowane do Doktoranta:
5. Jakie praktyczne znaczenie w zapobieganiu zakażeniom pałeczką ropy błękitnej chorych lub terapii zakażonych chorych może mieć wykrycie nowej aktywności egzotoksyny A w stosunku do hemocytów owadów (indukcja apoptozy i autofagii w tych komórkach)?
6. Jakie nowe perspektywy badawcze wynikają z tych badań?

Podsumowując moją recenzję, Doktorant rozprawy wykazał się umiejętnością rozwiązywania problemów badawczych, dobrze wykorzystał wiele różnorodnych metod badawczych (metody biochemiczne, immunologicznych, mikroskopowe, mikrobiologiczne) w celu realizacji postawionych w pracy zadań badawczych oraz wykazał się znajomością literatury przedmiotu. Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej są oryginalnym rozwiązaniem problemu badawczego, mają dużą wartość poznawczą odnośnie mechanizmów złożonych interakcji owad-patogen, otwierają nowe perspektywy badawcze i mają aplikacyjny potencjał. Realizacja badań, przedstawienie wyników doświadczeń i prawidłowo przeprowadzona dyskusja wyników w rozprawie w formie cyklu spójnych tematycznie publikacji świadczą o dobrym przygotowaniu Doktoranta do pracy naukowej.

Na tej podstawie stwierdzam, że **rozprawa doktorska Pana mgr. Bartłomieja Iwańczuka w pełni spełnia wymogi określone w art. 13 ust. 1 ustawy z 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki** (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789). Wnoszę zatem o dopuszczenie Doktoranta przez Wysoką Radę Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Poznań, 30.08.2023 r. E. Charniewska