

Kraków, 5 lutego 2024 r.



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pana mgr Michała Sułka pt. „**Przebieg infekcji i modulacja humoralnych mechanizmów odpornościowych *Galleria mellonella* po zakażeniu bakteriami *Pseudomonas entomophila*. Identyfikacja nowych związków przeciwbakteryjnych**”.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Michała Sułka, przygotowana pod kierunkiem promotora, profesora Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie Pani dr hab. Iwony Wojdy, podejmuje tematykę interakcji zachodzących między gospodarzem zakażenia a patogenem – mechanizmów zachodzących podczas wzajemnych oddziaływań między owadami a bakteriami, co dzięki zastosowaniu w realizacji zaawansowanych metod badawczych molekularnych biochemicznych i genetycznych przyczynia się do pozyskania interesujących wyników. Dotyczy to przede wszystkim poznania cech odpornościowych owadów i cech zjadliwości patogenów, jak i poznania nowych właściwości układu odpornościowego, co więcej, badania rokuja poznanie nowych związków bioaktywnych i odkrycie nowych bioinsektycydów. Jakkolwiek wszechobecność drobnoustrojów w biosferze, kolonizacja różnych nisz ekologicznych i zasiedlających je organizmów wyższych są zjawiskami ekologicznymi dobrze poznanymi przez biologów, to jednak w ostatnich dwóch dekadach szczególną uwagę przywiązuje się do nowych chorób infekcyjnych wyższych zwierząt a szczególnie człowieka, chorób pochodzących od zwierząt – antropozoonoz a w równej mierze do przenoszenia patogenów ze środowiska na wyższe organizmy zwierzęce.

*Odpowiedzią na wynikające z tego wyzwania jest dysertacja Pana mgr Michała Sułka, który stosując metody badań in vivo oraz zaawansowane techniki molekularne in vitro analizował wybrane aspekty odpornościowej odpowiedzi humoralnej gąsienicy o nazwie barciak większy *Galleria mellonella* na zakażenie bakteriami gatunku *Pseudomonas entomophila*.*

Rozprawa doktorska Pana mgr biotechnologii Michała Sułka została przygotowana w Katedrze Immunobiologii Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu im. Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie pod kierunkiem naukowym Pani dr hab. Iwony Wojdy, profesora UMCS. Zespół kierowany przez Panią prof. B. Wojdę wyróżnia się ugruntowaną wysoką pozycją naukową dzięki bardzo dobrym publikacjom z dziedziny immunobiologii i immunochemii, co zdaniem recenzenta jest ważne w tego typu projektach i w kształceniu młodych kadr badawczych.

Prof. dr hab. farm.

Jacek Międzobrodzki

Mikrobiolog,

Diagnosta laboratoryjny,

Specjalista zdrowia publicznego

Zakład Mikrobiologii

Wydział

Biochemii,

Biofizyki i Biotechnologii

PL 30-387 Kraków

ul. Gronostajowa 7

tel. +48(12) 664 63 71

tel. +48(12) 664 63 83

fax. +48(12) 664 69 02

jacek.miedzobrodzki@uj.edu.pl

Publikacje tego zespołu są rzetelnie opracowywane i ogłaszane w wysoko punktowanych periodykach, indeksowanych w międzynarodowych bazach danych, jak Scientific Reports, Developmental and Comparative Immunology, Invertebrate Survival Journal, Journal of Invertebrate Pathology i in., a także w rodzimych periodykach o wzrastającym wskaźniku impact factor – Acta Biochimica Polonica, Postępy Biochemii i in.

Rozprawa doktorska mgr M. Sułka została przygotowana w formie dysertacji napisanej w języku polskim, zgodnie z kanonem przyjętym na uniwersytetach. Praca ma logiczny układ i czyta się ją ze zrozumieniem poszczególnych wątków badawczych. Składa się z konwencjonalnych części; wyjątkami są: na początku, przed rozdziałem „Spis treści” informacje o: i) finansowaniu badań ze środków Narodowego Centrum Nauki (beneficjenci promotor dr hab. Iwona Wojda i dr Jakub Kordaczuk, Instytut Nauk Biologicznych UMCS); ii) dane bibliograficzne publikacji, z której część wyników przedstawiono w dysertacji, oraz iii) źródło uzyskania drobnoustrojów do badań, oraz na końcu rozprawy „Aneks” – naukowe *curriculum vitae* autora dysertacji. Wydzielenie z treści tych części porządkuje rozprawę wyróżniającą się dużą objętością liczącą 223 strony. Całość obejmuje kolejno następujące części: „Spis treści” (4 strony), „Wykaz skrótów” (4 strony), „Streszczenie i słowa kluczowe” w językach polskim i angielskim (łącznie 4 strony), „Wstęp” (54 strony), sformułowanie celów w rozdziale 2 „Cele pracy” (1 strona), „Materiały i metody” (22 strony), „Analiza wyników” (59 stron), „Dyskusja” (27 stron), „Podsumowanie i wnioski” (4 strony, w tym autorskie ryciny na 2 stronach), „Literatura” (287 pozycji na 31 stronach) „Spis rycin” (43 na 4 stronach), „Spis tabel” (9 na 1 stronie), ostatni rozdział to „Aneks” zawierający drogę edukacyjną doktoranta, aktywność naukową (uczestnictwo w 3 grantach, w tym w dwóch w charakterze współwnioskodawcy i wykonawcy, a w jednym jako kierownik), spis publikacji (6 oryginalnych, z czego w 2-ch jako pierwszy autor, w innych 3 jako drugi); kursy i staże naukowe (2 w wiodących ośrodkach krajowych i 1 w zagranicznym); ostatnia część – „Udział w konferencjach naukowych od momentu rozpoczęcia kształcenia w Szkole Doktorskiej” (8 prezentacji w językach polskim i angielskim, 1 wystąpienie wyróżnione).

Pierwszy rozdział „Wstęp” jest merytorycznie bardzo dobrym wprowadzeniem do dalszych części rozprawy. Przedstawiona problematyka naukowa ma charakter wielodyscyplinarny, bardzo złożony; uwagę zwraca rzetelne opracowanie wymagające wiedzy z kilku dyscyplin – entomologii, anatomii i fizjologii owada barciaka większego ze szczególnym uwzględnieniem immunologii, biochemii i genetyki, także ekologii i mikrobiologii środowiskowej. Zdaniem recenzenta część ta kwalifikuje się do publikacji w charakterze artykułu przeglądowego, po odpowiednich modyfikacjach, natomiast z powodu dużej objętości nadmiernie podnosi objętość całości dysertacji. Pewne podrozdziały, jak dotyczące historii poglądów nt. ewolucji, przedstawianie różnych hipotez, ekologii, porównywania z innymi gatunkami i in. dowodzą dużej wiedzy Autora ale nie były konieczne w tak rozbudowanej formie (albo w ogóle) dla oceny sprawnie zrealizowanego projektu badawczego. Uwagę czytelnika zwraca znakomite przygotowanie Autora przedstawiającego ze znanstwem i interesująco wiedzę na poziomach morfologicznym, komórkowym i molekularnym, na tematy odpowiedzi immunologicznej, biochemicznych mechanizmów reakcji obronnych, odpowiedzi humoralnej i komórkowej, ze szczególnymi opisami kaskad sygnałowych i szlaków regulujących syntezę peptydów odpornościowych aktywowanych przez bakterie i wirusy w czasie zakażeń, czego efektem jest synteza przez owady białek o charakterze odpornościowym, częściowo zidentyfikowanych, ale też niezidentyfikowanych. Autor stawia tezę, że badany przez niego owad, barciak większy jest cyt. „doskonałym źródłem peptydów

i białek o charakterze odpornościowym”. Stąd wywodzi się koncepcja doktoranta prowadzenia badań w kierunku określonym w tytule dysertacji. Rozdział ten znakomicie integruje obszary badawcze przedstawione w kolejnych etapach złożonego projektu.

Cele pracy sformułowane w kolejnym rozdziale są racjonalne, logiczne i nie budzą wątpliwości pod względem przesłanek. Są oryginalnym i wartościowym wkładem do nauki. Objęły one: i) ocenę przebiegu zakażenia gąsienic gatunku *Galleria mellonella* bakteriami gatunku *Pseudomonas entomophila*; ii) analizę wybranych humoralnych parametrów odpornościowych gąsienic; iii) identyfikację efektorów humoralnych odpowiedzi obronnej gospodarza po pojedynczym i powtórnych zakażeniach bakteriami; iv) poszukiwanie i określenie nowych związków aktywnych biologicznie. Nadrzędnymi celami było poznanie mechanizmu zakażenia i obrony immunologicznej oraz analiza właściwości wybranych peptydów, pochodzących i oczyszczonych z hemolimfy larw gatunku *Galleria mellonella* ze szczególnym uwzględnieniem ich aktywności przeciwbakteryjnej.

W kolejnym rozdziale „Materiały i metody” przedstawione zostały: materiał biologiczny - cel zakażeń, gąsienice z gatunku barciak większy i drobnoustroje gatunku *Pseudomonas entomophila*, podłoża hodowlane dla organizmów i odczynniki, aparatura i metody badawcze, opisane właściwie, aby czytelnik mógł ocenić prawidłowość eksperymentów i wypracować własny pogląd na temat wartości naukowej przedstawionych wyników. Jednak szczegółowa lektura tego rozdziału zwraca uwagę na nieprecyzyjny opis części dotyczącej iniekcji gąsienic zawiesinami drobnoustrojów; autor podaje, że użył bakterie z czterech gatunków, trzy stężenia zawiesin komórek *Pseudomonas entomophila*, dwa stężenia *Bacillus thuringiensis*, dwa stężenia komórek grzybów drożdżopodobnych gatunku *Candida albicans* i jedno stężenie *Pseudomonas aeruginosa*, natomiast brakuje informacji o liczebności gąsienic w poszczególnych grupach poddanych iniekcjom. W czasie obrony doktoratu recenzent będzie oczekiwał informacji, czy autor liczył obumarłe gąsienice? Czy obliczał wartości LD₅₀, współczynnik regresji, czy inny parametr, oprócz zastosowanych zaawansowanych metod statystycznych? W części mikrobiologicznej proszę też wyjaśnić, co autor rozumie pod pojęciem cyt. „odświeżanie hodowli bakteryjnej” i jaki jest tego cel? Co autor planował uzyskać po inkubacji zawiesiny bakteryjnej w świeżym podłożu w czasie 20 minut? Przygotowanie eubakterii na etapach hodowli jest bardzo ważne biorąc pod uwagę obecność powierzchniowych biosensorów w odniesieniu do transdukcji sygnałów do systemów regulacji genetycznej genów kodujących białka powierzchniowe i sekrecyjne ważne na różnych etapach zakażenia i w różnych fazach rozwoju pojedynczej komórki bakteryjnej.

Badania zostały rozłożone na kilka etapów w sposób logiczny, po czym konsekwentnie je realizowano. Uznanie wzbudza odważna decyzja zastosowania zwierzęcego modelu zakażenia. Reasumując, warsztat badawczy do rozwiązywania postawionych zadań został wybrany prawidłowo.

Kolejny rozdział nr 4 pt. „Analiza wyników” liczący 59 stron (nie jest najdłuższy lecz drugi po „Wstępie” liczącym 69 stron) zawiera obfitość oryginalnych wyników, sprawnie zaprezentowanych w kilku podrozdziałach ilustrowanych 25 rycinami i 3 tabelami. Do najważniejszych osiągnięć mgr M. Sułka należą: i) poznanie mechanizmów obronnych gąsienic *Galleria mellonella* zakażonych bakteriami gatunku *Pseudomonas entomophila* – wzrostu ekspresji genów kodujących odpornościowe peptydy i białka; ii) opisanie aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy związanej z obecnością tych peptydów; iii) zidentyfikowanie

kilku peptydów i odkrycie nieznanymi białek o właściwościach przeciwbakteryjnych; iv) zbadanie właściwości nowo odkrytych składników hemolimfy; v) opisanie podniesionej przeżywalności owadów zakażonych bakteriami powtórnie w porównaniu z owadami zakażonymi po raz pierwszy oraz rozpoznanie cech, z którymi to zjawisko jest powiązane; vi) otwarcie nowych obszarów badawczych proteomicznych związanych z immunomodulacją układu obronnego owadów gatunku *Galleria mellonella* i czynników wirulencji bakterii gatunku *Pseudomonas entomophila*.

Recenzent stwierdza, że są to poważne osiągnięcia naukowe mające dodatkowe wartości wynikające z uzyskanych osiągnięć badawczych, jak wskazanie kierunków badań w celu poznania mechanizmów obronnych u owadów na poziomie molekularnym a także perspektyw aplikacyjnych w rozumieniu wprowadzenia nowych środków (a może też leków) przeciwbakteryjnych, co ma szczególnie bardzo ważne znaczenie obecnie, w czasie największej pandemii w historii, tj. zjawiska nabywania lekooporności wśród chorobotwórczych drobnoustrojów i wynikającej z tego potrzeby poszukiwania nowych leków przeciwbakteryjnych i przeciwwgrzybiczych.

Biorąc pod uwagę dużo uzyskanych przez Doktoranta wyników o wysokiej wartości poznawczej, kolejny rozdział „Dyskusja” wymagał szczególnej dyscypliny i logiki. Doktorant wywiązał się sprawnie z tego wyzwania komentując krytycznie swoje osiągnięcia odnosząc się do wiedzy i wyników innych autorów. Trafną decyzją Autora było wprowadzenie podrozdziałów z tytułami w tym rozdziale liczącym 27 stron, co ułatwia czytanie i zrozumienie złożonych zjawisk jakimi są mechanizmy immunobiologiczne i immunochemiczne na poziomach molekularnych – chemicznym i genetycznym. W zakończeniu dyskusji Autor napisał na str. 178 o stosowaniu, cyt. „w nowoczesnej biomedycynie regeneracyjnej peptydów jako związków wspomagających gojenie i ochronę ran przed drobnoustrojami chorobotwórczymi”, wymienia też kilka cech, np. właściwości inhibitorów wobec proteaz serynowych. Pytanie: czy peptydy i białka przeznaczone do stosowania są bezpieczne? Czy mogą stanowić ryzyko dla pacjenta? Czy muszą spełniać określone wymagania?

*Kolejny rozdział pt. „Podsumowanie i wnioski” zawiera sformułowane w zwięzłej formie w 8 punktach konkluzje wynikające z osiągniętych wyników. Cenną wartość stanowią dwie autorskie ryciny (Ryc. 42 i Ryc. 43) pokazujące reakcje obronne w owadach *Galleria mellonella*, podsumowujące reakcje humoralne gąsienic po iniekcjach dawkami bakterii. Rozdział ten pokazuje zdolność Autora do budowania syntezy jak i dowodzi dojrzałości naukowej, co więcej zdolności widzenia perspektywicznego zachodzących zjawisk.*

Kolejne rozdziały to „Literatura”, obejmujący 287 pozycji na 31 stronach. Jest to dowód bardzo dobrego przygotowania Doktoranta do przeprowadzonych badań, chociaż zdaniem recenzenta niektóre rozbudowane wątki dysertacji były niepotrzebnie poparte wysoką liczbą odniesień literaturowych; jak również niektórzy autorzy mieli cytowanych swoich 8, 7 lub 6 publikacji.

Ostatnie rozdziały to „Spis rycin”, „Spis tabel” zawartych w dysertacji i „Aneks – naukowe curriculum vitae” Autora, zaprezentowane zwięźle i wyraźnie. Życiorys Autora pokazuje poszczególne fazy ambitnego rozwoju naukowego.

Strona edytorska i językowa. Oceniana praca została przygotowana starannie. Generalnie tekst jest napisany przejrzystym językiem, zdania są pełne i zrównoważone,

natomiast niektóre fragmenty są nadmiernie rozbudowane językowo; zauważa się emocjonalne stosowanie zwrotów językowych przynależnych do form popularyzatorskich, np. „broń wunderwaffe”, str. 161 „inwestycja nieopłacalna”, str. 166 „zwarne preparaty”, str. 167 „skrojona na miarę odpowiedź immunologiczna”, str. 172 „zużycie peptydów do neutralizacji patogenu”, str. 172 „faworyzowanie mRNA”, str. 178 „inwestowanie w białko” i „immunologicznie opłacalne”. Załączone ryciny są pokazane w atrakcyjnych formach przyciągających uwagę. Czytanie pracy budzi zainteresowanie czytelnika. Obok tych uwag recenzent przedstawia dodatkowe spostrzeżenia. Zauważony błąd merytoryczny na str. 63, malaria to nie choroba wirusowa, jej czynnikiem etiologicznym są pierwotniaki, jednokomórkowe zwierzęta *Plasmodium* spp. Z racji obowiązku recenzent znajduje i przytacza szereg uchybień: i) zjawiska policzalne nie określa się słowami „ilość” lecz „liczba”, i nie „mała” czy „duża” lecz „niska”, „wysoka”; poziom nie „zwiększony” lecz „podniesiony”, itp.; ii) stosowanie żargonów: „bakteria” w odniesieniu do gatunku drobnoustrojów w języku polskim to błąd, w języku angielskim to liczba mnoga, w języku polskim powinno być „bakterie” lub „gatunek”, nie „zastrzyk” lecz „iniekcja”; iii) nie zaczyna się zdania ani od skrótu ani od nazwy łacińskiej (w wielu miejscach); iv) powinna być forma bezosobowa a nie osobowa (w wielu miejscach „Dyskusji”; v) strona emocjonalna nie jest akceptowana, str. 98, 122, 142, 158; vi) zamiast „zdjęcie” - „fotografia”, str. 17, 18. Stwierdzono też liczne błędy interpunkcyjne: brak znajomości zasad stosowania przecinków, angielski cudzysłów, kropki po rzymskich liczebnikach, kursywy w nazwach łacińskich. *W podsumowaniu opisu tej części dysertacji recenzent stwierdza, że wykazane uchybienia i usterki natury redakcyjnej nie wpływają na wartość merytoryczną dysertacji, ani na całościową wysoką ocenę recenzenta.*

Podsumowanie. Biorąc pod uwagę przedstawiony w dysertacji oryginalny dorobek naukowy Pana mgr Michała Sułka recenzent stwierdza, że jest to dorobek solidny, wynikający z bardzo dobrej koncepcji i uzyskany właściwie dobranymi metodami badawczymi, zarówno klasycznymi zweryfikowanymi w praktyce badawczej jak i metodami zaawansowanymi molekularnymi, biochemicznymi i genetycznymi, które są nowością naukową i pozwoliły uzyskać bardzo dobre wyniki; co więcej wyznacza nowe kierunki badań i aplikacji. Spostrzeżenia te jednoznacznie wskazują na wysokie kwalifikacje Doktoranta. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana i zredagowana zgodnie z przyjętym kanonem uniwersyteckim i spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2023 poz. 742).

Niniejszym recenzent wnosi do wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Biologicznych Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie Pana mgr Michała Sułka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, 5 lutego 2024 r.

