



Łódź, 15.08.2024

Prof. dr hab. Maciej Cedzyński,
Instytut Biologii Medycznej PAN,
Pracownia Immunobiologii Zakażeń,
ul. Lodowa 106
93-232 Łódź
e-mail: mcedzynski@cbm.pan.pl

Ocena rozprawy doktorskiej Mgr Mateusza Maksymiliana Urbaniaka

pt. „Proregeneracyjne, przeciwdrobnoustrojowe i immunomodulujące właściwości piomelaniny *Pseudomonas aeruginosa*”.

Szybki wzrost populacji ludzkiej i jednoczesne starzenie się niektórych społeczeństw, liczne migracje, wojny domowe i konflikty międzynarodowe, zmiany klimatyczne, narastająca lekooporność patogenów należą do czynników stwarzających konieczność poszukiwania substancji bioaktywnych, niezbędnych w leczeniu chorób zakaźnych, nowotworowych, z autoimmunizacji, cywilizacyjnych, urazów czy umożliwiających poprawę jakości życia osób dotkniętych chorobami genetycznymi.

Takie aktywne biologicznie związki, zarówno naturalne, pochodzenia roślinnego lub drobnoustrojowego, jak i syntetyczne, są przedmiotami badań prowadzonych w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej Uniwersytetu Łódzkiego, przez Zespół kierowany przez Prof. Magdalenę Mikołajczyk-Chmielę. Wyniki dotyczące istotnego fragmentu tych badań zostały przedstawione i omówione w ocenianej rozprawie doktorskiej Mgr Mateusza M. Urbaniaka, zatytułowanej „Proregeneracyjne, przeciwdrobnoustrojowe i immunomodulujące właściwości piomelaniny *Pseudomonas aeruginosa*”.

Rozprawa obejmuje opis źródeł finansowania, wykaz publikacji będących jej podstawą, wykazy pozostałych publikacji i zgłoszeń patentowych, których współautorem jest Mgr Mateusz M. Urbaniak, projektów badawczych, w których realizacji uczestniczył Doktorant, wykaz staży naukowych oraz rozdziały charakterystyczne dla rozpraw doktorskich w formie pisemnej: Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wykaz stosowanych skrótów, Wprowadzenie, Założenia i cele pracy, Materiały i metody, Publikacje wchodzące w skład rozprawy wraz z ich podsumowaniem, Dyskusja, Wnioski szczegółowe i wniosek końcowy, Literatura, a także Oświadczenia Współautorów o udziale w publikacjach, które wymagane są jeśli rozprawa stanowi wyodrębnioną część pracy zbiorowej. Przedstawiona rozprawa ma charakter mieszany – Doktorant przedstawił dane opublikowane (dwa artykuły oryginalne i jeden przeglądowy), jak i niepublikowane, w postaci manuskryptu wysłanego do redakcji *International Journal of Biological Macromolecules*, który w czasie złożenia rozprawy podlegał recenzji.

Doktorant jest pierwszym autorem obu opublikowanych prac oryginalnych i manuskryptu oraz autorem korespondującym jednej z publikacji i wspomnianego artykułu podlegającego recenzji. Jego



wiodącą rolę w opracowaniu koncepcji badań, ich przeprowadzeniu, analizie i interpretacji wyników oraz opracowaniu publikacji/manuskryptu potwierdzają również zamieszczone w nich informacje „Author contributions” oraz stosowne oświadczenia Współautorów. Ponadto, Pan mgr Mateusz M. Urbaniak wniósł istotny wkład w powstanie pracy przeglądowej, będącej integralną częścią rozprawy. Łączny współczynnik oddziaływania załączonych publikacji wynosi 17 (według danych dostępnych w chwili złożenia rozprawy, zaktualizowanych później), a punktacja MNiSW – 420. Należy zauważyć, że Doktorant jest też pierwszym autorem dwóch zgłoszeń patentowych, których opracowanie było możliwe dzięki badaniom będącym przedmiotem pracy doktorskiej. Rozprawa nie zawiera jednak informacji czy Mgr Mateusz M. Urbaniak prezentował wyniki tych badań na konferencjach naukowych, dlatego proszę o jej udzielenie.

Lista pozostałych publikacji obejmuje 7 pozycji o zbiorczym IF >43,5 i punktacji wynoszącej 1280. Doktorant, jako kierownik lub wykonawca uczestniczył w realizacji 6 projektów badawczych i odbył 4 krótkoterminowe staże naukowe. Opisane osiągnięcia świadczą o bardzo wysokiej aktywności naukowej, umiejętności współpracy, dbałości o własność intelektualną i skuteczności w pozyskiwaniu funduszy na badania.

Rozdział „Wprowadzenie” obejmuje rzeczowy opis zagadnień, którymi Doktorant zajmował się w pracach doświadczalnych, których wyniki są podstawą rozprawy – charakterystykę *Pseudomonas aeruginosa*, z naciskiem na jego potencjalnie użyteczne metabolity, zwłaszcza piomelaninę, opis *Helicobacter pylori*, bakterii będącej nie tylko czynnikiem etiologicznym zapalenia żołądka i dwunastnicy, wrzodów tych narządów, lecz także karcynogenem oraz omówienie biologii tkanki kostnej z podkreśleniem wagi badań służących opracowaniu terapii wspomagających regenerację kości. W rozdziale tym znajduje się kilka błędnych lub nieprecyzyjnych sformułowań, przede wszystkim związanych z nazewnictwem chemicznym. Przykładem jest określenie „zardzewiała miedź” (str. 27). Rdzewieniem nazywany jest proces korozji żelaza i jego stopów. Na str. 38 (oraz w wykazie skrótów) pojawia się nazwa „kwas 4-hydroksyfenylopirogrońianowy” – o ile nazwa jonu/soli „4-hydroksyfenylopirogrońian” jest prawidłowa, nazwa kwasu jest błędna. Proszę Doktoranta o wyjaśnienie zapisów „grupa COO-” (str. 40) i „jony H⁺ i Cl⁻ zakwaszają przedział resorpcyjny” (str. 53). Chciałbym też zapytać, czy wszystkie ryciny (poza ryc. 3) zamieszczone w rozdziale „Wprowadzenie” są oryginalnymi dziełami Autora rozprawy, czy też pochodzą z innych, wymagających cytowania, źródeł (źródło wskazano tylko w przypadku ryc. 3).

Założenia i cele pracy są prawidłowo sformułowane i nie budzą wątpliwości dotyczących planu badań. Rozdział „Materiały i metody” napisany jest bardzo skrótowo – w przypadku metod jest to raczej lista niż opis, należy jednak zauważyć, że stosowane procedury zostały szczegółowo opisane w publikacjach oryginalnych i manuskrypcie, w związku z czym nie uznaję takiego sposobu prezentacji za uchybienie. Doktorant nie wymienił jednak hodowli *Helicobacter pylori* i *Staphylococcus aureus* (optymalizacja warunków wzrostu *Pseudomonas aeruginosa* jest ważnym fragmentem części doświadczalnej oraz przedmiotem zgłoszenia patentowego i jako taka nie musi być wspomniana w spisie metod).

Kolejne części rozprawy Mgr Mateusza M. Urbaniaka stanowią publikacje, opis danych niepublikowanych w postaci manuskryptu oraz podsumowanie tych opracowań w języku polskim.



Artykuły oryginalne PI i PII, opublikowane w *Int. J. Mol. Sci.* związane są z realizacją pierwszych dwóch celów. Niezwykle ważnym osiągnięciem było opracowanie i scharakteryzowanie warsztatu służącego badaniom własnym, który może być wykorzystany także w dalszych pracach, w kierunku praktycznego zastosowania piomelaniny, prowadzonych w Katedrze Immunologii i Biologii Infekcyjnej. Otrzymywane w sposób powtarzalny produkty okazały się termostabilne, bezpieczne dla komórek eukariotycznych i larw owadów, a także wykazują potencjał terapeutyczny w zakażeniach *H. pylori* – zarówno przez właściwości bakteriobójcze, jak i przeciwdziałające skutkom działania czynników patogenności oraz właściwości proregeneracyjne. Lektura publikacji PI i PII nasuwa pytanie natury technicznej. W opisie metod zaznaczono, że hodowle *Pseudomonas aeruginosa* były ekspozowane na światło słoneczne (2 dni lub 48 godzin), w temperaturze pokojowej. Jeżeli to możliwe przed uzyskaniem ochrony patentowej, proszę Doktoranta o kilka dodatkowych informacji: czy hodowle były wstrząsane w takich samych warunkach jak podczas wzrostu w temperaturze 37°C i czy ekspozycja była, przynajmniej częściowo, standaryzowana. Jeżeli wykorzystano światło słoneczne (a nie np. imitującą lampę), to czy trwała ona 48 godzin z przerwami na noc czy krócej, uwzględniając cykl dzień/noc, pory roku czy pogodę. Znaczenie może mieć też szkło nieprzepuszczające promieniowania w pewnym zakresie długości fali.

Jak zaznaczyli Autorzy w publikacji PII, mechanizm przeciwbakteryjnego działania piocyjanin nie jest znany – chciałbym w związku z tym zapytać czy prowadzone lub planowane są badania mające na celu wyjaśnienie tego zjawiska.

Manuskrypt artykułu oryginalnego oznaczony PIII oraz publikacja PIV (mimo, że ma ona charakter pracy przeglądowej, a więc nie dokumentuje własnych wyników Autorów) związane są z realizacją celów 3 i 4. Badania opisane we wspomnianym manuskrypcie wykazały bakteriobójczą aktywność piomelanin w stosunku do innego patogenu – *Staphylococcus aureus*, co istotne także w przypadku klinicznego szczepu MRSA. Preparaty te (a w szczególności forma rozpuszczalna) charakteryzowały się dobrą cytozgodnością dla osteoblastów, nasilały różnicowanie komórek i zarastanie rany w teście gojenia rany. Stosując hodowle długoterminowe, wykazano ich wpływ na namnażanie komórek, syntezę osteokalcyny, stężenie niektórych cytokin oraz aktywność fosfatazy alkalicznej. Tak więc, Doktorant i Współautorzy udowodnili aktywność osteoindukcyjną piomelanin i potwierdzili ich potencjalne działanie proregeneracyjne, dla innej niż opisano w artykule PII tkanki. Publikacja PIV, to obszerny i wnikliwy przegląd dotyczący czynników bioaktywnych, które mogą być wykorzystywane w leczeniu ubytków tkanki kostnej, wraz z analizą możliwości zastosowań, wyzwań i ograniczeń związanych z tą tematyką badań.

Artykuły wchodzące w skład rozprawy, wraz częścią niepublikowaną, tworzą spójną całość, a przedstawione w nich dane potwierdzają, że cele pracy zostały w pełni zrealizowane.

W niezbyt obszernym ale rzeczowym rozdziale „Dyskusja”, Pan mgr Mateusz M. Urbaniak podkreślił najważniejsze osiągnięcia swojej pracy, skonfrontował je z danymi literaturowymi i zwrócił uwagę na dalsze wyzwania i potencjalne kierunki badań. Jak słusznie zauważył, konieczne jest np. zbadanie *in vitro* i *in vivo*, czy zastosowanie wybranych piomelanin jako czynników przeciwdrobnoustrojowych nie indukuje zbyt nasilonej reakcji zapalnej. Mogłoby to prowadzić do poważnych powikłań, mimo eliminacji patogenów i zniwelować np. efekt proregeneracyjny w stosunku do tkanek gospodarza. Omawiany rozdział świadczy o znajomości piśmiennictwa i umiejętności interpretacji danych doświadczalnych. Jak wynika z włączonych do rozprawy artykułów



i manuskryptu, zazwyczaj forma rozpuszczalna piomelaniny wykazuje wyższą aktywność w porównaniu z formą nierozpuszczalną w wodzie, jednak niekiedy obserwowano odwrotną zależność (np. niższe wartości MIC₅₀ i MIC₉₉ w stosunku do *H. pylori* dla PyoM_{insol} czy silniejsza stymulacja wydzielania TNF α przez osteoblasty). Proszę Doktoranta o próbę wyjaśnienia przyczyn tych różnic. Chciałbym także zapytać o przyczyny nazwania nieopublikowanego manuskryptu publikacją (PIII). Forma mieszana rozprawy nie jest sprzeczna z ustawą Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 20 lipca 2018 roku z późniejszymi zmianami, ani zaleceniami Rady Doskonałości Naukowej i jako taka nie stanowi przeszkody w postępowaniu o nadanie stopnia doktora. Praca została przygotowana bardzo starannie, a nieliczne błędy, przede wszystkim natury edytorskiej, niewymienione w recenzji i niewpływające na jakość rozprawy, zostaną wskazane Doktorantowi.

Wniosek końcowy przedstawiony w rozprawie jest słuszny, natomiast wnioski szczegółowe stanowią raczej wykaz najważniejszych wyników. Wykaz literatury obejmuje 230 pozycji, zarówno z ostatnich lat, jak i nieco starszych, jednak istotnych dla treści ocenianej rozprawy.

Rozprawa doktorska Mgr Mateusza M. Urbaniaka, zatytułowana „**Proregeneracyjne, przeciwdrobnoustrojowe i immunomodulujące właściwości piomelaniny *Pseudomonas aeruginosa***” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej i jako wyodrębniona część pracy zbiorowej spełnia warunki określone w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 20 lipca 2018 roku z późniejszymi zmianami. W związku z tym, zwracam się do Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pana Mateusza M. Urbaniaka do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z uwagi na wartość naukową pracy, potwierdzoną trzema publikacjami znajdującymi się na liście JCR o wysokiej punktacji MNiSW, jej potencjałem aplikacyjnym, wykazanym dodatkowo przez dwa krajowe zgłoszenia patentowe, wnioskuję także o wyróżnienie ocenianej rozprawy. Mgr Mateusz M. Urbaniak jest pierwszym autorem obu opublikowanych artykułów oryginalnych i autorem korespondującym jednego z nich. Jak wspomniałem wyżej, bardzo istotnym osiągnięciem było opracowanie i scharakteryzowanie cennego warsztatu badawczego, który może stanowić impuls dalszego rozwoju macierzystej Katedry Doktoranta.

Prof. dr hab. Maciej Cedzyński