GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
www.gumed.edu.pl

Uczelnie Fahrenheita
www.FarU.edu.pl

Gdańsk, 3 grudnia 2025.

Dr hab. n. med. Beata Szostakowska, prof. GUMed
Zakład Parazytologii Tropikalnej
Katedra Medycyny Tropikalnej i Parazytologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

RECENZJA

Osiągnięcia naukowego mgr Iwony Polak pt. Transkryptom *Anisakis simplex* źródłem informacji o molekularnych podstawach przeżycia nicienia w organizmie żywiciela

Recenzowana praca dotyczy multi-omicznych analiz wpływu glukozy na *Anisakis simplex* w dwóch etapach rozwoju larwalnego tego pasożyta.

Anisakis simplex (Nematoda: Anisakidae) jest pasożytniczym nicieniem organizmów morskich o złożonym cyklu życiowym, obejmującym bezkręgowce, ryby i głowonogi (żywiciele pośredni lub parateniczni) oraz ssaki morskie będące naturalnymi żywicielami ostatecznymi. *A. simplex* sensu lato to kompleks 3 gatunków tzw. bliźniaczych, tj. nieodróżnialnych na podstawie cech morfologicznych, które rozprzestrzenione są w wodach morskich różnych części globu. Człowiek może ulec zarażeniu wskutek konsumpcji surowych lub nie poddanych wystarczającej obróbce cieplnej ryb morskich, stając się tym samym żywicielem przypadkowym. Choroba wywołana przez *A. simplex* to anisakioza, będąca szczególnym przypadkiem anisakidozy, którym to terminem definiuje się zarażenie także innymi gatunkami nicieniami z rodziny Anisakidae (np. *Pseudoterranova decipiens*). Pierwsze udokumentowane przypadki anisakidozy (a konkretnie anisakiozy) dotyczą pacjentów z Europy, ale globalnie, najwięcej przypadków choroby pochodzi z krajów azjatyckich, głównie Japonii, a także Korei, gdyż w tamtych rejonach spożywa się najwięcej potraw z surowych ryb. W ostatnich latach szacuje się, że w Europie i krajach azjatyckich liczba nowych przypadków inwazji tymi nicieniami może być porównywalna, co wynika z zmian w zwyczajach kulinarnych w krajach

europejskich i dotyczy zwłaszcza Hiszpanii i Włoch. Od czasu gdy izolowane od pacjentów larwy *Anisakis simplex* s.l. zaczęto identyfikować metodami molekularnymi, stwierdzano u pacjentów *A. simplex* sensu stricto oraz *A. pegreffii*.

Celem badawczym jakiego podjęła się Doktorantka było wykrycie różnic i podobieństw profili transkryptomów *Anisakis simplex* w stadiach rozwojowych L3 i L4 w obecności glukozy na poziomie całego organizmu (tego zagadnienia dotyczy praca pierwsza) oraz określenie ekspresji genów związanych z transportem sacharydów u tych larw, w odpowiedzi na obecność glukozy w środowisku (tematyka pracy drugiej).
Tematyka podjętych przez Doktorantkę analiz jest bardzo ważna, gdyż wnosi wkład w poznanie mało dotąd znanych mechanizmów warunkujących zdolności kolejnych stadiów larwalnych *A. simplex* do przetrwania w organizmie żywicieli.

Recenzowana dysertacja składa się z cyklu dwóch spójnych tematycznie artykułów opublikowanych w 2025 roku w recenzowanych czasopismach naukowych. Współczynnik oddziaływania IF obu prac łącznie wynosi 9.0, a liczba punktów MEiN wynosi 240. Doktorantka jest pierwszą autorką obu prac oraz współautorką korespondencyjną jednej z nich. Oba artykuły są wieloautorskie ((7 i 6 autorów), jednak wszyscy współautorzy uznali wiodący, wynoszący 60%, udział Doktorantki w ich powstaniu.

Struktura rozprawy jest prawidłowa, zawiera wszystkie wymagane elementy i przedstawia się następująco:

- Streszczenie w języku polskim i angielskim
- Wstęp, w którym znajdują się podstawowe informacje na temat pasożyta będącego obiektem badań, aktualnego stanu wiedzy o sposobach pozyskiwania energii do rozwoju przez larwy tych nicieni i innych helmintów, a także informacje na temat anisakiozy obejmujące dane epidemiologiczne i kliniczne oraz stosowane współcześnie metody molekularne w badaniach *A. simplex* i pokrewnych nicieni, z bardzo obszernym omówieniem najnowocześniejszych technik.
- Zwięźle przedstawione hipotezy, cele i zadania badawcze
- Rozdziały, w których zaprezentowane są metodyka i wyniki uzyskane w obu pracach oraz podsumowanie.

- Bibliografia (obejmująca 116 pozycji)

W rozdziałach Wstęp, Metodyka i Podsumowanie umieszczone są autorskie, pomysłowe ryciny stworzone przy pomocy internetowego programu graficznego BioRender.

Powyższa część dysertacji, wraz ze spisem rycin, mieści się na 57 stronach, a dalej znajdują się kopie publikacji składających się na rozprawę oraz oświadczenia wszystkich współautorów obu prac o wkładzie w ich powstanie.

W pierwszej pracy Doktorantka analizowała transkryptomy larw L3 *A. simplex* obecne po 24 godzinach hodowli *in vitro* w obecności glukozy, wobec kontroli bez obecności glukozy. Następnie przeprowadziła analogicznie doświadczenie z wyhodowanymi *in vitro* larwami L4. Transkryptomy i -proteomy otrzymane u larw L3 i L4 poddała analizom porównawczym i stwierdziła istotne różnice w profilach pomiędzy stadiami L3 i L4 *A. simplex*, przy czym wykazała, że stadium rozwoju wywiera istotniejszy wpływ na profil ekspresji genów i białek niż ekspozycja na glukozę. Analizując jednocześnie transkryptomy i proteomy wykazała, że połączenie tych analiz może być pomocne w wyjaśnianiu złożonych procesów biologicznych.

W drugiej pracy, aby określić ekspresję genów związanych z transportem sacharydów u larw L3 i L4 A. simplex, Doktorantka dokonała analiz *in silico* i zidentyfikowała geny biorące udział w procesie transportu glukozy, a następnie przeprowadziła analizy ekspresji tych genów u larw L3 i L4 w warunkach hodowli *in vitro*. Wykonała także biochemiczne oznaczenie ilości glukozy, trehalozy i glikogenu oraz zmierzyła aktywność trehalazy. Badania wykazały, że poziom ekspresji genów biorących udział w transporcie glukozy jest wyższy u larw w stadium rozwoju 4 niż u larw L3 i były one długo reaktywne nawet przy niskim stężeniu tego cukru. Zaobserwowane różnice transkryptomowe i biochemiczne między larwami L3 i L4 sugerują zmianę mechanizmów wychwytu glukozy – z absorpcji przezskórnej u larw L3 na wychwyt glukozy jelitowej u larw L4 po aktywacji jelit.

Doktorantka osiągnęła założone cele. Przeprowadziła wiele, bardzo dogłębnych i szczegółowych analiz z wykorzystaniem najnowszych możliwości i narzędzi badawczych, co świadczy o Jej doskonałym przygotowaniu do pracy naukowej w najnowocześniejszych laboratoriach molekularnych i plasuje rezultaty badań w czołówce światowej. Przyczyniają się one do lepszego poznania i zrozumienia mechanizmów sterujących

procesami metabolicznymi tych pasożytów w różnych stadiach rozwojowych, decydującymi o ich przeżyciu w żywicielu, oraz mogącymi mieć wpływ na ich patogeniczność. Co więcej, zaobserwowane mechanizmy mogą występować także u innych, bardziej niebezpiecznych nicieni pasożytujących u człowieka, co być może wskaże drogę badań nad nowymi lekami do zwalczania tych helmintów.

Należy podkreślić, że prace wymagały znajomości najnowszych technik, nie tylko tych stosowanych w nowoczesnych laboratoriach molekularnych ale i nowoczesnych programów komputerowych, co sprawia, że przedstawioną do oceny dysertację oceniam bardzo wysoko.

Moje uwagi dotyczą następujących zagadnień:

We Wstępie Doktorantka podaje informacje na temat rozprzestrzenienia geograficznego i cyklu życiowego *A. simplex* i wywoływanej przez tego nicienia zoonozie, zarówno w aspekcie objawów jak i epidemiologii, zacytowała jednak niewłaściwe piśmiennictwo na temat występowania *A. simplex* w Bałtyku: Rokicki i wsp. (2009) nie wykryli tego nicienia w badanych rybach, a Skrzypczak i wsp. (2014) co prawda wykryli go u fok, ale jedynie w 0.8% badanych ssaków, co jest znikoma wartością. Są publikacje dostarczające znacznie więcej danych na ten temat. Szkoda też, że podając dane na temat anisakiozy w świecie nie wspomniała o pierwszym i jedynym jak dotąd wykrytym przypadku anisakiozy w Polsce, opisanym w roku 2020. Był on ciekawy także z tego powodu, iż objawy utrzymywały się znacznie dłużej niż podane przez Nią, najczęściej opisywane kilka – kilkanaście dni, a mianowicie kilka tygodni.

W Rozdziale Metody molekularne (str. 14-15), opisując metody stosowane w badaniach parazytologicznych Doktorantka wymienia jako dwie niezależne: „metody molekularne" (mając na myśli pewnie konwencjonalny PCR i proste analizy uzyskanych produktów np. analizę długości fragmentów restrykcyjnych i ich sekwencjonowanie, czy odmianę PCR jaką jest nested PCR) oraz „metody nowej generacji, w tym sekwencjonowanie wysokoprzepustowe", podczas gdy te drugie to również, aczkolwiek nowsze, techniki molekularne.

Zawarte w tym rozdziale obszerne opisy najnowocześniejszych technik molekularnych, w tym sekwencjonowania wysokprzepustowego oraz technik stosowanych w badaniach ekspresji genów uważam za bardzo cenne i podziwiam ogromną wiedzę Doktorantki, zarówno

teoretyczną jak i praktyczną na temat tych jakże trudnych zagadnień. Opis podstawowych technik molekularnych jest natomiast bardzo krótki, co można zrozumieć, gdyż Doktorantka w swojej pracy ich nie stosowała lub stosowała w bardzo ograniczonym stopniu.

Jednak pragnę zwrócić uwagę, że starsze metody, uważane być może przez młodą osobę posługującą się najnowszymi technikami za bardzo już nieaktualne, są wciąż niezastąpione w wielu badaniach, a ponadto są zwykle punktem wyjścia do opracowywania kolejnych, nowocześniejszych metod, więc ich zrozumienie jest niezbędne do tego, by dysponować solidną bazą do dalszego rozwoju naukowego (dotyczy to zresztą każdej dziedziny nauki).

Tymczasem, zauważyłam w tym krótkim opisie pewne nieścisłości, które poniżej prostuję:

- rejony ITS1 i ITS2 nie są genami lecz fragmentami niekodującymi (**I**nternal **T**ranscribed **S**pacers) w jądrowym DNA, które znajdują się między genami kodującymi małą i dużą podjednostkę rybosomalnego RNA, często analizowanymi ze względu na stosunkowo duże zróżnicowanie pomiędzy gatunkami bliźniaczymi, podczas gdy geny kodujące podjednostki rybosomalne są bardziej zakonserwowane.

-technika real-time PCR i RT-PCR to dwie odmienne techniki wykorzystywane w różnych celach. Ponadto, sam real-time PCR nie jest techniką ilościową, a jest nią qPCR będący szczególną odmianą real-time PCR.

Ponadto, nie mogę zgodzić się ze stwierdzeniem: „RT-PCR /myślę, że Doktorantka ma tu na myśli real-time PCR?/ to system amplifikacji zamknięty, szybki, zautomatyzowany i prosty w obsłudze, co znacznie zmniejsza ryzyko kontaminacji w porównaniu do konwencjonalnego PCR." Każdy z systemów można zautomatyzować zmniejszając tym samym możliwość kontaminacji, ale w podstawowym schemacie, próbki do analizy przy pomocy PCR i real-time PCR przygotowuje się w podobny sposób. Zaletą drugiej metody jest szybszy odczyt wyniku amplifikacji, gdyż nie jest wymagana wizualizacja wyniku na żelu agarozowym (co zajmuje dodatkowy czas), a drugą, niezaprzeczalną zaletą real time PCR jest to, że jest to metoda czulsza (z czym wiąże się też niestety zwiększone ryzyko kontaminacji).

Zauważone niewłaściwe sformułowania:

-sformułowanie „Typy królestw" (str. 13) jest niepoprawne, gdyż „typ" (ang. Phylum) to, podobnie jak „królestwo" kategoria taksonomiczna.

-pasożyty „inwadują" a nie „infekują", w związku z tym należy pisać „inwazje", a nie „infekcje" pasożytnicze.

-termin „Infestacja" dotyczy inwazji pasożytami zewnętrznymi, więc pisząc o pasożytach wewnętrznych należy używać terminu „inwazja" a nie „infestacja".
-nazwy genów wybieranych do identyfikacji bliźniaczych gatunków i analiz struktury taksonomicznej w obrębie Anisakidae są nieprawidłowe (str. 14). Co oznacza nazwa genu „mitochondrialny cytochrom b (mtDNA*cytb*)? zapewne chodzi o gen **kodujący** mitochondrialny cytochrom b. Sformułowania „gen kodujący mitochondrialny cytochrom oksydazę 2 oraz mitochondrialny cytochrom oksydazę 1" są nieprawidłowe.
-po zdaniu „RT-PCR umożliwia monitorowanie amplifikacji w czasie rzeczywistym" znajduje się niezrozumiałe zdanie: „Zachowano w niej swoistość i czułość klasycznej metody, a dodatkowo umożliwiono szacowane intensywności zarażenia i żywotności pasożytów" (drugi akapit str. 15). Abstrahując od tego, że Doktorantka odnosi się do real-time PCR, a nie RT-PCR, zdanie to jest niezrozumiała. Jest to prawdopodobnie daleko idący skrót myślowy, dotyczący połączenia technik RT-PCR i real-time PCR, który jednak wymaga wyjaśnienia.

Powyższe niefortunne sformułowania dotyczące nazewnictwa stosowanego w biologii wynikają prawdopodobnie z tego, iż doktorantka specjalizuje się w bardzo wąskiej dziedzinie biotechnologicznej i jest absolwentką biotechnologii, a nie biologii. Błędne nazwy genów to prawdopodobnie pomyłki wynikające z niesprawdzenia ostatecznej wersji tekstu przed wydrukowaniem, ale wymaga sprostowania. Uwagi te nie mają żadnego wpływu na pozytywną ocenę dysertacji, a wymieniam je jedynie z obowiązku recenzenta.

Mam do Doktorantki jedno pytanie, które dotyczy biologii *Anisakis simplex*. Podając informacje o zasięgu występowania *A. simplex* i możliwym z tego powodu narażeniu konsumentów ryb bałtyckich napisała Pani, że w Bałtyku nicień ten pojawia się sezonowo, w zarażonych nim śledziach migrujących z cieśnin duńskich na tarło, które odbywają w wodach przybrzeżnych. Ostatnie kilkuletnie badania przeprowadzone przez polskich naukowców pokazują także inne możliwości i proszę o podanie tych dodatkowych, stosunkowo nowych informacji na temat możliwości zamknięcia cyklu życiowego *A. simplex* w Bałtyku.

Wniosek końcowy.

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Iwony Polak stanowi cenny wkład w poznanie aspektów metabolizmu glukozy w dwóch stadiach larwalnych pasożytniczego nicienia *Anisakis simplex*. Cele i zadania badawcze zostały dobrze

sformułowane i konsekwentnie zrealizowane. Doktorantka w pełni udowodniła znajomość najnowocześniejszych narzędzi i technik badawczych. W związku z tym z przyjemnością stwierdzam, że recenzowana **rozprawa doktorska Pani mgr inż. Iwony Polak spełnia warunki określone** w art. 187 **Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity Dz. U. z 2024 poz. 1571, ze zm.)**. Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o dopuszczenie Pani mgr inż. Iwony Polak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem,

dr hab. Beata Szostakowska, prof. GUMed