

Kraków, 15 lipca 2017

Prof. dr hab. Barbara Płytycz
Emerytowany profesor zwyczajny Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ
Czynny profesor zwyczajny Małopolskiej Wyższej Szkoły im. J. Dietla
barbara.plytycz@uj.edu.pl

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PANI MGR PAULINY TASZŁOW
„Modulacja humoralnej odpowiedzi immunologicznej barciaka
większego (*Galleria mellonella*) w przebiegu zakażenia bakteriami
Bacillus thuringiensis”**

Ochronę przed czynnikami patogennymi zapewnić człowiekowi i innym kręgowcom niespecyficzna odporność wrodzona oraz wysoce swoista odporność z udziałem limfocytów i uwalnianych przez nie przeciwciał. Udział limfocytów wiąże się z ich proliferacją klonalną, zapewniająca pojawienie się dużej puli komórek i przeciwciał dostosowanych do sprawnego rozpoznania i szybkiej eliminacji danego czynnika inwazyjnego napotkanego ponownie, co stanowi podłoże i główny mechanizm swoistej pamięci immunologicznej. Pamięć i swoistość odporności z udziałem limfocytów i przeciwciał umożliwiły wprowadzenie szczepień profilaktycznych, będących głównym osiągnięciem medycyny XX wieku, umożliwiającym zapobieganie chorobom zakaźnym i eradykację wielu z nich, co jest jednak niezwykle trudne – a może nawet niemożliwe – w przypadku patogenów szybko zmieniających się (jak np. zarodek malarii czy wirus HIV). Zaczęto się zatem interesować sposobami wzmocnienia tzw. ‘niespecyficznej’ odporności wrodzonej, zapewniającej ochronę przed różnymi czynnikami zakaźnymi.

Dopiero pod koniec XX wieku, dzięki odkryciom dokonany w trakcie badań receptorów Toll u muszki *Drosophila*, wykryto receptory Toll-podobne TLR (*toll-like receptors*), wszechobecne u zwierząt i roślin jako jeden z typów receptorów rozpoznających patogeny (PRR). Dzięki tym badaniom, uhonorowanym w 2011 roku nagrodą Nobla, badania odporności bezkręgowców przestały już być dziedziną niszową, interesującą wąską grupę specjalistów, lecz doceniono ich rolę w poznawaniu mechanizmów odporności wrodzonej. Bezkręgowce, stanowiące znakomitą większość współczesnej fauny, pozbawione są limfocytów i przeciwciał, a pomimo to znakomicie radzą sobie bez nich w rozmaitych środowiskach, często obfitujących w mikroorganizmy potencjalnie patogenne. Nie mogą się

tu oprzeć przywołaniu dżdżownic zasiedlających glebę z miliardami bakterii. Odmienny sposób życia i odmienne zagrożenia czyhają na larwy – gąsienice barciaka większego, *Galleria mellonella*, stanowiące od lat model badawczy zespołu stworzonego przez prof. Teresę Jakubowicz i Jej Uczniów w Zakładzie Immunobiologii UMCS w Lublinie. Tym razem mam przyjemność recenzować pracę doktorską Pani mgr Pauliny Taszłow, wykonanej pod kierunkiem dr hab. Iwony Wojdy.

W recenzowanej pracy wykazano zwiększoną przeżywalność larw barciaka zainfekowanych patogennymi bakteriami *Bacillus thuringiensis*, po wcześniejszym poddaniu gąsienic albo stresowi cieplnemu albo ‘szczepionce’ zawierającej te właśnie bakterie. Celem precyzyjnie zaplanowanego cyklu eksperymentów było badanie mechanizmów protekcyjnego działania stresu abiotycznego (temperatura) lub biotycznego (bakterie) na odpowiedź immunologiczną *Galleria mellonella*, ze szczególnym uwzględnieniem zaangażowanych w nią czynników humoralnych.

Duża objętościowo praca (198 stron maszynopisu) przygotowana jest w sposób tradycyjny. Po spisie treści znajdujemy streszczenie w języku polskim i angielskim, rozwinięcie 99 stosowanych w niej skrótów, a następnie WSTĘP (str. 16-66) zawierający charakterystykę modelu badawczego; rozdział ten, ilustrowany dwunastoma bardzo instruktywnymi rysunkami, prowadzi do jasnego sformułowania głównych celów pracy (str. 67), którymi było prześledzenie wybranych parametrów odpowiedzi humoralnej barciaka po wprowadzeniu do hemocelu bakterii *B. thuringiensis*, oraz analiza wpływu stresu poprzedzającego zakażenie na modyfikację tych parametrów.

Rozdział MATERIAŁY I METODY (str. 68-92) przygotowany jest wzorowo. Doktorantka musiała się zapoznać z licznymi technikami badawczymi, zarówno *in vivo*, jak *in vitro* oraz z nowoczesnymi analizami molekularnymi. Opanowała immunizację larw barciaka w wyznaczanie krzywych przeżywalności; pobieranie hemolimfy larw i analizę aktywności zawartych w niej białek oraz ekspresję genów w komórkach ciała tłuszczowego; opanowała hodowlę i wyznaczanie ilości bakterii. Posługiwała się kilkoma modyfikacjami metod elektroforetycznych, z których najbardziej czuła i przydatna do założonych celów okazała się bioautoradiografia.

Największą część pracy stanowi ANALIZA WYNIKÓW (str. 93-138), którą doktorantka zaprezentowała w sposób imponujący, często odwołując się tu do wyników własnych już opublikowanych (Wojda i Taszłow, 2013; Taszłow i Wojda 2015). Precyzyjnemu opisowi rezultatów kolejnych eksperymentów towarzyszą zawsze czytelne, zazwyczaj wielocłonowe, ryciny, o numerach 20-50. WYNIKI pogrupowano w trzy podrozdziały. W pierwszym z nich zaprezentowano kinetykę zmian wybranych parametrów humoralnych hemolimfy larw barciaka w wybranych punktach czasowych od iniekcji bakterii, a w podrozdziale 2 i 3 – zmiany tej kinetyki u larw poddanych przed zakażeniem działaniu stresu abiotycznego (szoku cieplnego) lub biotycznego (preiniekcja niskiej dawki bakterii żywych, albo wyższej dawki bakterii termicznie osłabionych). Każdy z nich składa się z podpunktów, zawierających jasno sprecyzowany cel danej serii badań wraz z uzasadnieniem zastosowanych procedur i metod badawczych, oraz opis wyników wraz z komentarzem i wnioskami. Szczególną uwagę zwracano na poziom badanego czynnika u gąsienic zainfekowanych bakteriami bez żadnych uprzednich zabiegów z poziomem u gąsienic poddanych wcześniej jednemu ze stresów: szokowi cieplnemu lub pre-iniekcji bakteryjnej.

Po ANALIZIE WYNIKÓW następuje ciekawa DYSKUSJA (str. 139-159), po niej WNIOSKI zawarte w czterech punktach (str. 160-161) i LITERATURA obejmująca 359 pozycji starannie wyselekcjonowanego piśmiennictwa oraz SPIS 59 RYSUNKÓW (str. 196-198).

W doskonale napisanej DYSKUSJI osadzono wyniki własne na tle danych z literatury fachowej. Narzuca się tu wiele analogii z badaniami nad układem immuno-neuro-endorynnym kręgowców. U gąsienic *G. melonella* oba zastosowane czynniki wywołujące stres ostry, zarówno krótkotrwały szok cieplny (jako przykład stresu abiotycznego) jak i wcześniejsza odpowiedź na nie-lethalną infekcję bakteryjną (stres biotyczny) wydłużają czas przeżycia po letalnej dawce bakterii. W tym drugim przypadku znajdujemy analogię ze szczepieniem profilaktycznym kręgowców, choć podłoże komórkowe (hemocyty kontra limfocyty) a zapewne też molekularne, jest odmienne. W przypadku pamięci immunologicznej kręgowców i piętnowania immunologicznego (*immune priming*) bezkręgowców mamy więc do czynienia ze zjawiskami konwergencji. W obu przypadkach organizm zwiększa szansę przeżycia kolejnej infekcji przez ten sam patogen.

W związku z tym ciekawa jestem odpowiedzi Doktorantki na pytanie, które nasunęło mi się w trakcie lektury rozprawy. Czy znane są u barciaka (lub innych owadów) doświadczenia nad swoistością piętnowania immunologicznego? Innymi słowy, czy rolę protekcyjną może spełnić pre-iniekcja bakterii innego gatunku/rodzaju? Być może inny czynnik biotyczny, np. bakterie nie-patogenne, również spowoduje wzmocnienie odporności? Innymi słowy: jak sprawdzić specyfikę reakcji piętnowania immunologicznego?

W obecnym schemacie mam zastrzeżenie do wyników otrzymanych w odległych punktach czasowych (> 9 godzin od iniekcji bakterii), gdy ogólna kondycja gąsienic już zmierza do kompletnego wyczerpania. Porównujemy więc czynniki w organizmach nieuchronnie zbliżających się już do śmierci... W omawianej pracy badano odpowiedź gąsienic na letalną dawkę bakterii oraz mniej lub bardziej znaczące wydłużenie czasu przeżycia po szoku cieplnym lub pre-iniekcji bakteryjnej. Czy istnieje możliwość takiego zmodyfikowania modelu badawczego, aby monitorować proces ZDROWIENIA gąsienic po zachorowaniu spowodowanym dawką niższą, od obecnie stosowanej? Z tekstu wynika, że da się zaobserwować zmiany behawioralne gąsienic chorych. Może da się też wyznaczyć przełom w chorobie i moment WYZDROWIENIA. Ciekawe (i przyjemniejsze dla obserwatora) byłoby monitorowanie zmian odporności w takim właśnie układzie eksperymentalnym. Być może odnalazłby się wówczas czynnik KLUCZOWY dla powrotu do zdrowia.

Podsumowując, największą zaletą każdej pracy naukowej jest fakt, że skłania ona do stawiania dalszych pytań. W przypadku ocenianej rozprawy doktorskiej rodzi się ich wiele. Część wyników już została opublikowana, w trakcie przygotowywania do druku pozostałych danych zrodzi się zapewne mnóstwo ciekawych pomysłów, gdyż praca wnosi wiele do zastanego stanu wiedzy. Głównymi osiągnięciami są stwierdzenia, iż:

- 1) szok cieplny zastosowany przed infekcją *B. thuringiensis* wydłuża przeżycie larw *G. mellonella* dzięki większej aktywności czynników przeciwbakteryjnych hemolimfy oraz ich mniejszej podatności na degradację przez inhibitory metaloproteinaz bakteryjnych**
- 2) piętnowanie odporności (*immune priming*) przez wstępny kontakt bakteriami osłabionymi termicznie wydłuża przeżycie gospodarza po letalnej dawce bakterii.**

W ocenianej rozprawie, o tak dużej objętości, znalazłam bardzo niewiele pomyłek. Np. na rysunku 1 warto byłoby zamieścić skalę. Na stronie 23 komarowi dodano jedno ‘n’ za dużo w łacińskiej nazwie *Anopheles*. Na stronie 53 niepotrzebnie zastosowano kursywę w nazwie Insecta (tylko nazwy rodzajów i gatunków pisze się kursywą). Dowodzi to, że praca została przygotowana niezwykle starannie.

Stwierdzam zatem, że przedstawiona do zaopiniowania rozprawa **„Modulacja humoralnej odpowiedzi immunologicznej barciaka większego (*Galleria mellonella*) w przebiegu zakażenia bakteriami *Bacillus thuringiensis*”** spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim i zwracam się do Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie o dopuszczenie **Pani mgr Pauliny Taszłow** do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Stawiam też wniosek o wyróżnienie tej rozprawy.

Barbara Płytycz