

Prof. dr hab. Mieczysława Irena Boguś
Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN
Warszawa

**OCENA
PRACY DOKTORSKIEJ**

mgr Pauliny Taszłow

**pt.: „Modulacja humoralnej odpowiedzi immunologicznej barciaka większego
(*Galleria mellonella*) w przebiegu zakażenia bakteriami *Bacillus thuringiensis*”**

System broniący owady przed patogenami składa się z barier morfologicznych (kutikula, bariera jelitowa i tchawkowa) jak również z obrony realizowanej przez wyspecjalizowane komórki hemolimfy (hemocyty) a także konstytutywnej oraz indukowanej odpowiedzi humoralnej. Wysoka sprawność systemu broniącego owady przed licznymi prokariotycznymi i eukariotycznymi entomopatogenami uważana jest za główny czynnik sprawczy ewolucyjnego sukcesu owadów. Choć w ostatnim dziesięcioleciu osiągnięto znaczny postęp w rozszyfrowywaniu mechanizmów kierujących odpowiedzią immunologiczną owadów, nadal niewiele wiadomo o roli stresorów środowiskowych w modulowaniu reakcji obronnych. Dlatego podjęcie przez Doktorantkę badań plastyczności odpowiedzi immunologicznej larw mola woskowego *Galleria mellonella* jest w pełni uzasadnione. Mol woskowy, z powodu braku diapauzy w swym cyklu życiowym, jest dogodnym obiektem badawczym powszechnie wykorzystywanym w laboratoriach. Ponieważ u bezkręgowców w toku ewolucji wykształcone zostały wyłącznie mechanizmy wrodzonej, nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, owady stanowią doskonały model do badania interakcji pomiędzy patogennymi mikroorganizmami a konstytutywnymi mechanizmami odporności gospodarza. Badania prowadzone na owadach są znacznie tańsze i łatwiejsze do wykonania z powodu braku złożonych oddziaływań pomiędzy wrodzonym a nabytym systemem odporności obecnym u kręgowców.

Recenzowana praca posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich, liczy ogółem 198 stron zawierających 6 rozdziałów i obszerny spis literatury zawarty na 33 stronach. W tekście zamieszczono 50 rycin ilustrujących w zdecydowanej większości (30 rycin) wyniki prac eksperymentalnych prowadzonych przez Doktorantkę.

Część doświadczalną pracy poprzedza teoretyczny Wstęp, w którym Doktorantka, opierając się na aktualnych danych piśmiennictwa naukowego, przedstawiła w bardzo wnikliwy sposób obecny stan wiedzy na temat mechanizmów odpornościowych owadów oraz modulacji odpowiedzi immunologicznej owadów przez abiotyczne i biotyczne czynniki zewnętrzne. We Wstępie przedstawiona została również charakterystyka organizmów użytych w badaniach: mola woskowego *Galleria mellonella* oraz bakterii *Bacillus thuringiensis*. *G. mellonella* to kosmopolityczny szkodnik pasiek. *B. thuringiensis* to naturalny czynnik chorobotwórczy owadów od lat z powodzeniem wykorzystywany do ograniczania liczebności populacji niektórych owadów szkodliwych. Zamieszczone we Wstępie dane zostały zaprezentowane w sposób kompetentny, wskazujący na dobre przygotowanie Doktorantki do realizacji własnych zamierzeń badawczych. Zagadnienia poruszone we Wstępie ściśle wiążą się z doświadczalną częścią pracy. Cele pracy zostały sformułowane prawidłowo i w przejrzysty sposób.

Do realizacji zaplanowanych badań Doktorantka wykorzystwała zróżnicowaną metodykę, poczynając od hodowli owadów i mikroorganizmów poprzez badanie aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy owadów aż do wyznaczenia poziomu ekspresji w ciele tłuszczowym genów kodujących białka i peptydy odpornościowe.

W toku prac eksperymentalnych Doktorantka wykazała, że:

- zarówno zmiana warunków temperaturowych (poddanie larw krótkotrwałemu szokowi termicznemu) jak i „piętnowanie” larw mola woskowego bakteriami *B. thuringiensis* (zarażanie małą ilością bakterii lub bakteriami inaktywowanymi) w istotny sposób modulują odporność larw *G. mellonella* wobec bakterii;
- zwiększonej przeżywalności larw mola woskowego poddanych szokowi termicznemu towarzyszyła wzmożona ekspresja genów kodujących peptydy odpornościowe (cekropina, gallerymycyna, galiomycyna, peptyd anionowy II) i białko opsonizujące (hemolina) oraz obniżona podatność polipeptydów przeciwbakteryjnych, jak również apoLp-III, obecnych w hemolimfie na degradację proteolityczną przez termolizynę;

- „piętnowanie” immunologiczne larw *G. mellonella* przez *B. thuringiensis* przejawiało się w postaci podwyższonej aktywności przeciwbakteryjnej hemolimfy oraz pojawiania się w hemolimfie większej ilości indukowalnych peptydów;
- „piętnowaniu” immunologicznemu nie towarzyszył wzrost ekspresji genów kodujących peptydy odpornościowe (cecropina, gallerymycyna, galiomycyna, peptyd anionowy II) i białka opsonizujące (apoLp-III, hemolina) jak również owadzi inhibitor metaloproteinaz (IMPI) - zaobserwowano wręcz obniżenie ekspresji tych genów po powtórnym zainfekowaniu larw letalną dawką *B. thuringiensis*;
- modulacji na skutek „piętnowania” immunologicznego nie podlegała podatność peptydów odpornościowych na degradację termolizyną oraz aktywność oksydazy fenolowej.

Oceniając przedstawioną mi do recenzji pracę stwierdzam, iż:

- praca została napisana w sposób jasny i zrozumiały,
- szata graficzna rozprawy jest staranna, choć zastosowanie kolorowych diagramów zamiast słupków w różnych odcieniach szarości znacznie ułatwiłoby analizę zaprezentowanych wyników,
- obszerny wstęp (51 stron) stanowi dobre teoretyczne wprowadzenie do zagadnień będących przedmiotem badań Autorki,
- zadania jakie sobie postawiła Doktorantka są jasno sformułowane,
- metody użyte w badaniach (opisane na 24 stronach) zostały dobrane w sposób właściwy,
- wyniki badań bogato udokumentowane rycinami i zdjęciami, zostały przedstawione na 46 stronach w sposób nie budzący zastrzeżeń,
- w dyskusji (21 stron) Autorka umiejętnie i w sposób rzeczowy konfrontuje uzyskane wyniki z danymi dostępnymi w literaturze fachowej,
- bogate piśmiennictwo jest właściwie dobrane i obejmuje aktualną wiedzę dotyczącą poruszanych zagadnień.

W trakcie analizy rozprawy zauważyłam, że pewne jej fragmenty wymagają korekt. Wśród zauważonych uchybień są drobne błędy i nieporadności stylistyczne. Jest też kilka fragmentów budzących zastrzeżenia merytoryczne.

Zastrzeżenia merytoryczne:

1. Str. 17. Autorka twierdzi, że larwy *G. mellonella* „przechodzą siedem stadiów rozwojowych zanim osiągną ostatnie stadium larwalne”. Stadia rozwojowe owadów należących do Lepidoptera są cztery: jajo z rozwijającym się zarodkiem, larwa, poczwarka, imago. Larwy mogą wielokrotnie linieć przechodząc z jednego stadium larwalnego w następne. W przypadku *G. mellonella* mamy do czynienia z siedmioma stadiami larwalnymi.
2. Str. 72. „W badaniach stosowane były larwy ...z początku ostatniego stadium, ważące około 200 mg.” Na początku ostatniego stadium larwalnego (0-24 godziny po linieniu) waga osiągana przez larwy *G. mellonella* waha się pomiędzy 60 a 80 mg. Średnią wagę około 200 mg larwy osiągają 3-4 dnia ostatniego stadium. Maksymalną wagę około 250 mg larwy osiągają 5-6 dnia, tuż przed zaprzestaniem żerowania. Wydaje się więc, że badania zostały przeprowadzone na larwach 3-4 dniowych a nie na larwach z początku ostatniego stadium larwalnego. Precyzyjne określanie wieku i etapu rozwoju owadów używanych do badań (larwy żerujące, nieżerujące, „wandering”, wytwarzające oprzęd w postaci otwartych rurek lub zamkniętych kokonów, przedpoczwarki itd.) jest bardzo ważne ponieważ przebieg reakcji odpornościowych jest uzależniony od stanu fizjologicznego owada.
3. Str. 45. „Przynależność owada do danego gatunku określa jednoznacznie rodzaj jego materiału genetycznego i decyduje o przebiegu cyklu rozwojowego oraz cechach osobniczych”. Zdanie to sugeruje, że przynależność do gatunku decyduje o materiale genetycznym oraz determinuje rozwój i cechy osobnicze danego organizmu. Podobna sugestia zawarta jest również w informacji zamieszczonej na rys.9 (str. 46) gdzie wśród czynników wpływających na funkcjonowanie układu odpornościowego owadów wymienione są: przynależność gatunkowa, kondycja fizjologiczna i stadium rozwojowe. Trudno zgodzić się z sugestią, że przynależność gatunkowa decyduje o sposobie funkcjonowania organizmu. Pojęcie „przynależność gatunkowa” to wytwór odwiecznej dążności człowieka do porządkowania otaczającego świata poprzez klasyfikowanie istot żywych i wyodrębnianie grup osobników posiadających wspólne cechy. Cechy na podstawie, których klasyfikujemy organizmy żywe są uwarunkowane genetycznie. Tak więc to materiał genetyczny determinuje cechy na podstawie, których zaliczamy dany organizm do danego gatunku a nie przynależność do danego gatunku determinuje materiał genetyczny.

Nieporadności językowe:

Str. 84-85 „prebarwiony” to anglicyzm. W rozprawie pisanej w języku polskim należy unikać anglicyzmów.

Str. 119. „...białka.... były nieco mniej intensywne u gąsienic...”. Autorka zastosowała tu zbyt duży skrót myślowy.

Str. 93-138 anglicyzm w postaci używania litery „h” w celu oznaczenia ilości godzin jest dość powszechny ale powinno się go unikać.

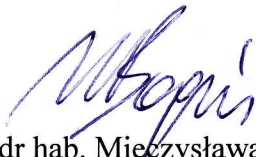
Str. 149. „zcedować” - prawidłowa forma to „scedować”

Str. 160. Autorka pisze o aktywności przeciwbakteryjnej „...skorelowanej ze wzmożoną ekspresją peptydów odpornościowych...” zapominając, że ekspresjonowane są geny a nie peptydy.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji, którą oceniam bardzo wysoko. Autorka w przedstawionej rozprawie doktorskiej wykazała umiejętność samodzielnego rozwiązywania postawionych zadań naukowych, dobre opanowanie metod badawczych oraz znajomość piśmiennictwa. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki stanowią Jej oryginalne osiągnięcia i znacząco poszerzają wiedzę na temat udziału czynników biotycznych i abiotycznych w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej owadów.

Stwierdzam, że przekazana mi do recenzji dysertacja doktorska mgr Pauliny Taszłow pt.: „Modulacja humoralnej odpowiedzi immunologicznej barciaka większego (*Galleria mellonella*) w przebiegu zakażenia bakteriami *Bacillus thuringiensis*” w pełni odpowiada wymaganiom określonym w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnioskuję o dopuszczenie Autorki tej rozprawy do dalszych, przewidzianych ustawą, etapów przewodu doktorskiego.

Warszawa, 16.08.2016


Prof. dr hab. Mieczysława Irena Boguś