

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

Łódź, 7.01.2023

Ocena rozprawy doktorskiej Mgr Kamili Wiśniewskiej

pt. „*Potencjał immunologiczny hemolimfy pająka *Steatoda grossa* (Theridiidae) w warunkach długotrwałej ekspozycji na wybrane metale podawane drogą pokarmową*”.

Wyniki szeregu publikacji z ostatnich lat wskazują na przydatność pajaków w ocenie skażenia środowiska metalami ciężkimi, w tym kadmem o silnej toksyczności i niskiej biodegradalności. Znaczący postęp wiedzy w tym zakresie jest zasługą Zespołu kierowanego przez Panią dr hab. Grażynę Wilczek, a pająk *Steatoda grossa* jest od wielu lat z sukcesem stosowanym modelem do prowadzenia systematycznych badań dotyczących akumulacji metali ciężkich, mechanizmów ich detoksykacji czy też biologicznych konsekwencji ich gromadzenia. Praca doktorska Pani magister Kamili Wiśniewskiej jest kontynuacją i rozszerzeniem tych badań, a jej przedmiotem było poznanie wpływu długoterminowej ekspozycji na ksenobiotyczny kadm oraz biogenną miedź u samic pająka *Steatoda grossa* na profil komórkowy hemolimfy, ultrastrukturę hemocytów, skład proteomu hemolimfy oraz podatność na immunostymulację.

Rozprawa doktorska ma charakter monografii o układzie typowym dla prac doświadczalnych i obejmuje rozdziały: Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki, Wnioski, wykaz cytowanej literatury a także dwujęzyczne streszczenie, wykaz używanych skrótów, odczynników, spis zamieszczonych rycin i tabeli oraz aneks zawierający dodatkowe analizy statystyczne. Całość prac liczy 136 stron, w tym trzy strony niezadrukowane (nr 11, 125 i 136). W liczącym 15 stron rozdziale „Wstęp”, w syntetyczny sposób przedstawiono wpływ kadmu i miedzi na organizmy. Opisano ich źródła w środowisku, wykorzystanie w przemyśle, toksyczność i jej mechanizmy a także sposoby neutralizacji metali u pajaków – w tym z wykorzystaniem metalotionein. Scharakteryzowany został również układ odpornościowy pajaków bazujący na komórkach hemolimfy – głównie prohemocytach, granulocytach i plazmocytach. Zwrócono uwagę na możliwość nabycia przez hemocyjaninę aktywności oksydazy fenolowej, istotnej do ograniczenia szerzenia się zakażenia. Przedstawiono także peptydowe czynniki hemolimfy o działaniu antybakteryjnym - defensyny i cekropiny.



Cele pracy, oparte o jasno sformułowane hipotezy badawcze, obejmowały ocenę wpływu długoterminowej ekspozycji na kadm i miedź na zmiany ilościowe subpopulacji hemocytów oraz ich ultrastrukturę, na proteom hemolimfy oraz stężenie wybranych białek o aktywności antibakteryjnej (defensyny i cekropiny) czy neutralizującej metale ciężkie (metalotioneiny).

Rozdział „Materiały i Metody” zawiera charakterystykę gatunku pająka *Steatoda grossa* oraz opis warunków jego hodowli. W czytelny sposób przedstawiono schemat doświadczeń ekspozycji pajaków na metale drogą pokarmową. Opisano również immunostymulatory – zawiesiny inaktywowanych termicznie (100°C 2,5h) bakterii Gram-ujemnych (*Pseudomonas fluorescens*) i Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus*) oraz octan mirystynianu forbolu, (PMA). Opisano szczegółowo drogę podania immunostymulatorów, jednak nie podano kiedy zostały one zastosowane. Moje zastrzeżenie budzi określenie „immunizacja” w przypadku zastosowania badanych czynników – bardziej adekwatnym terminem byłaby „stymulacja” czy „pobudzenie”. W badaniach zastosowano nowoczesne metody takie jak absorpcyjna spektrometria atomowa do oznaczeń stężeń metali w ciałach pajaków, cytometria przepływowa do analiz ilościowych hemocytów w hemolimfie, transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) do badań ultrastrukturalnych, elektroforeza dwukierunkowa połączona z spektrometrią mas do analiz proteomicznych hemolimfy czy ELISA do oznaczeń stężeń wybranych białek hemolimfy. Opisuując metodę ELISA do oznaczeń białek o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, prawdopodobnie błędnie wpisano ten sam rodzaj przeciwciał drugorzędowych, skoro – jak zaznaczono – przeciwciała przeciwko defensynom to przeciwciała królicze, a przeciwko cekropinom – mysie. Nie zaznaczano także, jakich kontroli użyto do wykazania swoistości reakcji, nie zaznaczono również, z jakim enzymem skoniugowane były przeciwciała drugorzędowe. Być może, pewnych powtórzeń można było uniknąć, gdyby opis metody analiz ilościowych białek metalotioneinopodobnych poprzedzał opis oceny stężenia białek o aktywności przeciwbakteryjnej.

Wyniki badań zostały przedstawione bardzo przejrzysto w postaci starannie opracowanych tabel, wykresów i fotografii. Wykazano w nich, iż długoterminowa ekspozycja pajaków na kadm lub miedź doprowadziła do nagromadzenia w ich organizmach znacznych ilości metali, zwłaszcza kadmu. Wśród najważniejszych wyników przedstawionych przez Doktorantkę należałoby wymienić:

- a. wywołane długotrwałą ekspozycją na kadm i miedź obniżenie liczby hemocytów oraz zmiany ilościowe ich subpopulacji, w porównaniu z grupą kontrolną
- b. modulujący wpływ długotrwałej ekspozycji na kadm i miedź na proliferacyjną aktywność badanych immunostymulatorów – wzrost aktywności proproliferacyjnej badanych immunostymulatorów przez długotrwałą ekspozycję na kadm i miedź
- c. związek długotrwałej ekspozycji na kadm i miedź z nasiloną podatnością hemocytów na nekrozę/apoptozę
- d. zmiana profilu białkowego hemolimfy w wyniku długotrwałej ekspozycji na kadm i miedź



- e. identyfikacja hemocyjaniny i aktywności wśród białek o najbardziej zaburzonej ekspresji w stosunku do pajaków grupy kontrolnej
- f. możliwe osłabienie odporności przeciwbakteryjnej u pajaków, w wyniku ekspozycji na kadm lub miedź, prowadzącej do obniżenia ekspresji białek ciekropinowych i defensyn
- g. Nasilenie ekspresji białek metalotioneinopodobnych w wyniku ekspozycji na kadm, miedź i czynniki immunostymulujące.

Należy zwrócić uwagę, iż ze względu na ograniczoną dostępność odczynników dedykowanych badaniom pajaków (np. przeciwciał swoistych dla subpopulacji hemocytów), przeprowadzenie wielu analiz jest bardzo trudne, a wyniki otrzymane przez Doktorantkę nie zawsze są łatwe do interpretacji. Jak wspomniano w Dyskusji – do tej pory nie jest poznany pełen genom pajaka *Steatoda grossa* ani sekwencja jego białek. Tym bardziej należy podkreślić pomysłowość w wyborze metod, umożliwiających rozwiązanie wielu technicznych problemów i otrzymanie wiarygodnych wyników. Wart podkreślenia jest również bardzo długi (sześciomiesięczny) czas ekspozycji na badane metale.

Według uzyskanych informacji, immunostymulatory podawano 24 h przed pobraniem hemolimfy do badań. Chciałabym zapytać Doktorantkę na jakiej podstawie został wybrany ten czas? Czy na podstawie danych literaturowych czy też został ustalony eksperymentalnie?

W rozdziale „Dyskusja”, Autorka przeanalizowała otrzymane dane i odniosła je do opublikowanych wyników badań innych grup zajmujących się podobną problematyką. Fragment ten świadczy nie tylko o znajomości literatury ale też o umiejętności interpretacji danych doświadczalnych. Ze względu na nadal stosunkowo niewielką wiedzę dotyczącą podjętej tematyki, Doktorantka w wielu przypadkach mogła się jedynie odnieść do wyników badań, w których model stanowiły inne stawonogi.

Wyniki Autorki wskazują na hemocyjaninę jako główne białko hemolimfy o zaburzonej ekspresji w wyniku ekspozycji na kadm. *Chciałabym zapytać czy dostępne są dane o wiązaniu kadmu przez hemocyjaninę a także wpływie kadmu na układ oddechowy kręgowców i możliwość jego wychwytywania przez hemoglobinę? Niezwykle ważnym wydaje się zaobserwowanie nasilenia ekspresji kuliny, białka istotnego dla oddziaływań ubikwityna-proteasom, pod wpływem tego metalu. Bardzo ciekawa jest też obserwacja obniżonej aktywności immunostymulującej badanych czynników u pajaków narażonych na kadm. Chciałabym zapytać Doktorantkę czy w trakcie sześciomiesięcznej hodowli zaobserwowano zwiększoną śmiertelność pajaków pod wpływem subletalnych dawek kadmu, niezwiązaną z kanibalizmem?*



Wykaz cytowań zawiera 135 pozycji, z których zaledwie 12 zostało opublikowanych przed rokiem 2000. Świadczy to o dynamicznym rozwoju dziedziny badań będących przedmiotem zainteresowania Mgr Kamili Wiśniewskiej w ostatnich latach. Warto podkreślić, iż aż 9 cytowanych prac to publikacje Zespołu Pani prof. Wilczek.

Przedstawiona rozprawa świadczy o umiejętności prowadzenia badań za pomocą bardzo różnorodnych technik i dojrzałości naukowej Autorki. Praca jest przygotowana bardzo starannie pod względem edytorskim, aczkolwiek Doktorantce nie udało się uniknąć pewnych błędów – literówek, pominięcia jednostek stężenia itp.. Niewątpliwym błędem jest np. w przypadku opisywania wyników analiz pisanie o „aktywności” zidentyfikowanych białek. Zastosowane metody (elektroforeza dwukierunkowa, ELISA dla białek o aktywności przeciwbakteryjnej) są technikami pozwalającymi jedynie na ilościową analizę stężenia ale nie ocenę aktywności.

Mimo wspomnianych niedociągnięć, rozprawa zatytułowana „*Potencjał immunologiczny hemolimfy pająka Steatoda grossa (Theridiidae) w warunkach długotrwałej ekspozycji na wybrane metale podawane drogą pokarmową*” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki wymagane Ustawą z dnia 14.03.2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz.595), z późniejszymi zmianami z dnia 18.03.2011 roku (Dz. U. Nr 84, poz.455), w związku z art. 179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Dz. U. poz. 1669). Należy również podkreślić dorobek naukowy Doktorantki – według bazy PubMed jest ona współautorką czterech publikacji związanych z podjętą w rozprawie tematyką. W związku z powyższym, zwracam się do Wysokiej Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydziału Nauk Przyrodniczych, Uniwersytetu Śląskiego. z wnioskiem o dopuszczenie Pani mgr Kamili Wiśniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na bardzo szeroki zakres przeprowadzonych badań, wartość uzyskanych wyników oraz dorobek publikacyjny Doktorantki, zwracam się także z wnioskiem o jej wyróżnienie.

Prof. dr hab. Anna Świerżko