



UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU

Wydział Nauk Biologicznych  
i Weterynaryjnych

Dr hab. Teresa Napiórkowska, prof. UMK

Toruń, 26.06.2023

Katedra Zoologii Bezkręgowców i Parazytologii

### Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Czerwonki

pt. „Poziom markerów odporności nieswoistej u zarodków wybranych gatunków pajaków”

Przedłożona do oceny praca doktorska Pani mgr Agnieszki Czerwonki została wykonana w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem dr hab. Agnieszki Babczyńskiej, prof. UŚ jako promotora.

#### 1. Znaczenie i ocena wyboru problematyki badawczej

Wśród stawonogów niezwykle ważną, liczną i zróżnicowaną grupę stanowią pająki, które przez blisko 300 milionów lat istnienia osiągnęły ogromny sukces ewolucyjny, czego przejawem jest występowanie w różnych biotopach niemalże na całym świecie. Świadczy to, m. in., o sprawności i skuteczności ich systemu obronnego oraz wskazuje, że brak odporności nabytej nie powstrzymał ich sukcesu ewolucyjnego. Oczywistym jest, że są one stale narażone na infekcje bakteryjne, wirusowe, grzybowe, pasożyty, urazy, a także inne stresory środowiskowe, dlatego też aby uchronić się przed nimi pająki rozwinęły skuteczne mechanizmy obronne, które obejmują odpowiedź komórkową i humoralną. Celem odpowiedzi wrodzonego, nieswoistego układu obronnego pajaków jest rozpoznanie stresora, np. patogenu, pochycenie i skuteczne jego usunięcie poprzez włączenie specyficznych komórek krążących w hemolimfie, czyli hemocytów. To one są zaangażowane w odpowiedź komórkową oraz humoralną, stawiając czoło działaniu nie tylko jednemu, ale też wielu stymulantom jednocześnie. Badania nad hemocytami skupiają się głównie na owadach, które są ważne dla człowieka z ekonomicznego, jak również z medycznego punktu widzenia. Natomiast wiedza na temat rozwoju układu obronnego i jego potencjału u pajaków jest ograniczona i opiera się głównie na badaniach przeprowadzonych na osobnikach dorosłych. Istnieje więc potrzeba zapełnienia luki w wiedzy na temat rozwoju i

funkcjonowania tego układu u pajaków na różnych etapach ontogenezy. Dodatkowo, według aktualnej wiedzy, funkcja tego układu zależna od wieku pajaków, może być związana z alokacją energii i zasobu składników odżywczych w zależności od strategii reprodukcyjnej przyjętej przez różne gatunki pajaków lecz ta kwestia wymagałaby jeszcze potwierdzenia, co stymuluje i zachęca do dalszych badań z tego zakresu. Należy jednocześnie zaznaczyć, że potencjał obronny stawonogów, w tym pajaków był, jest i będzie obiektem zainteresowań badaczy, szczególnie dotyczy to białek antymikrobiałnych, stąd też wszelkie próby podjęcia badań dotyczących immunokompetencji hemocytów uważam za cenne i potrzebne w nauce. W ten nurt wpisuje się tematyka dysertacji doktorskiej mgr Agnieszki Czerwonki. Dlatego też wysoko oceniam istotność, trafność i aktualność podjętej tematyki badawczej, która wpisuje się w dyscyplinę: nauki biologiczne.

## 2. Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Agnieszki Czerwonki jest typową monografią prezentującą wyniki badań eksperymentalnych. Jest napisana w języku polskim i ma formę standardowej rozprawy zawierającej wszystkie wymagane elementy dla dysertacji doktorskich. Obejmuje ona 124 strony druku, z czego tekst uzupełniają 4 tabele i 25 rycin. W toku wywodu, Autorka rozprawy cytuje 239 pozycji literatury, które zostały zawarte na 20 stronach maszynopisu. Są to, za wyjątkiem jednej, pozycje anglojęzyczne, z których większość została opublikowana po roku 2000.

Rozprawę doktorską rozpoczyna notatka informująca, że badania w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały dofinansowane z Grantu PRELUDIUM 16 nr2018/31/N/NZ8/00606, pt. „Skład mikrobiomu modelowego pajaka *Parasteatoda tepidariorum* (Theridiidae, Araneae) w zależności od stadium rozwojowego i warunków środowiskowych”. Przed spisem treści, Autorka zamieściła objaśnienia skrótów użytych w tekście rozprawy (55). Kolejne rozdziały dysertacji: Wstęp, Cele pracy, Materiały i metody, Wyniki i Dyskusja zostały przez Panią magister podzielone na szereg podrozdziałów. Wstęp liczący 21 stron maszynopisu, jest standardowym przeglądem literatury dotyczącym przedstawianego problemu badawczego. Ponieważ projekt został podzielony na dwie części, w Celach pracy, do każdej części, Doktorantka sformułowała szczegółowe pytania i hipotezy robocze. W rozdziale Materiały i metody, Autorka wyróżniła Materiał badawczy podając charakterystykę gatunków pajaków, na których prowadziła eksperyment oraz warunki ich hodowli. W podrozdziale Metody, który został podzielony na dwie części, Autorka szczegółowo omówiła przygotowanie materiału biologicznego do oceny potencjału

immunologicznego pajaków na wczesnych (Część I) i późnych (Część II) etapach ontogenezy pajaków oraz szczegółowo opisała zastosowane metody badawcze. W rozdziale Wyniki, zostały podane przez Doktorantkę uzyskane w toku eksperymentu wyniki, oddzielnie dla każdej części projektu badawczego. Po 12 stronicowej Dyskusji, Autorka dysertacji umieściła Wnioski oraz Streszczenie w języku polskim i angielskim. Rozprawę zamyka bogata Bibliografia.

### 3. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Tytuł ocenianej rozprawy doktorskiej, „Poziom markerów odporności nieswoistej u zarodków wybranych gatunków pajaków”, w mojej opinii, nie jest do końca precyzyjny i wymagałby korekty, bowiem rozprawa dotyczy nie tylko oceny potencjału obronnego zarodków wybranych gatunków pajaków, ale również samic niedojrzałych i dojrzałych płciowo, a więc osobników w okresie postzarodkowym.

Pierwszy rozdział dysertacji zatytułowany Wstęp jest interesującym i dobrze napisanym przeglądem literatury. Ze względu na szeroki wachlarz zagadnień w nim poruszanych, Doktorantka podzieliła go na szereg podrozdziałów, co czyni go przejrzystym i zawiera wszystkie informacje dotyczące układu immunologicznego bezkręgowców, w tym stawonogów. We Wstępie Doktorantka wyróżniła podrozdziały, w których syntetycznie podała informacje dotyczące odporności bezkręgowców w ujęciu ewolucyjnym i ontogenetycznym, scharakteryzowała strukturę układu immunologicznego i mechanizmy odporności wrodzonej wyróżniając i skrótowo opisując reakcje typu komórkowego, humoralnego oraz inne reakcje związane z układem immunologicznym u zwierząt bezkręgowych, zawarła też podstawowe informacje o immunostymulantach i reakcjach organizmu na czynniki stresogenne. W tym miejscu chciałabym wyrazić swoją opinię na temat podrozdziału 1.1.2. Organizacja układu immunologicznego bezkręgowców. W moim odczuciu ten podrozdział dotyczy w zasadzie stawonogów, a więc sugerowałabym zmianę tytułu tego podrozdziału. Rozdział Wstęp zakończony jest opisem układu odpornościowego u pajaków, gdzie Autorka zwróciła uwagę na różną klasyfikację komórek hemolimfy podkreślając, że do chwili obecnej nie ma oficjalnej i ostatecznie ustalonej terminologii. Jednocześnie, w Tabeli 1, Autorka podała wykaz opisanych białek antymikrobiałnych, które zostały wyizolowane z różnych gatunków pajaków i których właściwości zostały poznane, co jest w mojej ocenie bardzo istotne w ocenie potencjału obronnego pajaków. Autorka na zakończenie przeglądu literatury zwraca uwagę, że zgodnie z obecnym stanem wiedzy, funkcjonowanie układu immunologicznego pajaków może być związane z alokacją zasobów

energetycznych w zależności od przyjętej strategii rozrodczej, co jest rozwijane i dyskutowane w dalszej części wywodu doktorskiego.

W mojej ocenie zaprezentowany przegląd literatury stanowi logiczną i spójną całość. Przedstawione podstawy teoretyczne są dobrym wprowadzeniem do celów pracy. Ponieważ projekt obejmował: i) poznanie potencjału immunologicznego pajaków na wczesnych etapach rozwoju osobniczego w kontekście inwestycji rodzicielskiej w ochronę zarodków, jak również ii) reakcje układu immunologicznego w okresie postzarodkowym (samice niedojrzałe, samice dojrzałe płciowo) w odpowiedzi na immunostymulację o różnym stopniu i charakterze, do każdej części projektu Autorka sformułowała szczegółowe pytania i słusznie postawione hipotezy robocze. W mojej opinii, cele badań oraz hipotezy zostały słusznie postawione, a badania tak zaplanowane, aby w toku ich realizacji uzyskać wyniki dające na nie odpowiedź.

Rozdział Materiały i metody obejmuje opis materiału badawczego, czyli pajaka *Parasteatoda tepidariorum*, gatunku iteroparycznego wraz z warunkami hodowli oraz pajaka *Pardosa lugubris*, gatunku semelparycznego, którego Autorka dysertacji odławiała ręcznie, a pozyskane samice przetrzymywała w hodowli tymczasowej, w takich samych warunkach laboratoryjnych jak *P. tepidariorum*. Bardzo wysoko oceniam dobór materiału badawczego, dwóch różnych pod względem zamieszkiwanego środowiska, trybu życia i strategii reprodukcyjnej pajaków. Doceniam również zaangażowanie Pani magister w prowadzenie stałej, stabilnej hodowli gatunku modelowego, jakim jest hodowla laboratoryjna *P. tepidariorum*. Z doświadczenia wiem, że nie jest to łatwe zadanie, ponieważ opieka nad tymi zwierzętami jest pracochłonna, wymaga nieustannej uwagi i kontroli. Z tego zadania Doktorantka wywiązała się doskonale, jak zresztą z pozyskaniem samic *P. lugubris* z terenu i opieką nad nimi w laboratorium.

Poza opisem materiału badawczego niniejszy rozdział obejmuje metody, które zostały wykorzystane przez Doktorantkę. Na szczególne podkreślenie zasługuje odpowiedni dobór nowoczesnych metod i technik badawczych, których zastosowanie pozwoliło na weryfikację postawionych hipotez badawczych. Doktorantka bardzo dokładnie opisała procedury i wykorzystane w toku badań metody i techniki badawcze w poszczególnych częściach projektu, tj. mikroskopię świetlną, technikę SEM, PCR, elektroforezę SDS-Page, test immunoenzymatyczny ELISA, analizę Western-blot, hemocytometrię oraz cytometrię przepływową. Autorka podała również, jakie analizy statystyczne zostały przez nią zastosowane. Na podkreślenie zasługuje zakres dobranych metod zapewniający przeprowadzenie kompleksowych badań w celu analizy potencjału obronnego pajaków na

wczesnych (zarodki *P. tepidariorum* i *P. lugubris*) oraz późnych etapach rozwoju osobniczego (samice niedojrzałe i dojrzałe płciowo *P. tepidariorum*). Doceniam przygotowane przez doktorantkę Ryciny, gdzie zostały graficznie przedstawione wszystkie analizowane grupy badawcze (kontrolne i eksperymentalne - stymulowane), bowiem ułatwiają one odbiór informacji. Wysoko oceniam wybór metod immunostymulacji, jakimi były: w przypadku zarodków, mechaniczne naruszenie struktury jedwabnego oprzędu chroniącego złoże oraz, w przypadku samic *P. tepidariorum*, sterylne, nylonowe włókno wbite w opistosomę i nylonowe włókno pokryte zawiesiną bakterii *Bacillus subtilis*, co generowało rosnący stopień immunostymulacji. Zakres i różnorodność zastosowanych metod badawczych dowodzi, że Doktorantka dobrze posługuje się nowoczesnymi technikami, potrafi zaplanować i wykonać analizy, co świadczy o dobrym przygotowaniu do prac laboratoryjnych.

W rozdziale Wyniki, które według przyjętej koncepcji dysertacji Doktorantka podzieliła na dwie części, znajdują się otrzymane wyniki badań. Pani magister zreferowała je szczegółowo i w sposób uporządkowany. Uzupełnieniem tego rozdziału jest 15 rycin oraz jedna tabela. Są one czytelne i przygotowane starannie, np. profile białkowe. Uzupełnieniem tego rozdziału pracy są informacje dotyczące wyników przeprowadzonych analiz statystycznych, które Doktorantka przedstawiła graficznie. Warte podkreślenia jest to, że w recenzowanej dysertacji wyniki badań będące efektem rzetelnego przeprowadzenia szeregu analiz są dobrze zaprezentowane.

W rozdziale Dyskusja, Pani magister przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników w kontekście postawionych celów i hipotez roboczych. W tym rozdziale, na który składają się dwie części, Doktorantka w sposób kompleksowy i wnikliwy przeanalizowała otrzymane wyniki konfrontując je z wynikami innych badaczy wykazując się przy tym pewną interpretacyjną ostrożnością, co dowodzi dojrzałości Autorki jako badacza. Odniosła się też do postawionych hipotez wskazując, w oparciu o wyniki z części I i II eksperymentu, że hipotezy robocze: 1, 3, 4 i 5 zostały pozytywnie zweryfikowane, natomiast hipoteza robocza 2 nie została w pełni potwierdzona.

Na końcu dysertacji, po rozdziale Dyskusja, Doktorantka umieściła Wnioski, które sformułowała w postaci pięciu trafnych stwierdzeń płynących z przeprowadzonych analiz. Za streszczeniami w języku polskim i angielskim znajduje się starannie przygotowany i bogaty spis literatury obejmujący najważniejsze, trafnie dobrane i w głównej mierze najnowsze pozycje literatury z zakresu przedmiotu badań.

Konkludując ocenę merytoryczną stwierdzam, że rozprawa powstała na podbudowie dobrej, spójnej koncepcji badań, które zostały zilustrowane, a wyniki opracowane statystycznie. Recenzowana dysertacja wnosi nowe wartości i poszerza dotychczasowy stan wiedzy na temat odporności nieswoistej u pajaków. Koncepcja badań, zastosowane precyzyjne i nowoczesne metody oraz odpowiednie przygotowanie doktorantki umożliwiło osiągnięcie wartościowych wyników mających potencjał publikacyjny.

Za osiągnięcie Doktorantki uważam:

1. Wykazanie, że zarodki *P. tepidariorum* i *P. lugubris* dysponują czynnym potencjałem immunologicznym mierzalnym na poziomie ekspresji genów kodujących wybrane AMPs, obecności niskocząsteczkowych białek na profilu białkowym oraz stężenia wybranych, konserwatywnych AMPs wykrywalnych metodą immunodetekcyjną, a wyizolowanie zarodków z ochronnej jedwabnej przędzy wskazuje, że zarodki wykazują zarówno konstytutywną, jak też i stymulowaną aktywność układu odpornościowego. Dodatkowo, Doktorantka wykazała różnice międzygatunkowe (wyższy potencjał immunologiczny *P. lugubris*), które wskazują na związek strategii związanych z opieką rodzicielską oraz ze środowiskiem i trybem życia pajaków (większe narażenie embriionów *P. lugubris* na patogeny) na potencjał obronny.

2. Wykazanie, że samice niedojrzałe i dojrzałe płciowo *P. tepidariorum* różnią się potencjałem obronnym wyrażanym poprzez ekspresję genów kodujących białka związanych z układem immunologicznym, stężenie HSP70, lizozymu i innych białek pełniących funkcje immunologiczne oraz odsetek żywych, apoptotycznych i martwych hemocytów. Ponadto, Doktorantka wykazała, że rosnąca intensywność immunostymulacji powoduje wzrost poziomu markerów immunologicznych.

Z obowiązku recenzenta chciałabym też zwrócić uwagę na nieścisłości i uchybienia w tekście rozprawy. Dotyczą one błędów korektorskich i doprecyzowania niektórych stwierdzeń.

Dla przykładu:

- str. 27 jest „leberidocyty” powinno być „leberidiocyty”
- str. 33 jest „osobnbiki” powinno być „osobniki”
- str. 58 jest „*P. tepidarium*” powinno być „*P. tepidariorum*”
- str. 84 jest „*L. redemciguttatus*” powinno być „*L. tredemciguttatus*”

- str. 87 jest „inwetowania” zamiast „inwestowania”

W tekście są też niedokończone zdania, np. Również białka przeciwwgrzybicze stanowią dużą grupę, Najmniejsza liczba... str. 29; W jednym paskiecie jajowym znajduje się Samica otwiera kokon.... str. 33; U 169-godzinnych zarodków oraz u osobników młodocianych stężenie defensyn. str. 88;

Ponadto, w Dyskusji, (str. 84) powtarza się zdanie: W badaniach tych wyizolowano....

Są też potknięcia, np.: Pierwszymi opisanymi pajęczkami AMPs, wykryte w wydzielinie gruczołów jadowych *Lycosa carolinensi*, były lykotoksyny I i II (str. 30); Jednak koszt związany z czynnościami związanymi z opieką - tworzeniem kokonu, czynną ochroną przez zarodków przed pasożytami i drapieżnikami... (str. 35); W stężeniu defensyny we wszystkich analizowanych grupach wiekowych jest nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie. str. 75; *P. lugubris* należy do rodzaju i charakteryzuje się dużą inwestycją rodzicielską – nie rozstaje się.... str. 88.

Na str. 34, gdzie Autorka wyróżnia siedem typów gruczołów przednich, pojawiają się gruczoły: większy, mniejszy, gruszkowaty, agregatowy, kanalikowy, wiciowaty i groniasty – brakuje nazwy gruczołu większego i mniejszego. Należałoby wpisać termin: „ ampułkowaty” Dalej Autorka pisze: kokony wytwarzane są przez gruczoły rurkowate i groniaste. Tutaj prosiłabym o wyjaśnienie dotyczące gruczołów rurkowatych, bowiem pojawiają się one jako ósmy typ gruczołów.

Zalecam też w Materiałach i metodach (str. 49) sprawdzenie i poprawę grup wiekowych. Autorka wyróżnia grupę embrionów 120 h zebranych do badania po pięciu dniach, później po 144 h zebranych po sześciu dniach, następnie pojawia się grupa 120 h embrionów zebranych po siedmiu dniach i na koniec grupa embrionów 168 h zebranych do badania po ośmiu dniach (168 godzinne zarodki to zarodki siedmiodniowe).

Jest też nieścisłość w Wynikach (str. 69-70) odnośnie dokumentacji fotograficznej zarodków na wczesnych etapach ontogenezy. Legenda pod Ryciną 11 nie jest do końca zgodna z opisem w tekście. Nie ma też w legendzie odniesienia do fotografii g), która, moim zdaniem, przedstawia zarodka 72 h. Proszę o wyjaśnienie.

Ponadto, niektóre twierdzenia zawarte we Wstępie rozprawy wymagałyby uściślenia. Dotyczy to zdań: Pierwszą, podstawową linię obrony przed wszelkimi patogenami stanowi kutykula – zewnętrzna powłoka ciała zwierząt bezkręgowych. (nie wszystkie bezkręgowce pokryte są kutikulą); dalej czytamy: Co więcej obecność otwartego układu krążenia, niesie za sobą....; Hemolimfa jest plynem ustrojowym bezkręgowców, który odpowiada nie tylko za transport.... (str. 15-16). Odnośnie owadów, na str. 25 Autorka pisze: W celu dodatkowego

zabezpieczenia przed utratą wilgotności środowiska rozwoju zarodków, jaja wychodzące z dróg rodnych samicy są zamykane w ootece, czyli swoistym kokonie ulegającym sklerotyzacji (nie u wszystkich owadów jaja zamykane są w ootece). Proszę o doprecyzowanie powyższych stwierdzeń.

W pracy Autorka stosuje termin „odwłok” na określenie drugiej tagmy ciała pajaków. Obecnie w literaturze arachnologicznej stosuje się inną terminologię na określenie tagm ciała u pajaków. Są to: prosoma i opistosoma. Zalecałabym stosowanie takiego nazewnictwa.

I moja końcowa uwaga, która dotyczy zarodków *P. tepidariorum* i *P. lugubris*. Zarodki obu gatunków były podzielone na grupy kontrolne i eksperymentalne, w których zostały wydzielone grupy wiekowe: 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 i 168-godzinne. W przypadku *P. tepidariorum*, Autorka podjęła się weryfikacji danych literaturowych odnośnie czasu i wczesnych stadiów embrionalnych tego gatunku, co jest dużym plusem. Do tej pory, takich szczegółowych danych literaturowych odnośnie *P. lugubris* nie ma, w związku z tym Autorka przyjęła pobór próbek do eksperymentów w tym samych punktach czasowych, jak w przypadku zarodków *P. tepidariorum*. Szkoda, że Autorka nie podjęła się próby oszacowania, czy kluczowe stadia embrionalne u *P. lugubris* występują mniej więcej w tym samym czasie, co u *P. tepidariorum*. Oszacowanie, w jakim czasie mają miejsce kluczowe etapy embriogenezy jest możliwe i stosunkowo proste przy użyciu chociażby oleju parafinowego, w którym zanurza się zarodki. Olej przeświecła chorion i etapy embriogenezy takie jak: blastoderma, dysk zarodkowy, płytką pierwotną, cumulus i jego wędrowka, segmentacja smugi zarodkowej, zakładanie się odnoży i inwersja zarodka są widoczne. Można byłoby tym sposobem porównać tempo rozwoju zarodkowego obydwu gatunków pajaków i stwierdzić, czy w tych samych punktach czasowych mają miejsce te same stadia rozwojowe. Byłby to bardzo cenne informacje wzbogacające dysertację o nowe treści poszerzające wiedzę w tym zakresie.

Lektura dysertacji wzbudziła moje zainteresowanie i skłoniła mnie do przemyśleń, z których wyłoniło się pytanie dotyczące pamięci immunologicznej. Chciałabym poznać stanowisko Doktorantki na pytanie: czy stawonogi, a w tym pająki, mają pamięć immunologiczną i czy widzi Pani możliwość przetestowania tego problemu naukowego na pająkach?

#### 4. Wniosek końcowy

Doktorantka wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia eksperymentów naukowych, a także zdolność do opracowania i interpretacji uzyskanych wyników.



Zaprezentowała tym samym dobrą znajomość problematyki badawczej stanowiącej rozprawę doktorską. Mogę stwierdzić, że tematyka pracy doktorskiej wpisuje się w aktualne badania nad potencjałem obrony nieswoistej u pajaków. Tematyka dysertacji jest oryginalna, a otrzymane wyniki podczas jej realizacji stanowią rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka udowodniła, że posiada ogólną wiedzę do właściwej oceny otrzymanych wyników, ma umiejętność ich prezentowania i dyskusji. Moim zdaniem cele badawcze zostały przez Panią magister osiągnięte. Wygenerowanie i zebranie wyników, w mojej ocenie, jest wyznacznikiem dalszych prac badawczych, które mogłyby być kontynuowane i rozwijane na kolejnych etapach pracy naukowej Doktorantki.

Reasumując stwierdzam, że recenzowana praca doktorska mgr Agnieszki Czerwonki, pt. "Poziom markerów odporności nieswoistej u zarodków wybranych gatunków pajaków" została przygotowana zgodnie z art. 14 ust. 2 pkt 2 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U z 2017 r., poz. 1789) w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1669). W związku z tym, wnioskuję do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska o dopuszczenie mgr Agnieszki Czerwonki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jerzy Napędowski