

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

**OCENA
PRACY DOKTORSKIEJ**

mgr Patryka Nowickiego

**pt.: „Gonadotropowa i immunotropowa aktywność nanodiamentów oraz ich
koniugatów z *Neb*-kolostatyną i jej analogami u chrząszcza *Tenebrio molitor* ”**

Wiele gatunków owadów odpowiedzialnych jest za poważne szkody gospodarcze w uprawach i przechowywaniu produktów spożywczych. Przenoszenie przez owady patogenów niebezpiecznych dla ludzi i zwierząt hodowlanych zmusza do ograniczania liczebności populacji owadów szkodliwych. Zagrożenie dla bioróżnorodności, w wyniku stosowania klasycznych insektycydów, oraz rosnąca oporność szkodników na te środki, powoduje intensyfikację poszukiwań nowych, selektywnie działających, wydajnych i bezpiecznych dla środowiska naturalnego insektycydów. Badania nad stosowaniem naturalnych wrogów owadów w postaci wirusów, bakterii, grzybów i nicieni, jako bioinsektycydów zaowocowały powstaniem preparatów komercyjnych, jednak ich skuteczność i selektywność nie jest jeszcze zadowalająca. Alternatywnym podejściem do tego problemu są badania nad możliwością zastosowania peptydomimetyków, czyli zmodyfikowanych chemicznie peptydów regulujących ważne funkcje życiowe owadów, w tym zwłaszcza peptydów zaangażowanych w procesy związane z rozmnażaniem oraz odpowiedzią immunologiczną. Jednym z naturalnie występujących u owadów peptydów o wielokierunkowej aktywności jest *Neb*-kolostatyna. Ten 19 aminokwasowy peptyd wykazuje aktywność oostatyczną przejawiającą się zahamowaniem wzrostu oocytów, biosyntezy witelogenin i ich deponowania w oocytach much i chrząszczy. *Neb*-kolostatyna indukuje też procesy apoptozy i autofagii komórek folikularnych oraz komórek w obszarze germarium, co w efekcie prowadzi do znacznego zmniejszenia ilości składanych jaj i wylęgłości larw. Oprócz oddziaływania na układ rozrodczy *Neb*-kolostatyna indukuje apoptozę hemocytów,

immunokompetentnych komórek hemolimy. Poważnym problemem jest sposób wprowadzenia aktywnego peptydu do ciała owada zapewniający zachowanie jego aktywności biologicznej. W celu zwiększenia stabilności peptydów w warunkach polowych oraz odporności na degradację przez enzymy owadów natywne peptydy poddawane są modyfikacjom chemicznym. Poszukiwane są także neutralne przenośniki substancji aktywnych biologicznie umożliwiające skuteczny ich transport przez kutikulę. Nanocząsteczki diamentu stosowane są obecnie, jako wydajne przenośniki wielu substancji biologicznie aktywnych do komórek ssaczyc, jednak dotychczas nie prowadzono badań nad ich użyciem w transporcie poprzez kutikulę owadzi.

Podjęcie przez Doktoranta badań mających na celu zbadanie wpływu *Neb*-kolostatyny i jej analogów oraz ich koniugatów z nanodiamentami na wybrane elementy układu odpornościowego oraz rozrodczego *Tenebrio molitor*, jest w pełni uzasadnione.

Recenzowana praca posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich i liczy ogółem 140 stron. Obszerny spis literatury zawiera 226 pozycji. W tekście zamieszczono 36 rycin ilustrujących w zdecydowanej większości (28 rycin) wyniki prac eksperymentalnych prowadzonych przez Doktoranta.

Część doświadczalną pracy poprzedza teoretyczny Wstęp, w którym Doktorant, opierając się na danych piśmiennictwa naukowego, przedstawił obecny stan wiedzy na temat metod ograniczania liczebności owadów szkodliwych dla człowieka, scharakteryzował hormony immunotropowe i gonadotropowe owadów oraz *Neb*-kolostatynę i jej analogi. Doktorant przedstawił też w zwięzły sposób najważniejsze informacje dotyczące układu odpornościowego owadów oraz budowę żeńskiego układu rozrodczego chrząszcza stanowiącego obiekt badawczy niniejszej pracy. Zamieszczone we Wstępie dane zostały zaprezentowane w sposób kompetentny, wskazujący na dobre przygotowanie Doktoranta do realizacji własnych zamierzeń badawczych. Zagadnienia poruszone we Wstępie ściśle wiążą się z doświadczalną częścią pracy. Cele pracy zostały sformułowane prawidłowo i w jasny sposób.

Do realizacji zaplanowanych badań Doktorant wykorzystał zróżnicowaną metodykę, poczynając od aplikacji topikalnej owadom oraz za pomocą mikroiniekcji nanodiamentów funkcjonalizowanych badanymi peptydami, badania ich przenikania przez kutikulę i dystrybucji wewnątrz organizmu, poprzez pomiar liczby hemocytów oraz ich aktywności fagocytarnej, pomiar ilości nodul, badanie aktywności oksydazy polifenolowej a kończąc na

badaniu wpływu testowanych związków na ilość składanych jaj i przeżywalność embrionów *T. molitor*.

W toku prac eksperymentalnych Doktorant wykazał, co następuje:

1. nanodiamenty wnikają poprzez kutikulę do wnętrza ciała *T. molitor* i nie wywierają żadnego istotnego wpływu na procesy rozrodcze oraz funkcjonowanie komórek układu immunologicznego owadów.
2. *Neb*-kolostatyna i jej analogi:
 - obniżają liczbę hemocytów krążących w hemolimfie larw, poczwarek i imago *T. molitor* a także liczbę fagocytykujących hemocytów oraz wytworzonych przez hemocyty nodul,
 - zmniejszają aktywność oksydazy polifenolowej,
 - hamują rozwój jajnika oraz wzrost i dojrzewanie oocytów,
 - hamują składanie jaj,
 - zaburzają embriogenezę i metamorfozę
3. Koniugaty nanodiamentów z *Neb*-kolostatyną lub jej analogiami wnikają poprzez kutikulę do wnętrza ciała *T. molitor* i zachowują aktywność biologiczną opisaną powyżej.

Oceniając pracę przedstawioną mi do recenzji stwierdzam, iż:

- praca została napisana w sposób przejrzysty i zrozumiały,
- szata graficzna rozprawy jest staranna,
- wstęp opisany na 34 stronach stanowi dobre teoretyczne wprowadzenie do zagadnień będących przedmiotem badań Autora, choć w rozdziale 1.1. dotyczącym metod zmniejszania liczebności populacji szkodników pominięta została rola bakterii entomopatogennych a *Bacillus thuringiensis* wspomniany został wyłącznie w kontekście genetycznej modyfikacji roślin,
- zadania jakie sobie postawił Doktorant są jasno sformułowane,
- metody użyte w badaniach (opisane na 15 stronach) zostały dobrane w sposób właściwy,
- wyniki badań bogato udokumentowane rycinami zostały przedstawione na 34 stronach w sposób nie budzący zastrzeżeń,
- w dyskusji (28 stron) Autor 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 drobnych korekt lub uzupełnień:

Strona 25 - Brak informacji, że przytoczone klasy hemocytów (plazmatocyty, granulocyty, sferulocyty, oenocytoidy i prohemocyty) są charakterystyczne dla Lepidoptera. U przedstawicieli innych rzędów skład hemocytów jest z reguły inny. W rozprawie brak jest informacji, jakie klasy hemocytów zostały stwierdzone u *Tenebrio molitor*.

Strona 26 - W opisie procesu nodulacji brak informacji, że dotyczy on wyłącznie patogenów o niewielkich rozmiarach.

Strona 74 - Przedstawienie całkowitej ilości złożonych jaj w każdym wariancie doświadczalnym w postaci tabeli zbiorczej zwiększyłoby przejrzystość tych danych. Rycina 28 jest w obecnej postaci nieczytelna. Moim zdaniem przedstawienie tych danych osobno dla każdego testowanego peptydu w postaci diagramu z rozkładem w czasie (dni od 1 do 7) lepiej przedstawiałoby dynamikę składania jaj a zestawienie diagramów jeden pod drugim bardziej unaoczniałoby różnice pomiędzy aktywnością poszczególnych związków.

Strona 89 - Uważam, że nie należy używać w stosunku do hemolimfy owadów określenia krew, ponieważ funkcje hemolimfy u owadów nie pokrywają się z funkcjami pełnionymi przez krew kręgowców.

Dyskutując możliwość uzupełnienia w hemolimfie puli hemocytów utraconych w wyniku działania czynników hemocytotoksycznych należy też uwzględnić proces rekrutacji hemocytów osiadłych w tkankach.

Strona 98 - Ostatnie zdanie pierwszego akapitu jest niezręcznie sformułowane, bo sugeruje, że jaja posiadają zdolność do zapłodnienia (strona czynna), podczas gdy chodzi o możliwość, że jaja zostaną zapłodnione (strona bierna).

Strona 100 - Dwukrotnie błędnie został podany skrót nazwy hormonu juvenilnego: zamiast JH jest LH.

W kilku miejscach rozprawy (strony: 39, 82 i 88) pojawiły się też literówki.

Podczas czytania rozprawy nasunęło mi się kilka pytań do Autora:

1. Czy sprawdzono, jaki procent nanodiamentów podanych na powierzchnię kutikuli dociera do hemocelu?

2. Czy sprawdzono, u jakiego odsetka samic potraktowanych badanymi związkami i koniugatami a następnie kojarzonych z samcami dochodziło do kopulacji? Czy kojarzenie musi się odbywać w grupach?
3. Czy sprawdzana była liczebność poszczególnych klas hemocytów?
4. Czy sprawdzono, które hemocyty fagocytowały (plazmatocyty czy granulocyty a może obie klasy)?
5. Czy wszystkie doświadczenia przeprowadzane były wyłącznie na samicach?

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji, którą oceniam wysoko. Autor w przedstawionej rozprawie doktorskiej wykazał umiejętność rozwiązywania postawionych zadań naukowych, dobre opanowanie metod badawczych oraz znajomość piśmiennictwa. Uzyskane przez Doktoranta wyniki stanowią Jego oryginalne osiągnięcia i znacząco poszerzają wiedzę na temat istotnych aspektów oddziaływania *Neb*-kolostatyny a także analogów tego peptydu, na kluczowe funkcje życiowe *Tenebrio molitor*. Eleganckie wykazanie, że możliwe jest wprowadzenie *Neb*-kolostatyny i jej analogów do wnętrza ciała owadów poprzez mikropory w kutikuli za pomocą nanodiamentów, otwiera możliwość zastosowania w praktyce peptydomimetyków do walki z owadami szkodliwymi.

Stwierdzam, że przekazana mi do recenzji rozprawa doktorska mgr Patryka Nowickiego pt.: „Gonadotropowa i immunotropowa aktywność nanodiamentów oraz ich koniugatów z *Neb*-kolostatyną i jej analogami u chrząszcza *Tenebrio molitor*” w pełni odpowiada wymaganiom określonym w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym i wnioskuję o dopuszczenie Autora tej rozprawy do dalszych, przewidzianych ustawą, etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuję jednocześnie o wyróżnienie nagrodą Autora powyższej rozprawy doktorskiej.

Warszawa, 04.09.2020


Prof. dr hab. Mieczysława Irena Boguś