

Olsztyn, dnia 30.11.2017 r.

Dr hab. Rajmund Sokół, prof. UWM
Katedra Parazytologii i Chorób Inwazyjnych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani mgr Ewy Anny Zaobidnej pt.: „Zmiany w szlaku sygnałowym Toll w odpowiedzi pszczoły miodnej *Apis mellifera* na zarażenie *Varroa destructor*”.

Wykonanej w Katedrze Biochemii na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem promotora Pani prof. dr hab. Krystyny Żółtowskiej i promotora pomocniczego Pani dr Elżbiety Łopieńskiej-Biernat.

Podstawą formalną wykonania recenzji była uchwała Rady Wydziału Biologii i Biotechnologii UWM w Olsztynie przedstawiona w piśmie skierowanym do mojej osoby z dnia 25.10.2017 r.

Rozprawę doktorską Pani mgr Ewy Anny Zaobidnej stanowi spójny tematycznie cykl prac doświadczalnych opatrzony wspólnym tytułem „Zmiany w szlaku sygnałowym Toll w odpowiedzi pszczoły miodnej *Apis mellifera* na zarażenie *Varroa destructor*” opublikowany w języku angielskim w czasopiśmie naukowych znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (JCR). W skład cyklu wchodzi 3 prace oryginalne autorstwa Pani mgr Ewy Anny Zaobidnej, promotora Pani prof. dr hab. Krystyny Żółtowskiej oraz promotora pomocniczego Pani dr Elżbiety Łopieńskiej-Biernat:

1. Zaobidna E.A., Żółtowska K., Łopieńska-Biernat E. 2017. *Varroa destructor* induces changes in the expression of immunity-related genes during the development of *Apis mellifera* worker and drone broods. *Acta Parasitologica*, 62(4): (IF: 1,185; pkt. 20).
2. Zaobidna E.A., Żółtowska K., Łopieńska-Biernat E. 2015. Expression of the prophenoloxidase gene and phenoloxidase activity, during the development of *Apis*

mellifera brood infected with *Varroa destructor*. Journal of Apicultural Science, 58(2): 85-93.
DOI:10.1515/jas-2015-0025 (IF: 0,944; pkt. 25).

3. Zaobidna E.A, Żółtowska K., Łopieńska-Biernat E. 2017. Expression and activity of lysozyme in *Apis mellifera carnica* brood infested with *Varroa destructor* - short communication. Journal of Apicultural Science, 61(2) DOI: 10.1515/jas-2017-0014. (IF: 0,944; pkt. 25).

Sumaryczny IF powyższych prac wynosi 3.073, a łączna liczba punktów według listy MNiSW 70. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem i autorem korespondencyjnym.

Przedstawione do oceny opracowanie liczy 66 stron, w tym prace stanowiące podstawę dysertacji. Doktorantka na pierwszej stronie opracowania zamieściła informacje o tym, że badania zostały wykonane – sfinansowane z projektów w ramach konkursów na finansowanie działalności służącej rozwojowi młodych naukowców i uczestników studiów doktoranckich w latach 2012-2015 oraz z projektu badawczego *Preludium* 2013/11/N/NZ9/00053 Narodowego Centrum Nauki, którego jest kierownikiem.

Opracowanie rozpoczyna *Spis treści*, następnie *Spis użytych skrótów* oraz *Streszczenie* w języku polskim i angielskim. W dalszej części opracowania Doktorantka zamieściła autoreferat podzielony na następujące rozdziały: *Wstęp* liczący 14 stron, dwustronicowy *Cel pracy*, *Materiał i metody* opisane na jednej stronie. Czwarty rozdział stanowi *Opis realizacji zadań* pracy doktorskiej liczący 4 strony, kolejny rozdział to *Wykaz publikacji* składających się na dysertację wraz z *Oświadczeniami* współautorów określający ich udział w badaniach oraz kserokopie 3 prac oryginalnych będących podstawą rozprawy doktorskiej. Rozdział 6 to *Podsumowanie* liczące 2 strony, 7. *Wnioski* oraz 8. *Bibliografia*.

We *Wstępie* Doktorantka bardzo sprawnie wprowadza czytającego w problematykę opisującą znaczenie i rolę pszczoły miodnej *Apis mellifera* w życiu człowieka. Wskazuje na zagrożenia występujące w środowisku jej życia, szczególnie kładąc nacisk na rolę groźnego ektopasożyta *Varroa destructor*. Podaje informacje o jego adaptacji do pszczoły miodnej i skutkach negatywnego oddziaływania. Wszystko podparte jest stosownie i starannie dobraną literaturą naukową. W dalszej części tego rozdziału przedstawia organizację rodziny pszczelej, panującą w niej hierarchią, podział pracy, liczbę osobników i wiele innych ważnych

informacji, które wykorzystwała w swoich badaniach. Zgrabnie zaprezentowała także cykl rozwojowy *Varroa* zaznaczając te postacie rozwojowe pasożyta, które posłużyły do realizacji badań. Słusznie zauważa, że bez cyklu rozwojowego robotnicy lub trutnia cykl *Varroa* nie zaistnieje. Zawarła tu również informacje o problemie, polegającym na współistnieniu obu owadów w komórce pszczelej oraz o charakterze różnych zmian u pszczół powodowanych przez *V. destructor*. Pobiera on selektywnie hemolimfę robotnicy lub trutnia w trakcie ich rozwoju osobniczego, co wyraża się niedorozwojem fizycznym, ubytkiem masy ciała, a przede wszystkim infekowaniem organizmu owada różnymi patogenami. W konsekwencji powoduje chorobę pszczoły miodnej powszechnie nazywaną warrozą. Z tego rozdziału poznamy przebieg tej choroby w rodzinie pszczelej oraz skutki opisane przez wielu badaczy tego problemu cytowanych przez Doktorantkę. W dalszej kolejności omawia mechanizmy odporności u owadów, w tym u pszczoły miodnej z uwzględnieniem szlaku Toll, który przedstawiła graficznie wraz z własną modyfikacją wynikającą z badań opisanych w pierwszym artykule stanowiącym podstawę rozprawy doktorskiej. W tym rozdziale również zwięźle przedstawiła rolę lizozymu jako czynnika odpowiedzi humoralnej o działaniu bakteriobójczym oraz inne ważne procesy immunologiczne aktywowane przez szlak Toll u owadów.

Celem pracy zgodnie ze stwierdzeniem zawartym na stronie 24 opracowania w j. polskim było:

1. zbadanie zmian ekspresji genów szlaku sygnałowego Toll u czterech stadiów czerwia oraz świeżo wygryzionych robotnic i trutni pszczoły miodnej w odpowiedzi na zarażenie ... tu zabrakło
2. analiza zmian zachodzących w rozwoju czerwia obu płci w odpowiedzi na stres jakim jest zarażenie *V. destructor* obejmująca badania ekspresji i aktywności dwóch immunologicznie ważnych enzymów:
 - a. profenolooksydazy oraz fenolooksydazy
 - b. lizozymu

Zaprezentowany cel podparła dwiema hipotezami badawczymi zakładającymi różnice osobnicze wynikające z płci i wieku badanych owadów.

Stwierdzam, że temat ocenianej pracy jest aktualny i wpisuje się w tematykę badań naukowych dotyczących funkcjonowania układu immunologicznego pszczoły miodnej pod wpływem immunomodulatora/supresora jakim jest *V. destructor*.

W rozdziale *Materiał i metody* Doktorantka przedstawiła co stanowiło materiał badawczy. Na jakim gatunku pszczoły miodnej wykonała badania i co istotne, że badania były oparte o naturalne zarażenie pszczół *V. destructor*. Moim zdaniem Doktorantka wykorzystała nowoczesne metody badawcze, które zastosowane w umiejętny sposób pozwoliły na zrealizowanie założonych celów badań.

W rozdziale *Realizacja zadań* pracy doktorskiej Doktoranta przedstawiła uzyskane wyniki w formie opisowej i wyodrębniła je jako zadania, zgodnie kolejnością opublikowanych artykułów:

W zadaniu 1, zgodnym z pierwszą publikacją wykazała różnice wzoru odpowiedzi genów szlaku Toll w rozwoju czerwiu dwu postaci pszczół w odpowiedzi na inwazję *V. destructor*. Oddziaływanie to – supresja genów immunologicznych jak wynika z przeprowadzonych badań była znacznie wyższa u imago robotnicy. Według Autorów tej publikacji wskazywać to może na różnice w kontroli odpowiedzi immunologicznej na sygnał zarażenia u obu płci.

W zadaniu 2, podzielonym na 2 publikacje, w pierwszej z nich wykazała, że indukowane zarażeniem przez *V. destructor* zmiany poziomu ekspresji pro i fenolooksydazy u różnych postaci rozwojowych pszczoły zależą od stadium rozwojowego i płci. W drugiej publikacji analizującej wpływ zarażenia na ekspresję genu lizozymu-1 oraz aktywność enzymatyczną lizozymu u różnych postaci rozwojowych robotnicy i trutnia wykazała, że wystąpiły różnice w ekspresji genu u imago robotnic i trutni, wolnych od inwazji oraz zarażonych, a także stwierdziła różnice w zależności od postaci rozwojowej robotnicy i trutnia.

Opisane powyżej zależności należy jednoznacznie uznać za oryginalne osiągnięcie Doktorantki. Potwierdzają to wyniki badań, ale i oświadczenia współautorów artykułów, że Doktorantka była autorem koncepcji naukowej badań, zaprojektowała i wykonała je jako główny wykonawca, następnie opracowała otrzymane wyniki badań oraz przeprowadziła analizę tych wyników.

W rozdziale 6 *Podsumowanie* Doktorantka omawia uzyskane w badaniach własnych wyniki w bardzo przemyślany sposób, świadczący o dużej dojrzałości naukowej. Podparte

jest to czytelną tabelą ilustrującą zmiany w ekspresji badanych przez nią genów związanych ze szlakiem Toll uwzględniającym różnice rozwojowe robotnicy i trutnia zarażonych oraz wolnych od inwazji *V. destructor*.

Z przeprowadzonych badań Doktorantka wyciągnęła 3 wnioski mające odzwierciedlenie w uzyskanych wynikach.

Ostatni 8 rozdział *Bibliografia* zawiera 80 pozycji aktualnego piśmiennictwa głównie anglojęzycznego.

Analizując przedstawiony do oceny przez Doktorantkę cykl publikacji uważam, że odrębna ocena recenzencka jest zbędna. Każda z zaprezentowanych publikacji była szczegółowo recenzowana pod kątem wymagań stawianym pracom oryginalnym oraz była poddana niezależnej ocenie merytorycznej przez recenzentów będących autorytetami w danej dziedzinie badań oraz w systemie, który zapewnia bezstronność. Dlatego w przypadku recenzji dysertacji w formie publikacji rolą recenzenta jest ocena wkładu indywidualnego kandydata/tki do stopnia naukowego w powstanie pracy zbiorowej. We wszystkich opracowaniach współdział Doktorantki został określony precyzyjnie jak zaznaczyłem powyżej, a publikacje powstały w wyniku logicznie zaplanowanych badań eksperymentalnych. Doktorantka zajęła się istotnym problemem jaki stwarza *V. destructor* w rodzinach pszczoły miodnej analizując wybrane wskaźniki odporności pszczoły, które mają duże znaczenie dla przeżywalności kolonii pszczół, a w konsekwencji dla człowieka.

Doktorantka słusznie zauważyła, że zagadnienia dotyczące szczegółowych badań immunosupresji *V. destructor* u pszczół nie zostały dobrze poznane i w tym kontekście badania eksperymentalne Doktorantki należy uznać za potrzebne i ważne.

Należy podkreślić, że z organizacyjnego punktu widzenia, przeprowadzenie trudnych badań poczynszy od pozyskania odpowiedniego materiału badawczego w terenie do badań laboratoryjnych było czasochłonne. Ponadto przekazane do oceny opracowanie w j. polskim jest starannie przygotowane pod względem edytorskim.

Podjęte przez Doktorantkę badania mają nie tylko aspekt poznawczy, ale i aplikacyjny. Uzyskane wyniki są ważne z punktu widzenia naukowego, hodowlanego a przede wszystkim dają asumpt do wyjaśnienia oraz opracowania skutecznego sposobu obniżenia populacji *V. destructor* w rodzinie pszczelej. Nie do przecenienia jest fakt, że badania zostały wykonane na materiale terenowym, gdzie zarażenie było naturalne, co

wyklucza otrzymanie wyników hipotetycznych i zaburzonych przez sztuczny lub błędnie zinterpretowany układ pasożyt-żywiciel.

Podsumowując, Doktorantka w pełni zrealizowała cele badawcze i jest uprawniona do uznania prezentowanego cyklu publikacji jako podstawy ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora na podstawie rozprawy naukowej stanowiącej część pracy zbiorowej. Dowiodła również, że posiada umiejętności planowania i prowadzenia badań naukowych, dobierania właściwych metod badawczych oraz dokonania prawidłowej analizy wyników.

Szczegółowa analiza opracowania w języku polskim ujawniła, że Doktorantka nie ustrzegła się pewnych uchybień, które z racji obowiązku recenzenta przedstawię w formie kilku uwag:

1. unikał bym określenia: pasożyt *Varroa destructor*, sama nazwa własna wskazuje, że mamy do czynienia z pasożytem, nic innego w biologii nie nosi tej nazwy,
2. w rozdziale *Materiał i metody* zabrakło mi opisu metod statystycznych, chociaż mam pełną świadomość, że ich opis jest w publikacjach,
3. rozdział *Realizacja zadań* pracy doktorskiej zatytułował bym logicznie i prosto *Wyniki badań*,
4. w nazwie badanych enzymów pro i fenolooksydaza mamy tzw. literówkę,
5. w oświadczeniu do trzeciej publikacji wkradł się błąd polegający na braku zakresu współdziałania trzeciego autora pracy, a we wszystkich oświadczeniach brak informacji kto pisał artykuły, być może zastąpiono to wyrażeniem interpretacja wyników,
6. największy niedosyt budzi we mnie rozdział *Wnioski*, zastosowano w nim formę beletrystyczną, stąd są bardzo mało precyzyjne, mimo, że wyniki badań są jednoznaczne. Nie dotyczy to wniosków zaprezentowanych w publikacjach, tu są precyzyjne.

Przytoczone uwagi mają jedynie charakter uzupełniający i nie wpływają na pozytywną ocenę merytoryczną pracy. Przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, a Doktorantka bezspornie wykazała się wiedzą oraz umiejętnością samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Biorąc powyższe pod uwagę, z przyjemnością stawiam wniosek o wyróżnienie recenzowanej dysertacji stosowną nagrodą.

Stwierdzam również, że rozprawa doktorska Pani mgr Ewy Anny Zaobidnej pt.: „**Zmiany w szlaku sygnałowym Toll w odpowiedzi pszczoły miodnej *Apis mellifera* na zarażenie *Varroa destructor***” odpowiada warunkom określonym w artykule 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym raz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DZ.U. z 2014 r., poz. 1852 ze zm. W dz. U. z 2015 r. poz. 249) i przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Ewy Anny Zaobidnej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Robert S. J. S. J.