



prof. dr hab. Piotr Świątek

Katowice 25-01-2016

Katedra Histologii i Embriologii Zwierząt

Uniwersytet Śląski

Strona | 1 ul. Bankowa 9, 40-007 Katowice

Ocena rozprawy doktorskiej p. mgr Karola Żłobińskiego pt.

„Różnicowanie nabłonka folikularnego w politroficznych jajnikach wybranych przedstawicieli motyli (Lepidoptera) i chrzączek (Trichoptera)”

Badania morfologiczne wykonywane dzięki wciąż ewoluującym w kierunku lepszej rozdzielczości i możliwości obrazowania 3D technikom mikroskopowym dostarczają nam wciąż nowych danych porównawczych. Na szczęście techniki te oraz możliwości, które dają wciąż przyciągają młodych adeptów nauki. Szczegółowe obrazowanie narządów, tkanek i komórek ma nadal sens a kolejnym dowodem na to jest recenzowana praca doktorska. Pan mgr Karol Żłobiński kontynuuje chlubną tradycję Zakładu Biologii Rozwoju Zwierząt Uniwersytetu Wrocławskiego badań nad gametogenezą stawonogów. Obiektem zainteresowań doktoranta jest struktura jajnika i proces oogenezy 10 gatunków owadów zaliczanych do dwu rzędów: Lepidoptera (motyle) i Trichoptera (chrzączki). Jajniki owadów i oogeneza stanowią bardzo wdzięczne pole do badań – u owadów opisano wiele różnych systemów organizacji jajnika a proces oogenezy jest bardzo dynamiczny i najczęściej widowiskowy. Dodatkowo owady to najliczniejsza gatunkowo grupa zwierząt, trudno się więc dziwić, iż tym tematом u owadów poświęcono tysiące oryginalnych prac badawczych i wiele książek. Mimo to daleko nam jeszcze od kompletnych opisów tych zagadnień dlatego z dużą ciekawością i zainteresowaniem należy przyjąć badania porównawcze wykonane przez p. Żłobińskiego. Lepidoptera i Trichoptera uważane są za grupy siostrzane i łączone jako Amphiesmenoptera, która to grupa z kolei przez wielu autorów uważana jest za takson siostrzany do Antliophora czyli grupy zawierającej Siphonaptera (pchły), Mecoptera (wojsiłki) i Diptera (muchówki). Wspominam o tym, ponieważ jednym z głównych celów pracy było porównanie otrzymanych wyników do badań nad *Drosophila melanogaster*.

Wybór materiału do badań jak i cele pracy uważam za bardzo dobre i nie budzące wątpliwości. Doktorant zajął się badaniami nad ogólną strukturą owariol i wybranymi aspektami

Katedra Histologii i Embriologii Zwierząt

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

ul. Bankowa 9, 40-007 Katowice

tel. 32 359 18 20 lub 32 359 13 42, fax 32 359 13 18

e-mail: piotr.swiatek@us.edu.pl



oogenezy – przede wszystkim różnicowaniem i dywersyfikacją nabłonka folikularnego – w dwóch rodzinach motyli tj. Sphingidae i Micropterigidae oraz pięciu rodzinach chruścików:

Hydropsychidae, Polycentropodidae, Phryganeidae, Limnephilidae i Sericostomatidae. Wybór ten był bardzo trafny – chociaż literatura tematu poświęcona motylom jest bardzo obszerna, to wybrane grupy nie były intensywnie badane a ponad to zestawienie gatunków bazalnych (Micropterigidae – 1 badany przedstawiciel) i wyspecjalizowanych (Sphingidae – 4 gatunki) motyli w celach porównawczych ma duży sens. Z rzędu Trichoptera wybrano do badań po jednym przedstawicielu z każdej rodziny a uzyskane dane są bardzo wartościowe ponieważ chruściki rzadko cieszyły się uwagą badaczy zainteresowanych tymi procesami. Autor we Wstępie jasno postawił cele pracy. W sumie jest to jeden cel nadrzędny: analiza porównawcza różnicowania i dywersyfikacji nabłonka folikularnego. Ten nadrzędny cel wygenerował wiele pytań, na które Autor chciał odpowiedzieć. Czy reprezentanci badanych rodzin motyli i chruścików o odmiennej pozycji filogenetycznej mają taką samą organizację owarioli i tą samą liczbę subpopulacji komórek folikularnych? Czy są i jakie różnice w ich morfologii i ultrastrukturze? Które komórki folikularne i jak migrują? Czy istnieją „homologi” komórek polarnych, które u *Drosophila* determinują losy różnych subpopulacji komórek folikularnych? Jak wspomniano uzyskane dane Autor wykorzystał nie tylko do porównań w obrębie dwu badanych rzędów ale także do porównań z danymi znanymi z *D. melanogaster* i innymi Amphiesmenoptera. Ponad to ambicją Autora było wykorzystanie uzyskanych wyników w rozważaniach filogenetycznych dotyczących pokrewieństw w obrębie Amphiesmenoptera.

Od razu chciałbym wypunktować najważniejsze osiągnięcia prezentowanych badań, które bez wątpliwości przesądzą o tym, że przedstawiona do recenzji praca stanowi oryginalne osiągnięcie naukowe i spełnia ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim:

- oryginalny opis jajników 4 gatunków zawisaków i 1 gatunku skrzydliniakowatych, wykazanie wielu podobieństw jak i istotnych różnic (filamenty terminalne, styliki międzypęcherzykowe) w organizacji owariol pomiędzy tymi rodzinami,

- oryginalny opis morfologii i ultrastruktury jajników 5 przedstawicieli chruścików, w tym wykazanie, iż jajnik *Polycentropus irroratus* znacznie różni się od jajników pozostałych gatunków badanych chruścików a jest podobny do analizowanego przedstawiciela skrzydliniakowatych *Micropterix calthella* (np. u obu gatunków brak stylików międzypęcherzykowych), dane te wg. Autora świadczą o bliskim pokrewieństwie obu grup,



- szczegółowy opis różnicowania się oraz zachowania w czasie postępu oogenezy komórek folikularnych wszystkich analizowanych gatunków z obu rzędów, w tym wykazanie iż formuje się 5 subpopulacji tych komórek i stwierdzenie, iż procesy różnicowania i dywersyfikacji komórek folikularnych w obu badanych rzędach są bardzo podobne, są to kolejne cechy potwierdzające bliskie pokrewieństwo Lepidoptera i Trichoptera

- wykazanie, iż tylko komórki centrypetalne badanych gatunków mają zdolność do aktywnej migracji,

- dokonanie szczegółowego porównania badanych procesów z danymi dotyczącymi jajnika *D. melanogaster*, porównania te świadczą po raz kolejny, iż pewnych danych z gatunków modelowych nie można uogólniać, gdyż nawet w grupach blisko spokrewnionych wiele procesów przebiega inaczej.

By osiągnąć te rezultaty Autor znakomicie opanował i zastosował wiele mikroskopowych technik badawczych. Badał zarówno całościowo preparowane owariole (kontrast Nomarskiego i mikroskop fluorescencyjny – preparaty barwione histochemicznie oraz immunohistochemicznie), jak i materiał sekcjonowany na skrawki półcienkie zatapiane w żywicach eponowych i akrylowych różnorodnie barwiony w celu identyfikacji np. kwasów nukleinowych, białek srebrochłonnych czy polisacharydów oraz dokonywał analizy skrawków ultracienkich w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Osobno chciałbym wspomnieć o badaniach przyżyciowych bo one w mojej opinii stanowią jeden z wartych inwestowania kierunków rozwoju współczesnej biologii. Pan mgr Żłobiński także wykonał takie analizy wizualizując w żywych komórkach cytoskielet mikrotubularny i siateczkę śródplazmatyczną. Wyrazem natomiast znakomitego opanowania technik badawczych jest dokumentacja fotograficzna pracy; jakość jej jest wyśmienita i może stanowić wzór godny do naśladowania. Na pewno oprócz predyspozycji Autora niebagatelną rolę w uzyskaniu tak dobrej dokumentacji odegrała szkoła macierzystego Zakładu. Bardzo ładne i czytelne są wstawione w tekst pracy oryginalne schematy wykonane przez Autora. Generalnie interpretacja przedstawionej dokumentacji nie budzi zastrzeżeń, pewne wątpliwości przedstawię poniżej. Chciałbym tu także dobitnie podkreślić, iż Autor pracował na organizmach niemodelowych, pozyskiwanych z terenu co na pewno znacznie ograniczało liczbę powtórzeń poszczególnych analiz i wykorzystanych technik. Godny pochwały jest także pomysł hodowli 3 gatunków



zawisakowatych – umożliwiło to analizę jajnika w stadium poczwarki, co u owadów ma duże znaczenie bowiem u większości gatunków imagines nie mają funkcjonalnego germarium.

Strona | 4 Chciałbym teraz odnieść się do samej rozprawy doktorskiej. Ma ona układ klasyczny. Od razu chciałbym zaznaczyć, że praca jest wydana bardzo starannie. Widać, że Autor przywiązał dużo uwagi do edytorskiej strony pracy. Wszystko tu jest dopracowane w najmniejszych szczegółach – Autor starał się ułatwić maksymalnie przyswajalność pracy i np. wytłuszczał w tekście różnorodne terminy a cytowana literatura jest zaznaczona na niebiesko, w dokumentacji zaś pewne obrazy zostały sztucznie pokolorowane. Wstęp jest krótki, bardzo syntetyczny i ogólnie zarysowuje najważniejsze fakty dotyczące budowy jajnika owadów i procesów różnicowania nabłonka folikularnego – te ostatnie omówiono na przykładzie tylko *D. melanogaster*. We Wstępie, podano także omówione już wcześniej cele pracy oraz zamieszczono krótką notkę o pozycji systematycznej motyli i chrzączek. W Materiałach i Metodach przedstawiono dane na temat badanych gatunków oraz opisano w sposób szczegółowy zastosowane metody badawcze. Opis metodyki jest jasny i nie budzi zastrzeżeń. Jedynie brakuje tu danych ile osobników danego gatunku było analizowanych i ile powtórzeń badań wykonano. Wyniki są obszerne (23 strony), napisane jasnym, precyzyjnym językiem. Podzielono je kilka podrozdziałów, w których osobno opisano budowę owarioli i losy komórek folikularnych zawisakowatych, skrzydliniakowatych, *Polycentropodidae* i pozostałych 4 gatunków chrzączek. Jak wspomniano wyniki ilustrowane są dokumentacją o doskonałej jakości (28 tablic każda zawiera co najmniej kilka mikrofotografii) oraz okraszone sześcioma schematami i zbiorczą tabelą podsumowującą dane na temat subpopulacji komórek folikularnych. Dyskusja podzielona jest na 3 podrozdziały; w pierwszym Autor porównuje swoje dane dotyczące ogólnej budowy owariol z danymi literaturowymi dotyczącymi motyli i chrzączek oraz *D. melanogaster*. W kolejnym wg tego samego schematu skupia się głównie na różnicowaniu nabłonka folikularnego i różnorodnych aspektach z tym związanych jak np. połączenia pomiędzy komórkami folikularnymi czy produkcja przez nie prekursorów żółtka. W ostatnim podrozdziale zatytułowanym „Rozważania filogenetyczne” stara się odnieść swoje dane do współczesnych koncepcji filogenetycznych dotyczących *Amphiesmenoptera* – zostało to już zaznaczone wcześniej. Podsumowanie to zestaw 11 punktów sumujących uzyskane dane i ich interpretację porównawczą i filogenetyczną. Nie mam żadnych uwag co do wykorzystanej w pracy literatury (260 pozycji). Autor cytuje zarówno pionierskie jak i ostatnie prace dotyczące omawianych problemów. I choć w kilku miejscach prac cytowanych wydaje się być za dużo (np. w odniesieniu do *Drosophila* cytowane są np. liczne prace



oryginalne na dany temat i zarazem wiele prac przeglądowych, niekiedy bardzo ogólnych) to sposób napisania pracy dobitnie świadczy o tym, że Autor zna cytowaną literaturę i sprawnie się w niej porusza.

Strona | 5

Nie mam wątpliwości, iż aktualnie priorytetem Autora oraz Pań Promotor jpowinno być opublikowanie uzyskanych wyników. Chciałbym więc w tym miejscu podzielić się z kilkoma komentarzami, zapytaniem czy wątpliwości, które pojawiły się w wyniku analizy niniejszej pracy:

- str. 7 „.. białka ekspresjowanego przez” – to jakaś niezręczna kalka językowa, ekspresji ulegają geny, białka są produkowane, wytwarzane itp.

- str. 12 i następne – w wielu miejscach Autor pisze „Poszczególne gatunki motyli (chrzączków) oznaczył” – oznacza się (i bada) osobniki danego gatunku

- str. 15 Metody rodz. 2.2 – autor wymienia tu wiele metod, które nie zostały w pracy pokazane w żaden sposób (tzn. nie wspomniano o nich w Wynikach i nie ma żadnej dokumentacji). Chodzi tu np. o barwienie Azurem B, metodzie AgNOR czy wykrywaniu białek metodą rtęciowo-bromofenolową. Można co prawda domyślić się, że tymi metodami analizowano np. domeny jądrowe w pęcherzyku zarodkowym i trofocytach (wspominano ogólnie o analizach tych struktur w Wynikach na str. 22, 31, 37) ale wydaje mi się nie celowe opisywanie całej metodyki zastosowanej w czasie studiów doktoranckich a nie pokazanej w żaden sposób w pracy.

Mam tu kolejne zapytania/komentarze metodyczne– szczególnie w kontekście publikowania wyników tych badań. Czy Autor planował lub wykonywał badania w SEM? Szczególnie były by przydatne obrazy powierzchni kapsuł jajowych. Poza tym Autor duży nacisk w pracy kładzie na „aktywność proliferacyjną” różnych subpopulacji komórek folikularnych i porównuje ją jako „dużą”, „małą”, brak itp. W pracy nie zaprezentowano żadnych obliczeń statystycznych by wnioski takie były w pełni uprawnione. Z pracy wynika, że aktywność ta była wnioskowana jedynie na podstawie obserwacji figur mitotycznych na skrawkach bądź na preparatach całościowych analizowanych w mikroskopie fluorescencyjnym. By wyniki były bardziej wiarygodne sugerowałbym zastosowanie znakowań specyficznych dla mitozy jak metoda z zastosowaniem BrdU, znakowanie przeciwciałem skierowanym przeciwko ufosforylowanej formie histonu H3 czy zastosowanie PCNA. Ponieważ, u większości zwierząt podziały komórkowe uzależnione są także od cyklu dobowego metody te pozwoliły by skuteczniej wykrywać komórki wchodzące w mitozę i



umożliwić odpowiednie obliczenia. W pracy brakuje mi także jakichkolwiek pomiarów morfometrycznych – są one łatwe do przeprowadzenia i dają konkretne wyniki. Autor często pisał np. o komórkach dużych, małych, zmniejszającej się wysokości nabłonka itp. – podanie tutaj konkretnych wartości na pewno było by dobrym potwierdzeniem obserwacji. Ostatnie już pytanie metodyczne: domyślam się, że tylko ograniczenia w dostępie do materiału uniemożliwiły Autorowi wykonanie analiz trójwymiarowych? Szczególnie pytam o to w kontekście np. wędrówki komórek centrypetalnych czy kontaktu komórek bieguna tylnego z blaszką podstawną. Rozumiem także, że takie stwierdzenia jak to mówiące iż komórki bieguna tylnego *Smerinthus ocellatus* pokazane w Tab. VIII Fot. 5 nie mają kontaktu z blaszką podstawną padły na podstawie analiz seryjnych skrawków ultra- bądź półcienkich? Nie zaznaczono tego w pracy a pojedyncze obrazy ultrastrukturalne jak ten przedstawiony w Tab. VIII Fot. 5 nie są żadnym dowodem, że ta konkretna komórka nie ma kontaktu z blaszką podstawną. Coraz łatwiej dostępne mikroskopowe techniki 3D pozwoliły by jednoznacznie wyjaśnić takie wątpliwości.

- str. 29 Wyniki, zastanawiam się dlaczego w pracy nie pokazano żadnej dokumentacji dotyczącej formowania mikropyle *Laothoe populi*? Czy u innych analizowanych gatunków motyli i chrzączek obserwowano mikropyle?

- Tab. II Fot. 4. Intrygują mnie fragmenty komórki widoczne w prawym górnym rogu mikrofotografii. Czy to też jest fragment komórki prefolikularnej?

- Tab. XII Fot. 4. Pytanie wynikające z obserwacji własnych: czy takie specyficzne barwienie Tubulin Tracker Green nie wynika raczej z tego, iż barwnik ten wnika nierówno do żywych komórek? Słowem czy zawsze obserwował Pan tylko kilka komórek stylika międzypęcherzykowego, w których znakowały się mikrotubule? Myślę, że w takich badaniach trzeba wykonać wiele prób i podchodzić ostrożnie do ich interpretacji.

Dyskusja str. 46. Wydaje mi się, że do pełnego porównywania organizacji germarium i wyciągania wniosków były by konieczne badania wcześniejszych niż imago stadiów rozwojowych Micropterygidae i badanych Trichoptera.

Dyskusja str. 58. Stwierdzenie, że komórki centrypetalne Amphiesmenoptera nie wydają się być analogiczną populacją do komórek centrypetalnych Diptera. Chyba chodziło tu o to, że nie są populacją homologiczną?



Dyskusja str. 63 Autor pisze, iż „Wyniki badań (....) uzyskane w niniejszej pracy również zostały wykorzystane w analizie filogenetycznej”. Jest to zdanie na wyrost, bo Autor nie wykonywał w pracy żadnych analiz filogenetycznych, nie zrobił żadnej matrycy cech, nie zastosował żadnej filogenetycznej metody badawczej i nie zaprezentował żadnego drzewa filogenetycznego.

- Nigdzie w pracy nie znalazłem odpowiedzi na ostatni cel pracy (str. 10) – czy taka subpopulacja „organizatorów morfogenetycznych” u badanych gatunków istnieje??

Mam nadzieję, że w/w uwagi i zapytania są konstruktywne i pomogą Autorowi w dalszych pracach nad upublicznieniem prezentowanych wyników.

Podsumowując, we wniosku końcowym stwierdzam, iż przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska stanowi kompleksowe i staranne opracowane osiągnięcie naukowe wnoszące oryginalne dane do literatury tematu i tym samym w pełni spełnia ustawowe wymogi stawiane pracom doktorskim. Pan mgr Karol Żłobiński w pełni zasługuje na dopuszczenie go do kolejnych etapów przewodu doktorskiego o co wnioskuję do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Jednocześnie rekomenduję Wysokiej Radzie wyróżnienie niniejszej pracy. Wyróżnia się bowiem ona na tle znanych mi tego typu opracowań przede wszystkim poziomem dokumentacji i ponadprzeciętnym, w mojej ocenie, zaangażowaniem autora w pozyskanie i wykonanie różnorodnych analiz mikroskopowych jajników 10-ciu gatunków owadów.

Świątek Piotr