



WARSZAWSKI
UNIwersytet
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII OGÓLNEJ I PARAZYTOLOGII

Warszawa, 20 września 2024r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

mgr Ewy Magdaleny Pyrki

pod tytułem

**„Taksonomiczne i filogenetyczne aspekty układu pasożyt-żywiciel (Digenea, Strigeidae)
w oparciu o badania molekularne”**

Podstawą sporządzenia niniejszej recenzji jest uchwała nr 77/2022 Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne Uniwersytetu Wrocławskiego z dnia 21 kwietnia 2022r. oraz pismo prof. dr hab. Marcina Kadeja Przewodniczącego tejże Rady z dnia 22 lipca 2024r.

Rozprawa doktorska mgr Ewy Magdaleny Pyrki została przygotowana w Zakładzie Parazytologii Wydziału Nauk Biologicznych pod kierunkiem promotora dr hab. Joanny Hildebrand, prof. UW, a jej zasadniczą część stanowi cykl trzech powiązanych tematycznie, oryginalnych artykułów naukowych. W dwóch z nich doktorantka jest pierwszą autorką, a w jednym współautorką.

Wybór tematyki badawczej uważam za w pełni uzasadniony, istotny z poznawczego punktu widzenia i wpisujący się w problemy podejmowane przez promotora rozprawy.

Układ pasożyt-żywiciel jest jedną z najbardziej złożonych i różnorodnych biologicznych interakcji. W kontekście ewolucji, zależność między pasożytem a jego żywicielem kształtuje ich biologię, taksonomię oraz filogenezę. Badania molekularne, w tym analiza DNA, RNA oraz białek, pozwoliły na głębsze zrozumienie tych zależności, umożliwiając precyzyjne określenie relacji taksonomicznych i filogenetycznych. Tradycyjna taksonomia opierała się głównie na cechach morfologicznych i fizjologicznych. Jednakże rozwój technik molekularnych, takich jak sekwencjonowanie DNA, czy analiza markerów

molekularnych (np. genów mitochondrialnych, rybosomalnych), umożliwił bardziej precyzyjną klasyfikację organizmów, w tym pasożytów i ich żywicieli. Badania molekularne pozwalają na identyfikację gatunków pasożytów nawet wtedy, gdy różnice morfologiczne są minimalne. Sekwencjonowanie markerów genetycznych, takich jak geny rybosomalne (np. 18S rRNA) lub mitochondrialne (COI), umożliwia precyzyjne rozróżnienie tych gatunków. Ponadto, wykorzystanie narzędzi molekularnych pozwala na badanie tzw. gatunków kryptycznych, czyli takich, które są morfologicznie niemal identyczne, ale genetycznie wyraźnie odrębne. Sytuacja ta stosunkowo często występuje wśród pasożytów, co znacznie komplikuje klasyfikację i zrozumienie ich biologii.

Filogeneza, czyli rekonstrukcja drzew ewolucyjnych, opiera się na badaniu wspólnych cech genetycznych organizmów. Dzięki analizom molekularnym możliwe jest określenie nie tylko pochodzenia pasożytów, ale także ewolucji ich interakcji z żywicielami. Stąd Jednym z najważniejszych aspektów filogenezy układu pasożyt-żywiciel jest zjawisko koewolucji. Koewolucja odnosi się do wzajemnych, powiązanych zmian ewolucyjnych zachodzących zarówno u pasożyta, jak i u żywiciela. Badania molekularne mogą wykazać, jak pasożyty dostosowują swoje strategie przystosowawcze do żywiciela (np. reakcji immunologicznych), a także jak żywiele rozwijają mechanizmy obronne w odpowiedzi na zarażenie. W niektórych przypadkach drzewa filogenetyczne pasożytów i ich żywicieli są ze sobą zgodne, co sugeruje, że pasożyty koewoluowały ze swoimi żywicielami przez długie okresy. Badania molekularne potwierdziły tę zgodność u wielu grup pasożytów, gdzie linie ewolucyjne pasożytów i żywicieli rozgałęziały się równocześnie.

Warto dodać, że Jednym z kluczowych zagadnień badanych dzięki metodom molekularnym jest zjawisko zmiany żywiciela przez pasożyta. Badania filogenetyczne wykazały, że niektóre pasożyty przenoszą się na zupełnie nowych żywicieli, niekiedy z odległych grup filogenetycznych. Analiza molekularna umożliwia identyfikację takich przypadków i wyjaśnienie mechanizmów, które umożliwiają pasożytom adaptację do nowych środowisk i żywicieli.

Taksonomiczne i filogenetyczne badania układu pasożyt-żywiciel na podstawie technik molekularnych dostarczają niezwykle precyzyjnych narzędzi do zrozumienia ewolucji tych złożonych relacji. Metody te, umożliwiając identyfikację gatunków pasożytów, badanie koewolucji oraz zmian żywiciela, rewolucjonizują klasyfikację i interpretację relacji ewolucyjnych między pasożytami a ich żywicielami. W przyszłości dalszy rozwój narzędzi

molekularnych pozwoli na jeszcze głębsze zrozumienie mechanizmów ewolucyjnych leżących u podstaw tych interakcji. W tym kontekście badania przeprowadzone przez doktorantkę przyczyniają się do lepszego zrozumienia biologii i filogenezy przedstawicieli Strigeidae Railliet, 1919.

Rozprawa doktorska mgr Ewy Pyrki ma klasyczny układ, a zasadniczą część rozprawy rozpoczyna *Wstęp* poprzedzający załączone artykuły. Cykl publikacyjny rozprawy stanowią niżej wymiotne publikacje:

- 1 **Pyrka E**, Kanarek G, Zaleśny G, Hildebrand J. Leeches as the intermediate host for strigeid trematodes: genetic diversity and taxonomy of the genera *Australapatemon* Sudarikov, 1959 and *Cotylurus* Szidat, 1928. *Parasites & Vectors*, 2021, 14: 44; doi:10.1186/s13071-020-04538-9. Wskaźnik Impact Factor - 4.047 (2021); punkty MEiN - 100 (2021).
- 2 **Pyrka E**, Kanarek G, Gabrysiak J, Jeżewski W, Cichy A, Stanicka A, Żbikowska E, Zaleśny G, Hildebrand J. Life history strategies of *Cotylurus* spp. Szidat, 1928 (Trematoda, Strigeidae) in the molecular era - Evolutionary consequences and implications for taxonomy. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2022, 18: 201-211; doi: 10.1016/j.ijppaw.2022.06.002. Wskaźnik Impact Factor - 2.6 (2022); punkty MEiN - 100 (2022)
3. Kanarek G, Gabrysiak J, **Pyrka E**, Jeżewski W, Stanicka A, Cichy A, Zaleśny G, Hildebrand J. Hyperparasitism among larval stages of Digenea in snail hosts: sophisticated life strategy or pure randomness? The scenario of *Cotylurus* sp. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2024, 200(4): 865–875; doi: 10.1093/zoolinnean/zlad102. Wskaźnik Impact Factor - 3.0 (2024); Punkty MNiSW - 140 (2024)

Powyższe periodyki należą do uznanych w świecie czasopism naukowych o wysokim, jak dla reprezentowanej przez Doktorantkę dziedziny, współczynniku oddziaływania (IF). Świadczy to pośrednio o wartości prezentowanych przez Doktorantkę wyników badań.

Rozprawa doktorska mgr Ewy Pyrki mieści się na 101 numerowanych stronach, włączając w to kopie publikacji i oświadczenia współautorów. Została ona podzielona na rozdziały i podrozdziały, z których poza kopiami publikacji, najważniejsze to *Wstęp*, *Cel i Hipotezy*, *Wyniki Przedstawione w Publikacjach* oraz *Podsumowanie*.

Zanim przejdę do omówienia treści rozprawy, chciałbym odnieść się do jej tytułu „Taksonomiczne i filogenetyczne aspekty układu pasożyt–żywiciel (Digenea, Strigeidae) w

oparciu o badania molekularne”, który uważam za niezbyt udany. Już sama jego konstrukcja budzi pewne wątpliwości „...aspekty układu pasożyt–żywiciel (Digenea, Strigeidae)...”. Może chodziło o taksonomiczne i filogenetyczne aspekty układu pasożyt–żywiciel na przykładzie cyklu życiowego przywr z rodziny Strigeidae?

Część merytoryczną rozpoczynają streszczenia w języku polskim i angielskim oraz *Wstęp*, który jest spójny, przemyślany i odnosi się do najważniejszych pozycji literaturowych. Rozdział ten jest prawidłowo skomponowany pod względem merytorycznym i dobrze wprowadza w temat rozprawy. Doktorantka porusza w nim zagadnienie układu pasożyt–żywiciel, przedstawiając kilka kluczowych informacji, jak: relacje pasożytnicze, koewolucja pasożytów z żywicielami oraz cykle rozwojowe pasożytów. Całość przedstawia bogate tło teoretyczne, które jest istotne dla badań nad rodziną Strigeidae. Choć moim zdaniem zbyt syntetycznie została potraktowana rodzina przywr będąca zainteresowaniem doktorantki. Tekst zawiera szczegółowe opisy morfologiczne i cykli życiowych, co mogłoby zostać wzbogacone dodatkowymi rycinami. Brakuje na przykład grafiki przedstawiającej morfologię Strigeidae. Rycina 1 jest słabo opisana, należałoby rozwinąć legendę i uzupełnić rycinę o dodatkowe grafiki takie jak np. stadia larwalne. Nie znalazłem też odniesienia do tej ryciny w tekście. Dodatkowo, choć wstęp dobrze kontekstualizuje hipotezy i cele, brakuje w nim powiązania z konkretnymi pytaniami badawczymi. Warto było szerzej przedstawić, jakie nowe badania zostały przeprowadzone, aby testować hipotezy i jak będą one wpływać na zrozumienie cykli życiowych i systematyki Strigeidae.

Bibliografia Wstępu liczy 83 pozycje oraz 3 odnośniki do stron internetowych. Skoro prace doktorantki przyczyniły się do lepszego poznania zróżnicowania i biologii badanej rodziny przywr, to czy cytowania jej publikacje nie powinny wzbogacić wstępu o te najnowsze informacje?

Postawione przez doktorantkę hipotezy badawcze zakładały, że (1) Metody morfometryczne uznawane za diagnostyczne są niewystarczające do prawidłowej klasyfikacji taksonów przywr z rodziny Strigeidae oraz (2) Wykorzystanie markerów molekularnych jest niezbędne do prawidłowej weryfikacji taksonomicznej i biologii układu pasożyt – żywiciel. Druga hipoteza jest niezgrabnie sformułowana i nie do końca wiadomo w jaki sposób użyte przez doktorantkę markery molekularne miałyby przyczynić się weryfikacji biologii układu pasożyt–żywiciel w przypadku przywr z rodziny Strigeidae. Proszę w tym miejscu o odpowiednie wyjaśnienie i doprecyzowanie, co Doktorantka miała na myśli.

Powyższe hipotezy Doktorantka postanowiła zweryfikować stawiając sobie za główny cel analizę taksonomiczną przedstawicieli rodziny Strigeidae występujących w Polsce oraz trzy cele szczegółowe tj:

1. Molekularna charakterystyka przedstawicieli Strigeidae (*Australapatemon*, *Cotylurus*) w odniesieniu do aktualnej systematyki.
2. Określenie przydatności i informatywności poszczególnych markerów molekularnych.
3. Analiza zróżnicowania i specyficzności żywicielskiej przedstawicieli Strigeidae, z uwzględnieniem biologii.

W dalszej części znajdują się kopie artykułów wchodzących w cykl publikacji i oświadczenia współautorów wskazujące wkład Doktorantki w ich przygotowanie.

W załączonych pracach Doktorantka w sposób logiczny i spójny odpowiada na postawione w rozprawie hipotezy i realizuje zdefiniowane cele. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż wyniki zostały dodatkowo przedstawione na bardzo dobrze opracowanych i przemyślanych rycinach, do przygotowania których niezbędna jest znajomość narzędzi bioinformatycznych. Nie będę szczegółowo przedstawiał wyników kolejnych publikacji. Pozwolę sobie jedynie na wskazanie tych osiągnięć Doktorantki, które uważam za najważniejsze.

- Ujawnienie polifiletycznego charakteru gatunków *C. syrius* Dubois, 1934 i *C. cornutus* (Rudolphi, 1809) Szidat, 1928 oraz niejasny status *Cotylurus raabei* (Bezubik, 1958).
- Wykazanie istnienia dwóch odrębnych linii filogenetycznych i ekologicznych w obrębie rodzaju *Cotylurus* różniących się strategiami życiowymi - jedną wykorzystującą pijawki, i drugą, wykorzystującą ślimaki jako żywicieli form inwazyjnych.
- Stwierdzenie przypadkowego charakteru hiperpasożytnictwa metacerkarii *Cotylurus* sp. na rozmnażających się bezpłciowo stadiach rozwojowych przywr (sporocystach i/lub rediach) występujących w ślimakach oraz braku widocznych trendów faworyzujących taką strategię życiową
- Zaobserwowanie znacznie wyższej prevalencji i średniej intensywności występowania metacerkarii u ślimaków niezarażonych sporocystami i/lub rediami,

niż u ślimaków, w których one występowały. Może to sugerować potencjalne negatywne oddziaływania między tymi elementami helmintofauny, a w efekcie wpływać na zgrupowania pasożytniczych u ślimaków.

- Stwierdzenie użyteczności fragment genu COI mDNA jako markera zarówno do identyfikacji przywr, jak i do analiz zróżnicowania wewnątrz rodzajowego. Doktorantka potwierdziła również informatywność i użyteczność fragmentu genu 28S rDNA w identyfikacji taksonomicznej oraz jego większą przydatność w analizach pokrewieństw filogenetycznych przywr w porównaniu z 18S rDNA.

Załączone do rozprawy publikacje Doktorantki, stanowią zasadniczą część rozprawy. Ukazały się one w bardzo dobrych i cenionych czasopismach z dziedziny, co gwarantuje, że zostały już zrecenzowane przez ekspertów zajmujących się tą tematyką badawczą. Trudno jest zatem dokonywać ponownej oceny prac, które z pewnością zostały poprawione i uzupełnione o sugestie recenzentów. Z ciekawości naukowej pozwolę sobie na kilka komentarzy.

Publikacja A1. Artykuł dostarcza cennych informacji na temat występowania i różnorodności metacercarii w pijawkach oraz ich taksonomii. Wyniki potwierdzają znaczenie pijawek jako żywicieli pośrednich przywr i dostarczają nowych danych na temat różnorodności gatunkowej oraz struktur genetycznej w obrębie rodzajów *Australapatemon* i *Cotylurus*.

Poniżej zamieszczam krótkie, dodatkowe komentarze:

- Próba badana jest stosunkowo ograniczona. Przebadano 153 osobników pijawek, co może być niewystarczającą liczbą, aby w pełni zrozumieć bogactwo gatunkowe przywr i zróżnicowanie biologiczne w większej skali. Taka próba może nie odzwierciedlać pełnego zróżnicowania na terenie obszaru Polska.
- Artykuł koncentruje się na wynikach z trzech regionów Polski (nie podano liczby stanowisk, w których był zbierany materiał) i na kilku gatunkach pijawek. Rozszerzenie badań na inne lokalizacje geograficzne oraz dodatkowe gatunki pijawek mogłoby dostarczyć pełniejszego obrazu rozprzestrzenienia i różnorodności.
- W niektórych lokalizacjach liczba prób była niewielka, co może wpływać na dokładność wyników i ogólne wnioski. Na przykład, z Dolnego Śląska zbadanych zostało tylko 13 osobników gatunku *Erpobdella octoculata*, co może być niewystarczające do uzyskania reprezentatywnych danych.

- Wydaje się, że analiza GMYC sugeruje, że w obrębie niektórych kładów (np. *C. strigeoides* i *C. syrius*) wyniki nie są w pełni jednoznaczne, co może wskazywać na potrzebę dalszej weryfikacji i potwierdzenia rozdziału gatunków. Czy i jakie badania są planowane do wykonania w tym kontekście?
- Badania Doktorantki nie uwzględniają w pełni różnic ekologicznych i środowiskowych (np. warunków wodnych, dostępności innych potencjalnych żywicieli pośrednich), które mogą wpływać na częstość i intensywność zarażenia. Włączenie takich zmiennych mogłoby pomóc w lepszym zrozumieniu czynników wpływających na występowanie metacerkarii.
- Wyniki Doktorantki sugerują, że pijawki pełnią ważną rolę w krążeniu przywr w środowisku wodnym, ale praca nie dostarcza dogłębnej analizy, jakie mogą być tego implikacje dla szerszego ekosystemu wodnego. Szersze ujęcie ekologicznych konsekwencji tych interakcji mogłoby wzbogacić dyskusję.

Publikacja A2. Wyniki tej publikacji wskazują na istotne różnice w prevalencji i intensywności zarażenia metacercariami *Cotylurus* w zależności od lokalizacji i gospodarza, co może mieć znaczenie ekologiczne i biologiczne. Analizy molekularne i filogenetyczne dostarczają solidnych podstaw do zrozumienia różnorodności i taksonomii *Cotylurus* spp., ale również wskazują na potrzebę dalszych badań w celu pełniejszego rozpoznania potencjalnych kompleksów gatunkowych i ich różnorodności. Podobnie jak w poprzednim przypadku proszę o odniesienie się do poniższych komentarzy:

- Czy dane molekularne były porównywane z identyfikacją morfologiczną *Cotylurus*?
- Proszę o komentarz czy była możliwa kontaminacja podczas pobierania prób z tkanek ślimaka i czy mogło to wygenerować błędy. Jeśli kontaminacja była możliwa, to w jaki sposób jej unikano?
- Doktorantka wskazuje istotne różnice w poziomie zarażenia między gatunkami żywicieli, zabrakło jednak głębszej analizy, która wyjaśniałaby, jakie czynniki mogą za to odpowiadać. Należy wziąć pod uwagę różnice w biologii ślimaków. Nie wskazano również, czy wiek, wielkość, oraz stan fizjologiczny ślimaków były analizowane jako potencjalne zmienne.

- Istnieje duża zmienność w intensywności zarażenia w różnych lokalizacjach i wśród różnych gatunków ślimaków. Może to sugerować wpływ czynników środowiskowych lub biologicznych, które powinny być uwzględnione w przyszłości.

Ponieważ udział Doktorantki w powstaniu **Pracy A.3** jest ograniczony do 30%, pozwalam sobie na brak szczegółowego komentarza w recenzji. Podkreślę tylko, że jest to publikacja wartościowa, solidna metodologicznie i dostarczająca cennych informacji na temat hiper Pasożytnictwa metacerkarii *Cotylurus* sp.

Na koniec, tradycyjnie proszę Doktorantkę o wskazanie, które z przedstawionych wniosków uznaje za najważniejsze i dlaczego? Jakie kierunki badań wyznaczyła, o ile może nam to zdradzić?

Niezależnie od zawartych w recenzji drobnych uwag, wysoko oceniam rozprawę doktorską mgr Ewy Magdaleny Pyrki. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki są nowatorskie, wartościowe i znacznie poszerzają naszą wiedzę o taksonomii, filogenezie i biologii przywr z rodziny Stigeidae. Zastosowanie odpowiednio dobranych metod oraz różnorodność przeprowadzonych analiz, świadczy o przemyślanym i nowoczesnym podejściu do rozwiązania problemu badawczego. Zaś opublikowanie wyników w uznanych czasopismach z dziedziny, dowodzi dojrzałości i samodzielności Doktorantki oraz wartości naukowej uzyskanych rezultatów.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzji pragnę podkreślić, że wysoko oceniam rozprawę mgr Ewy Magdaleny Pyrki oraz stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane pracom doktorskim. Wobec powyższego uważam, że rozprawa doktorska mgr Ewy Magdaleny Pyrki spełnia wszelkie wymagania określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595 z późn. zm. Dz.U. z 2017 r. poz. 1789) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 roku, poz. 1669). Wniosuję zatem do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne, Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Pani mgr Ewy Magdaleny Pyrki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Ewy Magdaleny Pyrki cechuje się wyróżniającą jakością i starannością przeprowadzonych badań, w których Doktorantka zastosowała nowoczesne metody molekularne i odpowiednio dobrała narzędzia służące do analizy uzyskanych wyników. Uznając wysoką i unikalną jakość badań, opublikowanych w uznanych akademickich czasopismach naukowych, wnioskuję do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Biologiczne, Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o wyróżnienie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej mgr Ewy Magdaleny Pyrki.

KIEROWNIK
Katedra i Zakład Biologii Ogólnej
i Parasytologii

prof. n. med. Daniel Młocicki