

Prof. dr hab. Krystyna Skwarło-Sońta
Zakład Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
e-mail: kss25@biol.uw.edu.pl

OCENA
ROZPRAWY DOKTORSKIEJ mgr ŁUKASZA PIJANOWSKIEGO
zatytułowanej:

BADANIA WPLYWU IMMUNOSTYMULACJI I STRESU NA AKTYWNOŚĆ FAGOCYTÓW
KARPIA (*Cyprinus carpio* L.)

Odporność wrodzona, podstawowy mechanizm obronny całego królestwa zwierząt, jest — od czasów odkrycia przez Miecznikowa ponad 100 lat temu zjawiska fagocytozy — chyba najczęściej badanym procesem odpornościowym. Mogłoby się zatem wydawać, że wiemy na ten temat bardzo wiele — żeby nie powiedzieć: wszystko, zwłaszcza od kiedy poznaliśmy wzorce molekularne patogenów oraz rozpoznające je receptory obecne na komórkach fagocytujących. Okazuje się jednak, że coraz doskonalsze narzędzia badawcze, oferowane przez biologię molekularną pozwalają odkrywać kolejne tajemnice mechanizmów biologicznych a immunologia czerpie z tego warsztatu metodycznego pełnymi garściami. Stosunkowo niedawno rozszyfrowano mechanizmy molekularne procesów obronnych, podejmowanych przez komórki fagocytujące w sytuacji, kiedy patogen nie może być przez nie wchłonięty i rozłożony — krótko mówiąc opisano sieci zewnątrzkomórkowe, wytwarzane przez fagocyty i zaczęto zgłębiać mechanizmy, rządzące ich powstawaniem i właściwościami obronnymi. Dobrze się więc stało, że w polu widzenia Zakładu Immunobiologii Ewolucyjnej Wydziału BiNoZ UJ znalazło się zgłębianie tych mechanizmów u ryb, a mgr Łukasz Pijanowski zajął się nimi w swojej pracy doktorskiej, powstałej pod kierunkiem dr hab. Magdaleny Chadzińskiej, we współpracy z Department of Animal Sciences, Cell Biology & Immunology, Wageningen University (The Netherlands). Analiza tych problemów w ujęciu porównawczym wnosi bowiem nie dający się przecenić wkład w poznawanie praw, rządzących mechanizmami pozwalającymi organizmom zachowywać tożsamość, mimo licznych zagrożeń pochodzenia zewnętrznego. Rozszerzenie pola badawczego o wrażliwość na stres, skorelowaną z potencjałem obronnym przeciwko infekcjom różnych linii badanego gatunku (*Cyprinus carpio* L.) nadaje ocenianej rozprawie walor nowości z dużym ładunkiem poznawczym, a nawet w pewnym stopniu aplikacyjnym.

Formalna ocena pracy

Przedstawiona mi do recenzji, na podstawie Uchwały Rady Wydziału BiNoZ Uniwersytetu Jagiellońskiego z 25.06.2013r, rozprawa doktorska mgr Łukasza Pijanowskiego to 146-stronicowe opracowanie, zawierające tekst 4 publikacji oryginalnych, powstałych w latach 2013-2015, opatrzone obszernym wstępem, dyskusją z wnioskami i spisem piśmiennictwa. Publikacje są wieloautorskie, doktorant

jest w każdej z nich pierwszym autorem zaś dr hab. Magdalena Chadzińska, kierowniczka grupy badawczej i promotor rozprawy, jest autorem korespondującym.

Zespół współautorów jest dość liczny, bowiem oprócz doktoranta i Jego opiekunki naukowej zawsze znajduje się w tym gronie dr BML Verburg-van Kemenade ze wspomnianego ośrodka w Wageningen oraz inne osoby (od 1 do 4 dodatkowych autorów), zarówno z instytucji krajowych jak i z Holandii. Współpracownicy załączyli oświadczenia, oceniające zakres ich wkładu w poszczególne publikacje. Jak można było oczekiwać – współautorzy „laboratoryjni” określają swój udział w powstawaniu prac na etapie wykonywania poszczególnych analiz (w wymiarze 5-10%), zaś obydwie panie profesor uczestniczyły zarówno w tworzeniu koncepcji kolejnych badań, nadzorze pracy laboratoryjnej jak i w dyskusji uzyskanych wyników oraz ostatecznej wersji poszczególnych publikacji. Po podliczeniu deklaracji wszystkich współautorów – stwierdzam, że mgr Pijanowski wniósł do swoich artykułów od 40 do 55 % wkładu, co jest nieuniknione, jeśli stosuje się bogaty wachlarz nowoczesnych metod, wymagających znajomości ich tajników i obsługi niekiedy bardzo wyrafinowanej aparatury. Omawiane publikacje ukazały się w recenzowanych czasopismach, zajmujących wiodące pozycje w swojej dyscyplinie, były więc już oceniane zarówno pod względem precyzji układu doświadczalnego, adekwatności stosowanych metod, jak i poziomu dyskusji wyników i wyciągania wniosków. Bardzo żałuję, że mimo całej pedanterii w przygotowaniu tego opracowania doktorant nie zamieścił IF poszczególnych czasopism (*Fish Shelfish Immunol 2013* oraz *2015a i b; Fish Physiol Biochem 2015*), co dałoby więcej informacji o wkładzie omawianych badań w ogólny obieg informacji naukowej.

Natomiast w moim pojęciu wkładem całkowicie osobistym doktoranta są części tekstowe przedłożonej rozprawy i ich głównie będą dotyczyć moje uwagi i komentarze.

Ocena merytorycznej zawartości pracy

Oceniany tekst rozpoczyna obszerny Wstęp (25 str) zakończony sformulowaniem hipotezy badawczej i sposobów jej weryfikowania. Bardzo mi tu brakuje spisu stosowanych skrótów, co ogromnie utrudnia „nawigację” w najeżonym nimi tekście, w którym występują wielokrotnie. Należy jednak podkreślić, że wszystkie, bardzo liczne i nawet najbardziej złożone skrótowce czy akronimy są „na miejscu” rozwijane bardzo starannie, z podaniem angielskiego (najczęściej) źródłosłowu, co jednak tylko częściowo tłumaczy brak, a na pewno nie zastępuje alfabetycznego spisu choćby najważniejszych, niestandardowych a często powtarzających się skrótów w łatwo dostępnym miejscu, pozwalającym na ich odnajdywanie w odpowiednim momencie. Jest to zresztą wymaganie większości czasopism naukowych, dlatego nie bardzo rozumiem, czemu tu go nie ma (choć mogę się domyślać – ale zapewne dowiem się podczas publicznej obrony).

Jak już podkreśliłam, Wstęp jest bardzo obszerny i zawiera zarówno charakterystykę komórek, uczestniczących w procesach odporności nieswoistej, ze szczególnym naciskiem na występujące u ryb, jak i opis zjawisk związanych z tworzeniem sieci zewnątrzkomórkowych (ET), będących „przebojem” immunologii ostatnich lat. Końcowy fragment Wstępu jest poświęcony stresowi i wzajemnym oddziaływaniom między

układami neuroendokrynowym i odpornościowym a zwięźczeniem tych rozważań jest króciutki podrozdział, zawierający hipotezę badawczą i „sposoby realizacji założonych celów”. Hipoteza nie jest szczególnie odkrywczą, zakłada bowiem regulację aktywności komórek odpornościowych karpia przez immunostymulację i stres, co wydaje się być pewną tautologią (stymulacja odporności reguluje komórki odpornościowe) – a może tylko nieręcznym sformulowaniem? Wymienione następnie zadania badawcze pokrywają się z tematyką kolejnych publikacji, wchodzących w skład rozprawy.

Dwie pierwsze publikacje, tworzące dysertację (*Fish Shelfish Immunol*, 2013; 34(5):1244-1255 oraz 2015; 42(2):473-482) dotyczą charakterystyki sieci zewnątrzkomórkowych, tworzonych przez fagocyty karpia i mechanizmów, uczestniczących w ich indukcji. Dały one doktorantowi cenne narzędzie do wnikliwego wejrzenia zarówno w działanie stresu na osie regulacyjne neuro-hormonalne jak i w ich pośrednictwo we wpływie na potencjał obronny ryb. Wybranie linii karpia, różniących się podatnością na infekcje, było bardzo skutecznym posunięciem, pozwoliło bowiem na zwrócenie uwagi na wzajemnie „przenikające się” mechanizmy immunoregulacji i odporności na czynniki zewnętrzne, zarówno patogenne jak i stresotwórcze. Jako fizjologowi, od lat zajmującemu się neuroendokryno-immunoregulacją, najbardziej podoba mi się praca trzecia (*Fish Physiol Biochem*, 2015; 41(5):1261-1278), kompleksowo analizująca wpływ zastosowania stresu unieruchomienia na wiele aspektów funkcjonowania układu odpornościowego i osi regulacyjnej HPA (HPI w przypadku ryb). Jest to również praca najbogatsza eksperymentalnie i metodycznie, dostarczająca jednocześnie najwięcej informacji o mechanizmach działania stresu na procesy obronne 4 linii hodowlanych karpia, różniących się opornością na zakażenia bakteryjne i pasożytnicze. To pozwoliło doktorantowi wybrać dwie linie, o przeciwstawnej wrażliwości na patogeny i różnej aktywacji osi stresowej, aby w ostatniej pracy cyklu (*Fish Shelfish Immunol*, 2015; 47(2):886-892) spojrzeć na mechanizmy generujące sieci zewnątrzkomórkowe i możliwe implikacje praktyczne, warunkujące większą lub mniejszą przeżywalność w warunkach stresu i/lub infekcji. Stanowi to cenną klamrę spinającą pozornie odrębne publikacje w logiczną całość.

Licząca 18 stron Dyskusja to kolejna okazja Autora aby wykazać się osobistym wkładem w całość rozprawy. Stanowi kompetentne porównanie otrzymanych w omawianych publikacjach wyników z piśmiennictwem – zarówno dotyczącym ryb (raczej ubogim) jak i lepiej poznanymi procesami u ssaków. Dało to Autorowi podstawy do konstatacji, że są to pierwsze doniesienia o możliwości tworzenia sieci zewnątrzkomórkowych przez makrofagi ryb (na modelu karpia), zawierające zarazem próby opisanie mechanizmów regulujących ich formowanie.

Rozprawę zamyka krótkie, ale bardzo esencjonalne „Podsumowanie”, kończące się przejrzystym zestawieniem otrzymanych wyników. Pozwala to zarówno na porównanie między sobą aktywności poszczególnych subpopulacji fagocytów karpia jak i wpływu stresu na wybrane parametry reakcji odpornościowej. Mam wrażenie, że Autor nie do końca wykorzystał stworzony przez siebie schemat, na podstawie którego oczekiwałabym wniosków jasno wyartykułowanych. Te bowiem, które wieńczą tekstową część rozprawy są raczej streszczeniem uzyskanych wyników.

Spis cytowanego piśmiennictwa jest przebogaty – zawiera bowiem 441 pozycji, w większości z ostatnich lat, bo też omawiane zagadnienia dotyczą głównie zjawisk opisanych niedawno i badanych intensywnie.

Uwagi krytyczne

Z całej rozprawy najmniej podoba mi się tytuł i wnioski. Niezręczność tytułu, formułowanego trzy lata przed złożeniem rozprawy do oceny jest tylko częściowo usprawiedliwiona; rozumiem, że w momencie otwierania przewodu doktorskiego nie można było przewidzieć, jak ciekawe i spójne wyniki przyniosą kolejne planowane badania. Tytułowe „Badania” zmierzały do wyjaśnienia, jakie czynniki (mechanizmy) wpływają na jeden z przejawów aktywności fagocytów ryb kostnych (na modelu karpia), polegającej na tworzeniu sieci zewnątrzkomórkowych. Pozwoliły ponadto wejrzeć wnikliwie w molekularne mechanizmy, poprzez które stres unieruchomienia, modyfikując poszczególne składowe odporności nieswoistej, przyczynia się do większej lub mniejszej oporności wybranych linii karpia na działanie patogenów.

Podobnie niezręcznie sformułowano „Wnioski końcowe”, będące, jak wspomniałam wyżej, w istocie podsumowaniem uzyskanych wyników. Gdyby tak po nich nastąpiło sformułowanie jednoznacznego wniosku o wykazanej w rozprawie roli mechanizmów zewnątrzkomórkowych, chroniących ryby przed czynnikami patogennymi, działającymi w stresie i warunkach od niego wolnych.... Chętnie podczas publicznej obrony podyskutuję z doktorantem o możliwości „ulepszenia” obydwu sformułowań – tak, aby praca była istotnie wzorcowa.

Rozprawa jest napisana i opracowana bardzo starannie, zwłaszcza piękne są ryciny, ilustrujące fragmenty Wstępu. Raczej trudno znaleźć w tekście potknięcia redakcyjne, choć czasem można spotkać niezręczności sformułowań, np. „priorytetowy cel” (str. 97), produkcja NET (wielokrotnie powtarzana w Dyskusji), „stan badań (...) jest niewielki (str. 102), „zachowania behawioralne” (str. 114). Na str. 30 glutation został nazwany enzymem, a na 107 – błędnie nazwano „wewnątrzkomórkową cząsteczkę adhezyjną”. Te drobne uwagi krytyczne zamieszczam wyłącznie z obowiązku recenzenta, zwłaszcza w sytuacji, kiedy praca jest oceniana bardzo dobrze.

Pretensje o brak spisu skrótów wyraziłam wcześniej.

Wnioski końcowe

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Łukasza Pijanowskiego spełnia z powodzeniem wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595) wraz z późniejszymi zmianami. Rozprawa zawiera wyniki ciekawe i nowatorskie, niekiedy wręcz pionierskie, uzyskane metodami nowoczesnymi i właściwie zastosowanymi. Wyniki zostały opublikowane w wiodących czasopismach z zakresu fizjologii i immunologii ryb, co gwarantuje ich szybkie wejście do obiegu globalnej informacji naukowej. Napisana po polsku część rozprawy jest przygotowana kompetentnie i bardzo starannie, wskazując na dojrzałość naukową jej autora.

Dlatego z najgłębszym przekonaniem kieruję do Wysokiej Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego wniosek o dopuszczenie **mgr LUKASZA PIJANOWSKIEGO** do dalszych etapów przewodu doktorskiego na podstawie dysertacji, zatytułowanej: **BADANIA WPLYWU IMMUNOSTYMULACJI I STRESU NA AKTYWNOŚĆ FAGOCYTÓW KARPIA (*Cyprinus carpio* L.)**.

Ze względu na wysoki poziom naukowy ocenianej rozprawy wnoszę ponadto o jej wyróżnienie zgodnie z miejscowym obyczajem.

Warszawa, 31 marca 2016

Krystyna Skwarło-Sońta