

Prof. dr hab. Hanna Jackowiak
Pracownia Histologii i Embriologii Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Poznań 27-02-2021

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pana magistra Pawła Kaczmarka

pt. „Rozwój zarodkowy narządu lemieszowo-nosowego i struktur towarzyszących u różnych gatunków gadów łuskonośnych (Squamata)”,

wykonanej pod kierunkiem promotora Pani dr hab. Weroniki Rupik, prof. UŚ

Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Pierwsza publikacja opisująca narząd lemieszowo-nosowy człowieka autorstwa Frederica Ruyscha datuje się na rok 1703. Kolejno, od 1809 roku Ludwig Levin Jacobson rozpoczął publikowanie wyników swoich badań u ssaków, co zapoczątkowało dalsze studia morfologiczne i fizjologiczne tego narządu, popularnie nazywanego narządem Jacobsona u kręgowców.

Parzysty narząd lemieszowo-nosowy gadów, za wyjątkiem kilku gatunków, jest uznawany za główny narząd węchu, przy czym z danych literaturowych wynika, że większość badań morfologicznych tego narządu była prowadzona u osobników dorosłych, podczas gdy badania nad rozwojem struktur wewnętrznych trzewioczaszki gadów są rzadkie. Tym samym, wybór tematyki dysertacji mgr Pawła Kaczmarka, dotyczącej charakterystyki rozwojowej narządu przedśionkowo - lemieszowego i struktur towarzyszących wybranych gatunków gadów, stanowi oryginalne i ważne zamierzenie badawcze. Doktorant przeprowadził badania u trzech gatunków jaszczurek, w tym anolisa brązowego (*Anolis sagrei*), gatunku należącego do Iguania oraz eublefara lamparciego (*Eublepharis macularis*) i u gekona płaczącego (*Lepidodactylus lububris*), należących do Gekkota, jak również gatunku reprezentującego węże, czyli zaskrońca (*Natrix natrix*).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnego tematycznie cyklu trzech oryginalnych anglojęzycznych rozpraw naukowych i ich omówienia w formie autoreferatu. Autoreferat rozprawy doktorskiej ma klasyczne rozdziały, które obejmują 36 stron tekstu w języku polskim z załączonymi streszczeniami w języku polskim i języku

angielskim oraz oświadczeniami autora i współautorów o udziale w pracy nad rozprawami naukowymi.

We wprowadzeniu autoreferatu Doktorant umiejętnie wprowadził czytelnika w tematykę badawczą, syntetycznie określając zakres badań nad budową morfologiczną narządu lemieszowo - nosowego gadów z zaznaczeniem jego odmienności w relacji do kręgowców. Autor zaakcentował, że podejmowane problemy rozwojowe, szczególnie w perspektywie badań rozwoju podniebienia, gruczołu łzowego, mają duże znaczenie dla dywagacji filogenetycznych.

W tej kwestii wykazano znaczenie planowanych rozwojowych badań mikro-i ultrastrukturalnych nabłonka zmysłowego narządu lemieszowo-nosowego łuskowców, które były dotąd charakteryzowane jedynie u osobników dorosłych.

Kolejno Doktorant zaprezentował główne cele pracy doktorskiej, które obejmują dwa zagadnienia tj. (i) analizę narządu lemieszowo - nosowego i narządów towarzyszących u wyżej wymienionych trzech gatunków jaszczurek oraz (ii) analizę procesów różnicowania nabłonka zmysłowego zaskrońca zwyczajnego podczas rozwoju zarodkowego. Te główne cele badawcze przybliżył czytelnikowi przez wyróżnienie w pierwszym przypadku aż dziewięciu zadań badawczych, które obejmują nie tylko opis pochodzenia zawiązków narządu lemieszowo-nosowego i ich przekształceń rozwojowych, ale także są próbą wyjaśnienia m.in. sposobu łączenia wyrostków twarzowych, tworzenia połączeń przewodu łzowego z rowkiem nozdrzowym oraz z przewodem narządu lemieszowo-nosowego. Doktorant wskazał jako cel wymienionych badań ocenę przydatności uzyskanych wyników do dyskusji w ramach zagadnień morfologii funkcjonalnej i do rekonstrukcji filogenezy gadów łuskonośnych.

W celu analizy zmian rozwojowych nabłonka zmysłowego zaskrońca wyróżniono trzy zadania badawcze mające scharakteryzować niezwykle ciekawy proces formowania kolumn nabłonkowych, występujących jedynie u węży oraz opisać budowę i rozmieszczenie poszczególnych typów komórek w różnicującym nabłonku, a w tym ultrastrukturę neuronów bipolarnych.

W rozdziale „Materiały i metody” uzyskujemy wyczerpujące informacje o badanych zwierzętach i inkubacji zarodków, na co uzyskano stosowne pozwolenia Lokalnej Komisji Etycznej w Katowicach. Podkreślić należy, że prowadzone badania miały mocne umocowanie metodyczne, wynikające z prowadzonych wcześniej, unikalnych badań nad zarodkami gadów,

prorowadzonych w zespole badawczym promotora dysertacji Pani prof. Weroniki Rupik. Zastosowanie wypracowanej i sprawdzonej metodyki badań zarodków gadów technikami mikroskopii świetlnej i elektronowej skaningowej oraz transmisyjnej obrazuje doskonała dokumentacja fotograficzna we wszystkich wskazanych rozprawach naukowych.

W opisie zastosowanych technik i metod uwagę zwraca część dotycząca opracowania metodyki przygotowania zarodków jaszczurek do innowacyjnych badań technikami mikrotomografii rentgenowskiej, które przeprowadzono w Uniwersytecie w Wiedniu pod kierunkiem profesora Briana Metschera. Uzyskane przekroje narządowe zostały kolejno opracowane komputerowo przy użyciu specjalistycznego oprogramowania, prowadząc do wykonania trójwymiarowych modeli badanych struktur anatomicznych głowy zarodków w poszczególnych okresach rozwojowych, co było m.in. podstawą do przygotowania dwóch rozpraw naukowych. Podkreślić należy, że badania wykonane w dysertacji uzyskały finansowanie w oparciu o grant NCN Preludium nr 2018/28/TNZ4.00182

Cykl rozpraw naukowych dysertacji mgr. Pawła Kaczmarka obejmuje trzy prace opublikowane w prestiżowych czasopismach o międzynarodowym zasięgu i umieszczonych na liście JCR tj.:

1. Kaczmarek P., Janiszewska K., Metscher B., Rupik W. 2020: development of the squamate naso-palatal complex; detailed 3D analysis of the vomeronasal organ and nasal cavity in the brown anole *Anolis sagei* (Squamata: Inguania). w: Frontiers in Zoology IF= 2.570
2. Kaczmarek P., Metscher B., Rupik W. 2020: Embryology of the naso-palatal complex in Gekkota bades on detailed 3 D analysis in *Lepidodactylus lugubris* and *Eublepharis macularius*. w: Journal of Anatomy, IF=2.013
3. Kaczmarek P. Rupik W. 2020 Structural and ultrastructural studies on the developieng vomerosnasal sensory epithelium in the grass snake *Natrix natrix* (Squamata: Colubridae). w: Journal of Morphology, IF= 1.563

Wartość punktowa tych czasopism na liście MNISW jest bardzo wysoka i wynosi od 100 do 140 punktów, a wskaźnik IF waha się od 1.563 do 2.570.

W załączonych do autoreferatu oświadczeniach znajdujemy informacje, że udział Doktoranta w powstawaniu trzech rozpraw naukowych był - cytuję zwrot z oświadczeń - „największy i wiodący”, jednakże nie podano zwyczajowego udziału procentowego autora. Ze względu na opisane czynności w ramach przygotowania rozpraw naukowych, począwszy od sekcji zwierząt, poprzez

wykonywanie preparatów do analiz mikroskopowych, przygotowanie części analitycznej wyników i manuskryptu, można z pewnością przyjąć, że udział doktoranta przekraczał 50 procent.

Ocena merytoryczna

Oceniając wartość naukową wyników osiągniętych przez dr Pawła Kaczmarka, chciałabym podkreślić fakt podjęcia się bardzo trudnych i żmudnych badań zarodków wybranych gatunków łuskonośnych. Badania embriologiczne kręgowców obejmują wiele pasjonujących zagadnień dotyczących organogenezy, stąd podjęcie takiej tematyki u gadów, jak wspomniałam wcześniej, jest z reguły zamierzeniem unikalnym i wnoszącym wiele, nowych danych naukowych. Opublikowanie wyżej wymienionych rozpraw naukowych, zawierających obszerne analizy morfologiczne z wieloaspektową dyskusją, potwierdza uznanie oryginalności badań Doktoranta. Ponieważ rozprawy naukowe zostały poddane procedurze „*peer review*” dopuszczającej do publikacji w wymienionych czasopismach, to chciałabym odnieść się do wybranych treści zawartych w rozdziale „Wyniki i dyskusja” autoreferatu.

Dwie pierwsze prace przedstawione przez Doktoranta charakteryzują zmiany w obrębie twarzoczaszki zarodków jaszczurek doprowadzających do powstania narządu lemieszowo - nosowego, jamy nosowej i podniebienia. Stwierdzone zmiany strukturalne pozwoliły na wyróżnienie trzech etapów rozwojowych, które są przedstawione na trójwymiarowych modelach uzyskanych techniką mikrotomografii komputerowej i każdorazowo odnoszone do obrazów przekrojów badanych struktury z preparatów histologicznych. Perfekcyjnie w tym względzie, prezentują się dane zamieszczone w tabelach rozwojowych w anglojęzycznych rozprawach, będąc swoistym kluczem rozwojowym, umożliwiającym szczegółowe porównanie zachodzących zmian w poszczególnych stadiach rozwojowych u gekona płaczącego i eublefara lamparciego, czy u anolisa brązowego, czy też w przyszłości innych gadów.

Porównywane dane określają dynamikę kształtowania wzajemnych struktur, poczynając w dużym skrócie od układu wyrostków twarzowych i struktury związkowej narządu lemieszowo-nosowego i jego przewodu, poprzez tworzenie podniebienia i procesu separacji badanej narządu zmysłu od jamy nosowej, aż do ustalenia m.in. relacji topograficznych między rowkiem nozdrzowym a przewodem łzowym. We wspomnianych pracach pojawia się także wątek budowy

mikroskopowej nabłonka pokrywającego badany narząd zmysłu z określeniem momentu, kiedy staje się nabłonkiem zmysłowym.

Rozwój nabłonka zmysłowego narządu przedsionkowo-nosowego stał się zresztą tematem trzeciej rozprawy dysertacji mgr Pawła Kaczmarka. Doktorant poszerza tutaj wiedzę dotyczącą badań embriologii, czy morfogenezy narządu lemieszowo-nosowego zaskrońca zawartą we wcześniejszej publikacji naukowej, którą opublikowano w 2017 roku. Trochę szkoda, że ta praca naukowa nie została włączona do dysertacji.

Badania procesów historóżnicowania nabłonków zmysłowych zaskrońca na poziomie mikro- i ultrastruktury metodami mikroskopii elektronowej skaningowej i transmisyjnej dostarczyły wiele unikalnych informacji o formowaniu i przemianach komórkowych kolumn nabłonka zmysłowego węży. Sekwencja zmian rozwojowych, ujęta w trzech fazach rozwojowych, pozwoliła prześledzić charakterystykę i zmiany układu początkowo dwóch typów komórek podstawnych, z których jeden typ które mają status komórek niezróżnicowanych i występuje u osobników dorosłych oraz drugi typ komórek o charakterze progenitorowym dla komórek podporowych i zmysłowych. W pracy potwierdzono występowanie neuronów poza kolumnami nabłonka, co stanowi możliwość ich włączania do tworzących się kolumn nabłonka zmysłowego.

Doktorant interesująco komentował znaczenie obserwacji ultrastrukturalnych różnicujących się neuronów bipolarnych, jak i pojawiających się komórek zdegenerowanych. Osobiście przyjmuję stwierdzenie z angielskiej oryginalnej wersji dyskusji omawianej rozprawy, że obecność tych komórek zdegenerowanych uznano alternatywnie za objaw starzenia lub degeneracji.

W autoreferacie jednakże, Doktorant obecność komórek zdegenerowanych wiąże wyłącznie z procesem starzenia komórek. Kieruję więc pytanie, czy proces opisany jako starzenie komórek i będący pewnie wyrazem selekcji neuronów bipolarnych do sprawowanych funkcji, nie jest raczej przejawem dość powszechnej w procesach rozwojowych degeneracji morfogenetycznej niż wspomnianego starzenia?.

Istotną częścią autoreferatu jest podsumowanie w postaci aż trzynastu wniosków, płynących z przeprowadzonych badań. Dziesięć pierwszych wniosków charakteryzuje badania rozwojowe narządu lemieszowo-nosowego jaszczurek, a trzy kolejne wnioski dotyczą zmian rozwojowych w nabłonku zmysłowym zaskrońca. Zdaję sobie sprawę, że wybór najważniejszych kwestii naukowych przedsięwziętych w tak szeroko zakrojonych badaniach o charakterze

porównawczym i o dużym znaczeniu filogenetycznym, nastęcał Doktorantowi wiele trudności w sformułowaniu równo znaczących wniosków w odniesieniu do już opublikowanych rozpraw. Mamy wiec, wnioski kierujące uwagę czytelnika na następowanie najważniejszych zmian wzajemnie w topografii struktur narządu lemieszowo- nosowego i w otaczających częściach głowy, czy wynikające z procesu różnicowania nabłnka zaskrońca.

Jedyna uwaga krytyczna z mojej strony dotyczy nieuwzględnienia w żadnym wniosku faktu wyróżnienia przez Autora stadiów rozwojowych na podstawie obserwowanych cech, ale przyjmuję autorski pomysł przedstawienia zmian rozwojowych w odniesieniu do zagadnień związanych generalnie z filogenezą gadów.

Uwagi krytyczne

Uwagi krytyczne, które przedstawiam z obowiązku recenzenta, dotyczą także niewielu zawartych w Autoreferacie usterek, czy niekonsekwencji w stosowaniu nazewnictwa fachowego lub używania nazewnictwa stanowiącego „kalki” z języka angielskiego.

Przykładowo:

- na stronie 7 i 20 Autor pisze o „półkach podniebienia” w rozwoju podniebienia twardego ssaków, przy czym zarówno w mianownictwie embriologicznym, jak i podręcznikach dotyczących embriologii - vide H. Bartel „Embriologia” – prawidłowym terminem jest miano „wrostki podniebienne wtórne” .
- w tekście autoreferatu w języku polskim stosuje się często określenia „nabłonek sensoryczny”, będący odpowiednikiem angielskiego wyrażenia „sensory epithelium”, zamiast polskiego określenie „nabłonek zmysłowy”. W pierwszym zdaniu „Wprowadzenia” na stronie 6 Autor pisze, cytuję „Nabłonek węchowy jamy nosowej i nabłonek sensoryczny narządu lemieszowo- nosowego ...”, co sprowadza się do wspólnego określenia, że te nabłnki są zmysłowe.
- razi w tekście używanie określeń np. kierunek „wertykalny”, zamiast kierunek prostopadły lub pionowy, czy w zależności od sytuacji poprzeczny

Wniosek końcowy

Oceniana rozprawa doktorska przedstawia bardzo interesujące wyniki charakteryzujące sposób rozwoju narządu lemieszowo-nosowego i struktur towarzyszących wybranych gatunków gadów, które noszą cechy odkryć naukowych.

Praca włożona w przeprowadzenie systematycznych badań wykonanych różnorodnymi technikami mikroskopowymi, w tym innowacyjną techniką modelowania trójwymiarowego, została zwieńczona ważnymi rozprawami naukowymi, opublikowanymi w prestiżowych czasopiśmie naukowych. Prace Doktoranta wyróżniają się sposobem zarówno prezentacji, jak i krytycznej interpretacji uzyskanych wyników morfologicznych m.in. w aspekcie ich znaczenia dla problemów dotyczących filogenezy gadów, co charakteryzuje mgr. Pawła Kaczmarka jako młodego naukowca bardzo dobrze przygotowanego do dalszej pracy badawczej.

Pragnę wyraźnie zaznaczyć, że nieliczne krytyczne uwagi zawarte w recenzji nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę całości dysertacji.

Niniejszym stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr. Pawła Kaczmarka spełnia ustawowe wymagania określone przy nadawaniu tytułów i stopni naukowych tj. zgodne z ustawą z dnia 14.03.2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595) w związku późniejszymi zmianami z dnia 18.03.2011 (Dz U nr 84 poz 455), w związku z artykułem 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018r. (Dz.U.poz1669).

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy Doktoranta motywując nowatorskim zakresem przeprowadzonych badań mikroskopowych i wysoką wartością uzyskanych wyników.

Henryk Jedyniak

Poznań, 27.02.2018r.