

Katedra Antropologii
Prof. dr hab. Elżbieta Żądzińska

Łódź, 11 czerwca 2016 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr JUDYTY NOWAK
pt. „*Morfologiczne mierniki kondycji biologicznej a swoista odporność
immunologiczna*”

Próby oceny związku cech morfologicznych odgrywających istotną rolę w doborze płciowym z kondycją biologiczną osobnika są podejmowane coraz częściej przez biologów człowieka. Nie dziwi zatem, że Doktorantka wybrała za temat swojej rozprawy doktorskiej właśnie to zagadnienie. Prawidłowe zaprojektowanie badań pozwalających na klarowne, jednoznaczne wnioski jest jednak bardzo trudne z kilku powodów. Najważniejszym z nich jest pewność, że obie analizowane zmienne, np. morfologiczny wyznacznik stresu i parametr określający kondycję biologiczną/immunologiczną formują się w podobnym okresie ontogenezy. To wydaje się istotne, w przeciwnym razie analizujemy związek cechy kształtującej się pod wpływem zaburzenia środowiska rozwoju np. w pierwszych dwóch miesiącach ontogenezy z kondycją biologiczną, która jest efektem wielu współzależnych czynników modyfikujących rozwój np. głównie od urodzenia do okresu pokwitania czy w odpowiedzi na jednorazowy kontakt z patogenem. Trudno wtedy o jasną ocenę nie tylko ewentualnej zależności przyczynowo-skutkowej ale również asocjacyjnej.

Z większości tych ograniczeń Doktorantka zdaje sobie sprawę, co dobrze uzasadnia w dość obszernym wstępie i częściowo poddaje dyskusji wskazując w końcowej części pracy na ograniczenia swoich badań. Cała praca doktorska liczy wraz z czterema załącznikami 183 strony maszynopisu i ma typowy dla tego rodzaju opracowań układ. *Wstęp* rozpoczyna się od aktualnego przeglądu literatury na temat poszukiwania morfologicznych mierników kondycji biologicznej zwierząt, głównie ptaków i ich znaczenia w ewolucyjnie ukształtowanym procesie doboru partnera. W tym aspekcie Doktorantka najpierw omawia cechy dymorficzne płciowo jako potencjalne morfologiczne wyznaczniki kondycji biologicznej, w tym kondycji immunologicznej organizmu, następnie przechodzi do wyznaczników stabilności rozwojowej, szczególną uwagę zwracając na poziom asymetrii fluktuacyjnej cech parzystych człowieka. W drugiej części *Wstępu* Doktorantka opisuje mechanizmy immunologiczne, które można uznać za markery kondycji biologicznej człowieka.

Wstęp kończy krótkie podsumowanie (oczekiwane przez czytelnika wprowadzanego w interdyscyplinarne badania), z którego jasno wyłania się cel pracy i postawione hipotezy badawcze.

To dobrze napisana część rozprawy, choć mój niedosyt dotyczy braku uzasadnienia świadomego wyboru właśnie tych a nie innych wyznaczników kondycji biologicznej w aspekcie ich wzajemnej relacji etiologicznej. To ważne, np. asymetria całkowita jest składową asymetrii 12 subiektywnie wybranych przez Doktorantkę cech parzystych, których rozwój przebiega bardzo odmiennie. Wg Farkasa (1992) różne pomiary charakteryzujące wielkość i kształt ciała ludzkiego osiągają odmienny poziom dojrzałości - określane jako procent wielkości maksymalnej danej cechy - w różnym okresie rozwoju, np. jeśli chodzi o kompleks twarzoczaszki, głównie w okresie rozwoju prenatalnego. Przykładowo, do końca pierwszego roku życia szerokość małżowiny usznej osiąga dojrzałość na poziomie 93,5%, zaś wysokość ucha na poziomie 76,4%. Stopień asymetrii tych cech jest więc głównie efektem oddziaływania środowiska prenatalnego i środowiska rozwoju w pierwszym roku życia. Pomiary pozostałych cech, takich jak np. długość i szerokość stopy, 70-90% poziomu dojrzałości osiągają znacznie później. Grupując cechy podobne etiologicznie, np. osobno oceniając *cFA* cech kefalometrycznych i *cFA* cech somatometrycznych znacznie precyzyjniej moglibyśmy wskazać na czas powstania zaburzeń symetrii i oceniać związki tego „zdarzenia” z kondycją biologiczną w życiu dorosłym.

Sama idea badań jest nowatorska – połączenie morfologicznych markerów kondycji biologicznej człowieka z ilością i efektywnością limfocytów T i B. *Cel pracy*, tak jak napisałam wcześniej, jest klarowny: „ocena bezpośrednich zależności pomiędzy wartością wskaźnika barkowo-biodrowego, wysokością ciała oraz poziomem asymetrii fluktuacyjnej ciała mężczyzn, a ilościowymi i jakościowymi parametrami odporności swoistej ich organizmu”. Hipotezy badawcze sformułowano właściwie. Prawidłowo zaplanowano również badania biochemiczne, antropometryczne i immunologiczne, prowadząc je w 3 etapach uzależnionych od rytmu szczepień i standardów oceny immunologicznej odpowiedzi swoistej (odpowiedzi poszczepiennej).

Rozdział *Materiał i Metody* liczący 40 stron maszynopisu rozpoczyna się od solidnego, precyzyjnego opisu grupy badanej, kolejnych etapów rekrutacji i wszystkich etapów badań uczestników projektu (badania będące podstawą pracy są częścią projektu realizowanego w ramach dużego grantu OPUS 4 NCN). Na szczególne podkreślenie zasługuje jasny opis *sample attrition*. Autorka precyzyjnie i z pełną świadomością potencjalnego wpływu na wynik ostateczny, opisuje przyczyny wykluczenia z badań części zrekrutowanych uczestników: m.in. ze względu na deklarowany stan zdrowia, morfologię krwi, kliniczną ocenę stanów zapalnych. Kończąc czytanie rozdziału czytelnik ma jasność dlaczego ostatecznie do badań włączono 86 zdrowych mężczyzn w wieku 18,9-36,7 lat z kompletem wszystkich danych hormonalnych, morfologicznych, immunologicznych i dlaczego analizy proliferacji limfocytów T ograniczono tylko do testów pozyskanych w II sezonie badań, czyli do 48 mężczyzn w wieku 18,9-35 lat. Następnie Doktorantka dokładnie charakteryzuje stosowane metody: pomiar wysokości ciała, szerokości barków i bioder, 12

analizowanych cech parzystych, sposób wyliczenia wskaźnika barkowo-biodrowego (SHR), pomiar liczebności subpopulacji limfocytów B i T, w tym TCD4+ i TCD8+ (metoda immunofenotypowania), pomiar funkcjonalności limfocytów T w układach stymulowanych mitogenami (test transformacji blastycznej limfocytów krwi obwodowej), oznaczenie całkowitego poziomu przeciwciał klasy IgG i IgA (immunoenzymatyczna metoda fazy stałej ELISA) i ocena efektywności limfocytów B (pomiar siły odpowiedzi poszczepiennej). Metody immunologiczne zostały dobrane prawidłowo, co konsultowałam z mikrobiologiem z Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Wydziału BiOŚ UŁ. Rozdział kończy opis metod oceny i/lub pomiaru czynników/zmiennych kontrolowanych przy ocenie parametrów immunologicznych: poziomu testosteronu i kortyzolu, proporcji wagowo-wzrostowych i otluszczenia ciała, aktywności fizycznej, długości snu, nawyków żywieniowych, narażenia na stres, palenia tytoniu i spożywania alkoholu, stosowania suplementów wspomagających układ odpornościowy, wcześniejszych szczepień przeciw grypie. Doktorantka wykorzystwała typowe w tego rodzaju badaniach analizy statystyczne: modele regresji liniowej prostej i następnie standardowe modele regresji wielorakiej z analizą reszt poprzedzone oceną skośności rozkładu każdej zmiennej.

Rozdział *Wyniki* liczący 19 stron maszynopisu rozpoczyna się od prezentacji podstawowych statystyk opisowych analizowanych w pracy parametrów immunologicznych i mierników kondycji biologicznej. Następnie Doktorantka budując modele regresji liniowej prostej przechodzi do oceny bezpośredniego związku poszczególnych parametrów immunologicznych z czynnikami, które istotnie mogą zaburzać profil immunologiczny człowieka (poziom testosteronu i kortyzolu, BMI, otluszczenie organizmu, palenie tytoniu, spożywanie alkoholu, suplementy stymulujące odporność, aktywność fizyczna, zmiana nawyków żywieniowych, zaburzenia długości snu, narażenie na stres – czynniki kontrolowane, patrz Materiał i Metody 3.7) oraz z wiekiem i badanymi wyznacznikami kondycji biologicznej (wysokość ciała, SHR, *cFA*). Wreszcie dla każdego wyznacznika stanu odporności immunologicznej (liczba limfocytów T, liczba limfocytów B, wskaźnik CD4/CD8, siła odpowiedzi proliferacyjnej, stężenie całkowitych przeciwciał IgA i IgG, siła odpowiedzi poszczepiennej) konstruuje standardowy model regresji wielorakiej gdzie zmiennymi niezależnymi, objaśniającymi zakres zmienności odporności są morfologiczne mierniki kondycji biologicznej i czynniki kontrolowane, które jako istotne (lub zbliżone do istotności) zostały wskazane w kolejnych modelach prostej regresji liniowej. Taka „konstrukcja” *Wyników* jest bardzo jasna i logiczna.

Modele regresji wielorakiej wskazały, że dość znaczna część zmienności odporności immunologicznej jest wyjaśniona przez analizowane zmienne niezależne (od 6,3% dla stężenia przeciwciał IgG do 16,3% dla efektywności limfocytów T), „niestety” we wszystkich przypadkach w wyjaśnienie zmienności wkład mają zmienne z grupy czynników kontrolowanych: w przypadku liczby limfocytów T i siły odpowiedzi poszczepiennej jest to wiek badanych, w przypadku wskaźnika CD4/CD8 – otluszczenie organizmu i aktywność fizyczna (przy braku korelacji zmiennych niezależnych), w

przypadku efektywności limfocytów T – poziom testosteronu, w przypadku stężenia całkowitych przeciwciał klasy IgG – poziom kortyzolu.

„Negatywny wynik”, który uzyskała Doktorantka – żaden z analizowanych w pracy morfologicznych wyznaczników kondycji biologicznej (wysokość ciała, SHR, *cFA*) nie jest związany z badanymi parametrami odporności swoistej w grupie zdrowych mężczyzn – choć niewątpliwie trudny do opublikowania (wszyscy znamy istotę zasady *publication bias* działającej zawsze na korzyść wyników „pozytywnych”), przy całej rzetelności przeprowadzonych analiz, w mojej ocenie, może wnieść bardzo wiele do literatury przedmiotu ukierunkowując dalsze badania w tym zakresie. To ukierunkowanie głównie powinno się skupić na uwzględnieniu wszystkich ograniczeń, jakimi muszą być obciążone tego rodzaju „odważne” analizy. Doktorantka zresztą podkreśla ten aspekt w dobrze poprowadzonej 30-stronicowej *Dyskusji* opartej o szeroki przegląd właściwie dobranej literatury przedmiotu, prawie wyłącznie anglojęzycznej (*Bibliografia* jest imponująca i zawiera ponad 380 pozycji). W *Dyskusji* Autorka sprawnie odwołuje się do ciągle aktualnych hipotez pozwalających wyjaśnić biologiczny kontekst istotnych w ocenie atrakcyjności partnera cech morfologicznych: hipotezy *immunohandicapu*, hipotezy „dobrych genów”, „złych genów” i alokacji zasobów, hipotezy genów plejotropowych oraz hipotez „społeczno-ekonomicznych”, tzw. hipotezy „karty atutowej” i „trzeciego czynnika”. Odnosząc się do braku związku cech morfologicznych uznawanych za atrybuty atrakcyjności męskiej (większej wysokości ciała, wyższych wartości wskaźnika barkowo-biodrowego i niższego poziomu asymetrii fluktuacyjnej cech parzystych) z kluczowymi parametrami swoistej odpowiedzi immunologicznej, Doktorantka słusznie skupia się na dwóch aspektach: „niedoskonałości” (z punktu widzenia tych badań) oceny swoistości odpowiedzi odpornościowej jako cechy kształtowanej bardzo wieloczynnikowo, zawierającej kolejne środowiskowe ślady historii immunologicznej organizmu zależne nie tylko od jednorazowych kontaktów z patogenami ale również od okresu ontogenezy, w którym te kontakty miały miejsce i wieloczynnikowym procesie kształtowania się cech morfologicznych (podłoże genetyczne, okres prenatalny, okres pokwitania, osiąganie ostatecznej wartości cechy pod wpływem hormonów płciowych). Bardzo podobają mi się dwa ostatnie podrozdziały *Dyskusji*: 5.5. *Ograniczenia związane z zastosowanymi w pracy „stymulatorami” do oceny potencjału immunologicznego* i 5.6. *Perspektywy dalszych badań*. Świadczą one o dojrzałości naukowej Autorki. Zgadzam się w pełni z zawartymi w nich stwierdzeniami Doktorantki. Dodałabym jedynie, że może nie do końca wykorzystany został potencjał badawczy czynnika jakim jest asymetria fluktuacyjna. Może należało wybrać do badań jedynie cechy kefalometryczne – w minimalnym stopniu podatne na asymetrię funkcjonalną, która niewątpliwie „mieści” się w pomiarze asymetrii kończyn (pomimo stwierdzonego przez Autorkę braku *DA*). Dodatkowo wiemy, że większość parzystych cech kefalometrycznych od 76% do prawie 94% swej wielkości ostatecznej kształtuje do końca pierwszego roku życia. Może warto byłoby zbudować dwa modele *cFA*: jeden dla środowiska prenatalnego i wczesnego niemowlęstwa, a drugi oparty o cechy somatometryczne w znacznie większym stopniu kształtowane w okresie postnatalnym i w okresie pokwitania? Różnice w wyjaśnieniu

zmienności odpowiedzi swoistej przez te dwa rodzaje *cFA* mogłyby być ciekawe, np. wskazując na istotność danego okresu ontogenezy w jej kształtowaniu. Może zatem dalsze badania (oprócz powiększania liczebności badanych) powinny być poprzedzone precyzyjną analizą spójności okresu rozwoju ocenianych parametrów? Ciekawa jestem zdania Doktorantki na ten temat.

Pracę kończy Streszczenie w języku polskim i angielskim i 4 Załączniki zawierające zgodę właściwej komisji bioetycznej, wzór oświadczenia uczestnika badań, opis procedury wykonywania oznaczeń immunologicznych i kwestionariusz do oceny odczuwania stresu.

Z obowiązku recenzenta informuję, że Autorka nie ustrzegła się błędów literowych. Zdarza Jej się używać języka potocznego. Wszystkie błędy zaznaczyłam w tekście pracy.

Podsumowując stwierdzam, że praca Pani mgr JUDYTY NOWAK spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim przewidziane w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) i z przyjemnością wnoszę do Rady Wydziału Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego o dopuszczenie Jej do publicznej obrony.

Jednocześnie ze względu na nowatorskość i interdyscyplinarność pracy proszę o rozważenie wyróżnienia rozprawy stosowną nagrodą.