

Gdańsk, 25/10/2023

dr hab. Katarzyna Wojczulanis-Jakubas
 Katedra Ekologii i Zoologii Kręgowców
 Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański
 ul. Wita Stwosza 59
 80-308 Gdańsk
 katarzyna.wojczulanis-jakubas@ug.edu.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Adama Krupskiego,
 pt: „Współwystępowanie pasożytów krwi oraz jego wpływ na dostosowanie dziuplaków”
 rozprawa przedstawiona do oceny w dniu 28/08/2023.

OMÓWIENIE I OCENA OGÓLNEJ STRUKTURY

Dwieście-siedemnasto-stronnicową rozprawę rozpoczyna strona tytułowa ze wszystkimi niezbędnymi informacjami, następnie podany jest spis rzeczy, a za tym *Streszczenie* w języku polskim i angielskim. W obu wersjach językowych *Streszczenie* podaje krótkie wprowadzenie do tematu, a następnie relacjonuje główne wyniki poszczególnych działań badawczych. Zasadniczą część rozprawy otwiera obszerny *Wstęp*, stanowiący wprowadzenie do tematu, sformułowanie celów i opis stosowanej metodologii. We wstępie szeroko omawiana jest kwestia pasożytnictwa i współpasożytnictwa, ze zgrabnym przejściem do hemo-pasożytów i analizą zjawiska u ptaków. Treść wprowadzenia w temat jest jasno i logicznie poukładana, poparta obszerną i adekwatną literaturą i prowadzi do trzech jasnych celów badawczych. Część opisu dotycząca metodologii jest również klarowna i podaje odpowiednią ilość informacji. Części, zatytułowane *Rozdziałami* (I-III), mają postać trzech standardowych manuskryptów, przejrzyste opisujących osobne działania badawcze, wynikające z trzech wcześniej określonych celów. Każdy z manuskryptów ma swoją własną linię narracyjną, tak więc część treści wstępu i części metodologicznej w tych manuskryptach powtarza w pewnym stopniu z tym co zostało wcześniej opisane w ogólnym wprowadzeniu. Jest to jednak zrozumiałe przy przyjętej konstrukcji, a powtórki nie są prostą kopią tekstu. Przy takim układzie nieco brakuje wspólnej, szerszej dyskusji, ale pojawia się wspólne posumowanie i wnioski. Na końcu pracy umieszczone są obszerne materiały dodatkowe, podające informacje, które były zbyt szczegółowe aby je wprowadzać w tekst główny, ale są ważne dla przejrzystości pracy. **Strukturę pracy oceniam pozytywnie i szczególnie doceniam jasny i spójny logicznie styl pisania.**

OGÓLNA OCENA MERYTORYCZNA

Atuty rozprawy

Praca zakłada trzy zbliżone acz różne cele badawcze, które wynikają z niedostatku wiedzy w zakresie interakcji hemo-pasożyt – żywiciel. **Pierwszy z celów** zakłada określenie charakteru oddziaływań (synergistyczne/antagonistyczne/neutralne) między czterema różnymi rodzajami pasożytami krwi w populacji u samic jednego z gatunków sikor, modraszki. Jest to krok na przód w rozpoznaniu zjawiska inwazji hemo-pasożytów u ptaków, bo większość dostępnych prac koncentruje się na pojedynczych rodzajach pasożytów. Przedstawione wyniki ujawniają silną antagonistyczną interakcję między pasożytniczymi pierwotniakami z rodzajów *Haemoproteus* i *Plasmodium* oraz synergistyczne oddziaływanie między rodzajem *Leucocytozoon* i *Trypanosoma*. Choć kierunek interakcji nie jest całkowitym zaskoczeniem, bo wcześniej był stwierdzany w literaturze, **wynik jest wartościowy, jako jeden z nielicznych dokumentujących te interakcje.**

Warto podkreślić, że charakter współoddziaływań pasożytów (dla realizacji pierwszego celu) jest analizowany w dwóch grupach ptaków, mających różnić się kondycją ciała. Czynnikiem różnicującym tę kondycję jest eksperymentalnie kontrolowana presja ze strony ektopasożytów. Choć ostatecznie kondycja samic poddanych eksperymentowi wygląda podobnie i nie ujawniają się żadne różnice w charakterze i sile współzależności między pasożytami między grupami samic, **podejście jest merytorycznie zasadne i metodyczne wartościowe**, a więc zasługuje na podkreślenie.

Drugim celem pracy było określenie wpływu współwystępujących pasożytów na szereg różnych parametrów biologii lęgowej modraszki. Ta kwestia również była analizowana w kontekście zróżnicowanej presji ze strony ektopasożytów. Ze wszystkich branych pod uwagę parametrów, rozważanych w różnych układach, stwierdzono, że sukces klucia, wielkość zniesienia i moment rozpoczęcia lęgów znajduje się pod pewnym (negatywnym) wpływem infekcji pasożytniczej: sukces jest niższy u samic zarażonych trzema rodzajami pasożytów, samice zarażone wyłącznie *Trypanosoma* przystępują później do składania jaj, a samice zarażone wyłącznie *Haemoproteus* mają mniejsze zniesienia. Znowu eksperymentalnie kontrolowana ekspozycja na ektopasożyty nie ukazuje przewidywanego zróżnicowania efektów parazytemii. Uzyskane wyniki, jakkolwiek obarczone niepewnością (szczegóły poniżej), **bazują na solidnych danych i jako takie są wartościowe i istotne dla rozpoznania wpływu współwystępowania pasożytów na biologię rozrodu u ptaków** (np. mogą stanowić istotny wkład do większych meta-analitycznych opracowań).

Trzeci cel pracy zakładał określenie różnic pomiędzy zespołami pasożytów krwi występującymi u dorosłych i młodocianych bogatek oraz określenie czynników odpowiedzialnych za rozwój poszczególnych inwazji pasożytniczych i występowanie współpasożytnictwa. Wyniki porównania kwestii między grupami wiekowymi pokazały wyższą częstość zarażeń dla pasożytów z rodzaju *Trypanosoma* i niższą dla pasożytów z rodzaju *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* i *Plasmodium* u ptaków młodocianych. Stwierdzono również pozytywny charakter zależności między pasożytami z rodzaju *Trypanosoma* i *Plasmodium*, ale tylko dla młodocianych bogatek. Wymienione wyniki wpisują się w przewidywania wynikające z literatury, stosownie ją uzupełniając. Co istotne i warte podkreślenia, w podjętym działaniu badawczym badana była populacja ptaków młodocianych, które były próbkowane dwukrotnie w ciągu swojego krótkiego życia. Umożliwiło to umożliwiło analizę wpływu daty klucia i zaawansowania sezonu na zarażenie pasożytami, stwierdzając wyższe

prawdopodobieństwo zarażenia wraz z postępem sezonu. Uwzględnienie w badaniu ptaków młodocianych (w tym ich dwukrotne próbkowanie) jest **cennym, bo unikatowym podejściem metodologicznym** (większość prac w literaturze bazuje na ptakach dorosłych, z już ustabilizowanym ontogenetycznie układem immunologicznym, a ptaki próbkowane są jednokrotnie), poszerzającym wiedzę na temat czynników wpływających na ryzyko zarażenia się pasożytami krwi.

Ogólnie, **dużym atutem rozprawy jest łączna analiza czterech różnych rodzajów pasożytów w tym interakcji między nimi**, bo wiele prac dotyczących pasożytów krwi prowadzonych na ptakach, poświęconych jest pojedynczym rodzajom pasożyta. W tym kontekście **warto podkreślić dwukrotne próbkowanie tych samych osobników**, pozwalające odróżnienie (do pewnego stopnia) świeże zarażenie od chronicznej parazytemii. Jeśli prace poświęcone pasożytom krwi dotyczące ich współwystępowania tych pasożytów są nie częste, to te które analizowałyby kwestię w dwóch punktach czasowych, są absolutnie rzadkie. Tymczasem przyjęte w rozprawie podejście jest niezbędne do pełnego zrozumienia dynamiki zarażeń pasożytniczymi pierwotniakami. Niska częstość takiego podejścia w literaturze zapewne wynika z trudności metodologiczno-logistycznych, które w niniejszej pracy zostały wzorowo pokonane. To daje otrzymanym w pracy wynikiem **duży potencjał poznawczy**. Dla jakości otrzymanych wyników nie bez znaczenia jest też sposób wykonania badań, a w niniejszej rozprawie, jak wynika z jej lektury, **zarówno prace terenowe i laboratoryjne jak i analiza statystyczna zostały zaplanowane (i wykonane) z najwyższą starannością** i dbałością o każdy (istotny) szczegół (np. ekspozycja na pasożyty, podwójne rozmazy, sprawdzanie współliniowości zmiennych w modelu, itd). Ta **rzetelność pracy jest również widoczna na poziomie opisu wykonanych działań** (np. podanie informacji i testowanie efektu potencjalnie zakłócających czynników, tj dokarmianie czy modyfikacja gniazda) i raportowania wyników (np. obszernie dodatki).

Uwagi krytyczne i pytania

Zidentyfikowałabym pięć głównych kwestii, które są wspólne dla wszystkich celów badawczych i mogą być problematyczne, w tym sensie że nie zostały dostrzeżone lub dostatecznie omówione w rozprawie, a więc otwierają przestrzeń do dyskusji.

Określenie prewalencji i intensywności zarażenia. W każdym z rozdziałów, do identyfikacji pasożytów krwi, zastosowano zarówno metodę mikroskopową jak i molekularną. Każda z tych metod ma swoje zalety i ograniczenia, zastosowanie obu równocześnie jest niewątpliwym atutem, bo większe możliwości analityczne – zastosowane metody mogą działać wspierająco (*sensu* zwiększając dokładność stwierdzenia zarażenia) i/lub komplementarnie: molekularna pozwala na identyfikację linii genetycznych pasożytów, a metoda mikroskopowa pozwala ocenić intensywność zarażenia. Ten potencjał nie został jednak w pełni wykorzystany w odniesieniu do linii genetycznych. W rozdziale III pojawia się ten wątek, ale zidentyfikowane linie genetyczne nie są w żaden sposób analizowane, pojawia się więc pytanie o celowość takiej identyfikacji.

Dodatkowo, gdziekolwiek mowa o stwierdzeniu pasożytów we krwi osobników, nie jest jasne czy stwierdzenie oparte zostało o jedną (którą?) metodę czy obie rozważano równocześnie. Choć domyślam, się że problem może być marginalny, nie jest jasne jak były klasyfikowane badane

osobniki pod względem obecności pasożyta, jeśli analiza rozmazów wypadła pozytywnie, a analiza molekularna dała wynik negatywny.

Oddziaływanie między pasożytami - analiza. Jednym z głównych celów rozprawy, omawianym w każdym z rozdziałów jest kwestia oddziaływania między pasożytami. W tym kontekście interpretowane są przypadki zakażeń >1 rodzajem pasożyta. Do oceny charakteru interakcji między pasożytami, wykorzystuje się tutaj iloczyn obserwowanej częstości występowania każdego z pasożytów w badanej populacji żywicieli, rekomendowany przez Combes'a (1999). Dostrzegam tu cztery problemy. Pierwszy polega na tym, jak ustalana jest częstość występowania pasożyta? Z mojego rozumienia w pracy posługiwano się prewalencją pasożyta w populacji żywiciela. Jeśli tak, to dostrzegam tu błąd logiczny w rodzaju „błędne koło”: obserwowane wartości (częstość zarażenia różnymi rodzajami pasożytów) są wykorzystywane do ustalenia wartości referencyjnej (iloczyn częstości), a potem te same wartości (częstość zarażenia danym pasożytem) odnoszone są do ustalonej referencji. Drugi problem polega na tym, że jeśli pasożyty oddziałują na siebie w zakładany sposób, to ustalenie ich prewalencji w układzie żywiciela jest mocno obciążone; jeśli oddziaływania są, założmy negatywne, to dany rodzaj pasożyta może być niedoreprezentowany w populacji żywiciela. Trzeci problem jest taki, że ustalana jest jakaś wartość referencyjna, którą trudno interpretować bo jest to pojedyncza wartość, bez przedziału ufności. Nie wiadomo w takim kontekście, jaka powinna być różnica między wartością porównywaną a referencją, aby uznać, że jest to różnica znacząca? W końcu, czwarty problem polega na tym, że informacja o częstości występowania poszczególnych pasożytów w populacji właściwie zanika w zastosowanym podejściu analitycznym.

Iloczyn częstości występowania pasożyta jest wygodną miarą dla oceny oddziaływań między pasożytami, ale jest mocno uproszczony a jeśli nie bazuje na informacji pochodzących ze środowiska („dostępność” pasożyta w środowisku żywiciela, a nie w żywicielu) może być też obciążony. Rozwiązaniem może być tu statystyka bayesowska, która pozwala na aprioryczne ustalanie rozkładów częstości pasożytów wedle istniejącej wiedzy. Rozkłady te uwzględniane są w modelu, a na wyjściu dają cały rozkład estymowanych wartości, a więc ich interpretacja jest też mniej problematyczna. Dodatkowym atutem jest kwestia wielkości próby (patrz wątek poniżej), która w bayesowskim podejściu nie determinuje przyjęcia/odrzućenia hipotezy zerowej, a jedynie wpływa na rozkład prawdopodobieństwa obserwacji badanego zjawiska.

Oddziaływanie między pasożytami – interpretacja. W pracy dyskutuje się kwestię oddziaływania między pasożytami głównie w kontekście odporności krzyżowej, co przy sposobie prowadzenia badań (obserwacja stanu rzeczy, bez kontrolowanego zarażania) nie jest takie oczywiste. Wprawdzie przywoływana jest też kwestia wykrywalności pasożytów, która mogłaby wpłynąć na ocenę stopnia oddziaływania między pasożytami oraz apel o odpowiednie badania eksperymentalne, ale proponowałabym też wzięcie pod uwagę interpretację wyników w kontekście zachowania żywiciela po zarażeniu jednym pasożytem oraz potencjalnie heterogenicznego rozmieszczenia wektorów w środowisku. Jeśli zarażony jednym pasożytem żywiciel zmieniałby swoje zachowanie (możliwe?), to mogłoby to modyfikować prawdopodobieństwo zarażenia innym pasożytem. Jeśli do tego (ale też niezależnie), występowanie wektorów byłoby niejednorodne w środowisku (możliwe?), to zarażenie wieloma pasożytami mogłoby być nielosowe, niekoniecznie na skutek bezpośrednich oddziaływań między pasożytami w organizmie żywiciela. Ponadto, na śmiertelność (zwłaszcza u młodych ptaków)

i „odławialność” ptaków może być zróżnicowana zależnie od stopnia i rodzaju parazytemii, a to też może rzutować na ostatecznie obserwowaną obserwowane frekwencje współwystępowania pasożytów w populacji żywiciela, np. (Mukhin et al. 2016).

Konstrukcja modelu. Podczas konstrukcji modeli uwzględniano zmienne główne, dla których wcześniej przedstawiono uzasadnienie (wiek, płeć), ale do modelu wprowadzano też interakcje drugiego rzędu między predyktorami, czego nie uzasadniono. Jednocześnie interakcje były krokowo usuwane z modelu jeśli były nieistotne (na poziomie $P < 0.05$). To podejście jest realizowane w każdym z rozdziałów. Sprawia to wrażenie, jakby konstrukcja modeli nie była jednak w pełni przemyślana. Predyktor w modelu albo jest ważny sam w sobie i testuje się jego efekt (nie ważne czy będzie istotny czy nie) albo utrzymuje się go w modelu ze względu na konieczność blokowania pewnych oddziaływań między predyktorami. Z tego powodu stosowanie regresji krokowej jest w tej chwili odradzane, np. (Smith 2018).

Wielkość próby. Chociaż wyjściowo wielkość próby (liczba chwytych/próbkowanych osobników żywiciela) jest zadowalająca [*de facto* imponująca (!), biorąc pod uwagę ilość pracy terenowej i laboratoryjnej która za tym stoi], względnie niska częstość zarażenia określonymi pasożytami sprawiła, że ostateczna liczba przypadków współzarażenia w jednej z rozpatrywanych grup/kategorii była zerowa lub bardzo mała. Jeśli zerowa, pewne analizy zostały wykluczone (np. analiza wpływu różnych czynników na prawdopodobieństwo zarażenia pasożytem u młodocianych bogatek została wykonana tylko dla *Heamoproteus*, rozdział III) lub prowadziło to do przebudowania modelu (w sytuacji prawie całkowitego rozdzielenia). Gdy jednak gdy liczba obserwowanych przypadków nie była zerowa (np. zmiana w statusie zarażenia, Tabela 4, rozdział I albo analiza wpływu płci na zarażenie *Leucozytozoon* – rozdział III) analizy zostały przeprowadzone, jednak w interpretacji nie ma odniesienia do tego problemu. Przyjmowanie/odrzućanie hipotez przy takich niezbalansowanych próbach może być mocno obciążone. Znow, statystyka bayesowska, mogłaby tu pomóc rozwiązać problem.

Poniżej przedstawiam listę drobniejszych uwag, które nie mają większego znaczenia dla oceny pracy, ale je zauważywszy i niniejszym wymieniam; być może będą przydatne w przygotowaniu manuskryptów do druku.

Brakuje informacji i umieszczeniu sekwencji genetycznych wykrytych pasożytów w ogólnodostępnych bazach; być może w rozprawie nie jest to kluczowe, ale na pewno w publikowanej pracy taka informacja (i depozycja) powinna się znaleźć.

W każdej z pracy, dla oceny współliniowości zmiennych w modelu podana jest informacja, że VIF < 5 . Jako że w różnych pracach przyjmuje się różne kryteria dla uznania, że współliniowość nie występuje/nie ma znaczenia (czasem jest to VIF < 2), być może lepiej podawać obserwowane wartości dla użytych modeli (np. dla wszystkich modeli VIF < 3.1) i przy tym podać stosowane kryterium dla akceptowalnego poziomu VIF.

Kondycja ciała samic (rodział I i II) była mierzona za pomocą masy ciała standaryzowanej długością skoku. Mam wątpliwość czy jest to dobra miara, w tym sensie, że duży szum statystyczny wokół tej miary (różne zmienne mogące wpływać na wartość) mogą tłumić efekt działania ektopasożytów, zwłaszcza gdy efekt ektopasożytów na tę cechę może nie być bardzo silny. Być może, mając wykonane rozmazy krwi, warto by rozważyć ocenę parametrów hematologicznych, które mogą być lepszą miarą kondycji kształtowanej działaniem ektopasożytów (np. liczba leukocytów/heterofili mogą więcej powiedzieć o aktywności układu immunologicznego i ogólnym poziomie stresie).

Niektóre osobniki były reprezentowane >1 w puli danych i dla modeli w których to miało znaczenie, dla kontrolowania efektu niezależności punktów danych, dokonywano losowania lub „manualnego” selekcjonowania rekordów, tak by każdy osobnik reprezentowany był jednokrotnie. Zastanawiam się, dlaczego nie zastosowano modeli mieszanych z efektami losowymi, które pomagają ten problem kontrolować a jednocześnie lepiej „ściągają” współczynniki w modelu?

Rozdział I, Tabela 1: Niejasne co oznacza zakres dla daty złożenia pierwszego jaja oraz daty wyklucia (podane są liczby a zmienną jest data).

Rozdział I, opis metody: *„Ze względów logistycznych gniazda były umieszczane w innych skrzynkach niż te, w których zostały wybudowane. W każdym sezonie lęgowym w kilku pierwszych lęgach umieszczano „sztuczne” gniazda, do których budowy wykorzystano torfowce Sphagnum.”* – Niejasna informacja; zupełnie nie wiem o co tu chodzi.

Rozdział I, opis metody: *„Lęgi były przypisywane do grup wraz z postępem sezonu naprzemiennie w celu kontrolowania zmienności środowiskowej i fenotypowej ptaków.”* – Niejasna informacja, czy to znaczy że zmieniał się status infestacji pchłami? Jak to możliwe, jeśli proces infestacji był rozłożony w czasie (i.e. zwiększanie liczby pcheł w gnieździe poprzez ich dokładanie w środku inkubacji)??

Rozdział I, opis metody: *„Aby potwierdzić skuteczność zabiegu eksperymentalnego, w 14. dniu po wykluciu piskląt, gniazda były zbierane w celu określenia liczby pcheł. Gniazda były umieszczane w temp. ok. -20 °C przez co najmniej 24 h, a następnie materiał był dokładnie przeszukiwany pod kątem obecności dorosłych pcheł.”* – Niejasne. Gniazda były pobierane na 24h w 14dniu życia piskląt, a we wstępie jest napisane, że pisklęta opuszczają gniazdo po 18–20 u bogatki i 17–18 u modraszki. A więc odbywało się to w czasie kiedy pisklęta mogły być jeszcze w gnieździe?

Rozdział III, opis metody: *„W 2015 r. za datę klucia przyjęto dzień, w którym w momencie kontroli gniazda pisklęta wykuły się z ponad 50% jaj, natomiast w 2016 r. – dzień, w którym w momencie kontroli w gnieździe znajdowało się co najmniej jedno pisklę.”* – Niejasne dlaczego jest tu różny sposób kalkulacji daty klucia dla dwóch sezonów oraz jakie mogłoby mieć to znaczenie dla wyniku?

Rozdział III, Tabela 2 - Tabela podaje liczbę schwytanych samców i samic, ale w odniesieniu do całkowitej liczby schwytanych ptaków. Tymczasem część analiz było opartych o dane gdzie ptaki były

chwymane i próbkowane dwukrotnie (jako pisklęta i młodociane; mniejsza wielkość próby), a dla takiego zestawu danych nie wiadomo jak wyglądała proporcja płci.

Podsumowanie i ocena końcowa: Pomimo wymienionych uwag, moja ogólna opinia dotycząca rozprawy doktorskiej Pana mgr Adama Krupskiego jest pozytywna. Ilość tekstu dotyczącego wątpliwości czy formułowanych pytań jest być większa niż tego, który dotyczy pozytywów, ale proporcja nie powinna być tutaj w żaden sposób interpretowana. Ilość formułowanych przeze mnie uwag nie stanowi wartości pracy, zakładam, że jest to przestrzeń do dyskusji podczas obrony i ewentualne źródło inspiracji podczas publikowania wyników i w przyszłej pracy badawczej. Co najbardziej istotne, w rozprawie podnoszony jest ważny problem badawczy, jego uzasadnienie jest poparte odpowiednią literaturą a zastosowana metodologia jest poprawna. Prezentowane wyniki, pomimo swych ograniczeń są wiarygodne i stanowią istotny i wartościowy wkład w rozwój dyscypliny. Rozprawa ma postać jedno-autorskiego manuskryptu, i choć jak się domyślam prace terenowe i być może laboratoryjne mogły być realizowane przy udziale innych osób, udział doktoranta był tu kluczowy i znaczący, a więc jego autorstwo rozprawy jest niekwestionowalne. W związku z powyższym i zgodnie z obowiązującym prawem (Ustawa Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r.; Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 z późn. zm.), przedstawioną mi do oceny rozprawę uważam za "oryginalne rozwiązanie problemu naukowego". W ślad za tym uprzejmie rekomenduję Radzie Naukowej Muzeum i Instytutu Zoologii Polskiej Akademii Nauk w Warszawie dopuszczenie Pana mgr Adama Krupskiego do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Katarzyna Wojczulanis-Jakubas



dr hab. Katarzyna Wojczulanis-Jakubas
Dept of Vertebrate Ecology and Zoology
University of Gdańsk