

Recenzja rozprawy doktorskiej pana mgr Konrada Wojnarowskiego pt. **"Ocena wpływu hormonów płciowych na wybrane parametry fenotypu oraz ekspresję genu *cyp11b1* potencjalnie związaną z procesem karcinogenezy u danio przegowanego (*Danio rerio*)"**

Opracowanie recenzji rozprawy doktorskiej pana mgr. Konrada Wojnarowskiego pt. "Ocena wpływu hormonów płciowych na wybrane parametry fenotypu oraz ekspresję genu *cyp11b1* potencjalnie związaną z procesem karcinogenezy u danio przegowanego (*Danio rerio*)" wykonano w związku z pismem wystosowanym przez Radę Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Praca doktorska wykonana była na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod opieką naukową dr. hab. Ryszarda Polechońskiego, prof. UPWr. z Instytutu Hodowli Zwierząt Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt UPWr a promotorem pomocniczym była dr n. wet. Małgorzata Bednarska z Katedry Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UPWr.

Rozprawa doktorska zawiera 68 stron i ma układ typowy dla prac naukowych czyli: Wstęp podzielony na podrozdziały, cel pracy i hipotezy badawcze, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, literatura oraz spis odsyłaczy tj.: rycin, zdjęć, tabel i wykresów. Ponadto w pracy znajdują się streszczenie w języku polskim i angielskim wraz ze słowami kluczowymi, spis skrótów i pojęć oraz podziękowania.

Problem zanieczyszczenia środowiska jest stale aktualnym problemem, który nurtuje wielu naukowców. Jednym ze źródeł zanieczyszczeń środowiska są także pochodne hormonów wynikające z działalności i funkcjonowania człowieka. Problem pozostałości farmaceutyków, w tym także hormonów płciowych w ostatnich latach staje się jednym z poważniejszych problemów związanych ze źródłami zanieczyszczeń, gdyż ich specyficzna funkcja w organizmie może powodować znaczące zmiany w funkcjonowaniu ekosystemów naturalnych. Pod tym względem podjęty temat niniejszych badań wydaje się interesujący,

gdyż autor chciał przedstawić nam wpływ pozostałości hormonów płciowych w środowisku na pewne cechy żywego organizmu, w tym przypadku larw ryb.

Pomimo, że tytuł w większości odpowiada treści dysertacji to za niepotrzebne uważam użyte w nim sformułowanie „... potencjalnie związaną z procesem karcinogenezy u danio przegowanego ...”. Co prawda w pracy Autor na podstawie dostępnej literatury wyjaśnia tę zależność, jednak treść i wyniki uzyskane w niniejszej pracy nie dotyczą i nie wyjaśniają tego problemu.

W streszczeniu w języku polskim i angielskim Doktorant w poprawny sposób scharakteryzował i opisał najważniejsze osiągnięcia swojej pracy, ale w trakcie lektury tej części pracy nasunęło mi się kilka spostrzeżeń:

- Doktorant w streszczeniu napisał „Uzyskane wyniki wskazują na negatywny wpływ 17- $\beta$ -estradiolu na wybarwienie larw” (linia 14 – 15 streszczenia). Co Autor rozumie przez negatywny wpływ na wybarwienie?
- niektóre zdania streszczenia są niepoprawnie zbudowane np.: linia 16 – 17, „Wykazano istotny statystycznie wpływ estronu i estriolu, co stanowi pionierskie odkrycie w przypadku tych dwóch substancji”. Wpływ, ale na co? I jaki ten wpływ był?
- Autor bardziej skupił się na opisie różnic statystycznych niż na opisie wyników i ich omówieniu np.: linia 23 - 24 „Zaobserwowano występowanie wysoko istotnych ( $p < 0,01$ ) różnic między wszystkimi analizowanymi grupami.” i linia 26-27 „Ponownie zaobserwowano występowanie wysoko istotnych ( $p < 0,01$ ) różnic między wszystkimi analizowanymi grupami” i inne. Ponadto po lekturze pracy uważam, że wśród słów kluczowych brakuje „*Danio rerio*”, a zbędne są takie słowa kluczowe jak „receptory estrogenów”, „marker genetyczny”.

We wstępnej części swojej pracy Doktorant przedstawił podział i definicje związane z hormonami płciowymi a także opisał znaczenie estrogenów oraz ich wpływ na środowisko życia człowieka. Jak zaznaczył we wstępie Autor dysertacji estrogeny stanowią jedną z najbardziej niebezpiecznych grup hormonów, które mogą wpływać na funkcjonowanie środowiska naturalnego i organizmów w nich żyjących. Mogą one powodować szereg zmian w organizmie, a także mogą powodować regulacje i dysfunkcje różnych procesów w nich zachodzących. Ponadto przyjęcie jako celu dysertacji określenie wpływu naturalnych estrogenów w tym przypadku estronu, estriolu i 17 beta-estradiol na ekspresję genu CYP1B1 wydaje się jak najbardziej uzasadnione naukowo, gdyż gen CYP1B1 dostarcza instrukcji wytwarzania enzymów (z rodziny enzymów cytochromu P450), które biorą udział w wielu procesach w organizmie. Stąd uważam że tematyka podjęta w niniejszej rozprawie

doktorskiej jest jak najbardziej aktualna i może stanowić przyczynek do dalszych szerszych badań. Moim zdaniem Doktorant mógłby we wstępie umieścić dodatkowo informacje na temat monitoringu występowania pozostałości tych hormonów w środowisku wodnym oraz granicznych ich stężeń, które uznaje się za szkodliwe lub wpływające negatywnie na środowisko wodne. Byłoby to całkowicie uzasadnione, gdyż pod koniec 2013 r. Parlament Europejski zatwierdził Dyrektywę 2013/39/UE, która zmieniła zapisy dyrektyw 2000/60/WE i 2008/105/WE w zakresie substancji priorytetowych w dziedzinie polityki wodnej, wprowadzając obowiązek monitorowania w wodach powierzchniowych związków chemicznych z tzw. listy obserwacyjnej. Lista ta określa substancje, które mogą stanowić ryzyko dla środowiska wodnego UE. Wśród tych związków są dwa będące przedmiotem badań w niniejszej dysertacji tj.: estriol i 17 beta-estradiol (E2), których monitorowanie obowiązuje od września 2015r.

W kolejnych podrozdziałach Wstępu Autor przedstawił charakterystykę gatunku na którym prowadził eksperyment - danio pręgowany (*Danio rerio*). Opisane zostały środowisko życia, morfologia a także cechy biologiczne umożliwiające wykorzystanie tego gatunku, jako organizmu modelowego w różnego rodzaju eksperymentach. Część wstępu porusza także problematykę związaną z powszechnością nowotworów, a także wpływu hormonów płciowych i szczególnie estrogenów na procesy karcinogenezy. Doktorant w pracy określił jeden cel główny polegający na ewaluacji wpływu estriolu, 17- $\beta$ -estradiolu i estronu na wybrane parametry pigmentacji larw *Danio rerio* oraz na ekspresję genu CYP1B1. Dodatkowo sformułowane zostały cztery cele szczegółowe i cztery tezy badawcze, których zadaniem było wyjaśnienie celu głównego. Co prawda uważam, że hipotez badawcza powinna być sformułowana na tyle konkretnie na ile się da, aby wyjaśnić jakieś zjawisko, natomiast Doktorant sformułował je bardzo ogólnie. Na przykład teza nr 1 brzmi: „ekspozycja na estrogeny powoduje zmiany względnej pigmentacji larw danio pręgowanego”. Teza sama w sobie wydawać się może poprawna, nasuwa się pytanie: jakie zmiany? Wydaje mi się, że teza powinna zawierać założenie, że dany czynnik doświadczalny, w tym przypadku różne hormon płciowe i różne ich stężenia, wpływają albo pozytywnie albo negatywnie na względną pigmentację larw danio pręgowanego. Inaczej mówiąc powinna odnosić się do jakiejś konkretnej zależności a nie ogólnie do zależności.

Podsumowując ocenę tej części pracy uważam, że przedstawiony we wstępie pracy przegląd literatury bardzo szeroko opisuje podjętą tematykę badawczą i uzasadnia cel główny oraz cele szczegółowe sformułowane przez Autora w ocenianej dysertacji.

W kolejnym rozdziale rozprawy doktorskiej Autor przedstawił materiał i metody wykorzystywane przy prowadzeniu swoich badań. W zakres prac przy realizacji badań wchodziło szereg działań, których celem było:

- przygotowanie i przeprowadzenie eksperymentu utrzymania larw *Danio rerio* w różnych stężeniach estriolu, 17- $\beta$ -estradiolu i estronu wraz z kontrolą wybranych parametrów jakości wody tj.: odczynu, poziomu natlenienia, temperatury i przewodnictwa elektrycznego.
- przygotowanie materiału biologicznego pochodzącego z larw *Danio rerio* i przeprowadzenie izolacji RNA, syntezy cDNA oraz analizy real-time PCR w celu oceny poziomu ekspresji genu CYP1B1.
- analizę poziomu względnej pigmentacji larw *Danio rerio* na podstawie fotografii cyfrowej z wykorzystaniem programu do zaawansowanej obróbki fotografii GIMP.

Większa część tego rozdziału przedstawia bardzo konkretne i rzeczowe informacje metodyczne oraz szczegóły o sposobie przeprowadzenia analiz, ale w jednym z ostatnich podrozdziałów dotyczących analizy poziomu względnej pigmentacji larw oczekiwałbym bardziej konkretnych i uzasadniających informacji tzn. dlaczego Doktorant przyjął skalę szarości barw (tzn. od białego do czarnego w skali 1 - 255) a nie wspierał się ogólnie wykorzystywanym modelem RGB? Brakuje mi także w tej części pracy bardziej szczegółowego i jednoznacznego opisu miejsc/punktów próbkowania wartości pigmentacji. Załączona rycina 2 określająca punkty próbkowania pigmentacji obrazuje je bardzo niedokładnie, ogólnie w postaci bardzo dużych krzyżyków, a moim zdaniem wymagałoby to bardziej dokładnego opisu miejsca, w którym ten parametr był mierzony u wszystkich larw. Dodatkowo niewiele wiadomo na temat źródła światła podczas fotografowania, co prawdopodobnie mogłoby wpływać na ostateczną barwę larw. Część metodyczną kończy podrozdział dotyczący wykorzystanych analiz i programów statystycznych. Informacje te są bardzo skromne i moim zdaniem wymagałyby większego skonkretyzowania. Same zastosowane metody wydają się poprawne i właściwe, ale brakuje wyjaśnień:

- Zabrakło w opisie metod statystycznych opisu testu statystycznego np.: ANOVA – jednoczynnikowa analiza wariancji. Testy *post hoc* stosowane są w sytuacji, w której w wyniku testu statystycznego np.: ANOVA lub Welcha odrzucono hipotezę zerową ( $H_0$ ) zakładającą równość wartości średnich w próbach i przyjęto hipotezę alternatywną ( $H_1$ ) stwierdzającą, że przynajmniej jedna średnia różni się istotnie od pozostałych;
- sprecyzowania konkretnie dla jakich parametrów wykorzystano analizę statystyczną (np.: analizę wariancji) czy też, które grupy ze sobą porównywano;

- uważam, że Doktorant powinien umieścić wzmiankę, że analizy wykonywano przy dwóch poziomach istotności tzn.  $P \leq 0,05$  i  $P \leq 0,01$  (patrz rozdział „Wyniki” Wykres 7, 8 i 9);
- zabrakło również uściślenia parametrów szacowania korelacji Spearmana, pomiędzy jakimi grupami określano zależność pigmentacji od ekspresji genu CYP1B1. Czy ogółem dla wszystkich grup doświadczalnych, czy też uwzględniono różne grupy związane z zastosowanym czynnikiem doświadczenia tzn. estriolu, 17- $\beta$ -estradiolu i estronu;
- w tym rozdziale nie zauważyłem cytowania w tekście ryciny 2;
- pomyłono także znak przy określaniu poziomu istotności zamiast „>” powinien być „ $\leq$ ”.

W rozdziale „Wyniki” Doktorant w postaci 3 tabel i 9 wykresów przedstawił rezultaty prowadzonych badań. Uzyskane wyniki Autor pogrupował na wyniki względnej pigmentacji larw *Danio rerio*, gdzie czynnikiem doświadczalnym było stężenie poszczególnych rodzajów roztworów hormonalnych oraz wyniki poziomu ekspresji genu CYP1B1 u larw, które obejmowało wyniki uwzględniające dwa czynniki doświadczalne. Pierwszym z czynników były stężenia 10 ng/dm<sup>3</sup>, 100 ng/dm<sup>3</sup> i 1000 ng/dm<sup>3</sup> poszczególnych roztworów hormonalnych, natomiast drugim czynnikiem doświadczalnym był rodzaj roztworu hormonalnego, gdzie określono zróżnicowanie wartości uzyskanych wyników dla trzech stężeń w obrębie poszczególnych roztworów hormonalnych. Wydaje mi się, że ciekawym mogłoby być także wykorzystanie w część dotyczącej względnej pigmentacji larw *Danio rerio* porównania zmienności tej cechy w zależności od zastosowanego roztworu hormonalnego. Pomimo dość przejrzystego przedstawienia wyników przez Doktoranta nie obyło się bez nieścisłości, potknięć i niejasności. Moim zdaniem Doktorant w tym rozdziale pracy skupił się bardziej na opisie różnic statystycznych niż opisie samych wartości badanych cech czy parametrów. Różnice statystyczne nie są wynikiem, są dowodem na różnice pomiędzy badanymi, testowanymi grupami i nie opisujemy ich jako wyniki tylko udowadniamy nimi postawione tezy. W tej części pracy użyto skrótu RNE obrazującego poziom ekspresji genu CYP1B1, którego nie wytłumaczono w całej pracy, a także nie umieszczono go w „Wykazie skrótów i pojęć”. Ponadto w całej pracy przy cytowaniu poziomu istotności  $P < 0,05$  lub  $P < 0,01$  powinno się konsekwentnie używać poprawnego znaku „ $\leq$ ”.

Inne drobne uwagi do tego rozdziału:

- w tytułach tabel ze względną pigmentacją (Tabel 6, 7 i 8) brakuje określenia, że to średnia względna pigmentacja,
- dane w tabelach powinny zawierać dane o podobnym formacie tzn. liczba miejsc po przecinku powinna być taka sama,

- do całego rozdziału „Wyniki” - większa liczba cyfr po przecinku nie jest konieczna. Standardem jest stosowanie zaokrąglenia do dwóch miejsc po przecinku ewentualnie przy niższych wartościach statystyki „P” napisanie  $P < 0,001$ ,
- w tabeli 7 i na wykresie 2 brak indeksu z literką przy wartościach dla E2.2 – czy te dane nie były analizowane? Bo jeśli były a nie było stwierdzonych różnic statystycznych to taki zapis uważam za niepoprawny. Indeks górny literowy powinien być taki sam przy średnich nie różniących się statystycznie,
- czy dane na wykresach są tymi samymi danymi co dane w tabelach? Powinno się unikać powtarzania prezentacji tych samych danych w różnych formach,
- brak legendy/opisu dla wąsów na wykresach, nie wiadomo co oznacza ten parametr?
- w tekście można czasami napotkać sformułowania będące skrótami myślowymi np.: „..... nie wskazały na obecność istotnych różnic statystycznych pomiędzy stężeniami.” (np.: Wyniki str. 38, wiersz 2-4 od góry) i inne.

Uwieńczeniem analizy wyników jest w pracy rozdział „Dyskusja”. Doktorant w tej części pracy starał się podsumować wyniki uzyskane w przeprowadzonym eksperymencie i zaprezentować je na tle aktualnej wiedzy w tym obszarze. Generalnie jest to rozdział napisany poprawnie, ale Autor nie uniknął potknięć i niezbyt konkretnych sformułowań. Założone przez Doktoranta tezy badawcze stara się on w tym rozdziale potwierdzić, ale to potwierdzenie niekiedy wydaje się zbyt ogólne, bez stwierdzenia konkretnej zależności. Na stronie 44, akapit 3 Doktorant napisał „Wyniki analizy względnego poziomu pigmentacji larw przeprowadzonej w niniejszej pracy, wskazujące na istotny statystycznie wpływ 17- $\beta$ -estradiolu, potwierdzają prawdziwość pierwszej hipotezy zakładającej istnienie związku pomiędzy tymi zmiennymi.” Ale nie wiemy jakiego związku: pozytywnego czy negatywnego? I kolejne pytanie które chciałbym zadać: Co mamy rozumieć przez negatywny wpływ na pigmentację a co przez pozytywny, Autor nigdzie tego nie wyjaśnia. Innym niezbyt fortunnym stwierdzeniem w tym rozdziale jest zdanie:” Zaprezentowane wyniki własne są zbieżne z większością obserwacji innych autorów.” (Dyskusja str. 45, wiersz 14 i 15). Nasuwa się pytanie których autorów, Doktorant powinien zacytować te źródła, w których inni autorzy opisali wyniki zbieżne z uzyskanymi w ocenianej pracy.

W dalszej części dyskusji Autor odnosi się do potencjalnie większej toksyczności związku E2.3 w wysokich stężeniach na larwy ryb danio pręgowanego (str. 48, wiersz 5 – 8). I tutaj napisał: „Larwy poddane ekspozycji w tej grupie wykazywały się znacznie niższą żywotnością oraz chęcią żerowania”. Jest to zastanawiające, gdyż Doktorant nie badał tych zależności i nie poruszał tego tematu w wynikach swoich badań. Swoją drogą uważam,

że rozszerzenie tego zagadnienia i uwzględnienie tego w wynikach badań własnych wpłynęłoby na podniesienie jakości dysertacji. Podsumowując ocenę tej części pracy można stwierdzić, że Doktorant właściwie skorzystał z bogatej literatury, próbował potwierdzić sformułowane w pracy tezy badawcze i starał się dokonać porównania uzyskanych wyników w badaniach własnych z osiągnięciami innych autorów w tym obszarze.

Rozdział Wnioski powinien zawierać syntetyczne i podsumowujące odpowiedzi na sformułowane w dysertacji cele oraz tezy badawcze i w ocenianej pracy takie informacje otrzymujemy. Jednak forma opisu tych wniosków wydaje mi się za bardzo zbliżona do podsumowania wyników niż sformułowania wniosków.

Podjęty przez Autora temat oraz zakres badań pozwoliły na wykorzystanie w pracy bardzo bogatego liczącego 151 pozycji piśmiennictwa, z czego tylko jedno źródło (poz. 94) jest w języku polskim a pozostałe w języku angielskim. Większość cytowanych pozycji piśmiennictwa to prace z ostatnich lat (od 2018 roku – 49 pozycji, natomiast sprzed 2000 roku jest tylko 9 źródeł). Tak bogate i aktualne piśmiennictwo wskazuje na duże zainteresowanie w świecie nauki tematyką podjętą w ocenianej pracy oraz znajomość tematyki przez Doktoranta. Po lekturze tej części muszę przyznać, że jest ona bardzo niestarannie przygotowana. Napotkać w niej można szereg błędów edytorskich, wśród których należy wymienić:

- tytuły czasopism są raz pisane pełną nazwą, a znów innym razem skrótami;
- wiele tytułów czasopism jest pisane małymi literami np.: poz. 1, 3, 8 i wiele innych;
- niejednolity zapis nazw czasopism, raz normalna czcionka a innym razem kursywą np.: poz. 12, 21, 46, 49 i wiele innych;
- brak pełnych danych bibliograficznych (stron) publikacji np.: poz. 67, 73;
- brak dat korzystania ze stron internetowych np.: poz. 111, 113, 114

Pomimo zauważalnego dużego wkładu pracy Doktoranta w przygotowanie ocenianej dysertacji, w całej pracy wychwyciłem szereg nieścisłości, niewłaściwych sformułowań, skrótów myślowych i innych błędów edytorskich. Mam nadzieję, że Autor dysertacji podczas obrony rozstrzygnie i wyjaśni mi wszystkie wymienione wątpliwości.

Inne drobne uwagi do całej pracy:

- Doktorant powinien ujednoczyć sposób cytowania źródeł. Raz używa w pracy zapisu np.: Martinez i in. (str. 45) a innym razem np.: Spence i wsp. (tytuł tabeli 1), Lu i wsp. (dyskusja str. 47, 9 wiersz od góry).

- podobnie z zapisem nazwy genu CYP1B1 raz jest pisane wielkimi literami (str. 39 wiersz 2 i 3, a we Wstępie i w Dyskusji pisany jest małymi literami. Autor powinien ujednolicić ten zapis.

W niektórych miejscach praca jest niedopracowana edytorsko:

- tytuł zdjęcia 8 nie znajduje się pod zdjęciem, a jest na kolejnej stronie. Podobnie tytuł wykresu 5 nie jest pod wykresem i jest także na kolejnej stronie,
- raz są, a innym razem nie ma kropek po tytułach tabel, zdjęć i podrozdziałów np.: są kropki po tytule podrozdziału „Danio pręgowany jako gatunek modelowy”, (str. 18) i „Powszechność nowotworów” (str. 20) i inne.

Zapoznając się z dysertacją uznałem za stosowne poznanie dorobku naukowego Autora. Według wyników wyszukiwania w bazie Scopus (data 28.06.2022) w ostatnich czterech latach Doktorant był autorem lub współautorem 10 publikacji z czego większość (9) opublikowana została w ostatnim i bieżącym roku tj. 2021 i 2022. W dwóch wieloautorskich pracach Doktorant jest pierwszym autorem a w dwóch kolejnych, drugim autorem. Łączny wskaźnik *impact factor* dla wspomnianych publikacji wynosi 31,606. Uważam, że dorobek publikacyjny Doktoranta, jak na krótki staż naukowy jest imponujący. Mam nadzieję, że wymienione w mojej recenzji uwagi, niedociągnięcia i błędy edytorskie będą dla Doktoranta motywacją do bardziej intensywnej pracy nad doskonaleniem warsztatu naukowego.

### **Wniosek końcowy**

Dysertacja wnosi nowe elementy do poznania wpływu pozostałości hormonów rozrodczych w środowisku wodnym na cechy fenotypowe oraz procesy biochemiczne związane z ekspresją genu CYP1B1 u danio pręgowanego. Doktorant wykazał się dużą wiedzą teoretyczną w zakresie biochemicznych podstaw funkcjonowania młodocianych form ryb, umiejętnością prowadzenia badań naukowych oraz analizy i syntezy uzyskanych wyników. Na podkreślenie zasługuje również odpowiednie wykorzystanie bardzo bogatej literatury przedmiotu. Rozprawę doktorską Pana mgr Konrada Wojnarowskiego uważam za interesującą, a wskazane w mojej opinii uwagi, niedociągnięcia i błędy edytorskie są stosunkowo łatwe do usunięcia, co powinno mieć miejsce przy ewentualnym przygotowywaniu rozprawy do publikacji. Wymienione powyżej sugestie i uwagi krytyczne nie wpływają na moją pozytywną opinię o pracy.

Uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska pana mgr. Konrada Wojnarowskiego pt. "Ocena wpływu hormonów płciowych na wybrane parametry fenotypu oraz ekspresję genu *cyp1b1* potencjalnie związaną z procesem karcinogenezy u danio



pręgowanego (*Danio rerio*)" stanowi próbę rozwiązania postawionego problemu naukowego i spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Uchwale nr 3/2021 Senatu Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 29 stycznia 2021 oraz art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2022 poz. 574 ze zm.).

Powyższe upoważnia mnie do wystąpienia do Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie Pana mgr. Konrada Wojnarowskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

  
Jacek Rechulicz