

Warszawa, 01.08.2022 r.

Dr hab. Maciej Kamaszewski, prof. SGGW

Instytut Nauk o Zwierzętach

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Tel. 22 593 66 45, e-mail: [maciej\\_kamaszewski@sggw.edu.pl](mailto:maciej_kamaszewski@sggw.edu.pl)

### **Ocena 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 pręgowanego (*Danio rerio*)”, wykonanej na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Pod kierunkiem promotora Pana dr hab. Ryszarda Polechońskiego, prof. uczelni i Promotora pomocniczego Pani dr lek. wet. Małgorzaty Bednarskiej**

Wykonano recenzję monograficznej rozprawy doktorskiej, w której Doktorant przedstawił wyniki oryginalnych badań naukowych, pozwalających na rozwiązanie problemu naukowego. Została ona, wraz z pismem przewodnim od Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo (sygn. BDDD0000.RDZiR.4100.33.2022), przesłana w formie wydrukowanej. Przedstawiona do oceny dysertacja zawiera 68 stron, w tym 2 ryciny, 13 zdjęć, 8 tabel i 9 wykresów. Treść rozprawy doktorskiej została podzielona na „klasyczne” dla prac o charakterze doświadczalnym rozdziały: Streszczenie, Wykaz skrótów i pojęć, Wstęp (z podrozdziałami), Cel pracy i hipotezy badawcze, Materiał i Metody (z podrozdziałami), Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Literatura oraz Spisy rycin, zdjęć, tabel i wykresów.

Tematyka badań podjęta przez Doktoranta jest bardzo interesująca i aktualna. Mieści się ona w ramach dyscypliny zootechnika i rybactwo, oraz w obszarze zainteresowań osób zajmujących się ekotoksykologią. Do tej pory wpływ ksenohormonów, w tym hormonów płciowych, na organizmy wodne nie jest w pełni poznany. Każde badania z tej tematyki pozwalają na lepsze zrozumienie problemu, jakim jest zanieczyszczenie hormonami środowiska naturalnego i szacowanie ryzyka środowiskowego, jakie ten typ zanieczyszczeń

może powodować. Szczególnie wartościowe w pracy wydaje się analizowanie wpływu nie tylko estradiolu, ale także estronu i estriolu na rozwój embrionów i larw danio pręgowanego (*Danio rerio*), a także ekspresję genu *cyp1b1*, będącego jednym z markerów kancerogenezy. Ponadto godnym zauważenia jest dobór modelu badawczego - embrionów danio pręgowanego. Jest to ważny przykład implementacji zasady 3R w badaniach toksykologicznych.

Część merytoryczna pracy zaczyna się jednostronicowym streszczeniem w języku polskim i angielskim, które dobrze przedstawia cel pracy i uzyskane wyniki. Doktorant umieścił również 7 słów kluczowych, które opisują zagadnienie badawcze, nie są one jednak ułożone w kolejności alfabetycznej. Przed właściwą częścią rozprawy doktorskiej Autor umieścił „Spis treści” oraz „Wykaz skrótów i pojęć”.

Doktorant w pierwszej części „Wstępu” omawia zagadnienia związane z estrogenami, ich rodzajami oraz emisją do środowiska. Przedstawia także mechanizmy działania tych hormonów i ich wpływ na organizmy wodne. W kolejnej części Autor przedstawił zwięzłą charakterystykę danio pręgowanego, gatunku natywnie występującego w wodach Azji Południowej, oraz uwarunkowania, dlaczego ta ryba stała się jednym z najważniejszych modeli badawczych, powszechnie stosowanych we współczesnej nauce. W ostatniej części rozdziału Doktorant przedstawił wpływ estrogenów na proces kancerogenezy. W tym rozdziale pojawia się jednak nieścisłość. Ze względu na niedawne zmiany systematyczne, od mniej więcej roku, danio pręgowany nie jest zaliczany do rodziny ryb karpiowatych. Oczywiście, w licznych publikacjach naukowych powtarzane jest ujęcie systematyczne niezgodne z nowym stanem wiedzy, który jest prezentowany na fishbase.org. Obecnie podrodzina *Danioninae*, do której zaliczamy wykorzystany w prezentowanych analizach model badawczy, jest zaliczana do rodziny *Danionidae* w obrębie rzędu ryb karpiokształtnych (Cypriniformes). Z punktu widzenia merytoryki pracy jest to drobne uchybienie, ale ze względu na obowiązki recenzenta jestem zobligowany do wspomnienia o zmianach systematycznych.

Po wprowadzeniu czytelnika w zagadnienia, wokół których koncentruje się rozprawa doktorska, autor przedstawił cel pracy i hipotezy badawcze. W tym jednostronicowym rozdziale Doktorant w sposób syntetyczny przedstawił główny cel pracy, czyli „ewaluację wpływu estriolu, 17- $\beta$ -estradiolu i estronu na wybrane parametry pigmentacji larw *Danio rerio* oraz na ekspresję genu *cyp1b1*”. Następnie autor doprecyzował badane zagadnienie poprzez przedstawienie 4 celów szczegółowych oraz 4 testowanych hipotez badawczych. Klarowne przedstawienie celu i zakresu pracy pozwala osobom czytającym na skupieniu się na wynikach pracy i płynących z nich wnioskach.

W kolejnym, 13-stronicowym rozdziale, Doktorant przedstawił materiał i metody badawcze wykorzystane w doświadczeniu. Ten fragment tekstu został wzbogacony o 12 zdjęć, 3 tabele i jedną rycinę, które dobrze obrazują wykonane procedury badawcze. Autor przedstawił zagadnienia dotyczące: pochodzenia oraz hodowli danio pręgowanego podczas doświadczenia, przygotowania roztworów badanych hormonów oraz planu doświadczenia wraz z symbolami grup badawczych, pobierania i utrwalania materiału do analiz, przebiegu analiz genetycznych i poziomu względnej pigmentacji larw oraz analiz statystycznych.

W omawianej części zauważyłem szereg nieścisłości bądź pominięć, które w przyszłości, podczas przygotowywania publikacji naukowej, trzeba by było uzupełnić. Ze względu na prowadzenie badań na zwierzętach, na początku tego rozdziału przydałaby się informacja, dlaczego badania nie wymagają zgody lokalnej Komisji Etycznej ds. badań na zwierzętach. Autor zamieścił co prawda stosowną informację w podrozdziale „Procedura eutanazji larw” (strona 27), ale myślę, że tak ważna informacja powinna znaleźć się na początku rozdziału „Materiał i Metody”. Ponadto na stronie 23 Doktorant przedstawił Zdjęcie 2, które przedstawia butelki hodowlane zawierające embriony danio pręgowanego. W tekście na stronie 24 (podrozdział „System utrzymania larw”) pojawia się informacja, że ekspozycja embrionów i larw była prowadzona w zbiornikach 20-litrowych. Myślę, że tę niejasność związaną ze sposobem utrzymania embrionów i larw należałoby wyjaśnić. Ponadto ważnym problemem jest brak wyraźnie napisanej informacji, jak długo trwało doświadczenie, tj. kiedy embriony zostały poddane ekspozycji na badane hormony i jak długo ta ekspozycja trwała. Co prawda z tekstu można domyśleć się, że doświadczenie zakończono przed 5 dniem od wyklucia, czyli momentem rozpoczęcia odżywiania egzogenne przez larwy (strony 27-28). Jednakże myślę, że tak kluczowa informacja powinna być w sposób jasny umieszczona we fragmencie tekstu, gdzie prezentowany jest schemat doświadczenia.

Kolejną wątpliwością jest zdjęcie numer 4. W tekście na stronie 24 Doktorant napisał, że doświadczenie było prowadzone w zbiornikach 20-litrowych. Na wspomnianym zdjęciu można zobaczyć akwaria o odpowiadającej opisowi objętości, ale w ich środku można zauważyć pływające plastikowe kotniki, stosowane przez akwarystów m.in. do rozrodu ryb piękniczkowatych. Czy w tych małych kotnikach były utrzymywane embriony i larwy podczas doświadczenia? Czy doświadczenie prowadzono bezpośrednio w akwariach? Chciałbym również zwrócić uwagę na brak odwołania się w tekście na załączone w rozdziale Zdjęcie 5, Rycinę 2 oraz Tabelę 3.

W rozdziale „Wyniki” Doktorant przedstawił wpływ estrogenów na: pigmentację ryb (na 3 tabelach i 3 wykresach) oraz ekspresję genu *cyp11b1* (na 6 wykresach). Zaprezentowane wykresy klarownie przedstawiają uzyskane wyniki wraz ze statystyką. Dodatkowo w tekście Autor przedstawił również poziom uzyskanej korelacji między względną pigmentacją larw a ekspresją badanego genu.

W kolejnym rozdziale („Dyskusja”) zostały zestawione uzyskane wyniki badań z opublikowanymi przez innych autorów danymi. Ten 6-stronicowy rozdział jest wstępem do następnej części dysertacji, czyli „Wniosków”. Doktorant sformułował 7 wniosków, będących podsumowaniem uzyskanych wyników. Zawierają one *de facto* wkład merytoryczny doktoranta w rozwój ekotoksykologii, wskazują na nowe zależności (wpływ estriolu, estronu i estradiolu na ekspresję *cyp11b1* oraz pigmentację larw) oraz wytyczają kierunek dalszych badań. Zgodnie z oczekiwaniami, w rozdziale tym Autor zweryfikował postawione na początku dysertacji hipotezy badawcze. Ponadto zakładane cele pracy zostały osiągnięte.

Jednym z ostatnich rozdziałów pracy jest literatura. Doktorant w swojej dysertacji wykorzystał 151 pozycji literatury, w zdecydowanej większości są to artykuły anglojęzyczne, opublikowane w uznanych periodykach naukowych. Jednakże w tym rozdziale Autor nie ustrzegł się błędów, wynikających z braku ujednoczenia cytowanej literatury. Pozwolę sobie wymienić ogólne niedociągnięcia w tym rozdziale, mając na uwadze, że moje zastrzeżenia mogą pozwolić na prawidłowe przygotowanie manuskryptu do opublikowania w czasopiśmie naukowym. Moje uwagi dotyczą m.in.:

- braku ujednoczenia zapisu czasopism – raz są to skróty, raz pełne nazwy; bywają one zapisane dużymi lub małymi literami itp.
- rok wydania powinien być zawsze w jednym miejscu (w spisie dominuje układ autorzy.rok.tytuł.czasopismo – proszę spojrzeć na pozycję numer 12. Renaud i wsp. 2019)
- proszę łacińskie nazwy gatunkowe zapisywać kursywą

Na ostatnich stronach rozprawy doktorskiej Autor zamieścił spis rycin, zdjęć, tabel i wykresów.

Po zapoznaniu się z całością pracy moją uwagę przykuło kilka niedociągnięć natury edytorskiej. Proszę zwrócić uwagę na sposób formatowania tekstu. Na niektórych stronach (np. strona 5, 11) niektóre wiersze tekstu nie są prawidłowo wyjustowane. Ponadto w tekście pojawiają się błędy natury interpunkcyjnej, bądź brakuje zapisu kursywą łacińskich nazw gatunkowych. Ponadto na stronie 21 proszę zwrócić uwagę, że w zdaniu „[...] wyjaśnił w

swojej publikacji Słowikowski [97]” powinno się zapisać „Słowikowski i wsp.”. W rozdziale „Materiał i metody” brakuje przy Zdjęciu 8, 10, 11 i Rycinie 2 dodania informacji, kto jest ich autorem. Innym problemem jest ujednolicenie zapisu genu *cyp1b1*. Zwyczajowo zapisuje się gen kursywą i małą literą, tak jak Doktorant zapisał go w tytule. Natomiast na stronie 39, gen ten jest zapisany dużą literą. Ponadto wielokrotnie przy edycji pracy można zauważyć, że podpis zdjęcia czy wykresu „uciekł” na kolejną stronę, w stosunku do opisywanego obiektu (np. strony 40-41). Myślę, że podczas prac edytorskich w przyszłości trzeba będzie zwrócić na to uwagę. Zastanawiam się również nad doбором określeń naukowych – może zamiast wyrażenia „wystawienia embrionów” lepiej by było zapisać „ekspozycji/narażenia embrionów”, bądź zamiast „karcinogenezy” używać słów „karcynogenezy” lub „karcenogenezy”.

Przedstawione w recenzji uwagi nie umniejszają wkładu merytorycznego rozprawy doktorskiej w rozwój dyscypliny zootechnika i rybactwo i pokrewnych obszarów naukowych. Proszę te uwagi potraktować jako prośbę do przeprowadzenia starannej edycji tekstu, przed wysłaniem manuskryptu, opisującego uzyskane wyniki badań. Mając na uwadze wartość naukową przedstawionej do recenzji pracy doktorskiej oraz wysoką aktywność naukową i organizacyjną Doktoranta (m.in. 11 publikacji z JCR według Scopus, liczne doniesienia konferencyjne), mam nadzieję, że wkład Pana mgr Konrada Wojnarowskiego w rozwój nauki będzie kontynuowany.

**Podsumowując stwierdzam że przedłożona praca doktorska 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*)” spełnia warunki stawiane kandydatom do stopnia naukowego doktora, określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1668 wraz ze zmianą Dz. U. z 2020 r. poz. 85 z późn. zm.). Dlatego zwracam się do Rady Naukowej dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie Pana mgr. Konrada Wojnarowskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.**



dr hab. Maciej Kamaszewski, prof. SGGW

