

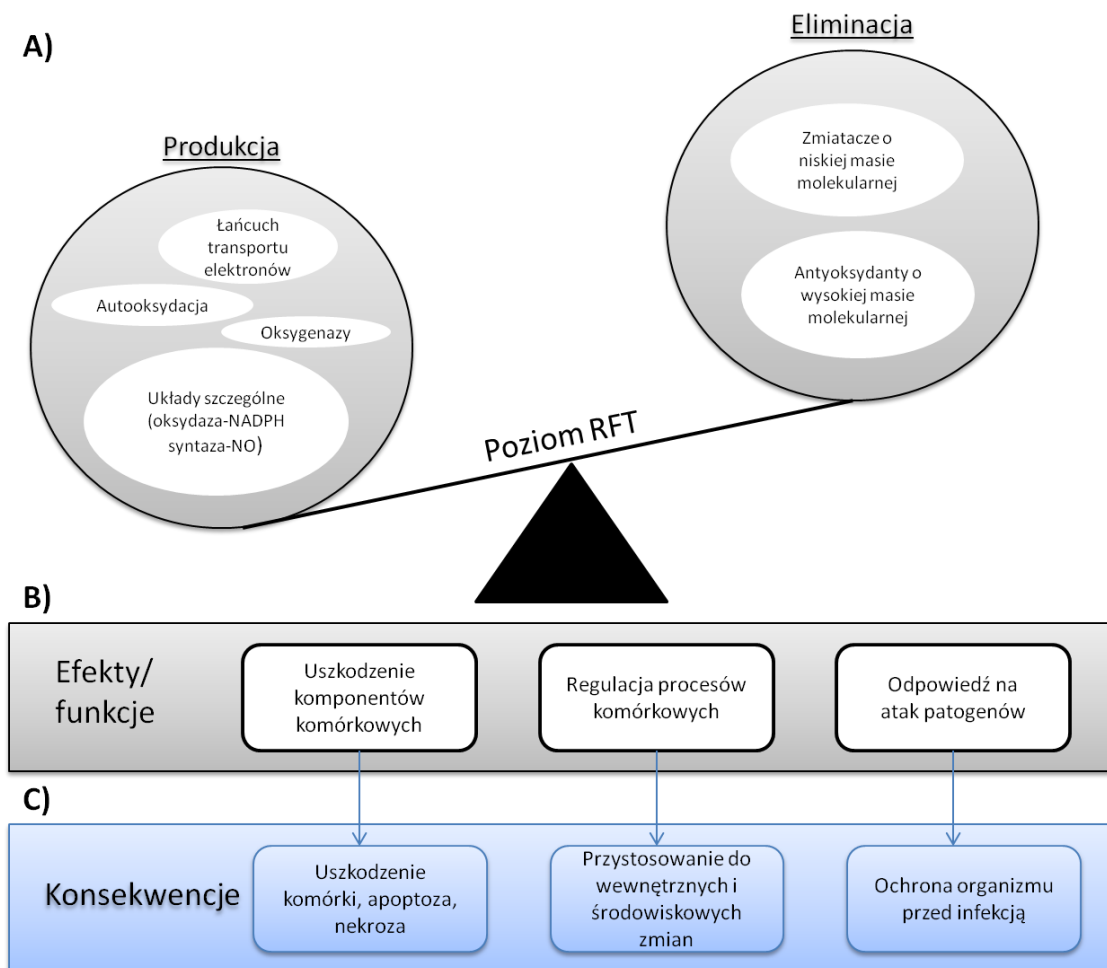
**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Palczyńskiej-Guguły
pod tytułem
„Kształtowanie się mechanizmów reakcji antyoksydacyjnych
oraz wybranych parametrów biochemicznych
w różnych stadiach rozwojowych troci wędrowej
(*Salmo trutta m. trutta* L.)”**

Praca wykonana pod kierunkiem dr hab. prof. nadzw. Natalii Kurhaluk, dr Haliny Tkachenko w Zakładzie Zoologii i Fizjologii Zwierząt, Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego Akademii Pomorskiej w Słupsku.

Reaktywne formy tlenu (RFT) są nieodzowną, choć uciążliwą częścią życia tlenowego. Mając w swojej strukturze atom tlenu z niesparowanym elektronem, najpopularniejszym przykładem jest tu rodnik hydroksylowy, RFT są biologicznie aktywne (do RFT należą również cząsteczki ozonu czy nadtlenu wodoru mimo, że nie mają żadnego niesparowanego elektronu). RFT powstają głównie w wyniku mitochondrialnych przemian energetycznych (łańcuch transportu elektronów), w rezultacie aktywności enzymatycznej (oksydazy w peroksosomach), a także samorzutnie, na drodze autooksydacji (Rys. 1).

W komórkach, RFT wiążą się kowalencyjnie (nieodwracalnie) z lipidami, białkami i cząsteczkami DNA, powodując ich uszkodzenia. Co ciekawe, niektóre wolne rodniki (RFT a także RFA; reaktywne formy azotu,) są celowo wytwarzane przez komórki do ochrony przed czynnikami patogennymi, na przykład bakteriami, wspomagając tym samym ochronę immunologiczną. Obecnie wiadomo, iż zarówno to szkodliwe jak i pożądane działanie wolnych rodników jest kontrolowane przez dość skomplikowany system ochrony antyoksydacyjnej, z udziałem nisko- (glutation, witamina C, beta karoten, witamina A) i wysokocząsteczkowych (np. dysmutaza nadtlenkowa, katalazy, preoksydazy, a także metalotioneiny i ferrytyny) komponentów biochemicznych. W stanie niezakłóconym komórki istnieje więc swoista równowaga pomiędzy produkcją i eliminacją RFT (Rys. 1A). Gdy równowaga pomiędzy produkcją RFT a biologiczną zdolnością do szybkiej detoksykacji reaktywnych produktów pośrednich lub naprawy wyrządzonych szkód chwieje się, powstaje stres oksydacyjny. Dzisiaj znamy wiele efektów molekularnych (Rys. 1B) i potencjalne skutki biologiczne (Rys. 1C) braku równowagi pomiędzy produkcją i eliminacją reaktywnych form tlenu w komórce. Dziś wiemy też jakie czynniki mogą zaburzać tę równowagę, prowadząc do wyższego poziomu RFT, a w konsekwencji do zmian chorobowych.

Wśród czynników powodujących stres oksydacyjny w warunkach eksperymentalnych i naturalnych u hydrobiontów takich jak ryby wymienia się zmiany temperatury, poziomu tlenu i zasolenia. W powstawaniu stresu oksydacyjnego istotną rolę odgrywają także jony metali przejściowych, na przykład miedzi, chromu, rtęci i arsenu, a także pestycydy i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne. Ostatnie lata badań nad rolą stresu oksydacyjnego w życiu komórek organizmów koncentrują się na rozszyfrowaniu mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za zwiększoną tolerancję, w tym funkcji niektórych czynników transkrypcyjnych (Keap1-Nrf2 i HIF-1) i potranskrypcyjnych (interferencja RNA, RNAi; mikroRNA) w koordynacji reakcji ochronnych.



Rysunek 1. Efekty molekularne i potencjalne skutki biologiczne braku równowagi pomiędzy produkcją i eliminacją reaktywnych form tlenu w komórce. A) Stabilny poziom RFT w komórce zapewniają procesy wytwarzania rodników równoważone procesami eliminacji. B) W pewnych warunkach, na które wpływ mają czynniki wewnętrzne i zewnętrzne, podaż RFT przewyższa zdolności ochronne biochemicznych składników antyoksydacyjnych-powstaje wówczas stres oksydacyjny. Efektami nadmiaru RFT są uszkodzenia składników komórkowych, zakłócenia sygnałowych kaskad regulacyjnych, odpowiedź na atak patogenów, i inne. C) Konsekwencje biologiczne zależą od kontekstu ocenianych zmian, mogą być dla organizmu niekorzystne albo pożądane (zmodyfikowane za Lushchak, 2011).

Pomimo postępu badań toksykologicznych nad podłożem mechanizmów stresu oksydacyjnego u ryb, to jak poszczególne gatunki o różnych historiach życiowych, na przykład ryby podejmujące wędrówki, reagują na czynniki zewnętrzne i wewnętrzne, jak zachowują się komórki ich narządów (skrzela, wątroba, mięśnie, serce) poddane długotrwałemu, chronicznemu stresowi, albo jak rozwija się uszkodzenie tkanek, wciąż nie jest wiadome. Stąd konieczne są badania, które wypełniłyby luki w naszej wiedzy na ten temat. Uzyskane informacje nie tylko umożliwiłyby lepsze poznanie ewolucji procesów metabolicznych związanych z produkcją i unieszkodliwianiem RFT, w modelach innych niż ssaki, ale dostarczyłyby też unikalnych danych umożliwiających lepsze zrozumienie zagadnień biologii systemowej kręgowców. Co więcej, służyłyby także opracowaniu lepszych metod przewidywania zagrożenia i oceny skutków zanieczyszczenia (termicznego, chemicznego) środowiska bytowania ryb.

Dlatego z dużym zaciekawieniem podjąłem się recenzji pracy doktorskiej p. Pałczyńskiej-Guguły. Autorka znalazła się w zespole badawczym prof. Kurhaluk-dr Tkachenko, który od lat zajmuje się zagadnieniami stresu oksydacyjnego. Temat pracy wpisuje się więc naturalnie w wieloletni zamiar badawczy realizowany przez zespół z konsekwencją i skutecznością.

Jeżeli dodać, że po raz pierwszy w tego typu badaniach było możliwe objęcie analizami wylęgu, stadium parr, smoltów, srebrniaków, tarlaków i keltów pomorskiej troci wędrowej (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) dorzecza Słupi (łącznie 426 ryb), to otrzymamy unikalne w treści i zakresie opracowanie naukowe.

Oceniana rozprawa, wydana w formie monografii, składa się z sześciu rozdziałów (Wstęp i cel pracy, Przegląd literatury, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski), po których następuje Spis tabel i rycin, Literatura (355 pozycji, większość w języku angielskim). Rozprawę kończą „Załączniki”. Całość liczy 184 strony.

Zaczynając od spraw porządkowych: maszynopis jest przygotowany dość niestarannie, całość opatrzona jest z rzadka stosownymi nagłówkami i przypisami co utrudnia czytanie i „nawigację” w tekście (szczególnie daje się to odczuć w Dyskusji). Usterki „literowe” są sporadyczne, jednak moje wątpliwości a czasem uśmiech budzi operowanie nazewnictwem naukowym (np. łosiostrąg, czy łagodny rak). Prawie wszystkie rysunki, pomijając dokumentację fotograficzną, są niskiej jakości, nieostre (np. Ryc. 3) z usterkami (np. wartości na osiach różnych rysunków mają niejednakowej wielkości czcionki). Niektóre, jak Ryc. 4, nie zawierają informacji zgodnej z legendą. Legendy rycin z wykresami nie zawierają informacji o liczności prób (n). Zwracam uwagę Autorki na typy usterek, w nadziei iż weźmie je pod uwagę i przygotowując stosowne publikacje samodzielnie je usunie.

W „Literaturze” pozycje są numerowane. Wśród 355 cytowanych publikacji, stosunkowo dużo bo 111 stanowią publikacje w języku polskim, a wśród nich jest 38 pozycji książkowych, omawiających często te same lub zbliżone treści (dominują tu na przykład podręczniki biochemii). Jednakże, co podkreślę, cytowane piśmiennictwo jest ściśle związane z tematyką rozprawy, jest dobrze wykorzystane do opisu stosowanych metod i ma kluczowe znaczenie w interpretacji uzyskanych wyników.

Lektura „Wstępu” dostarcza najważniejszych informacji o przedmiocie badań: biologii populacji troci wędrowej rzeki Słupi i wpływu czynników antropogenicznych na środowisko jej bytowania. Autorka w tej części rozprawy przytacza również podstawowe informacje dotyczące stresu oksydacyjnego i składników ochrony antyoksydacyjnej. Dwa ostatnie akapity zostały napisane zapewne z zamiarem wyjaśnienia, dlaczego ryby są dogodnym obiektem środowiskowych badań monitoringowych jak i szczegółowych badań fizjologicznych (bo rzeczywiście są) w kontekście proponowanych przez Autorkę badań. Niestety, ten zamiar powiódł się tylko częściowo i tekst który miał wprowadzać czytelnika do celu badań jest mało zrozumiały.

„Cel pracy” zwraca uwagę dość skomplikowaną konstrukcją, bo to „analiza ekofizjologicznych uwarunkowań bilansu antyoksydacyjnego i procesów lipoperoksydacji pomiędzy poszczególnymi stadiami rozwojowymi (wylęg, parr, smolt, srebrniak, tarlak, kelt) troci wędrowej (*Salmo trutta* m. *trutta* L.) z środowiska słodkowodnego i morskiego, a stopniem bioakumulacji metali w odpowiedzi na zróżnicowany stan ich naturalnych środowisk bytowania”. Tak postawiony, niewątpliwie długi, ale też bardzo (zbyt) ambitny cel pracy, był dla Autorki dużym wyzwaniem. Zakładał on bowiem, oprócz innych aktywności badawczych, także pozyskanie danych z różnorodnych środowisk bytowania troci, w tym dokładnej (całorocznej) charakterystyki fizyko-chemicznych wskaźników jakości wody w morskiej strefie bytowania troci, poszczególnych rzek i cieków, osadów. Szkoda, że w pracy pominięto także badania markerów stresu oksydacyjnego we krwi badanych ryb (np. SOD). Uzyskane wartości tych wskaźników uzupełniłyby naszą wiedzę o bilansie antyoksydacyjnym badanych stadiów rozwojowych troci. Pozwoliłyby także sformułować wnioski dotyczące użyteczności troci jako obiektu monitoringu środowiskowego rzeki Słupi. Niestety, wśród postawionych 4 pytań (ponumerowanych od 1-5, bez 4) nie ma pytania o nie. Zabrakło mi też

hipotez, które Autorka mogłaby zweryfikować, najpierw planując odpowiednie analizy i dysponując tak bogatym materiałem badawczym. Chociażby ta przedstawiona przez Hermes-Lima i in. (1998), a odnosząca się do „przygotowania” ochrony antyoksydacyjnej organizmów zmieniających środowisko bytowania. Mówi ona, że w sytuacji ekstremalnej zmiany otoczenia (na przykład podczas wędrówki tarłowej), organizmów ewolucyjnie do niej przystosowanych (takich jak trocie), system ochrony antyoksydacyjnej przygotowuje odpowiedź adaptacyjną, realizowaną z chwilą powrotu do sytuacji sprzed zmiany (Hermes-Lima i in. 1998).

Przy okazji jedna uwaga. W pierwszym zdaniu „Celu pracy” Autorka przyznaje, że „niewiele jest pozycji dostępnej literatury ...dla ryb”, więc jednak są jakieś pozycje i należało je wskazać. Jako przykład podaje pracę Czeczota i in. (2005), która dotyczy oceny statusu antyoksydacyjnego u pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym! Niestety, podobne przypadki nieprecyzyjnych cytowań są częste, co utrudnia zrozumienie narracji Autorki. Ja, dla ilustracji frontu badań, wymieniałbym tutaj pracę Wilson i in. 2014 (Oxidative stress in Pacific Salmon (*Oncorhynchus* spp.) during spawning migration).

Podkreślę jednak, iż postawione w Celu pracy pytania są trafne i w jasny sposób definiują obszar badań objęty rozprawą (Rys. 1A, częściowo B) .

„Przegląd literatury” dotyczącej tematu badań jest obszerny, liczy 42 strony i jest dość chaotycznie skonstruowany. W pierwszej części znajduje się charakterystyka i systematyka gatunku (brak informacji o autorze) wraz z zasięgiem występowania. Po nich następuje część, którą nazwałbym 1) opisem fizjologicznym ryby, z uwzględnieniem budowy i funkcji ważnych narządów, 2) opisem form ekologicznych i 3) zmian behawioru troci podczas całej historii życiowej tych ryb. Charakterystyka ta jest chwilami nadto szczegółowa i nie zawsze powiązana z tematem rozprawy (np. budowa blaszek lemiesza), a czasem popularnonaukowa (krótkowzroczność ryb). Ważniejsze jest jednak to, że Autorka skupia też sporo uwagi na opisie czynników wpływających na przebieg rozwoju ryb i roli jaką mogą ryby te spełniać w monitoringu środowiska. Dużo miejsca, i to jest zrozumiałe, Autorka poświęca na kolejny podrozdział dotyczący wybranych markerów stresu oksydacyjnego, który stanowi uporządkowany opis reakcji chemicznych zachodzących przy ich udziale w komórkach. Za ważny w kontekście pracy uważam przedstawiony przez Autorkę przegląd zmian metabolicznych u troci. Szkoda, że szereg przytoczonych tutaj informacji, często wynikających z badań na ssakach, ma charakter ogólny i tylko z rzadka ilustruje zmiany metabolizmu w konkretnych stadiach rozwojowych ryb. Kolejne podrozdziały dość dobrze przybliżają funkcjonowanie wybranych czynników biochemicznych w metabolizmie komórki i rolę składników mineralnych, głównie metali. Szkoda, że wkradły się tu sformułowania niezrozumiałe, takie jak „czynniki środowiskowe - obecność białek wiążących z metalami (obecność protein wiążących z metalami prowadzi do odtrucia wód)”(s. 50), albo niefortunne, jak w „Tabeli 2 (Wybrane funkcje i rola składników mineralnych u ryb), gdzie wapń „odgrywa” rolę w anoreksji. Ostatni z podrozdziałów to krótka charakterystyka terenu badań z ogólnymi (tylko) odniesieniami do stanu czystości rzeki Słupi. Moim zdaniem, w kontekście celu pracy ten ostatni podrozdział zasługiwał na bardziej szczegółowy opis. Podkreśliłby on ogrom problemów jakie stały z pewnością przed Autorką (konieczność zdobycia danych wieloletnich o stanie czystości wód konkretnych cieków, typowanie miejsc poboru prób, itd.), która rozpoczynała swoją pracę właściwie od początku, dysponując zaledwie kilkoma publikacjami źródłowymi.

Rozdział „Materiał i metody” zawiera bardziej szczegółowe informacje o terenie badań ilustrowane pięknymi zdjęciami, ogólne informacje o stadiach rozwojowych wytypowanych do analiz, ich ogólnej liczebności, o przygotowania próbek do analiz, o metodach analitycznych i statystycznych użytych w pracy. Niewątpliwie słabą stroną tej części pracy

jest brak istotnych szczegółów dotyczących ryb, od których pochodziły próby wzięte do analiz oraz samych prób. Na przykład nie wiadomo, czy tkanka mięśniowa wzięta do dalszych analiz została wypreparowana z mięśni białych czy czerwonych, ani z jakiej lokalizacji (bok ryby, ogon, czy przy płetwie grzbietowej, tłuszczowej?). To krytyczny punkt każdej pracy, tak terenowej jak i laboratoryjnej. Nie znalazłem tutaj podstawowych danych ilościowych (długość, masa) dotyczących kolejno wszystkich odłowionych ryb, sposobu odłowu, rzek z których pochodziły, ani daty odłowu. Co więcej, ponieważ ryby odławiane w kilku sezonach były łączone w grupy (tarlaki razem, kelty razem, itd.), taka informacja, wraz z uzasadnieniem oraz opisem sposobu przeprowadzenia tego zabiegu („pulowanie”) powinny być się znaleźć w tej części pracy. Metody analityczne użyte w pracy zostały dobrane poprawnie, jednak ich opis jest zdawkowy i często nieprecyzyjny; zaprezentowano zasadę metody, bez protokołu, a w niektórych przypadkach wątpliwości budzą szczegóły (np. długość fali przy której dokonywany jest odczyt). Nie wiadomo też z jakich urządzeń pomiarowych korzystała Autorka, kto był producentem odczynników itd. Ponieważ wszystkie te informacje wpływają na ocenę wiarygodności badacza, warto wziąć je pod uwagę i przygotowując stosowne publikacje samodzielnie je uzupełnić.

„Wyniki” to rozdział zestawiający bardzo liczne rezultaty badań. Autorka cierpliwie i dokładnie prowadzi czytelnika przez kolejne analizy w tym charakterystyki markerów stresu oksydacyjnego (TBARS, OMB₃₇₀, OMB₄₃₀), ochrony antyoksydacyjnej (SOD, GPx, GR, KAT), wskaźników biochemicznych (ALT, AST, LDH), zawartości mikro- i makroelementów (Mn, Cu, Zn, Fe, Ca, Mg) kolejnych tkanek (tkanka mięśni, serce, skrzela, wątroba). Co ważne na końcu każdego wątku Autorka formułuje swoją opinię dotyczącą uzyskanego wyniku. Choć czasem jest to bardzo ogólne stwierdzenie (winny jest stres oksydacyjny), taka dbałość o czytającego dowodzi dojrzałości naukowej Autorki. Za ważne naukowo uważam przeprowadzone analizy korelacji między uzyskanymi wskaźnikami. W wielu przypadkach dokumentują one odpowiedź systemu antyoksydacyjnego na nasilenie szkodliwych procesów oksydacyjnych w komórkach badanych tkanek (Rys. 1A).

W tej części pracy zabrakło mi danych z porównań analizowanych wskaźników w tkankach pochodzących od ryb z danego stadium rozwojowego (tkanka mięśni, serce, skrzela, wątroba, mikro-i makroelementy), osobno dla stadium parr, kelt, tarlaków, itd. Takie logiczne przecież uzupełnienie uzyskanych wyników dałoby Autorce możliwość scharakteryzowania po raz pierwszy u troci specyficznych tkankowo różnic w konstytutywnym poziomie procesów oksydacyjnych oraz zdolności antyoksydacyjnej w danym stadium rozwojowym ryby.

Rozdział „Dyskusja” jest trudny w odbiorze. Jednozdaniowe akapity nie ułatwiają skupienia się na ważnych, co do tego nie mam wątpliwości, sprawach. Rozdział ten nie jest podzielony na podrozdziały, nie ma też przyjętej w Dyskusji struktury. Mam na myśli kanon: Obserwacja > Interpretacja > Porównanie / Uogólnienie > Wnioski. Pomocne byłyby tutaj także zamieszczone dodatkowe rysunki i tabele, lepiej ilustrujące poglądy Autorki w kontekście uzyskanych wyników. Dużą część tego rozdziału (s. 103-106, 108, 111-113) Autorka przeznaczyła na informacje ogólne albo na przywoływanie szczegółowych wyników analiz, których naturalne miejsce jest, odpowiednio, we „Wstępie” albo rozdziale „Wyniki”. Niemniej jednak Doktorantce udało się dokonać obszernego porównania i sformułować ważne wnioski. To trudne zadanie, zważywszy jak niewiele jest wyników badań na temat stresu oksydacyjnego u ryb migrujących. Ja czuję niedosyt w interpretacji uzyskanych wyników odnoszących się do spodziewanych efektów molekularnych zachodzących w analizowanych tkankach (np. sposobu regulacji ekspresji genów uczestniczących w ochronie antyoksydacyjnej; Rys. 1C). Nie ma też odniesienia do poziomu równowagi pro-antyoksydacyjnej (Rys. 1A); czy wartości markerów które obserwujemy są w każdym przypadku wskaźnikiem stresu? Jaka, jeśli jest znana, jest wartość progowa stresu? Szkoda, że w pracy zabrakło dyskusji na ten temat.

Rozprawę kończy rozdział „Wnioski” (8). Z wyjątkiem wniosków 2, 4, 6, przywołujących jedynie wyniki analiz, zostały one poprawnie sformułowane, mają uzasadnienie w recenzowanej pracy. We wnioskach Autorka stwierdza, że praktycznie we wszystkich stadiach rozwojowych (przez całe życie ryby), choć w różnym stopniu, powstaje stres oksydacyjny i nagromadzają się jego szkodliwe efekty. Warto w przyszłości rozwinąć ten ogólny wniosek i podjąć bardziej szczegółowe badania nad stresem oksydacyjnym u ryb wędrownych, z zastosowaniem wysoko przepustowych analiz molekularnych (RNAseq, peptydomika, metabolomika) narządów o znanej funkcji metabolicznej oraz analiz histologicznych. Pozwoli to rozstrzygnąć jakie procesy komórkowe ulegają zaburzeniom pod wpływem RFT i jakie są ich konsekwencje dla dobrostanu ryb wędrownych.

Sumując odnotowuję, iż rozprawa jest skonstruowana w sposób przyjęty w tego rodzaju opracowaniach, zastosowane metody dowodzą dobrego opanowania przez doktorantkę trudnego warsztatu badawczego, a uzyskane wyniki wnoszą szereg nowych informacji dotyczących fizjologii ryb wędrownych. Stwierdzam, iż recenzowana rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, określone przez art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dziennik Ustaw, 2003, nr 65, poz. 595) i przedkładam wniosek o dopuszczenie Pani magister Katarzyny Pałczyńskiej-Guguley do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Paweł Brzuzan, prof. zw.
18-01-2017