



**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Moniki Wiśniewskiej  
„Wpływ 17 $\alpha$ -etynyloestradiolu (EE2) na przeżywalność, zachowania rozrodcze i  
różnicowanie płci gatunku *Gammarus tigrinus* Sexton, 1939”.**

Pani mgr Monika Wiśniewska przygotowała rozprawę doktorską w Zakładzie Ekologii Eksperymentalnej Organizmów Morskich pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Anny Szaniawskiej.

W przedstawionej mi do recenzji rozprawie Doktorantka postawiła przed sobą zadanie zbadania wpływu syntetycznej pochodnej estradiolu, 17 $\alpha$ -etynyloestradiolu (EE2), należącego do grupy związków określanych jako EDC (Endocrine Disruptor Compounds), na przeżywalność, behavior rozrodczy i cechy potomstwa kielża tygrysiego *Gammarus tigrinus*. 17 $\alpha$ -etynyloestradiol trafia do wód, w tym Bałtyku, od lat i stanowi istotne zagrożenie dla bytujących tu organizmów, stąd celowość prowadzenia badań nad zagadnieniem stanowiącym przedmiot rozprawy doktorskiej. Waga problemu znalazła odbicie w przyznaniu Doktorantce funduszy na badania przez Narodowe Centrum Nauki. Nie bez powodu obiektem niniejszych badań jest kielż tygrysi. Doktorantka uzasadnia swój wybór zauważając, że gatunek ten: i) występuje licznie w wodach przybrzeżnych, co sprawia, że łatwo go pozyskać, ii) ma znaczący potencjał rozrodczy i krótki cykl życiowy oraz iii) stanowi ważne ogniwo w łańcuchu troficznym, a ponadto, jako gatunek eurytropowy ma zdolność tolerowania szerokiego zakresu wahań czynników środowiskowych.

Teraz omówię poszczególne części rozprawy i poproszę Doktorantkę o odpowiedź na postawione pytania i odniesienie się do uwag.

*Wstęp*

Wpływ EE2 na organizmy został przedstawiony w tej części rozprawy wyczerpująco, choć nieco chaotycznie. W mojej opinii zamiast przytaczania i opisywania wyników kolejnych prac należało omówić je bardziej syntetycznie, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów i efektów działania EE2, przy zachowanym podziale na kręgowce i bezkręgowce. Wówczas czytałoby się ten fragment pracy łatwiej i z większym zainteresowaniem, i co najważniejsze zdecydowanie łatwiej można by było ocenić bieżący stan wiedzy i wykazać celowość prowadzenia niniejszych badań.

Uwaga: Z faktu, że jakiś związek (tu hormon) zaburza procesy rozrodcze u małych skorupiaków nie wynika, że, jak chciałaby to widzieć Doktorantka, w oczywisty sposób wpływa także na organizm ludzki; trzeba być ostrożnym we wnioskowaniu.

Ilustracje: Brakuje mi dobrych zdjęć samicy i samca kielża tygrysiego dla uwydatnienia dymorfizmu płciowego. Na Rysunku 3 osobniki obu płci są bardzo słabo odróżnialne. Natomiast Rysunek 2 pokazujący cechy gatunkowe bez szerszego kontekstu np. porównania z cechami innych gatunków, z którymi badany gatunek może być mylony, nie dostarcza istotnej informacji.

Chcę zwrócić uwagę na uchybienia w podrozdziale dotyczącym charakterystyki EE2. Tabela 1 podająca zawartości EE2 w ściekach i środowisku i omówienie zagadnienia w tekście nie dostarczają wystarczających informacji. W Tabeli 1 powinna znaleźć się informacja, jaką metodą, o jakiej czułości oznaczano EE2 w każdym przytoczonym przypadku, ponieważ różne metody oznaczania EE2 charakteryzują się różną czułością, o czym zresztą Doktorantka wspomina. Natomiast nie wydaje mi się celowe podawanie w tabeli odnośników do piśmiennictwa. Ponadto, wobec różnorodności danych należało raczej wybrać konkretne przykłady i dobrze je przedstawić/omówić w tekście lub/i w tabeli, tak, aby w syntetyczny sposób ilustrowały sytuację w różnych środowiskach. W tekście podrozdziału przydałby się komentarz, jak wartości stężeń mierzone w środowisku mają się w stosunku do

stosowanych dawek EE2 (w postaci leków) lub w czasie prowadzonych eksperymentów i konsekwentnie do stężeń EE2 oznaczanych w osoczu krwi ludzi lub zwierząt eksperymentalnych.

### *Założenia i cel pracy*

Rozdział ten czyta się trudno, gdyż porządek wypowiedzi został odwrócony: najpierw Doktorantka omawia potencjalne znaczenie wyników, dopiero później formułuje cele. Nie jestem zwolenniczką formułowania założeń pracy w tak kategorię sposób jakby to były wnioski pracy. W mojej opinii należało postawić hipotezy badawcze. W cele pracy w dość niezręczny sposób zostały wplecione zadania badawcze. Mam wrażenie, że rozdział ten stanowi kompilację tekstu wniosku o grant badawczy z oryginalnym tekstem rozprawy. W przygotowanej publikacji należy zwrócić uwagę na te uchybienia.

### *Materiał i metody*

Informacje dotyczące zebranego materiału są porozrzucane w kolejnych rozdziałach. Nie podano, jakie były warunki zewnętrzne, gdy materiał pozyskiwano – temperatura, oświetlenie, w jakiej porze dnia dokonywano połowów, jaka była liczebność prób. Informacje na temat liczebności prób znajdują się w Wynikach, ale są też niepełne. Właściwym sposobem byłoby zestawienie w formie tabeli zbiorczej następujących danych: ile osobników, jakiej płci (w przypadku samic, tam gdzie to potrzebne z podziałem na samice rozradzające się i nie rozradzające się) zebrano i przeanalizowano w każdym wariantcie badań. Nie podano, w jakim zagęszczeniu trzymano osobniki w pojemnikach 150 l i jak długo trwała aklimatyzacja do warunków eksperymentalnych. W jakiej porze dnia karmiono zwierzęta? Wszystkie te szczegóły powinny znaleźć się w publikacji.

W Tabelach 3, 4 i 5 w kolumnie LC 50 stężenia powinny być zapisane poprawnie np. 1-10, a nie jako: >1-10. Taki zapis jest niewłaściwy a poza tym, nie uwzględnia wartości granicznych np. =10. W tekście nie podano ile samic i samców przeanalizowano przy wyznaczeniu stężeń letalnych (podano, że łącznie było 1200 osobników).

Proszę Doktorantkę w czasie obrony o ustosunkowanie się do poniższych kwestii:

- Czy badano jak zmienia się stężenie EE2 w wodzie w ciągu pełnego dnia trwania eksperymentu?
- Czy codzienna wymiana wody z powodu rozkładającego się EE2 nie wpływała na zachowania osobników?
- Czy podobnej wymiany wody dokonywano równoległe także w grupach kontrolnych? W teście na przeżywalność należało zmieniać wodę zawsze codziennie, przez pełne 28 dni, u wszystkich grup, w tym kontrolnych, aby obserwacje były w pełni porównywalne.
- Na jakiej podstawie przyjęto, że czas 90 sekund bez wykonywania ruchów oznacza, że zwierzę jest martwe? Czy potwierdzano każdorazowo ten fakt i jak?

W podrozdziale opisującym badania wpływu EE2 na zachowania rozrodcze powinna znaleźć się tabela z informacją ile osobników użyto w poszczególnych wariantach doświadczenia. Opis badań jest bardzo mało czytelny i w niektórych fragmentach mylący. W opisie badań pilotażowych na początku wywodu Doktorantka napisała o dwóch stężeniach EE2, w których trzymano osobniki, a następnie czytamy: „każda para eksponowana była kolejno na wszystkie cztery stężenia eksperymentalne”. Prosiłabym o uzasadnienie wyboru stężeń EE2 w tym eksperymencie. Nie rozumiem, co oznacza, że „w przypadku gdy organizmy nie sparowały się w ciągu 15 minut...wyniku takiego nie uwzględniono w dalszych analizach”. Opis kolejnych wariantów/czasów ekspozycji jest niejasny, przydałby się przejrzysty schemat doświadczenia. W jakim celu wydzielano opisy 6-godzinnej ekspozycji i 8-godzinnej ekspozycji. Czym te dwa warianty się różniły, że nie można było

opisać ich łącznie (1-, 3- i 6-godzinne obserwacje mieściły się w zakresie 8-godzinnej)? Jaki jest powód przyjęcia takich dwóch wariantów doświadczalnych?

Podobnie niejasny jest opis badań wpływu EE2 na różnicowanie płci. Czy wszystkie 20 par poddano działaniu trzech stężeń EE2, ile było par w równoległych kontrolach, co oznaczają wspomniane „4 serie doświadczeń”? Czy codzienna wymiana wody nie zakłócała zachowań?

**Proszę Doktorantkę o podanie, jakie hormony płciowe zidentyfikowano u kielży i innych skorupiaków i czy znane są ich fizjologiczne stężenia np. w hemolimfie lub w częściach ciała. Czy badano poziomy EE2 w tkankach zwierząt morskich (niekoniecznie skorupiaków)? Prosiłabym o komentarz, jak wybrane do badań stężenia EE2 w wodzie mają się w stosunku do fizjologicznych poziomów hormonów płciowych i do stężeń EE2 spotykanych w środowisku.**

### *Wyniki*

W tej części rozprawy nadal brakuje szczegółowej informacji ile zebrano/zbadano osobników, w tym samców, samic rozradzających się i nie rozradzających się w poszczególnych miesiącach. Na rysunkach nie podano statystyki i brakuje precyzyjnego jej opisu w podpisach, co utrudnia analizę danych. W tekście opisującym wyniki też nie omówiono statystyki w sposób wystarczający. Doktorantka często wspomina o różnicach, choć nie wydają się one być istotne statystycznie, stąd wątpliwości.

Przykładowo: opis wyników nie pozostaje w zgodzie z danymi przedstawionymi na rysunku 10. W tekście stwierdzono: „w czerwcu i lipcu samice rozradzające się osiągały większe długości ciała niż samice nie rozradzające się i samce”, na rysunku samice rozradzające się i samce mają podobne długości; w dalszej części: „W lipcu i sierpniu długości wszystkich analizowanych zwierząt różniły się istotnie statystycznie”, co nie zgadza się z rysunkiem, gdyż rozmiar samic rozradzających się był w obu miesiącach podobny.

W kolejnym podrozdziale Doktorantka podaje informacje w tekście, które są rozbieżne z rysunkiem 12, w tym niefortunne sformułowanie: „rozpiętość masy - 27 mg” i najwyższa wartość masy podana w tekście =30,9 mg w listopadzie, a skala rysunku kończy się na 25-27 mg. Rozbieżność opisu z tym, co przedstawiono na rysunku dotyczy także badań współczynnika Fultona i rysunku 13.

Dalsze nieścisłości pojawiają się przy opisie zależności między masą a długością osobników, cytuję: „W sierpniu i listopadzie samice nie rozradzające wykazywały szybszy przyrost masy w porównaniu z samicami rozradzającymi się i samcami”, podczas gdy w listopadzie nie było samic rozradzających się, a więc nie można do nich odnosić danych dla pozostałych grup.

W przypadku omawiania struktury płci nie należało podkreślać, że w kwietniu występowało więcej samic (25 osobników) niż samców (23 osobniki), ponieważ w istocie liczebności te są takie same. Nie przekonuje mnie też sposób prezentowania wyników na rysunku 16, na którym przedstawiono % udział samic rozradzających się, w sytuacji, gdy liczebność prób różni się znacząco od  $n=16$  do  $n=935$ . Inną wagę ma kilkuprocentowa różnica przy przebadanych 16 osobnikach a inną przy liczbie  $n$  bliskiej 1000!

Wiele moich wątpliwości budzi podrozdział 4.2, w którym opisano wyniki badań toksyczności ostrej. Prosiłabym o wyjaśnienie, dlaczego utworzono 3 grupy doświadczalne (mieszana, osobno samce i samice), a potem w grupie mieszanej wyniki przedstawiono łącznie dla obu płci na rysunku 18. Skoro i tak oznaczano płcie w tej grupie, należało podać wyniki dla obu płci osobno. Ani na wykresie ani w tekście nie znalazłam informacji o liczebności grup. Doktorantka podaje, że samice są bardziej odporne, choć nie potwierdza tego ani test statystyczny ani zdrowy rozsądek, gdy spojrzysz się na rysunek 18 – jest to

nadinterpretacja wyników. W Tabeli 6 zamiast określenia „silnie toksyczny” pojawia się „niezwykle toksyczny”.

W podrozdziale 4.3 opisującym wyniki badań przeżywalności nie podano informacji, w jakiej porze roku wykonywano badania i ile razy powtórzono eksperyment. Dlaczego nie podano wyników dla samców i samic osobno?

W podrozdziale 4.4 przedstawiającym wyniki badań wpływu EE2 na zachowania rozrodcze opisano w sposób niejasny badania pilotażowe. Mierzony czas podano z przesadną dokładnością do setnych części sekundy. Proszę o podanie, w jaki sposób liczone istotność statystyczną zaznaczoną na rysunku 22.

Jak wspominałam wcześniej nie jest dla mnie jasne, dlaczego wydzielono eksperymenty z 6 i 8-godzinną ekspozycją i dlaczego wyniki omawiane są osobno. Proszę o podanie ile razy powtarzano eksperyment z udziałem tej samej pary i ile par użyto w każdym eksperymencie. W tekście przydałaby się tabela, ewentualnie schemat, który ułatwiłby zrozumienie modelu doświadczalnego. Opis i rysunek 23 nie wyjaśniają precyzyjnie, które wartości były istotne statystycznie. I co najważniejsze, otrzymane wyniki nie upoważniają do stwierdzenia, że „odpowiedź organizmów zmniejszała się wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji”. Proszę Doktorantkę o komentarz. W obu wariantach z 6 i 8-godzinną ekspozycją w przeważającej liczbie przypadków odchylenia standardowe były ogromne, więc trudno przyjąć, że zaobserwowane zmiany mogą być istotne statystycznie.

Charakterystyka osobników wykorzystanych w badaniach przedstawiona w rozdziale 4.6 powinna znaleźć się na początku pracy a nie pod koniec omawiania wyników.

**Chciałabym zapytać Doktorantkę, w jaki sposób można określić wiek kielża (korelacja z długością, masą?) i jak długo (średnio) żyją kielże w Bałtyku?**

#### *Dyskusja*

Tę część pracy czyta się lepiej niż pozostałe. Należy podkreślić, że Doktorantka dyskutując swoje wyniki odnosi się do bardzo obszernego piśmiennictwa. Przyznaję, że w związku z dostępną jedynie papierową wersją rozprawy nie byłam w stanie sprawdzić, czy wszystkie publikacje zostały w tekście zacytowane i odwrotnie. Poniżej zwrócę uwagę na pewne niedociągnięcia, które należy skorygować podczas przygotowania publikacji.

Informacja, że największy procentowy udział samic rozradzających się stwierdzono w kwietniu i maju, jest niepełna, ponieważ podobnie duży odsetek samic rozradzających się (a nawet nieco wyższy) był w październiku, a więc po zakończeniu sezonu rozrodczego (rysunek 16). Proszę Doktorantkę o komentarz. Cykl rozrodczy kielża warto by było przedstawić na rycinie. Podawanie długości z dokładnością do setnej części mm nie ma sensu. Moim zdaniem fragment Dyskusji odnoszący się do zasad biomonitoringu powinien znaleźć się we Wstępie.

W przeprowadzonych w niniejszej pracy testach toksyczności ostrej samice nie wykazywały większej odporności niż samce, co potwierdza negatywny wynik testu statystycznego i rysunek 18, więc interpretacja wyników jest nieprawidłowa, tak w Wynikach jak i w Dyskusji. Choć różnic nie zaobserwowano, słusznie badano obie płcie, ponieważ można było przypuszczać, że odpowiedź samców i samic będzie różna, szczególnie w odniesieniu do związku imitującego działanie naturalnego żeńskiego hormonu płciowego. Doktorantka nie wyjaśnia, dlaczego istotne jest badanie toksyczności chronicznej i jakich zmian w funkcjonowaniu organizmu można się spodziewać, a szkoda.

Bardzo wartościową częścią pracy jest ta poświęcona badaniu zachowania kielży. W ostatnich latach do oceny szeroko pojętego dobrostanu zwierząt (welfare) coraz częściej włącza się badania z zakresu etologii, choć wyniki często są trudne do interpretacji. Czasami obserwacje zmian zachowań pozwalają wcześniej (przy mniejszych dawkach badanego

czynnika lub/i krótszej ekspozycji) zorientować się, że dzieje się ze zwierzęciem coś niedobrego, zanim jeszcze pokażą to inne mierzalne parametry. W przypadku wielu gatunków najłatwiejsze do obserwacji i oceny są zachowania rozrodcze. W niniejszej pracy dokonywano pomiarów czasu potrzebnego na sparowanie osobników po ekspozycji na czynnik szkodliwy, jakim jest EE2. Choć bardzo trudno jest opracować właściwy test oparty o zachowania, Doktorantka podjęła się tego zadania. Trzeba wielu powtórzeń i ogromnego doświadczenia w pracy z określonym gatunkiem, aby taki test „znormalizować” i powszechnie używać. Praca ta stanowi dobry początek do opracowania tego testu na szerszą skalę i zachęcałabym do kontynuacji badań w tym zakresie. Zachęcam też do poprawienia opisu założeń tego testu, aby był przejrzysty. Interesujących wyników w niniejszej pracy dostarczają badania zmian struktury płci w potomstwie par poddawanych działaniu EE2.

#### *Wnioski*

Ten rozdział powinien być zatytułowany Podsumowanie i wnioski, bo ma charakter raczej podsumowania. Wnioski są z natury bardziej ogólne i obejmują tylko najważniejsze osiągnięcia, tu jest inaczej.

*Uwaga ogólna dotycząca stylu pracy:* Styl pracy nie jest najlepszy. W części wynika to zapewne z bezpośredniego tłumaczenia tekstu angielskiego na język polski, co skutkuje niezręcznymi sformułowaniami. W sumie tekst czyta się trudno. Prawdopodobnie przestanie to stanowić problem przy przygotowaniu tekstu do publikacji w języku angielskim. Wyszukiwanie istotnych informacji w wynikach pracy sprawia kłopoty: tekst tej części jest mało przejrzysty a podpisy pod rysunkami są niewystarczające. Uchybienia językowe zaznaczyłam tylko w tekście pracy, ponieważ nie uznałam za celowe wypisywanie ich w recenzji, wspomnę tylko nadużywanie wyrazu „ilość” tam gdzie powinna być „liczba”.

Niniejsza recenzja, w której wskazano przede wszystkim na uchybienia pracy może być uznana, jako wyjątkowo krytyczna. Zapewniam jednak, że tak nie jest. Starłam się jedynie wskazać Doktorantce elementy pracy, które trzeba poprawić przed opublikowaniem wyników. W trosce o dalszy rozwój naukowy Doktorantki pragnę zwrócić Jej uwagę na pewne przeoczenia i niedoskonałości, które jednak nie umniejszają **wysokiej rangi prowadzonych badań.**

**W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Wiśniewskiej pt. „Wpływ 17 $\alpha$ -etynyloestradiolu (EE2) na przeżywalność, zachowania rozrodcze i różnicowanie płci gatunku *Gammarus tigrinus* Sexton, 1939” stanowi ważny wkład do naszej wiedzy i spełnia warunki do uzyskania stopnia doktora określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Niniejszym wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie Pani mgr Moniki Wiśniewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Prof. dr hab. Ewa Kulczykowska  
Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk w Sopocie

Sopot, dnia 29.02.2016