

Prof. dr hab. Alicja Kosakowska
Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk
ul. Powstańców Warszawy 55
81-712 Sopot
e-mail: akosak@iopan.gda.pl

R e c e n z j a
rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kąkol
„Wpływ struktury populacji i czynników środowiskowych na zawartość hydroksyproliny
i kolagenu w skorupiakach bałtyckich”

“The influence of population structure and environmental factors on the hydroxyproline and collagen level in Baltic crustaceans”

zrealizowanej w Zakładzie Ekologii Eksperymentalnej Organizmów Morskich,
na Wydziale Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego
pod kierunkiem prof. dr hab. Anny Szaniawskiej

Podstawa: Pismo (G200-1610-384/2019) z dnia 28 maja 2019 roku otrzymane od Pana Dyrektora Instytutu Oceanografii UG dr hab. Mariusza Sapoty prof. nadzw, z prośbą o opracowanie recenzji rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kąkol „Wpływ struktury populacji i czynników środowiskowych na zawartość hydroksyproliny i kolagenu w skorupiakach bałtyckich”.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr Agnieszki Kąkol, zatytułowana „Wpływ struktury populacji i czynników środowiskowych na zawartość hydroksyproliny i kolagenu w skorupiakach bałtyckich” stanowi prezentację badań nad występowaniem hydroksyproliny i kolagenu w skorupiakach bałtyckich oraz rolę hydroksyproliny i kolagenu w procesach fizjologicznych tych zwierząt.

Rozkład osobników w populacji określa jej strukturę (struktura genetyczna i ekologiczna). Struktura ekologiczna obejmuje cztery typy rozkładu osobników w populacji na grupy: wiekowy, płci, funkcji i w przestrzeni. Wszystkie organizmy morskie pozostają pod wpływem działania wielu czynników abiotycznych i biotycznych, którym podlegają w swoim środowisku. Temperatura, zasolenie, dostępność tlenu, ilość i jakość pokarmu, struktura ekologiczna populacji a także czynniki antropogeniczne np. zanieczyszczenia rolnicze, komunikacyjne, przemysłowe, komunalne są przykładami najważniejszych spośród czynników kształtujących ich wzrost, reprodukcję i przeżywalność.

W ramach przedstawionej do oceny pracy doktorskiej Doktorantka podjęła się badań nad wpływem czynników biotycznych i abiotycznych oraz ich połączonym wpływem na zawartość hydroksyproliny i kolagenu u wybranych skorupiaków bałtyckich. Zwierzęta wykazują różnorodne przystosowania morfologiczne, behawioralne i fizjologiczne do zmieniających się warunków środowiskowych.

U większości organizmów, w tym skorupiaków morskich, zmiany zachodzące w funkcjonowaniu osobników danego gatunku są możliwe do kontrolowania na podstawie składu chemicznego ich tkanek. Jednym ze składników tkanek zwierząt morskich jest hydroksyprolina.

Skorupiaki są najliczniejszą i najbardziej zróżnicowaną grupą stawonogów żyjących w morskim środowisku. Ich wzrost i rozwój determinują czynniki abiotyczne i biotyczne m.in. rosną wolniej w warunkach niskiej temperatury, ograniczonej dostępności tlenu oraz ograniczonych zasobów, jednak mechanizmy odpowiedzialne za takie strategie są u tej grupy zwierząt mało poznane.

Uważam, że tytuł dysertacji „*Wpływ struktury populacji i czynników środowiskowych na zawartość hydroksyproliny i kolagenu w skorupiakach bałtyckich*” w pełni odpowiada tematyce badań oraz należycie informuje o ich przedmiocie i zakresie. Problematyka przedstawiona w przedłożonej do oceny pracy jest trafna i aktualna, o dużym znaczeniu poznawczym ale i praktycznym.

Tematyka pracy dotyczy bardzo ważnego nie tylko biologicznie, ale przede wszystkim ekologicznie zagadnienia odnoszącego się do oddziaływań wewnątrzpopulacyjnych.

Struktura pracy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Agnieszki Kąkol pod w/w tytułem obejmuje 160 stron standardowego maszynopisu wraz ze spisem literatury, streszczeniem (w j. polskim i angielskim), wykazem ilustracji (rysunki i fotografie) i wykazem tabel (w j. polskim i angielskim). Dodatkowo dysertacja zaopatrzona jest w Aneks (strony nienumerowane) zawierający tabelaryczne zestawienie wyników (Aneks zawiera 46 tabel).

Od strony formalnej praca jest poprawnie zredagowana, zawiera siedem głównych logicznie następujących po sobie rozdziałów - Wstęp, Materiały i Metodyka badań, Wyniki badań, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie, Spis literatury. W rozprawie wyniki badań zamieszczono na 45 rysunkach oraz 13 fotografiach. W rozdziałach 1, 2, 3 i 4 wydzielono podrozdziały I, II, III rzędu. Podział taki zwiększa czytelność, ułatwia analizę omawianych treści i jest zgodny z przyjętym układem dla prac naukowo-badawczych i doktorskich. Rozprawa napisana jest starannie i nie budzi zastrzeżeń merytorycznych

Założenia i cel pracy

Praca doktorska mgr Agnieszki Kąkol stanowi obszerne studium nad występowaniem i rolą hydroksyproliny i kolagenu wśród populacji bałtyckich skorupiaków. Skorupiaki bentosowe: garnela *Crangon crangon* (Linnaeus, 1758), krewetka bałtycka *Palaemon adspersus* Rathke, 1837, krewetka atlantycka *Palaemon elegans* Rathke, 1837 oraz podwój wielki *Saduria entomon* (Linnaeus, 1758) tworzą stabilne populacje, charakteryzujące się wysoką liczebnością, przez co mogą stanowić potencjalne i jednocześnie alternatywne źródło kolagenu.

Celem pracy było, jak precyzuje to autorka:

- „określenie ilości i roli hydroksyproliny oraz kolagenu u czterech gatunków skorupiaków bałtyckich, należących do różnych grup taksonomicznych,
- określenie zależności pomiędzy strukturą populacji badanych gatunków i czynników środowiskowych a zawartością w ich tkankach hydroksyproliny i kolagenu”

Tak postawione cele spowodowały, że zakres pracy jest bardzo obszerny i wielowątkowy. Obejmuje on dociekania poznawcze ale i badania metodyczne. Aby zrealizować cele badawcze, doktorantka postawiła następujące pytania:

„(1) czy zasiedlające Zatokę Gdańską *C. crangon*, *P. elegans*, *P. adspersus* i *S. entomon* posiadają hydroksyprolinę i kolagen?,

(2) czy istnieją różnice w ilości oraz sposobie wykorzystywania hydroksyproliny i kolagenu pomiędzy badanymi gatunkami skorupiaków?,

(3) czy i w jaki sposób hydroksyprolina i kolagen wpływają na procesy życiowe (między innymi wzrost i rozród) analizowanych gatunków?,

(4) czy istnieją powiązania pomiędzy cechami osobniczymi (wielkość i płeć) wymienionych wyżej gatunków i strukturą ich populacji, a poziomem hydroksyproliny i kolagenu?,

(5) jaki jest skład i struktura populacji analizowanych gatunków?,

(6) czy rejon oraz głębokość występowania analizowanych skorupiaków i związane z tym parametry środowiskowe (temperatura i zasolenie) mają wpływ na ilość hydroksyproliny i kolagenu w ich tkankach?,

(7) czy istnieją różnice pomiędzy analizowanymi gatunkami w składzie i molekularnej masie podjednostek kolagenu?.,

Struktura pracy jest typowa dla rozpraw doktorskich. Rozpoczyna się ona „Wstępem”, zajmującym 29 stron maszynopisu, w którym Autorka omawia rolę i znaczenie badanych gatunków skorupiaków. W kolejnym podrozdziale Doktorantka charakteryzuje rejon badań opisując warunki fizyczne i chemiczne w wodach Zatoki Gdańskiej, takie jak temperatura, zasolenie, zawartość tlenu, materii organicznej, zanieczyszczenia, produktywność wód i na tle panujących warunków przedstawia zmienność sezonową zoobentosu. Kolejne dwa podrozdziały we Wstępie dotyczą budowy i właściwości chemicznych oraz występowania i roli w morskich organizmach zwierzęcych oznaczanych składników tkanek - hydroksyproliny i kolagenu. Przegląd literatury jest wnikliwy i dobrze wprowadza w tematykę rozprawy a ogólna ocena tej części pracy jest pozytywna. Wstęp literaturowy pozwala na umiejscowienie badań Autorki w kontekście badań innych naukowców. W oparciu o lekturę tego rozdziału można powiedzieć, że z wymogami ustawowymi Doktorantka wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną w dziedzinie, w której prowadzi badania.

Następnym rozdziałem obejmującym ponad 10 stron to opis materiału doświadczalnego i zastosowanych metod badawczych.

Materiał i metody badań

Materiał badawczy został pozyskany w 2008 i 2009 roku z podczas rejsów r/v Oceanograf 2 z rejonu Zatoki Gdańskiej na 8 stacjach badawczych, na dwóch profilach głębokościowych, w tym 3-ch stacjach G1, G2, G3 – określane jak profil gdyński, 3-ch stacjach S1, S2, S3 określane jako profil sopocki, ze stacji SW- Góra Szwedów oraz stacji PJG Port Jachtowy Gdynia. Zarówno podczas rejsów, jak i podczas zbioru materiału z brzegu, na stacjach badawczych dokonywano pomiaru zasolenia oraz temperatury wody w warstwie nad dnem. Zebrany materiał badawczy został zamrożony do czasu dalszych analiz. W kolejnym etapie pracy przeprowadzono pomiary długości całkowitej osobników *S. entomon*, *C. crangon*, *P. elegans* i *P. adspersus* oraz wyznaczano masę każdego osobnika. Osobniki badanych gatunków zostały podzielone na: juwenilne, samce, samice oraz samice noszące jajeczka. W dalszej kolejności osobniki uszeregowano w klasy długości. Z każdego osobnika, wypreparowywano tkanki i mięśnie części tułowiowej i odwłokowej. W przypadku samic posiadających jajeczka przeanalizowano oddzielnie wypreparowane jajeczka oraz tkanki części odwłokowej i tułowiowej. W otrzymanych wypreparowanych próbkach oznaczono zawartość hydroksyproliny oraz kolagenu. Doktorantka do oznaczeń zawartości hydroksyproliny stosowała metodę spektrofotometryczną - pomiar absorbancji barwnego produktu będącego wynikiem kondensacji produktów powstałych w wyniku reakcji utleniania hydroksyproliny z aldehydem p-dwumetyloaminobenzoowym (PABA) a do rozdziału kolagenu badanych gatunków stosowała jednokierunkową elektroforezę w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących – w obecności soli sodowej siarczanu dodecyłu –SDS. Metoda SDS-PAGE (ang. plate acrylamide gel electrophoresis) jest metodą określania stopnia czystości białek oraz oznaczania ich masy cząsteczkowej i składu podjednostkowego.

Oceniając zastosowane metody mogę stwierdzić, że zostały one wybrane i użyte prawidłowo, dzięki czemu uzyskane wyniki są w pełni wiarygodne.

Wyniki badań

Rozdział ten stanowi zasadniczą część pracy i jest oryginalnym osiągnięciem Pani mgr Agnieszki Kąkol. Obejmuje on 57 stron z wydzieleniem podrozdziałów: temperatura i zasolenie nad dnem na poszczególnych stacjach badawczych w 2008 i 2009 roku; liczebności osobników; struktura płci i wielkości osobników; zmiany sezonowe w populacji; płeć i wielkość osobników a zawartość hydroksyproliny i kolagenu; zmiany sezonowe a zawartość hydroksyproliny i kolagenu; rejon

i głębokość występowania osobników a zawartość hydroksyproliny i kolagenu oraz porównanie zawartości hydroksyproliny u badanych gatunków bałtyckich skorupiaków.

Wyniki Doktorantka przedstawiała w formie opisowej i graficznej, na wykresach i fotografiach i dodatkowo w Aneksie w formie tabelarycznej. Przeprowadziła ponadto niezbędną analizę statystyczną uzyskanych wyników.

Dyskusja

Kolejną część dysertacji stanowi Dyskusja, która zawarta jest na 11 stronach maszynopisu, a jej treść została przedstawiona chronologicznie, rzeczowo. Doktorantka trafnie odnosi własne osiągnięcia do cytowanej literatury, zarówno w zakresie zgodności wyników jak i ich rozbieżności, co świadczy o bardzo dobrej orientacji w analizowanych zagadnieniach badawczych. Niekiedy jednak Doktorantce zabrakło wnikliwości w wyjaśnianiu m.in. roli jaką może pełnić kolagen u bezkręgowców morskich. I tak, wyniki badań Qin'a i Waite'a dotyczące obecności specyficznego kolagenu w małżach *Mytilus edulis* zdaniem Recenzenta zostały potraktowane zdawkowo.

Wnioski

Ostatnim merytorycznym rozdziałem w pracy są wnioski. Autorka rozprawy dokonała podsumowania w postaci 7 wniosków zawierających najważniejsze rezultaty badań. Są one sformułowane syntetycznie i na pewnym poziomie ogólności, co z pewnością nie było łatwe wobec bardzo bogatego materiału badawczego. Są one logiczne i w pełni odpowiadają na postawiony cel badań.

Dobór i wykorzystanie piśmiennictwa

Pracę kończy wykaz literatury, który zajmuje 21 stron maszynopisu. W dysertacji Doktorantka wykorzystwała łącznie 260 trafnie dobranych tematycznie pozycji materiałów źródłowych. Cytowane pozycje obejmują prace naukowe, rozdziały w monografiach, wydawnictwa książkowe oraz popularno-naukowe. Na podkreślenie zasługują liczne publikacje z ostatnich lat i publikacje obcojęzyczne, ale i dane historyczne co wskazuje na bardzo dobrą znajomość i bieżące śledzenie przez doktorantkę tematyki badawczej.

Dostrzegłam jednak pewne uchybienia, na które należy zwrócić uwagę podczas przygotowywania pracy do druku jak i nowych opracowań:

str. 1 – numeracja winna obejmować całość maszynopisu, zaczynając od strony tytułowej;

- wykaz skrótów jest wybiórczy; nie zawiera wszystkich skrótów zamieszczonych w tekście np. Col-P, Col-D

- w rozdziale Literatura

Autorka cytuje pracę Drewa i współ. 1978 z błędnym nazwiskiem współautora prof. Pautsch'a; powinno być:

Drewa, G., Dabrowska, T., Zbytniewski, Z. & **Pautsch, F.**, 1978. Purification and properties of soluble arylsulphatases isolated from hepatopancreas of the shrimp *Crangon crangon* L. Kieler Meeresforschungen, Supplement No. 4, 360-365.

- Bogucki M, 1956 - brak numeru stron

- Jurkowski Szaniawska A 1979 – brak tytułu pracy, czasopisma,

- Schmidt-Nielsen k. 1997- brak numeru stron

- von Ebner V.1894 – cytowanie powinno być od nazwiska Ebner V. von; brak zakresu stron 162-184

- zdarzają się również drobne błędy edytorskie

- w nazewnictwie naukowym stosuje się kursywę dla łacińskich nazw taksonów – w spisie literatury nie zastosowano takiej pisowni ?

Zagadnienia i pytania do Doktorantki

- Badania Qin'a i Waite'a przeprowadzone na małżach *Mytilus edulis*, wskazują na obecność zupełnie odmiennego rodzaju kolagenu z fragmentami Col-P i Col-D u bezkręgowców wodnych. Recenzent prosi Doktorantkę o syntetyczne przedstawienie właściwości (chemicznych i biologicznych) oraz roli w procesach życiowych odmiennego rodzaju kolagenu w małżach *M. edulis*.
- Czy znane są czynniki abiotyczne, biotyczne wpływające na poziom specyficznego kolagenu w tych organizmach?

Są to wszystko potknięcia marginalne, nie wpływające na merytoryczną wartość pracy. Jest to z pewnością praca pionierska w swoim zakresie merytorycznym Doktorantka dysertacji przeprowadziła bardzo wnikliwe, wieloaspektowe badania nad określeniem zależności pomiędzy strukturą populacji czterech gatunków skorupiaków bałtyckich a zawartością hydroksyproliny i kolagenu, a także określeniem wpływu hydroksyproliny i kolagenu na procesy fizjologiczne – wzrost, rozwój i rozród tych zwierząt.

Wykazała istotne powiązania pomiędzy poziomem hydroksyproliny i kolagenu a wielkością i wiekiem oraz płcią bezkręgowców bałtyckich. Ilościowe zależności badanych komponentów chemicznych determinowane są przynależnością do odmiennych grup taksonomicznych a w konsekwencji z ich biologią i ekologią, trybem życia i strukturą populacji.

Wyniki tych badań mają istotne znaczenie naukowe, gdyż wyjaśniają wiele dotąd nieznanych lub jasnych zależności zachodzących u bezkręgowców bałtyckich. Doktorantka wykazała, obecność aminokwasu hydroksyproliny u skorupiaków bałtyckich dowodząc tym samym występowanie w nich kolagenu.

Podsumowując, praca została poprawnie zaplanowana, jasno sprecyzowane zostały cele i hipotezy badawcze, wykorzystano w niej z dużą starannością sprawdzone metody badawcze, uzyskując bardzo interesujące wyniki, ważne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia. Wnikliwa analiza tych wyników przy wykorzystaniu metod statystycznych oraz dyskusja z danymi literaturowymi sprawia, że zaprezentowane wnioski są bardzo wartościowe, gdyż wnoszą nowe dane do rozwoju nauki oraz stanowią punkt wyjścia do dalszych badań.

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa pt.: *"Wpływ struktury populacji i czynników środowiskowych na zawartość hydroksyproliny i kolagenu w skorupiakach bałtyckich"* spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, zgodnie z art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Z tego względu wnoszę o dopuszczenie jej autorki mgr Agnieszki Kąkol do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na duże znaczenie poznawcze wyników badań, wkład w poznanie roli hydroksyproliny w procesach życiowych wybranych skorupiaków bałtyckich oraz wskazanie nowego potencjalnego źródła morskiego kolagenu - białka o znaczeniu aplikacyjnym – wnoszę o wyróżnienie rozprawy mgr Agnieszki Kąkol odpowiednią nagrodą.



prof. dr hab. Alicja Kosakowska

Sopot, 30 kwiecień, 2020