

dr hab. Ksenia Pazdro
Zakład Chemii i Biochemii Morza
Instytut Oceanologii Polskiej Akademii Nauk
ul Powstańców Warszawy 55
81-712 Sopot
pazdro@iopan.gda.pl

Sopot, 7 czerwca 2013

RECENZJA
rozprawy doktorskiej Pana mgr Oresta Kopko
pt. „Narażenie storni (*Platichthys flesus*) na czynniki genotoksyczne w południowym
Bałtyku mierzone przy zastosowaniu biotestu kometowego”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Oresta Kopko, została wykonana pod kierunkiem dr hab. Henryki Dąbrowskiej, prof. nadzw. MIR-PIB w Zakładzie Chemii Żywności i Środowiska Morskiego Instytutu Rybackiego-Państwowego Instytutu Badawczego w Gdyni. Rozprawa dotyczy oszacowania narażenia storni na czynniki genotoksyczne w południowym Bałtyku przy wykorzystaniu biotestu kometowego.

Rozwój cywilizacji stał się przyczyną wprowadzenia do środowiska przyrodniczego wielu różnorodnych zanieczyszczeń chemicznych. Istotna ich część trafia do środowiska morskiego, w szczególności do mórz przybrzeżnych. Pomimo wielu lat badań ocena skutków obecności zanieczyszczeń w środowisku morskim, a w szczególności skutków biologicznych wciąż pozostaje niewystarczająca. Analizy chemiczne poszczególnych związków, jakkolwiek dostarczają informacji odnośnie poziomu stężeń to nie pozwalają określić, czy i w jakim stopniu obecność mikrozanieczyszczeń występujących w postaci mieszanin wpływa na organizmy żyjące w ekosystemie. Oddziaływanie zanieczyszczeń zachodzi na różnym poziomie organizacji biologicznej od zmian na poziomie molekularnym do zmian na poziomie populacji aż do zaburzeń w funkcjonowaniu ekosystemu. Ocena wpływu tych związków na populacje np. ryb nabiera szczególnego znaczenia w przypadku narażenia ekosystemu na stały dopływ zanieczyszczeń. Badanie odpowiedzi biologicznej na poziomie populacji, za pomocą tak zwanych bio wskaźników (bioindykatorów) jest bardzo trudne, ponieważ objawy są zauważalne dopiero po długim czasie oddziaływania. Stąd też wzmożone zainteresowanie wskaźnikami wczesnego ostrzegania, które pozwalają na wykrycie niekorzystnych zmian na poziomie molekularnym zanim nastąpią bardziej zaawansowane na poziomie osobniczym czy populacji. Aspekt ten ma szczególne znaczenie w przypadku oceny narażenia na dość powszechnie występujące zanieczyszczenia charakteryzujące się właściwościami genotoksycznymi, wywołującymi uszkodzenia komórek na poziomie ich materiału genetycznego, których konsekwencją jest kaskada niekorzystnych zmian aż do poziomu populacji.

Opracowanie optymalnych miarodajnych metod biologicznego monitorowania zmian jakości środowiska wodnego, wywołanych przez mieszaniny mikrozanieczyszczeń, o zmieniającym się składzie stanowi również jedno z wyzwań zmierzających do stworzenia

baterii miarodajnych biotestów wczesnego ostrzegania (odpowiednio dobranego systemu biomarkerów) o biologicznych skutkach zanieczyszczenia, które znalazłyby zastosowanie w badaniach monitoringowych i zostały wykorzystane jako wskaźniki w ocenie stanu środowiska, użytecznej we wdrażaniu Dyrektyw Unijnych dotyczących ochrony jakości środowiska wodnego. W szczególnym stopniu dotyczy to Morza Bałtyckiego jako akwenu poddanego silnej antropopresji.

Z tego względu Rozprawa doktorska Pana mgr Oresta Kopko dobrze wpisuje się w nurt badań aktualnych, istotnych i wzbudzających szerokie zainteresowanie wśród społeczności międzynarodowej naukowców zajmujących się zagadnieniami chemii i ekotoksykologii morza. Autor Rozprawy podjął temat aktualny zarówno z punktu widzenia poznawczego jak i praktycznego.

Informacja ogólna o pracy

Całość pracy podzielona została na 8 zasadniczych części: wprowadzenie (4 strony), cel badań i zakres prowadzonych prac (12+12 stron), opis stanowisk i ryb do badań (2 strony), metod badawczych (10 stron), opis analizy statystycznej (2 strony), omówienie uzyskanych wyników (29 stron), dyskusję (10 stron) oraz wnioski (3 strony). Praca zawiera również wykaz cytowanej literatury, spis tabel, spisy rysunków i fotografii oraz wykaz stosowanych skrótów i akronimów, który w znacznym stopniu ułatwia czytanie rozprawy. Dysertacja zawiera 26 tablic, 35 rycin i 4 fotografie. W pracy zamieszczono również streszczenie w języku polskim i angielskim oraz spis publikacji których współautorem jest doktorant). Cytowana literatura jest obszerna (około 240 pozycji) i aktualna (ponad połowa cytowanej powstała w ostatnim dziesięcioleciu, a blisko jedna trzecia w ostatnim pięcioleciu).

Struktura pracy jest poprawna i logiczna.

Omówienie poszczególnych części pracy

Rozprawę rozpoczyna Wprowadzenie zawierające zwięzły zarys problematyki. W kolejnych podrozdziałach autor krótko przedstawia zagadnienia związane z oddziaływaniem zanieczyszczeń na organizmy, stan wiedzy na temat wpływu zanieczyszczeń na gatunki ryb zasiedlające Morze Bałtyckie. Następnie Doktorant krótko omawia zjawisko genotoksyczności w tym czynniki fizyczne i chemiczne powodujące zmiany w materiale genetycznym, podstawowe mechanizmy uszkodzenia DNA oraz trzy podstawowe biotesty stosowane w badaniach genotoksyczności środowiska wodnego, w tym biotest kometowy (tzw. Comet assay). Test ten został zaproponowany jako jeden z biomarkerów efektu przez Grupę ekspertów ds. zintegrowanego monitoringu zanieczyszczeń i biologicznego oddziaływania Międzynarodowej Rady Badań Morza. Jednakże, jak wynika z przeglądu dostępnej literatury test nie był do tej pory stosowany w badaniach środowiskowych stopnia uszkodzenia DNA u ryb bałtyckich. Lektura tej części Rozprawy wskazuje, że Autor wykazał

się dobrą znajomością omawianych zagadnień a wiadomości zawarte we wprowadzeniu dobrze uzasadniają podjęcie badań przedstawionych w pracy.

Jedynie zastrzeżenie do tej części to brak choćby krótkiego opisu gatunku, który wybrano do badań (pozycja gatunku w ekosystemie, zalety stosowania jako organizmu wskaźnikowego). Bardzo krótka informacja na ten temat znajduje się dopiero w części opisującej stanowiska i ryby do badań. Uważam, że informacje te powinny znaleźć się we Wprowadzeniu.

Kolejny rozdział Rozprawy przedstawia cel i zakres prowadzonych prac. Doktorant postawił sobie jako nadrzędny cel określenie stopnia uszkodzenia DNA u storni zasiedlającej obszar południowego Bałtyku przy użyciu biotestu kometowego, a jako specyficzne cele badań zweryfikowanie dwóch hipotez:

Stopień uszkodzenia DNA u storni jest zróżnicowany ze względu na różnice przestrzenne w zanieczyszczeniu środowiska

Stopień uszkodzenia DNA jest zmienny w skali roku i sezonu i zależy od warunków środowiskowych i biologicznych.

Zakres prac pozwalający na realizację wyznaczonych celów obejmował oznaczenie w pobranym materiale stopnia uszkodzenia DNA przy użyciu biotestu kometowego, pomiar stężenia metabolitów związków z grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) w żółci oraz stężenia związków z grupy polichlorowanych bifenyli (PCB) w mięśniach storni. Te zanieczyszczenia zostały wybrane przez Doktoranta ze względu to, iż są to jedne z dominujących zanieczyszczeń na badanym obszarze. Sądzę, że w dalszych badaniach wskazane byłoby również uwzględnienie analiz stężeń choćby wybranych metali ciężkich, jako innej grupy zanieczyszczeń powszechnie występujących w środowisku południowego Bałtyku a jednocześnie charakteryzujących się potencjalnym działaniem genotoksycznym. Zdaję sobie jednak sprawę, że wykonanie tych analiz w ramach pracy doktorskiej mgr. Kopko, ze względu chociażby na i tak szeroki zakres prac prowadzonych przez Doktoranta było niezbyt wykonalne. Kolejne trzy rozdziały dotyczą materiałów i metod. Do badań zmienności przestrzennej wybrano 4 stanowiska - 2 położone w obrębie Zatoki Gdańskiej oraz dwa zlokalizowane w otwartej części południowego Bałtyku, w tym jedno, na podstawie danych literaturowych wytypowane jako referencyjne. Ta część rozprawy wskazuje na dobrą umiejętność planowania badań przez doktoranta w celu zweryfikowania postawionych hipotez badawczych. Istotne z punktu widzenia czytelnika, byłoby zamieszczenie w tej części pracy informacji o liczbie próbek pobieranych na każdym ze stanowisk (w przypadku badań zmienności przestrzennej) oraz każdorazowo w poszczególnych miesiącach ze stacji na Zatoce Gdańskiej (w przypadku zmienności sezonowej) (w tym liczby powtórzeń).

W kolejnym podrozdziale Doktorant w wyczerpujący sposób opisuje poszczególne etapy biotestu kometowego, łącznie z walidacją metody przy zastosowaniu nadtlenu

wodoru jako modelowego genotoksykanta. W części dotyczącej celu badań i zakresu prowadzonych prac (str.37) Doktorant wskazuje, iż do celów prowadzonych badań opracowana została metoda biotestu kometowego (Kopko i in., 2010) na podstawie procedury przedstawionej dla ryb płasko-kształtnych przez Belpaeme i In. (1998) oraz Nacci i In. (1996). Prosiłabym o wyjaśnienie, na czym polegało opracowanie metody (walidacja metody dla storni z południowego Bałtyku, czy też optymalizacja (wprowadzenie nowych elementów w procedurze analitycznej) zaproponowanej wcześniej przez wyżej wymienionych autorów a następnie walidacji opracowanej metody). W kolejnej części pracy dotyczącej zastosowanych technik analitycznych Doktorant przedstawił szczegółowy opis procedur analitycznych stosowanych w celu oznaczenia metabolitów WWA w żółci storni, a następnie krótko przedstawił opis procedury określenia zawartości związków z grupy polichlorowanych bifenyli. W opisie zastosowanej metody dotyczącej analiz PCB konieczne byłoby uzupełnienie informacji o co najmniej takie parametry jak granica oznaczalności, precyzja i powtarzalność metody. Ponadto nasuwa się pytanie: czemu w dalszych rozważaniach wzięto pod uwagę tylko PCB 153, z jednej strony istotnie jest to kongener PCB powszechnie występujący w środowisku, z drugiej dane literaturowe wskazują, że również niskochlorowane kongenery PCB występujące w środowisku mogą być przyczyną uszkodzeń DNA w organizmach.

W rozdziale 5 autor opisuje metody analizy statystycznej zastosowane w interpretacji uzyskanych wyników, w tym analizę składowych głównych. Metody statystyczne zastosowane do analizy uzyskanych wyników są adekwatne i umożliwiły pogłębienie interpretacji uzyskanych wyników. Autor posługuje się zastosowanymi metodami sprawnie i bardzo umiejętnie w celu zweryfikowania postawionych hipotez.

Kolejna, a zarazem bardzo istotna część Rozprawy to obszerny Rozdział Wyniki podzielony na 2 podrozdziały grupujące uzyskane wyniki pod kątem weryfikacji hipotez przedstawionych w celu pracy. W części dotyczącej badań zmienności przestrzennej stopnia uszkodzenia DNA u storni Autor kolejno omawia parametry biologiczne charakteryzujące ryby poławiane z 4 lokalizacji (długość ciała, masa, współczynnik kondycji, zawartość lipidów, indeks hepatosomatyczny oraz indeks gonado-somatyczny), Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że mediany wartości tzw. parametrów biologicznych nie różniły się istotnie pomiędzy grupami storni z poszczególnych lokalizacji. Następnie Autor przedstawił wyniki dotyczące zawartości 1-OH pirenu, który jako jedyne z oznaczanych 7 metabolitów WWA występował w analizowanych próbkach żółci w stężeniach powyżej granicy oznaczalności oraz zawartości najczęściej występującego kongeneru PCB – CB 153. Stwierdzono statystycznie istotne zróżnicowanie w poziomie analizowanych zanieczyszczeń pomiędzy stanowiskiem referencyjnym a pozostałymi lokalizacjami.

Wyniki testu biokometowego przedstawiono jako mediany i 1-3 kwartył zawartości procentowej fragmentów DNA w części ogonowej komet (%Tail DNA). Analiza statystyczna wykazała, iż stopień uszkodzenia DNA w przypadku ryb pobranych z łowiska ustecko-lębskiego określonego w pracy jako referencyjny był statystycznie istotnie niższy niż w przypadku ryb z pozostałych miejsc pobierania. Stwierdzono, znaczną zmienność wewnątrzgrupową zawartości procentowej fragmentów DNA w części ogonowej komet w przypadku stanowisk z Zatoki Gdańskiej. Jaka może być przyczyna?

Zależności między stopniem uszkodzenia DNA, stężeniem analizowanych zanieczyszczeń oraz parametrów biologicznych najpierw zbadano przy użyciu analizy regresji liniowej. Przeprowadzone analizy wskazały na istnienie statystycznie istotnej zależności pomiędzy stopniem uszkodzenia DNA a stężeniem PCB 153 w mięśniach (przy poziomie istotności $p=0,001$). W celu pełniejszego obrazu zależności pomiędzy stopniem fragmentacji DNA a pozostałymi zmiennymi Autor zastosował także analizę składowych głównych. Przeprowadzenie tego typu analizy pozwoliło na udokumentowanie zależności pomiędzy stopniem fragmentacji DNA a stanowiskiem połowu storni oraz z narażeniem na zanieczyszczenie związkami z grupy PCB.

Kolejny podrozdział przedstawia wyniki dotyczące sprawdzenia hipotezy drugiej – a zatem zbadania zmienności stopnia uszkodzenia DNA w skali czasowej. Do badań słusznie wybrano stanowisko we wschodniej części Zatoki Gdańskiej, w przypadku którego w badaniach opisanych w podrozdziale 5 stwierdzono najwyższy stopień uszkodzenia DNA storni, jak również znaczne stężenia zanieczyszczeń. Sposób i kolejność prezentacji uzyskanych wyników został ujęty w sposób analogiczny do poprzedniego rozdziału. W przypadku parametru GSI odzwierciedlającego cykl rozwoju gonad w skali roku zaobserwowano oczywistą zmienność tego parametru w skali roku związaną z cyklem reprodukcyjnym storni. Interesujące jest zjawisko znacznej zmienności wewnątrzgrupowej GSI zaobserwowanej w październiku (92%). W przypadku oznaczeń zawartości metabolitów WWA w żółci storni stwierdzono obecność czterech związków, z których dominujące to 1-OH piren i 1-OH chryzen. Zwraca uwagę duża zmienność wewnątrzgrupowa stężenia 1-OH pirenu, szczególnie w kwietniu i listopadzie, jak można zinterpretować ten fakt? Uzyskane wyniki wskazują że stopień uszkodzenia DNA, mierzony w poszczególnych miesiącach był zmienny w skali roku. Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowanie wyników związane z cyklem reprodukcyjnym storni. Czy badano wpływ średniej temperatury wody na stopień uszkodzenia DNA? Analiza składowych głównych z jednej strony pozwoliła na potwierdzenie znanych literaturowo zależności (wzrost stężenia poziomu trwałych zanieczyszczeń organicznych wraz ze wzrostem zawartości lipidów), a jednocześnie umożliwiła określenie istotnej zależności stopnia uszkodzenia DNA jako funkcji miesiąca połowu ryb, narażenia

na obecność związków z grupy WWA i zawartości lipidów w mięśniach. Analiza skupisk potwierdziła sezonowość obserwowanych zmian.

Przedstawione wyniki stanowią dobrze udokumentowany, oryginalny materiał badawczy. Jedynie w przypadku podrozdziału 6.1.5., opisującym badanie zależności pomiędzy stopniem uszkodzenia DNA i pozostałymi mierzonymi zmiennymi przy użyciu analizy regresji oraz testu Spearman'a wskazane byłoby rozszerzenia o tabele bądź rysunki ilustrujące tekst (analogicznie jak uczyniono w podrozdziale 6.2.5.). Również w przypadku niektórych rysunków opis jest zbyt ubogi (patrz uwagi szczegółowe)

Interesująca i istotna część dysertacji to Dyskusja, w ramach której Doktorant starannie analizuje uzyskane wyniki w świetle dostępnej, aktualnej literatury. Ta część pracy świadczy o wiedzy, właściwym prowadzeniu badań i umiejętności dyskusji własnych wyników na tle danych literaturowych. Interesującym elementem dyskusji jest porównanie uzyskanych wyników stopnia uszkodzenia DNA, zawartości metabolitów WWA w żółci oraz stężenia PCB 153 w mięśniach storni z kryteriami jakości środowiska zaproponowanymi przez grupę ekspertów Międzynarodowej Rady Badań Morza. Wskaźniki te to BAC – poziom podstawowy nie powodujący niekorzystnych skutków biologicznych oraz EAC – poziom stężenia powodujący/wskazujący na szkodliwe zmiany u ryb. Ten fragment dyskusji wskazuje, iż poziomy stężenie badanych zanieczyszczeń oraz w większości przypadków stopień uszkodzenia DNA, czyli zmiany genotoksyczne u storni przekraczają wartości kryterium BAC. Jednocześnie ta część dyskusji wskazuje na dalszą potrzebę porządkowania i uwiarygodniania w/w kryteriów na bazie badań naukowych z uwzględnieniem specyfiki akwenu, gatunkowej jak również standaryzacji matryc stosowanych w badaniach monitoringowych, w których oznaczane są stężenia zanieczyszczeń.

W mojej ocenie w tej części rozprawy, zwłaszcza w kontekście tytułu, zabrakło odniesienia do zagadnienia związanego z oceną przydatnością biotestu kometowego do badań genotoksyczności w ekosystemie Bałtyku. Interesujące byłoby także odniesienie się do oceny narażenia na czynniki genotoksyczne w badanych rejonach oszacowanych przy zastosowaniu innych technik analitycznych (np. testu mikrojądrowego) (np. Barsiene et al., Mar.Environ.Res. 2012) Pozwoliłoby na bardziej pogłębioną interpretację uzyskanych wyników.

Zasadniczą część Rozprawy kończą wnioski w liczbie 10. Najważniejsze z nich to: stwierdzenie zróżnicowania przestrzennego stopnia uszkodzenia DNA u samic storni, związanego w znacznym stopniu z narażeniem na zanieczyszczenia z grupy PCB. Stopień uszkodzenia DNA wykazywał znaczące powiązanie z współczynnikiem kondycji ryb.

Stopień uszkodzenia DNA wykazuje zmienność w skali roku i jest powiązany z cyklem reprodukcyjnym i narażeniem na związki z grupy WWA w badanym rejonie, mierzonego stężeniem metabolitów WWA w żółci storni

Ocena narażenia na czynniki genotoksyczne przy zastosowaniu biotestu kometowego wskazuje iż organizmy w badanym rejonie są silnie narażone na działanie czynników genotoksycznych, czego przejawem jest przekroczenie wartości poziomu, który nie powoduje niekorzystnych skutków biologicznych w większości zmierzonych stężeń metabolitów WWA w żółci storni, stężenia polichlorowanego bifenyłu CB 153. W konsekwencji poziom zmian genotoksycznych zmierzony z użyciem biotestu kometowego również przekracza kryterium jakości środowiska BAC.

Rozprawa zasadniczo napisana jest poprawnym językiem naukowym, a błędy edytorskie są stosunkowo nieliczne. W niektórych przypadkach jednak, tytuły czy też omówienie dobrze udokumentowanych wyników staje się zbyt lakoniczne. Przy przygotowywaniu materiałów do publikacji zalecałabym rozszerzenie omówienia niektórych zagadnień.

Przedstawiona praca stanowi bardzo wartościowe studium badawcze, które w pełni może być uznane za oryginalne, otwierające nowe obszary problemowe. Realizacja celu rozprawy wymagała dużego nakładu pracy opanowania i wdrożenia metod biologicznych jak i analiz chemicznych. Realizacja celu pracy pozwoliła na uzupełnienie nielicznych danych dotyczących genotoksyczności środowiska południowego Bałtyku oraz w istotny sposób poszerzyła interpretację uwarunkowań tego zjawiska.

Wnioski końcowe

Wymienione wyżej uwagi krytyczne nie obniżają wartości merytorycznej przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej. Koncepcja pracy jest prawidłowa, a zastosowane metody zapewniły uzyskanie wyników adekwatnych do wyznaczonych celów. Doktorant uzyskał nowatorskie wyniki i wykazał się umiejętnością właściwej interpretacji zebranego materiału badawczego. Reasumując, po zapoznaniu się z całością pracy uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa Pana mgr Oresta Kopko, spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim w myśl obowiązującej ustawy o Stopniach i Tytułach Naukowych. Wnioskuje zatem o dopuszczenie Pana mgr Oresta Kopko do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Sopot, 7 czerwca 2013

dr hab. Ksenia Pazdro

Uwagi szczegółowe

Pomimo niewątpliwych zalet pracy Autor nie ustrzegł się kilku uchybień formalnych i mniej znaczących błędów edytorskich. Moje uwagi są następujące:

Str. 36- informacja dotycząca sposobu obliczania wartości wskaźników CF, HSI, GSI powinna znaleźć się w rozdziale 4 (metody badawcze)

Str. 36-37 – zakres prowadzonych prac obejmował...3. pomiar zawartości lipidów i PCBs w mięśniach *powinno być* 3. pomiar zawartości lipidów w mięśniach 4. pomiar zawartości związku z grupy PCB (PCB 153) w mięśniach (ponieważ są to zupełnie różne analizy)

Str.36 - czy każdorazowo podczas połowu mierzono tylko temperaturę wody czy również inne parametry środowiskowe, ponadto w części wynikowej nie znalazłam informacji o zależności czy też braku zależności stopnia uszkodzenia DNA od temperatury (a zależność ta jest wymieniona przy sformułowaniu hipotezy 2.

Str 49 i dalej na żadnym z rysunków ani w tabelach nie ma wyjaśnienia a,b, c (oczywiście można się łatwo domyśleć w czym rzecz, ale dobra praktyka nakazuje opis skrótów)

Str. 49 – rys. 4.1.2 i 4.1.3 czym różniły się obie serie?

Str. 51 – tabela 4.1.3. – różnice w precyzji dla wyników próbek kontrolnych w serii 1 i serii 2 czym mogą być spowodowane?

Str.59 materiał odniesienia przygotowywany w laboratorium wskazany opis jak przygotowywano ten materiał

Str. 64 – rys. 6.1.1, ryc. A – nie ma jednostek przy opisie osi poziomej

Str 63 – niejasna informacja czy N=72 oznacza, że średnia danej wartości charakteryzująca dane stanowisko połowowe to średnia z 72 pojedynczych wyników czy też 72 to liczba próbek z wszystkich 4 stanowisk łącznie

Str.79 – rys. 6.2.7 – przedstawienie graficzne zakresu zmienności stężenia CB 153 (zakres czy jest to 25-75%; 25% - wartość poniżej zera?

SEZON

Str. 73 – w tabeli 6.2.1. - brak liczby ryb dla których podano średnie wartości parametrów biologicznych

Wskazane byłoby dołączenie nośnika elektronicznego z wynikami w postaci tabelarycznej (jako uzupełnienie wykresów znajdujących się w pracy a przedstawiających już dane w postaci zakresów czy też median)