

UNIwersYTET
PRZYRODNICZO-HUMANISTYCZNY W SIEDLCACH

Wydział Przyrodniczy
Instytut Biologii, ul. Prusa 12, 08-110 Siedlce

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Bartosza Bojarskiego pt. „Oddziaływanie herbicydów na aktywność wybranych enzymów oraz ultrastrukturę skrzeli i wątroby ryb” wykonanej pod kierunkiem dr hab. lek. wet. Hanny Lutnickiej

Przedstawiona do oceny praca doktorska dotyczy toksycznego oddziaływania subletalnych dawek trzech herbicydów na młodociane osobniki karpia. Tematyka badań została wybrana trafnie, ponieważ zużycie herbicydów w rolnictwie rośnie, a ich pozostałości migrują do wód powierzchniowych, gdzie stanowią zagrożenie dla organizmów wodnych. Migracja ta uwarunkowana jest nie tylko przez terminy oprysków, ale także przez czynniki atmosferyczne i hydrologiczne, a więc stężenia herbicydów w wodach są zmienne i nieprzewidywalne. Za trafny uważam też wybór obiektu badań – karp jest popularnym gatunkiem hodowlanym, wykorzystywanym nie tylko w celach konsumpcyjnych, ale także jako ryba doświadczalna. Liczba stosowanych obecnie w rolnictwie herbicydów jest bardzo duża, a ich toksyczność dla zwierząt wciąż niedostatecznie poznana. Autor wybrał trzy spośród nich: MCPA, linuron i pendimetalinę, należące do różnych grup ze względu na budowę chemiczną i mechanizm działania. Celem pracy była ocena wpływu tych substancji na ultrastrukturę skrzeli i wątroby oraz na aktywność enzymów: Na^+/K^+ -ATPazy (skrzelowej i wątrobowej) oraz transaminaz wątrobowych: ALT i AST w osoczu. Badania przeprowadzono w dwóch etapach, wykorzystując 340 osobników karpia, a na ich przeprowadzenie Autor uzyskał zgodę I LKE do spraw doświadczeń na zwierzętach. Badania zostały przeprowadzone w ramach projektu N N 304 279440.

Rozprawa liczy 188 stron, z czego większą część stanowi obszerna dokumentacja fotograficzna preparatów mikroskopowych (SEM i TEM) licząca 107 zdjęć. Praca zawiera także 12 wykresów kolumnowych, 2 tabele oraz bibliografię liczącą 99 pozycji. Układ pracy jest typowy, a kolejność rozdziałów prawidłowa.

Tytuł pracy odzwierciedla jej treść, choć zamiast „ryb” powinien chyba zawierać „karpia”, ponieważ słowo „ryby” sugeruje, że badano więcej niż jeden gatunek. We Wstępie Autor przedstawił zwięzłą ogólną charakterystykę herbicydów z podziałem na grupy ze względu na budowę chemiczną, omówił ich zastosowanie, mechanizmy transformacji i migracji do wód naturalnych oraz stężenia w wodach powierzchniowych i gruntowych. W dalszej części rozdziału scharakteryzował toksyczne działanie herbicydów na ryby, podając przykłady ich wpływu na aktywność różnych enzymów (AChE, CAT, ALT, AST i LDH) oraz inne parametry fizjologiczne ryb (poziom metabolitów i hormonów, wskaźniki stresu oksydacyjnego), a także wywoływane przez nie zmiany histopatologiczne w skrzelach i wątrobie. Wstęp kończy się jasno postawionym celem badań. Rozdział ten byłby bardziej przejrzysty, gdyby kolejne podrozdziały opatrzone stosownymi tytułami. Część dotycząca koncentracji różnych herbicydów w wodach jest dość trudna w odbiorze i zamiast długiej formy opisowej mogłaby mieć postać tabeli – czytelnik mógłby wówczas o wiele łatwiej dostrzec, że danych dla MCPA jest najwięcej, a jego stężenia zawierają się w szerokim zakresie (0,5-100 µg/L), podczas gdy o poziomie linuronu i pendimetaliny w wodach wiadomo bardzo niewiele. We Wstępie brakuje także przekonującego uzasadnienia celu: wyboru stężeń pestycydów oraz tkanek i enzymów do analiz. Uzasadnienia te znajdują się dopiero w rozdziale Materiał i Metody. I tutaj jednak wybór stężeń nie jest do końca jasny. Zawierały się one wprawdzie w zakresie koncentracji obserwowanych w zanieczyszczonych wodach naturalnych, jednak stwierdzenie, że „odpowiadały 1/100 uśrednionej wartości LC_{50} ” jest nieprecyzyjne i budzi wątpliwości: 1. nie podano żadnych danych dotyczących wartości letalnych, 2. dane takie zwykle są bardzo rozbieżne i letalne koncentracje tej samej substancji mogą różnić się o kilka rzędów wielkości – zależą od gatunku i wielkości ryb, a także wielu czynników środowiska (temperatury, twardości wody, i in.), „uśrednianie” ich nie ma więc sensu, 3. nie wiadomo, o jaką wartość „ LC_{50} ” chodzi – wartości te są różne dla różnych czasów ekspozycji (zazwyczaj podaje się $96LC_{50}$). Moim zdaniem, aby wybrane stężenia

rzeczywiście odpowiadały 1/100 koncentracji letalnych, należało wykonać testy przeżywalności i na podstawie ich wyników obliczyć wartości 96hLC₅₀ dla młodocianych karp w konkretnych warunkach doświadczalnych.

Rozdział Materiał i Metody zawiera charakterystykę wybranych do doświadczenia pestycydów, ryb doświadczalnych i warunków ich aklimacji oraz ekspozycji, a także opis sposobu pobierania materiału biologicznego, jego przygotowania oraz wykonania analiz. Rozdział napisany jest przejrzysto i dość wyczerpująco, a tabele ułatwiają zrozumienie schematu badań (jedynie uwagi dotyczą liczby pobrań materiału biologicznego: w Tab. 1 powinno być 2 (wątroba) lub 3 (skrzela), natomiast w Tabeli 2 liczba pobrań wynosiła od 2 (Na⁺/K⁺-ATPaza w wątrobie) do 7 (ALT i AST). Moje wątpliwości budzi jednak sposób dawkowania herbicydów do wody: na jakiej podstawie zdecydowano się na czterokrotną aplikację podczas 14 dniowej ekspozycji? Nie jest jasne, czy wymieniano cały roztwór, czy też dodawano herbicydy (w jakiej ilości?) do wody bez jej wymiany. Podany przez Autora czas półtrwania tych substancji jest różny: od 13,5 dnia (MCPA) do 64 dni (pendimetalina). Czy wobec tego podawanie herbicydów do wody co 3-4 dni nie powodowało wzrostu ich stężeń w wodzie? Czy stężenia te były mierzone?

Zastosowane metody statystyczne na pierwszy rzut oka nie budzą zastrzeżeń, a ich opis jest prawidłowy. Jednak w Wynikach Autor pokazał jedynie istotność różnic aktywności enzymów parami: między grupą kontrolną a grupami poddanymi działaniu herbicydów, dla każdego terminu poboru prób osobno, co jest oczywiście prawidłowe, ale do takich porównań wystarczyłby test t-Studenta. Nie ma natomiast w pracy żadnych wyników analizy wieloczynnikowej, której wykonanie Autor deklaruje w M&M, a która służy do oceny wpływu kilku czynników (zmiennych niezależnych) na zmienną zależną. Nie jest też jasne, jakie czynniki w niej uwzględniono (można się domyślać, że rodzaj herbicydu i czas) oraz w jakim celu ją wykonano.

Przeważającą część rozdziału Wyniki (100 stron) stanowi prezentacja i opis fotografii mikroskopowych preparatów skrzeli i wątroby ryb z grupy kontrolnej i 3 grup poddanych działaniu każdego z trzech pestycydów przez 3 lub 14 dni oraz po 30 dniach detoksykacji w czystej wodzie. Fotografiiom towarzyszy szczegółowy opis zmian, który wskazuje, że wszystkie 3 herbicydy wywołały bardzo podobne zaburzenia: pogrubienie i zlewianie się blaszek, hipertrofię komórek nabłonka oddechowego, powstanie

nacieków komórkowych między blaszkami, degenerację komórek PVC z zanikiem mikrofaldek oraz wzrost wydzielania śluzu. Objawy te są typowe dla ryb poddanych działaniu substancji drażniących i toksycznych, ponieważ skrzela stanowią główne wrota ich wnikania do organizmu. Hiperplazja i hipertrofia nabłonka oraz obfite pokrycie blaszek śluzem, które początkowo stanowią reakcję obronną organizmu, z czasem powodują upośledzenie wymiany gazowej i zaburzenia osmoregulacji. Na fotografiach i w ich opisie nie znalazłam jednak żadnej informacji na temat komórek chlorkowych, będących bardzo ważnym elementem regulacji jonowej ryb i nie jest jasne, dlaczego Autor je pominął. Z literatury wiadomo, że komórki te są także bardzo wrażliwe na działanie substancji toksycznych. Jeśli nie stwierdzono ich obecności, warto byłoby to zaznaczyć, choćby tylko w opisie skrzeli ryb z grupy kontrolnej. Ultrastruktura hepatocytów także uległa pod wpływem wszystkich trzech herbicydów zmianom wskazującym na ich działanie hepatotoksyczne: zanotowano uszkodzenia mitochondriów, fragmentację RER a także uszkodzenia jąder komórkowych, stłuszczenie i cytolizę. Zmiany te mają charakter ewidentnie patologiczny i wskazują na możliwe upośledzenie funkcji narządu. Charakterystyczne jest, że – jakkolwiek Autor zanotował niewielką poprawę stanu skrzeli i wątroby po 30 dniach detoksykacji w czystej wodzie – to zmiany patologiczne wciąż się utrzymywały. Moim zdaniem to właśnie dokumentacja fotograficzna i jej szczegółowa analiza stanowi najcenniejszą wartość rozprawy, którą można było podkreślić nieco staranniejszym jej przedstawieniem: 1. strony ze zdjęciami powinny być oddzielone od stron zawierających tekst – czytanie pofragmentowanego tekstu przemieszanego ze zdjęciami utrudnia odbiór i tak niełatwej narracji, 2. zdjęcia powinny być jednakowej wielkości i ułożone w jednolity sposób – najlepiej po 2 na stronie, tworząc rodzaj atlasu fotograficznego, 3. na zdjęciach warto zamieścić skalę, aby zobrazować rozmiary przedstawionych struktur. Rozdział ten, choć bardzo obszerny objętościowo, pozostawia pewnien niedosyt i wrażenie, że wyniki uzyskane wielkim nakładem pracy (i kosztów) nie zostały w pełni wykorzystane. Na różne nasilenie zmian wskazują sformułowania „często”, „na ogół”, „niekiedy” i „niejednokrotnie” pojawiające się w opisie. Może warto było dokonać próby przynajmniej fragmentarycznej analizy ilościowej, np. oszacować odsetek uszkodzonych komórek lub stopień ich uszkodzenia, ustalając arbitralnie kilkustopniową skalę? Wyniki takiej analizy umożliwiłyby

śledzenie przebiegu rozwoju i cofania się zmian w czasie ekspozycji i detoksykacji oraz porównanie toksyczności badanych substancji.

Druga część rozdziału Wyniki dotyczy wpływu herbicydów na aktywność wybranych enzymów. Analizy wykazały ponaddwukrotny spadek aktywności Na^+/K^+ -ATPazy skrzelowej po 2 tygodniach ekspozycji na wszystkie 3 herbicydy oraz powrót do normy po 30 dniach detoksykacji, natomiast aktywność tego enzymu w wątrobie nie zmieniła się. Aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT) przejściowo istotnie spadła pod wpływem MCPA oraz linuronu, natomiast nie zmieniła się u ryb poddanych działaniu pendimetaliny. Wzrost zanotowano natomiast jedynie po 2 tygodniach ekspozycji na MCPA. Należy jednak zauważyć, że aktywność tego enzymu zmieniała się znacznie także w grupach kontrolnych. Aktywność aminotransferazy asparaginowej (AST) nie uległa istotnym zmianom, poza wzrostem po 30 dniach detoksykacji w grupie eksponowanej na MCPA. Ten podrozdział jest moim zdaniem trochę zbyt długi, a bardzo szczegółowe opisy zmian z dokładnym podawaniem wartości – zbędne. Co więcej, dla każdego z badanych enzymów lepiej byłoby wykonać jeden wspólny rysunek przedstawiający wpływ wszystkich trzech herbicydów, wydrukowany w dużym formacie na całej stronie. Można byłoby wówczas dokonać nie tylko porównań pomiędzy wartościami w grupie kontrolnej i grupach eksponowanych na toksykanty, ale także porównać wartości pomiędzy grupami ryb poddanych działaniu różnych herbicydów.

W Dyskusji Autor skonfrontował otrzymane przez siebie wyniki z obserwacjami innych autorów. Porównanie zmian ultrastruktury skrzeli i wątroby różnych gatunków ryb pod wpływem różnych herbicydów i insektycydów wykazało, że są one bardzo podobne, a ich obraz zależy głównie od czasu ekspozycji i stężenia. Spośród badanych enzymów, jak słusznie zauważa w Dyskusji Autor, aktywność Na^+/K^+ -ATPazy skrzelowej wydaje się być najczulszym wskaźnikiem intoksykacji ryb pestycydami, ponieważ uległa ona istotnym zmianom pod wpływem wszystkich trzech herbicydów oraz – jak pokazują dane różnych autorów – także wielu innych pestycydów. Dodatkową wartością tego enzymu jako wskaźnika jest stabilność jego aktywności w grupie kontrolnej. Zmiany aktywności aminotransferaz, szczególnie wobec dość dużej zmienności w grupie kontrolnej są nieco trudniejsze do interpretacji. W badaniach diagnostycznych za wskaźnik uszkodzenia wątroby przyjmuje się jedynie wzrost

aktywności tych enzymów w osoczu, którego przyczyną jest wyciek z uszkodzonych hepatocytów. Wzrost aktywności ALT i AST obserwowano jedynie u ryb poddanych działaniu MCPA, co być może wskazuje na wyższą hepatotoksyczność tego herbicydu w porównaniu z linuronem i pendimetaliną. W Dyskusji Autor wykazał się znajomością literatury, ale czytelnikowi trochę brakuje własnych przemyśleń dotyczących możliwych przyczyn i fizjologicznych skutków obserwowanych zaburzeń.

Wnioski sformułowane na końcu pracy odzwierciedlają otrzymane wyniki i mają charakter ich podsumowania.

Pod względem formalnym praca napisana jest dość dobrze: na ogół poprawnym językiem, prawie bez błędów literowych i interpunkcyjnych oraz starannie zredagowana. Znalazłam w niej jedynie kilka niezręczności językowych (np. „powrót aktywności tego enzymu do aktywności kontrolnej”) i usterek (np. „woda kranowa” zamiast „wodociągowa”, „wokalizacja” zamiast „wakuolizacja”).

Konkludując, pomimo uwag krytycznych (które są obowiązkiem recenzenta), uważam że rozprawa doktorska Pana magistra Bartosza Bojarskiego stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., nr 65, poz. 595, Dz. U. z 2005 r., nr 164, poz. 1365, Dz. U. z 2011 r., nr 84, poz. 455). Zwracam się zatem do Rady Wydziału Geograficzno-Biologicznego Uniwersytetu Pedagogicznego im. KEN w Krakowie o dopuszczenie mgr Bojarskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk biologicznych w dyscyplinie biologia.

Prof. dr hab. Małgorzata Witeska

Siedlce, 31 VIII 2016

