

Żabieniec, dnia 2 października 2017 r.

Prof. dr hab. Jacek Wolnicki
Instytut Rybactwa Śródlądowego
im. St. Sakowicza w Olsztynie
Zakład Rybactwa Stawowego
w Żabieńcu
e-mail: j.wolnicki@infish.com.pl

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Grzegorza Gosiewskiego
pt. „Wpływ kisspeptyny na oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadową u samicy
karasia srebrzystego (*Carassius gibelio*, Bloch 1782). Badania *in vivo* i *in vitro*”**

**wykonanej w Katedrze Ictiobiologii i Rybactwa Uniwersytetu Rolniczego
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
pod kierunkiem prof. dr hab. Mirosławy Sokołowskiej-Mikołajczyk**

*Recenzję wykonano w związku z uchwałą Rady Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie – pismo Dziekana Wydziału, prof. dr hab. Czesława Klocka
z dnia 23.05.2013 r.*

Tematyka rozprawy

Bieżące stulecie stoi pod znakiem gwałtownego rozwoju akwakultury, wymuszonego przez wyczerpywanie się naturalnych zasobów organizmów wodnych oraz rosnące potrzeby konsumpcyjne coraz liczniejszej ludzkości. Już dzisiaj wielkość połowów licznych gatunków zwierząt wodnych, w tym wielu ważnych gatunków ryb, ustępuje wielkości ich produkcji w warunkach akwakultury i z czasem ten trend z pewnością będzie się pogłębiał. Fundamentem akwakultury każdego gatunku zwierzęcia wodnego jest umiejętność jego skutecznego i efektywnego rozradzania, najlepiej wtedy, kiedy tego chcemy, a więc niekoniecznie w pełnej zgodzie z naturą. Rozród tymczasem jest najtrudniejszą i najbardziej złożoną fazą chowu i hodowli każdego gatunku, zaś jego efekty są ściśle uzależnione od stanu wiedzy na temat przebiegu tego procesu i czynników go kontrolujących. Jednym z takich czynników, na razie mało poznanych w ogóle, a u ryb w szczególności, jest kisspeptyna. Odkryto ją bardzo niedawno, zaledwie kilkanaście lat temu, nic więc dziwnego, że jej funkcje i oddziaływania w organizmie nie tylko ryb, ciągle kryją wiele zagadek.

W związku z powyższym tematykę badawczą podjętą w recenzowanej rozprawie uważam za wybór trafny i uzasadniony. Rangę przeprowadzonych badań istotnie podnosi fakt, iż ich wyniki mają nie tylko znaczenie poznawcze, lecz i aplikacyjne w wymiarze, którego dzisiaj chyba jeszcze nie potrafimy przewidzieć.

Struktura rozprawy

Rozprawa ma konwencjonalny układ podstawowych rozdziałów: *Wstęp*, *Cel pracy*, *Materiał i metody*, *Wyniki*, *Dyskusja*, *Stwierdzenia i wnioski*, *Literatura*. Objętość rozprawy wynosi 128 stron numerowanych. W tekście znajduje się 36 rycin oraz 5 tabel.

Pierwszy rozdział *Wstęp* jest obszerny w rozsądnych granicach, gdyż liczy 15 stron. Składa się on z dwóch podrozdziałów, których treść dotyczy najpierw hormonalnej kontroli dojrzewania płciowego u ryb, a następnie samej kisspeptyny. Rozdział jest napisany sprawnie i ciekawie, a lekturę niełatwych w odbiorze dla niefachowca treści ułatwia podział podrozdziałów na jeszcze mniejsze fragmenty. Autor swobodnie porusza się w obrębie omawianych zagadnień, zgrabnie przechodząc od ogółu do szczegółu, którym jest kisspeptyna i jej złożone funkcje w organizmie ryb, ze szczególnym uwzględnieniem regulacji osi PPG.

W rozdziale drugim *Cel pracy* Doktorant zwięźle i jasno podał, co było jego zamierzeniem badawczym. Precyzuje je, jako zbadanie wpływu kisspeptyny na spontaniczne i stymulowane przez analog GnRH uwalnianie LH z przysadki mózgowej karasia srebrzystego (...), ze szczególnym uwzględnieniem ewentualnej interakcji kisspeptyny z układem dopaminergicznym. Dobrym pomysłem było zamieszczenie w tym rozdziale dwóch rycin z przejrzystymi schematami, dzięki którym cel badań był łatwiejszy do percepcji. Co dziwne jednak, w tekście żadna z tych rycin nie została zacytowana.

Rozdział *Materiał i metody* (30 stron), pomimo wzbogacenia go w liczne ryciny ze schematami pokazującymi sekwencje istotnych czynności oraz w tabele, robi wrażenie mało uporządkowanego i przez to jest raczej słabo przyswajalny. Autor ponownie pomija w tekście cytowanie rycin (schematów), za to cytuje tabele. W kilku miejscach kompletność opisu ważnych elementów metodyki jest niedostateczna. Brakuje mi w tym rozdziale uzasadnienia wyboru do badań takiego, a nie innego gatunku ryby. Mamy przecież w naszych wodach karasia pospolitego, na przykład. Brakuje mi informacji na temat temperatury wody w stawie w momencie odłowu ryb oraz wyjaśnienia, co konkretnie determinowało decyzję w sprawie terminu odłowu. Na marginesie, odłowionych ryb z całą pewnością w laboratorium nie *aklimatyzowano*. Powinno tu być użyte zupełnie inne, prawidłowe określenie (jakie, chciałbym usłyszeć na obronie rozprawy). Tak naprawdę prawie nic nie wiadomo na temat warunków przetrzymywania ryb doświadczalnych w laboratorium przed doświadczeniami, a podanie objętości akwariów niewiele w tej ważnej sprawie wnosi. Nasuwają się tutaj pytania o

zagęszczenie ryb w akwariach, o podstawowe cechy jakości wody (nasylenie tlenem, ilość amoniaku i azotynów etc.). Bez tych informacji nie wiadomo, jaki był stan fizjologiczny badanego materiału biologicznego, poddanego przecież silnemu stresowi środowiskowemu w związku z przeniesieniem ze stawu do laboratorium. Wątpliwości rodzą się także w sprawie podejścia Autora do wyników takich samych doświadczeń, ale uzyskanych w różnych latach. Na jakiej podstawie wszystkie takie wyniki zostały wrzucone do jednego worka? Przyczyna takiego postępowania powinna być uzasadniona, tym bardziej że niektóre wyniki świadczą o silnie zróżnicowanej reakcji poszczególnych osobników w próbie na badany czynnik (patrz np. ryc. 21-23). Co mogło być tego przyczyną? Czy nie było istotnych różnic między sezonami, kiedy ryby na pewno miały za sobą nieco (?) inną historię termiczną? Dobrze byłoby także wiedzieć, jaki jest pogląd Autora na wielkość prób ryb w doświadczeniach. Czy czynnik ten może być odpowiedzialny za brak istotnych różnic między grupami doświadczalnymi w niektórych doświadczeniach, pomimo znacznej różnicy między wartościami średnimi? Rozdział metodyczny pracy dużo zyskałby na przejrzystości, gdyby wykazy użytych odczynników znalazły się w załącznikach na końcu pracy. W tekście wystarczyłyby odniesienia do nazw zastosowanych metod, gdyż Autor wykorzystał metody znane i praktykowane. W kontraście do nadmiernej skrótowości opisu pewnych cech metodyki badań, sam dobór metod badawczych i sposób przeprowadzenia doświadczeń uważam za poprawny.

Specyfiką rozdziału *Wyniki* (28 stron) są liczne, nieskomplikowane i przejrzyste wykresy oraz skrócony do zupełnego minimum, czasem przesadnie, opis tekstowy. I tutaj Doktorant nie cytuje rycin, tylko odwołuje się do nazw wykresów, stanowiących jedynie element podpisów pod rycinami. W tej sytuacji byłbym wdzięczny, gdyby Doktorant zechciał wyjaśnić, w jakim celu ryciny zostały w ogóle przez niego ponumerowane. Rozdział ten składa się z dwóch głównych podrozdziałów, poświęconych kolejno badaniom *in vivo* i *in vitro*, co jest zgodne z sekwencją wcześniejszych części rozprawy. W tym rozdziale zwracają uwagę nieprawidłowe podpisy pod prawie wszystkimi rycinami (chlubne wyjątki: ryc. 16-19). Otóż wykresy słupkowe pokazane na tych ilustracjach nie przedstawiają *badania wpływu kisspeptyny (...)*, ale wyniki tych badań, a to nie to samo. Niektóre ryciny nie są wolne od innych, poważniejszych błędów, które mogły już mieć wpływ na poprawność wniosków sformułowanych przez Doktoranta (mam nadzieję, że to nie miało miejsca). Otóż na kilku rycinach można dopatrzeć się błędów w indeksach literowych, które wskazują istotność różnic między porównywanymi średnimi w obrębie danego czasu poboru krwi. Szczególnie dobrym

przykładem jest rycina 19. W rozprawie została przyjęta konwencja oznaczania indeksem *a* najniższej wartości średniej. Jak to się jednak stało, że w obrębie średnich dla czasu 15 minut, dwuliterowy indeks *ac* odnosi się do grupy GnRHa i KISS1, podczas gdy indeks *bc* został przydzielony najwyższej wartości średniej, stwierdzonej w grupie KISS1+GnRH? Na tej samej rycinie, w obrębie danych odnoszących się do czasu 30 minut, problem nieprawidłowych indeksów wygląda jeszcze gorzej, gdyż panuje tutaj zupełny bałagan. Co więc w rzeczywistości różni się istotnie, a co istotnie się nie różni w tym doświadczeniu? Podobne wątpliwości dotyczą jeszcze na pewno rycin 11 i 13. Wszystkie niejasności tego rodzaju muszą zostać przez Doktoranta krytycznie zweryfikowane.

Rozdział *Dyskusja* liczy 20 stron i dobrze, że został podzielony na 7 podrozdziałów, korespondujących z kolejnością przeprowadzonych doświadczeń. W początkowej części tego rozdziału zwraca uwagę fragment dotyczący przydatności karasia srebrzystego do badań nad rozrodem ryb karpiowatych, którego wymowa nie jest dla mnie w pełni zrozumiała. Chciałbym, aby podczas obrony pracy Doktorant zechciał lepiej wyjaśnić kwestie pokrewieństwa gatunków w obrębie rodziny ryb karpiowatych oraz ich przydatności do badań nad rozrodem, biorąc pod uwagę również aspekty przyrodnicze, zupełnie tutaj pominięte. Cały rozdział oceniam jako napisany rzeczowo i z dużą znajomością poruszanych zagadnień, wśród których Doktorant porusza się z godną uznania swobodą. Dyskusja ma też swoje różne słabości, wśród których na pierwszym miejscu wymieniam niezrozumiałą i nieakceptowalną manierę cytowania w tekście symboli wykresów, a nie numerów rycin. Autor zrobił w tej sprawie tylko jeden wyjątek, pewnie przez roztargnienie cytując rycinę 8 (s. 84). W tym rozdziale daje się też zauważyć niekonsekwencję pod względem wymieniania, przy okazji pierwszej wzmianki w tekście, nazw naukowych organizmów, a nie tylko ich nazw pospolitych.

Rozdział stanowiący rekapitulację osiągnięć rozprawy liczy 3 strony i ma niekonwencjonalny kształt, gdyż jest połączeniem *stwierdzeń i wniosków*, wynikających z poszczególnych doświadczeń *in vivo* i *in vitro*. Taka formuła jest do przyjęcia, chociaż znacznie bardziej cenię u doktorantów niebanalną umiejętność sformułowania precyzyjnych i zwięzłych, a nie opisowych wniosków, wypływających nawet z obszernych wyników badań.

W rozdziale *Literatura* figuruje 171 pozycji, w tym liczne prace wydane w ostatnich latach. Są to bez wyjątku poważne publikacje naukowe, które w chwili opracowania wydruku rozprawy prawdopodobnie zawierały pełen przegląd wiedzy związanej ściśle z tematyką rozprawy. Na uznanie zasługuje fakt ponumerowania pozycji literatury, który to obyczaj –

chwalebny z punktu widzenia recenzenta – wśród współczesnych doktorantów wcale nie jest częsty.

Główne walory rozprawy

Kręgosłupem rozprawy doktorskiej mgr inż. Gosiewskiego jest seria dobrze pomyślanych doświadczeń *in vivo* i *in vitro*, które przeprowadził na karasiu srebrzystym w ciągu dwóch lat. Autor użył w nich kisspeptyny ludzkiej, a nie jak zdarza się to częściej, kisspeptyny specyficznej dla badanego gatunku. Takie podejście jest dużą zaletą rozprawy, gdyż więcej mówi o specyfice kisspeptyny jako hormonu konserwatywnego w obrębie podtypu kręgowców. Bardzo podoba mi się uwzględnienie podczas planowania doświadczeń faktu sezonowości rozrodu ryb, która to cecha dotyczy bardzo wielu gatunków z tej gromady. W efekcie badania miały miejsce zarówno w okresie przedtarłowym, jak i w okresie tarła lub krótko przed nim. Dzięki temu Autor był w stanie wykazać między innymi, że kisspeptyna wywiera modulujący wpływ na wydzielanie LH z przysadki mózgowej w zależności od fazy cyklu płciowego. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, iż mgr inż. Gosiewski jest autorem pierwszych w ogóle badań zależności w działaniu dopaminy i kisspeptyny na sekrecję LH u ryb, które to zagadnienie w praktyce rozrodu ryb ma istotne znaczenie. Jako duży walor merytoryczny rozprawy widzę i to, że jej wyniki – te zupełnie klarowne, i te mniej wyraziste – z pewnością wskażą badaczom mechanizmów hormonalnej regulacji rozrodu ryb, warte ich wysiłku i kierunki dalszych badań.

Uwagi krytyczne

Obowiązkiem recenzenta jest dostrzec i wskazać nie tylko silne, lecz i słabe strony ocenianej pracy. W tym miejscu stwierdzam, że recenzowana rozprawa po względem formy jest dziełem w najlepszym razie mocno dyskusyjnym. Nie będę tutaj rozwijał wątku słabej staranności tekstu, którą mogę ocenić jako co najwyżej dostateczną. Wspomnę tylko o obecności w pracy licznych usterek, spośród których wcześniej wymieniłem tylko niektóre. W pracy można znaleźć nawet błędy ortograficzne, co dziełu tej rangi zupełnie nie przystoi.

Rozprawa doktorska jest dziełem naukowym, podlega więc jasno określonym wymogom i ograniczeniom. Jednym z fundamentalnych jest zasada nieumieszczania w pracy ilustracji, które nie są później cytowane w tekście; drugą jest obowiązek cytowania w tekście ilustracji w porządku zgodnym z ich numeracją. Autor całkowicie zignorował obie te zasady,


co jest nie tylko niezgodne z powszechnym i dobrym obyczajem, lecz co gorsza, bardzo utrudnia lekturę pracy i przyswajanie jej treści. Najłatwiej przekonać się o tym w trakcie lektury dyskusji, gdzie znajdują się odwołania do niektórych ilustracji, ale nie do ich numerów, lecz tylko do nazw wykresów, w dodatku bez podania choćby numerów odpowiednich stron. Z tak swoistym, żeby nie powiedzieć kuriozalnym sposobem potraktowania ogólnie przyjętych zasad, w swojej dość bogatej karierze recenzenta spotykam się po raz pierwszy i mam nadzieję, ostatni.

Podsumowanie

Recenzowaną rozprawę doktorską uważam za dzieło poprawne z formalnego punktu widzenia i o wysokiej wartości merytorycznej. Wyniki uzyskane na drodze doświadczalnej przez Doktoranta traktuję jako oryginalny i wartościowy wkład do wiedzy naukowej na temat różnych aspektów wpływu kisspeptyny na oś podwzgórzowo-przysadkowo-gonadową, która to wiedza ma o wiele szerszy zakres niż tylko ten odnoszący się do badanego w pracy gatunku ryby. Rangę badań istotnie podnosi fakt możliwości wykorzystania ich wyników w praktyce; co więcej – nie tylko w akwakulturze gatunków ryb o dużym znaczeniu ekonomicznym, lecz również w chowie i hodowli gatunków rzadkich, zagrożonych, chronionych i w ogóle mających jedynie znaczenie przyrodnicze. Tę cechę rozprawy oceniam szczególnie wysoko.

Doktorant wykazał się dobrą znajomością różnych metod badawczych i umiejętnością ich wykorzystania do realizacji postawionych przed sobą celów badawczych, które w pracy zostały osiągnięte. Na uznanie zasługuje wszechstronna, bardzo dobra orientacja Autora w dziedzinie biologii rozrodu kręgowców w ogóle, a biologii rozrodu ryb w szczególności.

W związku z powyższym stwierdzam, że rozprawa doktorska **Pana mgr inż. Grzegorza Gosiewskiego** spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim (Ustawa z dn. 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w dziedzinie sztuki; Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.). **Na tej podstawie wnoszę o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**


prof. dr hab. Jacek Wolnicki