

Olsztyn, dn. 17.12.2024 r.

prof. dr hab. inż. Dorota Fopp-Bayat
Katedra Ichtiologii i Akwakultury
Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Ul. Oczapowskiego 5; 10-719 Olsztyn



Ocena

rozprawy doktorskiej mgr Natalii Kodzik pt.: „Proteom układu rozrodczego jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baerii*): charakterystyka profili białkowych plemników, plazmy nasienia, ikry i płynu owaryjnego oraz zmian w wyniku kriokonserwacji nasienia”

Ocena została sporządzona w związku z powołaniem mnie przez Radę Naukową Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie w dniu 17 października 2024 r. na recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Natalii Kodzik pt.: „Proteom układu rozrodczego jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baerii*): charakterystyka profili białkowych plemników, plazmy nasienia, ikry i płynu owaryjnego oraz zmian w wyniku kriokonserwacji nasienia”.

I. Ocena formalna rozprawy doktorskiej

Pani mgr Natalia Kodzik przygotowała rozprawę doktorską dotyczącą analizy wybranych fragmentów proteomu układu rozrodczego jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baerii*) z uwzględnieniem charakterystyki profili białkowych plemników, plazmy nasienia, ikry i płynu owaryjnego oraz zmian w wyniku kriokonserwacji nasienia. Swoją pracę doktorską realizowała pod opieką Pani dr hab. Marioli A. Dietrich, prof. Instytutu – wybitnej specjalistki z zakresu biologii i fizjologii rozrodu zwierząt oraz biologii gamet i zarodka.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl trzech opublikowanych oryginalnych artykułów naukowych, tematycznie związanych ze sobą. Publikacje naukowe, stanowiące rozprawę doktorską zostały wydane w latach 2023-2024. Wszystkie prace zostały opublikowane w czasopismach z listy MNiSW (sumaryczna liczba punktów MNiSW, zgodnie z rokiem wydania, wynosi 420; IF=13,70). We wszystkich publikacjach mgr Natalia Kodzik jest pierwszym autorem, natomiast rolę autora korespondującego pełni promotor rozprawy doktorskiej – dr hab. Mariola A. Dietrich, co wskazuje na nadzór merytoryczny nad badaniami naukowymi oraz sprawowanie ścisłej kontroli nad publikowanymi wynikami badań. Wkład indywidualny doktorantki w powstanie wymienionych publikacji naukowych (biorąc pod uwagę również realizację prac badawczych), głównie polegał na: pobieraniu materiału biologicznego, przygotowaniu materiału do analiz, współudziale w ekstrakcji białek z materiału biologicznego, cytometrycznej analizie żywotności, koncentracji plemników oraz integralności akrosomu, wykonaniu elektroforezy 2D-DIGE, identyfikacji białek przy użyciu spektrometrii mas MALDI-TOF/TOF, wykonaniu analiz bioinformatycznych, współudziale w analizie statystycznej, współudziale w interpretacji wyników, wizualizacji uzyskanych wyników, przygotowaniu manuskryptu oraz udziale w czynnościach związanych z procesem publikacji.

Recenzowana rozprawa doktorska obejmuje charakterystykę cyklu prac badawczych, przedstawioną na 49 stronach maszynopisu, uwzględniającą Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz następujące rozdziały: 1) Wstęp; 2) Hipoteza i cele badawcze; 3) Spis zastosowanych metod; 4) Wyniki; 5) Dyskusja; 6) Podsumowanie; 7) Wnioski; 8) Bibliografia. Ponadto, przedstawiona do recenzji praca doktorska zawiera 9) Publikacje wraz z oświadczeniami autorów, co stanowi najważniejszy element pracy doktorskiej.

Prezentowana rozprawa doktorska jest poprawna pod względem formalnym; zawiera wszystkie wymagane elementy, które syntetycznie i w sposób bardzo uporządkowany charakteryzują zakres

badawczy. Publikacje zamieszczone w rozdziale „Bibliografia” zostały dobrane odpowiednio i stanowią materiał źródłowy związany z obszarem badawczym prezentowanym przez doktorantkę.

II Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Tematyka pracy doktorskiej obejmuje zagadnienia związane z charakterystyką proteomu gamet (plemników i ikry) jesiotra syberyjskiego i otaczającego je środowiska (plazmy nasienia i płynu owaryjnego) oraz zmian proteomu plemników w wyniku kriokonserwacji nasienia, w celu zrozumienia biochemicznych i fizjologicznych podstaw funkcjonowania układu rozrodczego jesiotrów oraz poznania mechanizmów kriouszkodzeń plemników w zależności od zastosowanego krioprotektanta.

W rozdziale „Wstęp” Pani mgr Natalia Kodzik nakreśla tło obszaru badawczego, który stanowił podstawę jej doktoratu. Rozpoczynając od ogólnej charakterystyki ryb jesiotrowatych, doktorantka przedstawia gatunek jesiotra syberyjskiego, skupiając się głównie na specyfice biologii rozrodu tego gatunku oraz charakterystyce nasienia, ikry i płynu owaryjnego. W kolejnych fragmentach tego rozdziału, doktorantka wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące proteomicznej analizy białek oraz kompleksów białkowych nasienia, ikry i płynu owaryjnego ryb jesiotrowatych. Opisuje również kriokonserwację nasienia ryb jesiotrowatych wraz z jego analizą proteomiczną. Wszystkie wymienione powyżej zagadnienia są opisane w sposób zrozumiały dla czytelnika i zawierają najważniejsze informacje charakteryzujące obszar badawczy przedstawionej do recenzji dysertacji doktorskiej.

Kolejnym elementem pracy doktorskiej jest rozdział „Hipoteza i cele badawcze”, w którym doktorantka bardzo precyzyjnie określiła trzy hipotezy badawcze oraz zaplanowała cele badawcze, które powiązała z następującymi zadaniami badawczymi:

1. Charakterystyka profilu białkowego oraz kompleksów białkowych plazmy nasienia jesiotra syberyjskiego – Publikacja PI

2. Porównanie proteomu ikry i płynu owaryjnego jesiotra syberyjskiego – Publikacja P II
3. Analiza proteomiczna zmian w profilu białkowym nasienia jesiotra syberyjskiego po kriokonserwacji z użyciem MeOH i DMSO jako krioprotektantów – Publikacja P III

Osiągnięcie zamierzonych celów zostało zwieńczone opublikowaniem 3 poniżej wymienionych publikacji naukowych, w których doktorantka zawarła unikatowe wyniki swoich prac badawczych:

- **Kodzik N, Ciereszko A, Szczepkowski M, Karol H, Judycka S, Malinowska A, Świdarska B, Dietrich MA.** Comprehensive proteomic characterization and functional annotation of Siberian sturgeon seminal plasma proteins, *Aquaculture*. 2023; 568, 739326, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739326>. **IF: 4.4; MEiN: 140 pkt.**
- **Kodzik N, Ciereszko A, Szczepkowska B, Malinowska A, Dietrich MA.** Comparative proteomic analysis of the ovarian fluid and eggs of Siberian sturgeon. *BMC Genomics*. 2024; 25(1):451. doi: 10.1186/s12864-024-10309-y. **IF: 3.5; MEiN: 140 pkt.**
- **Kodzik N, Ciereszko A, Judycka S, Słowińska M, Szczepkowska B, Świdarska B, Dietrich MA.** Cryoprotectant-specific alterations in the proteome of Siberian sturgeon spermatozoa induced by cryopreservation. *Scientific Reports*. 2024; 14(1):17707. doi:10.1038/s41598-024-68395-7. **IF: 3.5; MEiN: 140 pkt**

Rozdział 3. „Spis zastosowanych metod” został podzielony na trzy części, związane z trzema doświadczeniami (bezpośrednio powiązanymi z publikacjami doktorskimi). Rozdział ten zawiera wykaz zaawansowanych metod badawczych, stosowanych przez doktorantkę w trakcie realizacji badań dotyczących pracy doktorskiej. Zakres zastosowanych metod analitycznych, bioinformatycznych i statystycznych jest imponujący i świadczy o dobrej znajomości zagadnień oraz zaawansowanych umiejętnościach analitycznych mgr Natalii Kodzik. Graficzne przedstawienie doświadczeń przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej wskazuje na dobrze zaplanowane prace badawcze, które tworzą spójną całość.

W rozdziale „Spis zastosowanych metod”, doktorantka nie uwzględniła metodyki badawczej, co nie jest błędem, ponieważ metodyka badawcza została dokładnie opisana w publikacjach, stanowiących dysertację doktorską. Uznaję, że brak metodyki jest związany z formą przygotowania rozprawy doktorskiej, obowiązującą w jednostce, w której doktorantka realizowała pracę doktorską.

Wszystkie prace eksperymentalne były prowadzone przy współpracy z Zakładem Hodowli Ryb jesiotrowatych w Pieczarkach, Instytutu Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza PIB w Olsztynie, gdzie znajdują się stada mateczne ryb jesiotrowatych. Część analityczna (analizy laboratoryjne, bioinformatyczne oraz statystyczne) doktoratu była realizowana przez doktorantkę w Zakładzie Biologii Gamet i Zarodka Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie, pod kierunkiem Pani promotor dr hab. Marioli A. Dietrich, prof. Instytutu, o czym świadczą informacje zawarte w publikacjach naukowych oraz w dołączonych oświadczeniach.

W rozdziale „Wyniki”, doktorantka przedstawiła w sposób syntetyczny wyniki badań, które zostały szczegółowo opisane w publikacjach naukowych. Wyniki badań zostały scharakteryzowane w trzech podrozdziałach, nawiązując do zaplanowanych zadań badawczych. Biorąc pod uwagę unikatowość badań, warto podkreślić, iż zawarte w niniejszej pracy doktorskiej badania są pierwszymi, które szczegółowo charakteryzują profile białkowe plemników, plazmy nasienia, ikry i płynu owaryjnego jesiotra syberyjskiego. Dodatkowo badania te charakteryzują zmiany zachodzące w wyniku kriokonserwacji nasienia tego gatunku jesiotra. W trakcie szeroko zakrojonych prac analitycznych, doktorantka wykazała, że białka plazmy nasienia odgrywają istotną rolę w procesach immunologicznych, metabolizmie, transporcie za pośrednictwem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych oraz proteolizie. Ponadto doktorantka zidentyfikowała białka zaangażowane w procesy rozrodcze (uwzględniając spermatogenezę, zapłodnienie, reakcję akrosomalną i ruchliwość plemników) oraz wytypowała cztery kompleksy białkowe w plazmie nasienia jesiotra. W trakcie badań związanych z analizą proteomiczną płynu owaryjnego, kandydatka wykazała znaczący udział białek włączonych w procesy odpornościowe, metabolizm cholesterolu oraz regulację cytoszkieletu

aktywnego. Wykazała również zaangażowanie białek ikry w szlaki metaboliczne, na przykład: fosforylację oksydacyjną i metabolizm kwasów tłuszczowych, ubikwitynację białek i translację. W trakcie eksperymentów dotyczących kriokonserwacji nasienia z wykorzystaniem dwóch różnych krioprotektantów, doktorantka wykazała, że plemniki kriokonserwowane w DMSO charakteryzowały się odmiennym profilem białkowym oraz wpływały na niższy odsetek wylęgu w porównaniu do plemników kriokonserwowanych z MeOH.

Uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej wyniki badań poszerzają wiedzę na temat mechanizmów molekularnych zachodzących w układzie rozrodczym samic i samców jesiotra syberyjskiego. Ponadto stanowią nową wiedzę na temat zaburzeń wynikających z kriokonserwacji nasienia przy zastosowaniu wybranych krioprotektantów.

Rozdział „Dyskusja” charakteryzuje uzyskane wyniki badań oraz ich unikatowość w porównaniu do podobnych badań prowadzonych na innych gatunkach ryb. W rozdziale tym, autorka opisuje ogólny stan wiedzy w obszarze badawczym, zbieżnym z realizowaną pracą dokorską. Dodatkowo, opisuje najważniejsze swoje osiągnięcia, wśród których można wyróżnić: 1) największy opisany proteom plazmy nasienia dla ryb jesiotrowatych, złożony z 665 białek; 2) zidentyfikowanie w plazmie nasienia białek wiążących ryboflawinę (RfBP) oraz RBP4, które wcześniej nie były identyfikowane u innych gatunków ryb; 3) zidentyfikowanie w plazmie nasienia 70 białek związanych, między innymi, z następującymi procesami rozrodczymi: spermatogeneza, zapłodnienie, wiązanie plemnika z osłonką przejrzystą, ruchliwość plemników i in.; 4) scharakteryzowanie i opisanie kompleksów białkowych występujących w plazmie nasienia jesiotra syberyjskiego; 5) scharakteryzowanie składu białkowego płynu owaryjnego i ikry; 6) wskazanie na podobieństwo składu białkowego płynu owaryjnego i plazmy nasienia jesiotra syberyjskiego; 7) zidentyfikowanie zmian proteomu nasienia jesiotra syberyjskiego poddanego kriokonserwacji z użyciem MEQH i DMSO. Ponadto doktorantka wskazuje na potrzebę rozszerzenia badań, na przykład w zakresie izolacji egzosomów z plazmy nasienia jesiotra wraz z ich proteomiczną i funkcjonalną charakterystyką.

Doktorantka wskazuje również na potrzebę przeprowadzenia badań ukierunkowanych na szczegółową charakterystykę kompleksów białkowych w celu zrozumienia interakcji białko-białko oraz poznania funkcji i regulacji białek plazmy nasienia w procesach rozrodczych ryb jesiotrowatych.

Zwieńczeniem uzyskanych wyników badań, zrealizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, jest 11 wniosków powiązanych z realizowanymi zadaniami badawczymi, które potwierdzają unikatowość i ważność prezentowanych badań naukowych.

Rozdział „Bibliografia” zawiera 102 pozycje literaturowe dobrane odpowiednio do obszaru badawczego w zakresie przygotowanej pracy doktorskiej.

Drobne błędy, wymagające korekty, dostrzegłam w cytowaniu piśmiennictwa; zauważyłam również pozycje literaturowe, które nie zostały zacytowane. Poniżej przedstawiam wspomniane uchybienia:

- str. 13 – jest Ginzburg i in. 1968; w spisie literatury jest Ginzburg 1968;
- str. 13 i 15 – jest Jamieson i in. 1991; w spisie literatury jest Jamieson 1991;
- str. 13 – jest Psenicka i Ciereszko, 2018; brak w spisie literatury;
- str. 14 – jest Ciereszko i in., 1994; brak w spisie literatury;
- str. 14 – jest Sun i in. 2015; brak w spisie literatury;
- str. 31 – jest Adami i in. 2020; brak w spisie literatury.

Ponadto w tekście brakuje cytacji następujących pozycji literaturowych, zamieszczonych w Bibliografii: Sun i Zhang 2015, Rahi i in. 2020.

Przytoczone powyżej uwagi mają charakter korektorski i w niczym nie umniejszają wysokiej wartości naukowej niniejszej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując uważam, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Natalii Kodzik stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, a uzyskane wyniki badań wnoszą nową wiedzę, która może być wykorzystana do optymalizacji technologii rozrodu ryb jesiotrowatych. Rozprawa doktorska przygotowana jest starannie, a zastosowane liczne metody badawcze świadczą

o bardzo dobrym opanowaniu nowoczesnych analiz laboratoryjnych, wskazując jednocześnie na umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Uzyskane wyniki wnoszą wiele nowych informacji o charakterze poznawczym i praktycznym, które mogą być wykorzystane w badaniach eksperymentalnych i pracach gospodarczych, związanych z rozrodem ryb jesiotrowatych w warunkach kontrolowanych.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną pracy, jej oryginalność oraz walory poznawcze i użyteczne oświadczam, iż praca pt.: „Proteom układu rozrodczego jesiota syberyjskiego (*Acipenser baerii*): charakterystyka profili białkowych plemników, plazmy nasienia, ikry i płynu owaryjnego oraz zmian w wyniku kriokonserwacji nasienia” prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie zootechnika i rybactwo oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Jednocześnie stwierdzam, że niniejsza praca doktorska w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim, zgodnie z aktualnie obowiązującymi zapisami ustawy określonymi w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.), w związku z czym opiniuję ją pozytywnie i przedkładam Radzie Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Państwa w Olsztynie wniosek o dopuszczenie mgr Natalii Kodzik do kolejnych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na zastosowanie bardzo zaawansowanych technik eksperymentalnych i analitycznych w niniejszej pracy doktorskiej oraz uzyskanie istotnych wyników naukowych, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Natalii Kodzik.

