

Prof. dr hab. Mirosława Sokołowska-Mikołajczyk
Profesor emerytowana



Recenzja

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” wykonanej w Zakładzie Biologii Gamet i Zarodka Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, pod kierunkiem dr hab. Marioli A. Dietrich, profesor Instytutu.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Dyrektora Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie z dnia 29.10.2024, zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Instytutu, podjętą w dniu 17.10.2024 r.

Opis merytoryczny rozprawy

Oceniana rozprawa doktorska dotyczy pogłębionej charakterystyki białek układu rozrodczego jesiotra syberyjskiego (plemników, plazmy nasienia, ikry, płynu owaryjnego) oraz zmian zachodzących w nasieniu tego gatunku po zastosowaniu kriokonserwacji. Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę na temat biochemicznych i fizjologicznych podstaw funkcji układu rozrodczego ryb jesiotrowatych, które należą do gatunków narażonych na wyginięcie.

W ciągu ostatnich dwudziestu lat pogłowie ryb jesiotrowatych znacząco zmalało w wyniku kłusownictwa, nadmiernej eksploatacji (kawior, wysokiej jakości mięso), degradacji miejsc rozrodu, kurczenia się naturalnych siedlisk dla młodych stadiów rozwojowych, czy zanieczyszczenia środowiska wodnego (przykład z naszego podwórka - w wyniku katastrofy ekologicznej w Odrze zginęły jesiotry, które eksperci od kilkadziesiątu lat próbują przywrócić do naszych rzek).

Obecnie jesiotry stanowią jedną z najcenniejszych i najbardziej zagrożonych wyginięciem grup zwierząt na świecie. Zmniejszanie się liczebności ich naturalnych populacji

stymuluje dynamiczny rozwój akwakultury jesiotrów notowany w ostatnich kilkudziesięciu latach. Rozwój ten wiąże się z rosnącym popytem na kawior, pozyskiwany najczęściej z jesiotra syberyjskiego i rosyjskiego (nb. Polska jest największym producentem kawioru w Europie i drugim na świecie), czy potrzebą produkcji materiału zarybieniowego do celów restytucji zagrożonych wyginięciem gatunków.

Biorąc pod uwagę znaczenie gospodarcze jesiotrów i fakt, że są to zwierzęta reliktowe o szczególnych cechach rozrodu, badanie ich gamet wnosi nowe elementy do wiedzy podstawowej jak i do praktyki kontrolowanego rozrodu, która to wiedza jest niezbędna do dalszego rozwoju hodowli tych gatunków. Ryby jesiotrowate, charakteryzują się unikalnymi, w porównaniu z rybami doskonałokostnymi (*Teleostei*), cechami procesu dojrzewania płciowego i rozrodu: plemniki jesiotrowatych posiadają akrosom, proces dojrzewania spermy zachodzi poza jądrem, podczas przejścia nasienia przez nerki do przewodów Wolffa, a plemniki charakteryzuje długi okres ruchliwości po ich aktywacji. W osłonce jajowej znajdują się liczne mikropyle, a bruzdkowanie jaj ma charakter holoblastyczny.

Wykonana przez Doktorantkę szczegółowa charakterystyka profili białkowych plemników, plazmy nasienia, ikry, a także płynu owaryjnego jesiotra syberyjskiego przedstawia kompleksowe podejście do zagadnienia rozrodu tego gatunku, w którym bierze się pod uwagę gamety obu płci (zarówno jakość nasienia i jakość ikry wpływają na skuteczność zapłodnienia) i ich otaczające środowisko (plazma nasienia, płyn owaryjny). Doktorantka badała także zmiany zachodzące w proteomie nasienia poddanego kriokonserwacji.

Płyn nasienny jesiotra ma specyficzny biochemiczny skład, a ponieważ tworzy optymalne środowisko dla plemników, znajomość kompozycji tworzących go białek może być wykorzystana dla doskonalenia techniki rozrodu, konserwacji nasienia i zapłodnienia u tego gatunku. Krioprezerwacja nasienia pozwalająca na ochronę zasobów genetycznych populacji dziko żyjących, czy hodowlanych, stwarza możliwość utrzymania zmienności genetycznej populacji i gatunków.

Dane pochodzące z praktyki wylęgarniczej pokazują, że standardowe parametry jakości nasienia kriokonserwowanego (ruchliwość, żywotność), wyrażone procentem wylęgu, zależą od wielu czynników, w tym od rodzaju zastosowanego krioprotektanta. Zagadnienie to badane już było u sterleta w oparciu m. in. o niewielką liczbę zidentyfikowanych białek w proteomie spermy u tego gatunku. Dlatego też zrozumienie mechanizmu kriouszkodzeń plemników następujących w procesie kriokonserwacji wymaga pogłębionej analizy składu białek zarówno w nasieniu jak i plazmie nasienia. Nie trzeba podkreślać jakie znaczenie mają

takie badania dla zachowania różnorodności genetycznej, programów restytucji i kontrolowanego rozrodu w hodowli ryb jesiotrowatych. Tak więc tematyka pracy doktorskiej Pani mgr Kodzik doskonale wpisuje się w proces kompleksowego poznawania zagadnień mających zarówno walor badań podstawowych: zrozumienie biochemicznych i fizjologicznych podstaw funkcjonowania układu rozrodczego jesiotrów u obu płci (proteom gamet, plazmy nasienia, płynu owaryjnego) oraz badań o znaczeniu aplikacyjnym w akwakulturze (doskonalenie metod krioprezervacji nasienia używanego w kontrolowanym rozrodzie).

Rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Kodzik przygotowana została na podstawie trzech oryginalnych prac naukowych, opublikowanych w 2023 i 2024 roku:

1. 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>.
2. 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. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10309-y>.
3. 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, 17707. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-68395-7>.

Warto podkreślić, że wszystkie prace składające się na cykl zostały opublikowane w renomowanych czasopismach indeksowanych w bazie JCR (sumaryczna wartość współczynnika IF tych prac to 11.7, a suma punktów MEiN wynosi 420). Czasopisma zostały dobrze dobrane pod względem profilu naukowego, a wymienione, wysokie wartości parametrów naukowych tych czasopism wskazują na to, że prace przeszły rzetelne recenzje dopuszczające je do publikacji. W mojej ocenie prezentują wysoką naukową wartość.

We wszystkich publikacjach składających się na cykl, będący podstawą rozprawy, Doktorantka jest pierwszym autorem. Zgodnie z Jej oświadczeniem miała istotny wkład w tworzenie tych publikacji, który wyraża się udziałem w pobieraniu materiału biologicznego do badań, jego przygotowaniem do analiz, cytometryczną analizą żywotności plemników,

koncentracji plemników, analizą integralności akrosomu, wykonaniem dwóch typów elektroforezy, identyfikacją białek przy zastosowaniu spektrometrii mas, wykonaniem analiz bioinformatycznych, współudziałem w interpretacji wyników, wizualizacji wyników, przygotowaniu manuskryptu pracy jak też uczestniczeniem w czynnościach prowadzących do opublikowania prac.

Biorąc pod uwagę wymóg oceny indywidualnego wkładu Doktorantki w powstanie publikacji, uwzględniając pisemne oświadczenia złożone przez wszystkich współautorów opublikowanych prac potwierdzające istotną rolę Doktorantki przy planowaniu, wykonywaniu i całościowym opracowaniu otrzymanych wyników badań oceniam, że indywidualny, twórczy wkład Pani mgr Natalii Kodzik w zakresie wykonanej pracy koncepcyjnej, eksperymentalnej i edytorskiej jest wystarczający do uznania Jej za autora przedłożonej rozprawy doktorskiej.

Układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Kodzik jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań. Recenzowana rozprawa doktorska (50 stron) składa się z wielu rozdziałów, z których początkowe (aż do rozdziału *Wstęp*) to: źródło finansowania badań (projekt badawczy NCN), streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, wykaz stosowanych skrótów, wreszcie zestawienie publikacji, które wchodzi w skład rozprawy doktorskiej. Zasadnicze rozdziały rozprawy to: *Wstęp, Hipoteza i cele badawcze, Spis zastosowanych metod, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie, Wnioski, Bibliografia* oraz kopie oryginalnych prac badawczych i publikacje wraz z oświadczeniami Autorów.

Tło naukowe przedstawione jest w rozdziale *Wstęp*. Na pierwszych 6. stronach tego rozdziału zaprezentowany jest badany gatunek, czyli jesiotr syberyjski, na tle podgromady ryb Chrzęstnokostnych (*Chondrostei*), z uwzględnieniem specyficznych cech biologii rozrodu tego gatunku (unikalne cechy budowy układu rozrodczego i dojrzewania gamet u obu płci oraz rozrodu). W kolejnych podrozdziałach scharakteryzowana jest plazma nasienia (pod względem składu, ciśnienia osmotycznego, zawartości składników mineralnych, enzymów), ikra (osłonki, mikropyle, rodzaj bruzdkowania) i płyn owaryjny (skład biochemiczny, zawartość jonów, stężenie białka, wpływ na ruchliwość plemników). Zarys stosowanych metod kriokonserwacji nasienia ryb jesiotrowatych przybliża stosowane krioprotektanty w nawiązaniu do uszkodzeń kriogenicznych występujących w warunkach zamrażania i rozmrażania nasienia.

W dalszej części rozdziału *Wstęp* Doktorantka definiuje proteomikę i wyjaśnia strategię analiz jakościowych stosowanych w celu uzyskania katalogu białek w badanej

próbie. Podrozdział ten ma charakter metodyczny, o skomplikowanej, szczegółowej treści, którą zobrazowano graficznie na załączonym rysunku nr 1. W kolejnych podrozdziałach Wstępu analizowana jest rola kompleksów białkowych, których funkcja w plazmie nasienia ryb nie jest dotychczas poznana. Autorka w dalszym ciągu rozdziału przedstawia dostępne, nieliczne dane literaturowe dotyczące analizy proteomicznej nasienia różnych gatunków jesiotrów i bardzo ograniczoną ilość badań odnośnie proteomu ikry i płynu owaryjnego jesiotrów. Ostatni podrozdział traktuje o wpływie kriokonserwacji na profil białkowy plemników kilku gatunków ryb (karpia, okonia morskiego, pstrąga tęczowego i sterleta). Danych na temat wpływu kriokonserwacji na białka plemników jesiota syberyjskiego w dostępnej literaturze brak.

Na tle przeglądu literatury Doktorantka przedstawiła trzy **hipotezy badawcze**, do zweryfikowania których sformułowała zadania badawcze, realizowane w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską.

1. charakterystyka profilu białkowego oraz kompleksów białkowych plazmy nasienia jesiota syberyjskiego (publikacja 1)
2. porównanie proteomu ikry i płynu owaryjnego jesiota syberyjskiego (publikacja 2)
3. analiza proteomiczna zmian w profilu białkowym nasienia jesiota syberyjskiego po konserwacji z użyciem metanolu i DMSO jako krioprotektantów (publikacja 3)

Rozdział **Spis zastosowanych metod** obejmuje zestawienie metod użytych w doświadczeniach, opisanych w każdej z trzech publikacji oraz schemat wszystkich doświadczeń przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej; przedstawiony został na rysunku 2. W tym miejscu podkreślić należy ogromną ilość technik, które opanowała Doktorantka. Są to najnowocześniejsze metody analizy proteomu stosowane w Zespole Biologii Gamet i Zarodka, które pozwalają na równoczesną analizę setek białek uczestniczących w różnych szlakach biochemicznych zachodzących w komórkach. Zastosowanie tych metod stworzyło ogromne możliwości, dobrze wykorzystane przez Doktorantkę, dla charakterystyki białek nasienia, plazmy nasienia, ikry i płynu owaryjnego jesiota syberyjskiego.

Rodział **Wyniki** - w każdej z publikacji stanowiących element cyklu omówione są oddzielnie. Białka zidentyfikowane w plazmie nasienia jesiota syberyjskiego, w ikrze i płynie owaryjnym zostały zdeponowane w bazie ProteomeXchange

Wnioski wypływające z wyników uzyskanych w poszczególnych publikacjach:

Publikacja 1: białka plazmy nasienia jesiotra syberyjskiego chronią plemniki i tkanki układu rozrodczego przed drobnoustrojami i stresem. W plazmie nasienia jesiotra zidentyfikowano 14 specyficznych białek związanych z funkcją układu immunologicznego, których istnienia nie wykazano dotychczas w plazmie nasienia innych gatunków ryb. Główne białka uczestniczą w metabolizmie lipidów, podtrzymują ruchliwość i żywotność plemników oraz wspomagają integrację błon. 70 zidentyfikowanych białek uczestniczy w spermatogenezie, zapłodnieniu i reakcji akrosomalnej plemników. Kompleksy białkowe w plazmie nasienia wspomagają funkcjonowanie nasienia.

Publikacja 2: białka ikry jesiotra syberyjskiego są ważne dla homeostazy i prawidłowego rozwoju zarodka. Białka w płynie owaryjnym uczestniczą w procesach odpornościowych, detoksykacji komórkowej, ochrony przed stresem oksydacyjnym, metabolizmie cholesterolu, regulują strukturę cytoszkieletu aktynowego, ważnego dla ochrony i rozwoju oocytów. Podobieństwo składu białek wykazane w płynie owaryjnym i plazmie nasienia wskazuje na to, że obydwa płyny pełnią zasadniczą rolę w ochronie i rozwoju gamet u obu płci.

Publikacja 3: kriokonserwacja nasienia jesiotra syberyjskiego oddziałuje negatywnie na ruchliwość, żywotność, integralność akrosomu i prowadzi do istotnych zmian w proteomie; zmiany w białkach wywołane stosowaniem DMSO jako krioprotektanta obniżają zdolność zapładniającą plemników, destabilizują genom i powodują zaburzenia we wczesnym etapie rozwoju zarodkowego.

Podsumowanie wyników uzyskanych przez Doktorantkę:

Badania opublikowane w ramach ocenianej pracy doktorskiej dostarczają nowych danych na temat biologii rozrodu jesiotrów. Doktorantka po raz pierwszy dokonała szczegółowej, pogłębionej charakterystyki proteomicznej białek układu rozrodczego jesiotra syberyjskiego. Połączenie dwóch komplementarnych strategii badań proteomicznych pozwoliło na zidentyfikowanie 665 białek w plazmie nasienia jesiotra syberyjskiego. 69 z nich jest związanych bezpośrednio z rozrodem: spermatogenezą, zapłodnieniem, reakcją akrosomalną, czy ruchliwością plemników. W płynie owaryjnym i ikrze jesiotrów wykrytych zostało odpowiednio 617 i 565 białek. W plazmie nasienia Doktorantka wykazała obecność czterech kompleksów białkowych, których funkcja nie jest jeszcze poznana.

Kompleksowe, zaawansowane badania proteomiczne prowadzone przez Doktorantkę mają duży potencjał aplikacyjny i mogą być wykorzystane zarówno do znalezienia markerów jakości nasienia jak też udoskonalenia metod jego przechowywania. Z wcześniej prowadzonych w Zespole Biologii Nasienia badań wynika, że w wyniku kriokonserwacji nasienia karpia następują uszkodzenia pewnych struktur plemników, a szlaki metaboliczne

ulegają zaburzeniom w czasie tego procesu. Tak więc zidentyfikowane białka potencjalnych markerów białkowych przydatności nasienia jesiotrów do mrożenia mogą służyć doskonaleniu technik jego kriokonserwacji. Również zmiany w proteomie zachodzące podczas starzenia się ikry pozwolą określić jej przydatności w kontrolowanym rozrodzie. Wyniki badań Pani mgr Kodzik pokazały, że stosowane dotąd standardowe parametry jakości nasienia nie są wystarczające do określenia zdolności zapładniającej kriokonserwowanych plemników, co daje nowe możliwości optymalizacji techniki ich zamrażania dzięki zastosowaniu badań proteomicznych. Doktorantka wykazała też, że metanol jest najskuteczniejszym krioprotektantem w procesie mrożenia nasienia, które to odkrycie ma duże znaczenie zarówno dla praktyki hodowlanej, ale także w pracach nad zachowaniem różnorodności genetycznej zagrożonych gatunków.

Na podkreślenie zasługuje znakomita strona graficzna opublikowanych prac, zilustrowanych merytorycznie, doskonałymi i czytelnymi schematami, rysunkami, tabelami, wykresami i diagramami, ułatwiającymi interpretację przedstawionych wyników. Doktorantka wykazała się także znajomością najnowszego piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań.

W trakcie lektury publikacji nie znalazłam elementów problematycznych. Prace mają jasno postawione cele, szczegółowo opisane i przedyskutowane wyniki. Ich wartość została potwierdzona przez recenzentów powołanych przez redakcje czasopism naukowych, w których się te prace ukazały. Z pełnym przekonaniem stwierdzam też, że przedstawiona do oceny praca doktorska, oparta na wspomnianych trzech publikacjach, prezentuje wysoki poziom naukowy, napisana jest przejrzysto, choć Doktorantka nie ustrzegła się kilku niezgrabnych, według mnie, sformułowań w tekście pracy, które nie mają żadnego wpływu na jej wartość, więc nie przytaczam ich brzmienia, a wspominam o nich tylko dla tzw. porządku.

W mojej opinii oceniana praca zasługuje na wyróżnienie. Badania Doktorantki zostały przeprowadzone na jesiotrze syberyjskim, gatunku istotnym dla środowiska i akwakultury. Badania proteomiczne doprowadziły do zidentyfikowania białek obecnych zarówno w gametach jak też i płynach otaczającego je środowiska (plazma nasienia, płyn owaryjny). Fakt, że dotyczą one obu płci ma niebagatelne znaczenie dla praktyki rybackiej. Efekt końcowy działań prowadzonych, czy to w celu zwiększenia produkcji danego gatunku w warunkach hodowli czy ochrony w warunkach zagrożenia bytu w środowisku naturalnym, to wypadkowa jakości nasienia i ikry, a jakość tychże zależy w dużym stopniu od środowiska zewnętrznego gamet (plazmy nasienia czy płynu owaryjnego). Dlatego kompleksowość badań

Doktorantki ma szczególne znaczenie dla zwiększenia wydajności zapłodnienia, jakości długookresowo przechowywanego nasienia, znalezienia potencjalnych markerów jakości gamet oraz przydatności nasienia do kriokonserwacji. Poznanie mechanizmu kriouszkodzeń plemników daje szansę opracowania skuteczniejszych metod kriokonserwacji plemników ryb jesiotrowatych, a najprawdopodobniej także innych gatunków, ważnych dla akwakultury. Poznanie składu białek występujących w plazmie nasienia stwarza też potencjalną możliwość diagnozowania zaburzeń w rozrodzie ryb. W przyszłych badaniach istotne będzie wyjaśnienie funkcji tych nowoodkrytych białek w rozrodzie jesiotrów.

Podsumowując swój wniosek o wyróżnienie pracy Pani magister Kodzik chciałabym zapytać o jej naukowe plany na najbliższą przyszłość!

Wniosek końcowy

Przedstawiona mi do oceny rozprawa Pani mgr Natalii Kodzik, zatytułowana „Proteom układu rozrodczego jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baerii*): charakterystyka profili białkowych plemników, plazmy nasienia, ikry i płynu owaryjnego oraz zmian w wyniku kriokonserwacji nasienia” spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim, o których mowa w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023r poz. 743 ze zm.), dlatego też wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Natalii Kodzik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na bardzo wysoką wartość merytoryczną rozprawy i oryginalność uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie pracy.

Kraków 27.11.2024


Prof. dr hab. Mirosława Sokołowska-Mikołajczyk