

Wrocław, 03.12.2024r.

Dr hab. Agnieszka Partyka
Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu



Ocena pracy 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”

Ryby z rodziny jesiotrowatych wyróżniają się wyjątkowymi cechami biologicznymi, które czynią je interesującym obiektem badań zarówno w kontekście ewolucyjnym, jak i praktycznym. Ze względu na swoją wartość w akwakulturze oraz kluczową rolę w utrzymaniu różnorodności biologicznej, gatunki te są przedmiotem intensywnych działań związanych z ochroną i reprodukcją. Współczesna biologia rozrodu ryb koncentruje się nie tylko na zrozumieniu fizjologii tych organizmów, ale także na zastosowaniu zaawansowanych metod analizy molekularnej, takich jak proteomika, w celu identyfikacji procesów warunkujących efektywne zapłodnienie i rozwój zarodków.

Postęp technologiczny umożliwia obecnie szczegółowe badanie składu molekularnego komórek rozrodczych i otaczających je środowisk, co ma istotne znaczenie zarówno dla biologii podstawowej, jak i zastosowań praktycznych, takich jak kriokonserwacja materiału genetycznego. Zrozumienie mechanizmów zachodzących na poziomie molekularnym jest szczególnie istotne w przypadku gatunków, których biologia rozrodu odbiega od modeli powszechnie stosowanych w badaniach naukowych.

W tym kontekście badania prowadzone przez Doktorantkę dotyczące charakterystyki proteomu plemników i ikry jesiotra syberyjskiego i otaczającego je środowiska oraz poznanie zmian proteomu plemników w wyniku kriokonserwacji nasienia trafiają w zapotrzebowanie współczesnej biologii i weterynarii. Autorka zbadała proteom gamet, plazmy nasienia, płynu owaryjnego i jego zmiany w celu zrozumienia biochemicznych i fizjologicznych podstaw funkcjonowania układu rozrodczego jesiotrów oraz poznania mechanizmów kriouszkodzeń plemników w zależności od zastosowanego krioprotektanta.

Podstawą formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej mgr Natalii Kodzik jest uchwała Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie z dnia 17 października 2024 roku.

Przedstawiona rozprawa doktorska liczy 50 stron opisu badań z piśmiennictwem, bez kopii opublikowanych prac stanowiących cykl przedłożony do oceny, i oświadczeń wszystkich autorów niniejszych prac. Rozprawa została zrealizowana pod kierunkiem dr hab. Marioli A. Dietrich, prof. Instytutu. Badania wykonano w ramach projektu badawczego nr 2019/35/B/NZ9/03501 finansowanego z Narodowego Centrum Nauki.

Praca składa się ze spisu treści, streszczenia w języku polskim i języku angielskim, wykazu skrótów, zestawienia danych bibliograficznych publikacji, na podstawie których opracowano rozprawę, wstępu, hipotezy i celu badań, spisu zastosowanych metod, wyników, dyskusji, podsumowania, wniosków i bibliografii. W dalszej kolejności umieszczono kopie całościowe opublikowanych prac oraz oświadczenia dotyczące udziału autorów w ich przygotowanie. Z uwagi, że są to nieodłączne części rozprawy doktorskiej, rekomendowałabym aby ich strony były również ponumerowane.

Na rozprawę doktorską składają się trzy oryginalne prace opublikowane w renomowanych czasopismach z listy JCR: *Aquaculture*, *BMC Genomics* oraz *Scientific Reports*. Łączny IF prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej to 11,7 i 420 punktów MEiN. Prace zostały opublikowane w roku 2023 oraz 2024 zespołowo. Doktorantka jest w nich pierwszym autorem, a jej udział był wiodący i pierwszoplanowy. Prace są spójne tematycznie i dotyczą tego samego zagadnienia.

Doktorantka w streszczeniu napisanym zarówno w języku polskim jak i angielskim przedstawiła syntetycznie i bardzo jasno uzyskane w doświadczeniach wyniki.

W dziesięciostronicowym wstępie Doktorantka scharakteryzowała gatunek na którym pracowała i podkreśliła konieczność prac nad rozrodem jesiotra syberyjskiego. Na początku skupiła się na specyfice biologii rozrodu ryb jesiotrowatych, opisując charakterystykę plazmy nasienia jesiotra, następnie ikry i płynu owaryjnego, a także podjęła temat dotyczący kriokonserwacji nasienia ryb jesiotrowatych. Dodatkowo Autorka przedstawiła proteomiczne podejście w badaniach białek, ilustrując dwie strategie badań w postaci graficznego schematu. Skupiła się także na opisie badań proteomicznych plazmy nasienia różnych zwierząt, a także płynu owaryjnego i ikry ryb i podkreśliła lukę w istniejącej wiedzy dotyczącej tego zagadnienia u ryb jesiotrowatych. Ciekawym i nie do końca poznanym zagadnieniem, na które zwraca uwagę Autorka dysertacji jest także zmiana w składzie białek podczas kriokonserwacji nasienia ryb.

W tej części opracowania Autorka wykazuje się bardzo dobrą znajomością tematu, porusza się bardzo swobodnie w zagadnieniach dotyczących biologii rozrodu i potwierdza bardzo dobrą znajomość piśmiennictwa.

W dalszej kolejności Doktorantka zawarła trzy hipotezy badawcze oraz trzy zadania badawcze, które bezpośrednio odpowiadały każdej publikacji.

Zabrakło mi w tej części jasno zdefiniowanego celu badawczego, który był w dalszej kolejności określony jako „zamierzony cel badawczy”. Czytający pracę może mieć wątpliwości czy chodzi o charakterystykę białek układu rozrodczego ryb jesiotrowatych w tym plemników, plazmy nasienia, ikry i płynu owaryjnego, czy zrozumienie biochemicznych i fizjologicznych podstaw funkcjonowania układu rozrodczego u tych ryb i zrozumienia ich wzajemnych interakcji podczas zapłodnienia, które również było sformułowane jako cel.

W rozdziale „Spis zastosowanych metod” bardzo zwięźle i klarownie Doktorantka wypisała zastosowaną w każdym doświadczeniu, czyli w każdej publikacji metodę, nie zwiększając bez potrzeby objętości tej części rozprawy doktorskiej. To co mogłoby się jednak w tym rozdziale pojawić to potwierdzenie otrzymania stosownych opinii/zgód Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach.

Dobór metod oceny materiału należy uznać za trafny, a liczba i wszechstronność badań i analiz proteomicznych oraz zastosowanie czułych i zaawansowanych metod jest imponująca. Opanowanie takiego warsztatu metodycznego jest godne podkreślenia i pochwały.

Omówienie wyników badań Autorka podzieliła na trzy działy, skupiające się na trzech artykułach. W tym rozdziale Doktorantka syntetycznie i zwięźle wyjaśniła uzyskane rezultaty.

W pierwszym artykule Doktorantka zidentyfikowała 665 białek w plazmie nasienia jesiotra syberyjskiego za pomocą dwóch strategii identyfikacji białek, co stanowi największy katalog białek plazmy nasienia ryb jesiotrowatych. Zbiór ten został zdeponowany w bazie ProteomeXchange, co znacząco zwiększa ich dostępność dla społeczności naukowej i podkreśla wartość uzyskanych danych. Ten krok świadczy o wysokim poziomie prowadzonych badań przez Doktorantkę oraz ich zgodności z zasadami otwartej nauki. Ponadto w omawianej pierwszej pracy Autorka przeprowadziła analizę funkcjonalną zidentyfikowanych białek przy użyciu programów IPA oraz ShinyGo, wykazując, że białka plazmy nasienia odgrywają kluczową rolę w odpowiedzi ostrej fazy, koagulacji, glikolizy i glukoneogenezy oraz w regulacji metabolizmu lipidów. Dodatkowo zidentyfikowane białka związane były z ruchem komórkowym, apoptozą, syntezą i degradacją białek oraz sygnalizacją

i interakcją międzykomórkową. Analiza według kryterium „procesy biologiczne” ujawniła dominujący udział białek plazmy nasienia w odpowiedzi immunologicznej, reakcji na stres oraz procesach katabolicznych. Stwierdzono także ich zaangażowanie w procesy rozrodcze, takie jak spermatogeneza, zapłodnienie, reakcja akrosomalna, wiązanie z osłonką jajową oraz ruchliwość plemników. Doktorantka również podjęła się analizy porównawczej proteomu plazmy nasienia jesiota syberyjskiego z człowiekiem oraz trzema gatunkami ryb, tj. czawyczą, sandaczem oraz pstrągiem tęczowym, która wykazała białka zarówno wspólne jak i specyficzne gatunkowo.

Drugi artykuł pokazuje różnice w proteomie ikry i płynu owaryjnego. Autorka zidentyfikowała 287 białek specyficznych dla ikry, a 339 białek unikalnych dla płynu owaryjnego jesiota syberyjskiego. Łącznie zidentyfikowała za pomocą spektrometrii mas LC-MS/MS 565 białek w ikrze oraz 617 białek w płynie owaryjnym. Funkcjonalna analiza tych białek ujawniła ich zróżnicowane role biologiczne. Białka charakterystyczne dla płynu owaryjnego były powiązane z egzocytozą, odpowiedzią immunologiczną, regulacją cytoszkieletu aktynowego i metabolizmem cholesterolu. Z kolei białka unikalne dla ikry uczestniczyły w procesach metabolicznych, takich jak fosforylacja oksydacyjna i metabolizm kwasów tłuszczowych, a także ubikwitynacja i translacja białek. Dodatkowo stwierdzono, że białka ikry i płynu owaryjnego uczestniczą w kluczowych procesach rozrodczych, takich jak zapłodnienie, dojrzewanie oocytów oraz mechanizmy zapobiegania polispermii.

W tej pracy Doktorantka podjęła się także walidacji otrzymanych wyników analizą Western blot dla wybranych białek, która potwierdziła prawidłowość wyników uzyskanych przez LC-MS/MS. Podobnie, jak w pierwszej pracy, także katalog białek występujących w ikrze i płynie owaryjnym jesiota syberyjskiego został zdeponowany w bazie ProteomeXchange.

Bardzo ważnym aspektem, wspomnianym na początku, który nie został do tej pory dobrze poznany, a którym zajęła się mgr Kodzik w trzeciej publikacji, było zbadanie zmian w składzie białkowym plemników oraz płynu zewnątrzkomórkowego jesiota syberyjskiego, zachodzących podczas procesu kriokonserwacji nasienia. Doktorantka zbadała proteom nasienia jesiota kriokonserwowanego z krioprotektantami: metanolem (MeOH) lub dimetylosulfotlenkiem (DMSO). W tej publikacji mgr Kodzik prezentuje nie tylko umiejętność przeprowadzania badań proteomicznych, ale także oceny nasienia, a w tym ruchliwości plemników z wykorzystaniem komputerowo wspomaganego analizatora CASA (CEROS II), koncentracji i żywotności plemników, płynności ich błon komórkowych (moim zdaniem oceniła również apoptozę w plemniach wykorzystując barwnik YO-PRO-1) i stresu

oksydacyjnego plemników za pomocą cytometru przepływowego, oraz integralności akrosomu pod mikroskopem fluorescencyjnym. Doktorantka sprawdziła dodatkowo zdolność zapładniającą plemników *in vivo*, przeprowadzając procedurę zapłodnienia.

Kriokonserwacja nasienia jesiota syberyjskiego z użyciem DMSO w dużym stopniu wpłynęła na zmiany w poziomie białek akrosomalnych oraz białek kluczowych dla rozpoznania i wiązania plemnika do komórki jajowej. Zastosowanie tego krioprotektanta spowodowało także zmiany nukleoporyn, odpowiedzialnych za upakowanie chromatyny w trakcie spermatogenezy, biogenezie witki i wydłużaniu jądra komórkowego. Zmieniły się również białka odpowiedzialne za strukturę witki i centrosomu, co z kolei prowadzi do zaburzenia procesu zapłodnienia, stabilizacji genomu, naruszenia integralności witki, metabolizmu i wczesnego rozwoju zarodkowego. Z kolei drugi krioprotektant, metanol, wykazał specyficzny wpływ na białka związane z funkcjonalnością mitochondriów, w tym te zaangażowane w produkcję energii oraz strukturę witki. Zauważono również zmiany w białkach uczestniczących w metabolizmie lipidów oraz odpowiedzi na stres oksydacyjny, co może wyjaśniać zwiększoną podatność plemników na uszkodzenia podczas kriokonserwacji. Doktorantka zaobserwowała także zmiany w białkach związanych z aksonemą plemników, co może tłumaczyć obniżoną ruchliwość plemników po procesie mrożenia. Podsumowując, mimo że oba krioprotektanty wpływają na strukturę i funkcjonalność plemników, metanol okazał się bardziej efektywny, powodując mniej istotne zaburzenia kluczowych procesów, co czyni go lepszym wyborem w kriokonserwacji nasienia jesiota syberyjskiego.

Rozdział „Dyskusja”, zawiera interpretację uzyskanych wyników i pokazuje, że Doktorantka jest bardzo dobrze zorientowana w omawianej problematyce. W mojej ocenie wykorzystwała najważniejsze prace istotne dla analizy przeprowadzonych badań. Dużym wyzwaniem tej części rozprawy była mnogość uzyskanych wyników. Autorka zdecydowała się na podzielenie dyskusji na podrozdziały odpowiadające wynikom, co należy uznać za korzystne. Dodatkowo, po dyskusji rezultatów, Doktorantka wskazuje ciekawe dalsze kierunki badań w omawianej tematyce. Wskazuje to na dużą dojrzałość naukową Pani magister oraz umiejętność formułowania istotnych pytań badawczych, co świadczy o jej zdolności do krytycznej analizy wyników i planowania przyszłych projektów naukowych. Następnie, w oparciu o wyniki badań sformułowała: 4 wnioski do zadania badawczego nr 1; 3 wnioski do zadania badawczego nr 2 oraz 4 wnioski do zadania badawczego nr 3.

Opis prac stanowiących rozprawę doktorską uzupełniony został o 102 pozycje piśmiennictwa. W dalszej kolejności Autorka przedstawia kopie publikacji stanowiących rozprawę oraz oświadczenia współautorów wyrażających zgodę na wykorzystanie publikacji

do rozprawy doktorskiej Pani Natalii Kodzik. Z niniejszych oświadczeń wynika, że udział Doktorantki w przygotowaniu prac był kluczowy, bowiem dotyczył opracowania koncepcji badań, wykonywania badań laboratoryjnych, analizy i interpretacji wyników, napisania/współudziału w pisaniu manuskryptu. Obrazuje to umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej Doktorantki.

Do szczególnych zalet przedłożonej pracy doktorskiej należy zaliczyć kilka istotnych aspektów, które wyróżniają ją na tle innych rozpraw naukowych w tej dziedzinie.

Na szczególne uznanie zasługuje fakt, że główne wyniki badań zostały opublikowane w formie trzech wysokiej jakości publikacji naukowych. Wszystkie artykuły wchodzące w skład cyklu pracy ukazały się w prestiżowych czasopismach znajdujących się na liście Journal Citation Reports (JCR) i charakteryzujących się wysokimi wskaźnikami impact factor, co potwierdza znaczenie i wartość naukową przedstawionych wyników.

Praca opiera się na zastosowaniu zaawansowanej i nowoczesnej metodyki badań proteomicznych, która w wielu przypadkach została wykorzystana po raz pierwszy w kontekście badania specyfiki biologii jesiotrów. Wybór tak nowatorskiego podejścia metodologicznego świadczy o dużej biegłości doktorantki w stosowaniu zaawansowanych narzędzi badawczych i umiejętności ich adaptacji do specyficznych celów badawczych.

Przedstawione wyniki wnoszą oryginalny wkład w rozwój reprezentowanej dziedziny wiedzy. Praca doktorska, dzięki swoim odkryciom i szczegółowej analizie, stanowi nowatorski element w badaniach z zakresu biologii rozrodu ryb. Wnioski wynikające z rozprawy nie tylko poszerzają dotychczasową wiedzę, lecz także otwierają nowe kierunki badań oraz możliwości zastosowania jej wyników w praktyce, co czyni ją istotnym osiągnięciem na polu naukowym.

Na podkreślenie zasługuje pracowitość Doktorantki oraz opanowanie przez nią tak dużego warsztatu naukowego. Z kolei, wspomniane przeze mnie wcześniej uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, a mają jedynie charakter porządkowy.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Natalii Kodzik odpowiada w pełni wymogom stawianym dysertacjom na stopień naukowy doktora, określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.) i opiniuję ją pozytywnie.

W oparciu o powyższą ocenę przedkładam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie o dopuszczenie mgr Natalii Kodzik do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Jednocześnie uwzględniając wysoką jakość przeprowadzonych badań, ogrom pracy włożonej przez

Doktorantkę w powstanie dysertacji, przydatność uzyskanych wyników zarówno w celach poznawczych jak i praktycznych, składam wniosek o wyróżnienie wymienionej pracy.

Dr hab. Agnieszka Partyka, prof. UPWr

Agnieszka Partyka