



Dr hab. Izabela Jędrzejowska
Zakład Biologii Rozwoju Zwierząt
Instytut Biologii Eksperymentalnej
Uniwersytet Wrocławski
ul. Sienkiewicza 21
50-335 Wrocław

Wrocław, 8. 03. 2021 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej magister Natalii Jarosz
pt. "Organizacja i funkcjonowanie męskich zespołów komórek płciowych podczas
spermatogenezy pijawek lekarskich z rodzaju *Hirudo* (Annelida, Clitellata)"
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Świątka
na Wydziale Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach**

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Jarosz wpisuje się w nurt badań nad strukturą gonad oraz przebiegiem gametogenezy zwierząt bezkręgowych. Badania te prowadzone były pod opieką doświadczonego w tej tematyce badawczej promotora Pana Profesora Piotra Świątka. Zasadniczym celem przedstawionej do oceny pracy doktorskiej było zweryfikowanie i uzupełnienie wiedzy na temat spermatogenezy pijawek lekarskich z rodzaju *Hirudo*.

Ocena merytoryczna

- Znaczenie problematyki podjętej w recenzowanej rozprawie*
Podjęta przez Doktorantkę problematyka badawcza jest bardzo istotna nie tylko z perspektywy poznania biologii rozwoju zwierząt, w tym zespołów komórek płciowych, lecz także z powodu częstego wykorzystywania cech struktury gonady do analiz filogenetycznych. Prace zawierające wyniki badań z obszaru *evo-devo* publikowane są w czasopismach z dobrym i bardzo dobrym wskaźnikiem cytowań. Pijawki lekarskie to grupa zwierząt bezkręgowych, które pod kątem przebiegu spermatogenezy są słabo poznane. Z powyższych względów uważam wybór tematu pracy oraz materiału do badań za uzasadnione.
- Zastosowana metodyka badawcza (założenia, cele, hipotezy, metody)*
W rozdziale zatytułowanym „Cele i metodyka badań” recenzowanej dysertacji doktorskiej (strona 20) przedstawiono cel główny rozprawy: którym jest zweryfikowanie i uzupełnienie wiedzy na temat spermatogenezy pijawek lekarskich z rodzaju *Hirudo* oraz 4 cele szczegółowe:
 - Poznanie, analiza i porównanie przebiegu procesu spermatogenezy pijawek lekarskich z rodzaju *Hirudo*.
 - Charakterystyka organizacji zespołów komórek płciowych na poszczególnych etapach spermatogenezy.
 - Analiza organizacji cytoszkieletu mikrotubularnego i F-aktynowego w męskich zespołach komórek płciowych.

4. Analiza rozmieszczenia, konformacji i aktywności mitochondriów w męskich zespołach komórek płciowych na poszczególnych etapach procesu spermatogenezy.

Cel główny i cele szczegółowe są jasno sprecyzowane i adekwatne do tytułu pracy. Niedosyt budzi brak pytań czy też hipotez badawczych, chociaż w celu ogólnym „zweryfikowanie i uzupełnienie wiedzy na temat spermatogenezy pijawek lekarskich z rodzaju *Hirudo*” pojawia się w domyśle pytanie o „poprawność” wyników badań wcześniej uzyskanych. Celem uzupełnienia życzyłabym sobie podczas publicznej obrony usłyszeć od Doktorantki pytania badawcze, na które uzyskała odpowiedzi prowadząc swoje badania.

Do realizacji wyżej wymienionych celów Doktorantka zaplanowała wykorzystanie szeregu metod i narzędzi takich jak: mikroskopia świetlna, skaningowa i transmisyjna mikroskopia elektronowa, seryjna mikroskopia skaningowa powierzchni błočka (SBEM) i rekonstrukcje trójwymiarowe, mikroskopia fluorescencyjna i konfokalna, badania molekularne (DNA barcoding) oraz analiza statystyczna wykorzystana do oszacowania liczby aktywnych i nieaktywnych mitochondriów. Wybór metod badawczych należy uznać za trafny i umożliwiający osiągnięcie zaplanowanych celów.

3. *Ocena poprawności struktury rozprawy (kolejność rozdziałów, proporcje między poszczególnymi rozdziałami), język i formalna strona rozprawy*

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska ma formę manuskryptu, który liczy łącznie 87 stron numerowanych, na których zamieszczono 7 tabel oraz 7 wykresów. W II części pracy zatytułowanej TABLICE znajduje się 25 rycin. Doktorantka załączyła płytę CD z cyfrowym zapisem tekstu manuskryptu oraz dokumentacji fotograficznej dodatkowo zawierającej 10 animacji. Tekst rozprawy zawiera typowe dla pracy naukowej rozdziały: Wstęp, Wyniki, Dyskusję, Podsumowanie, Streszczenie w języku polskim i angielskim oraz Literaturę. Dość nietypowy dla układu rozprawy doktorskiej jest rozdział drugi zatytułowany „Cele i metodyka badań”, w którym zawarty jest cel pracy, materiał do badań oraz metody. Zazwyczaj cel pracy umieszcza się na końcu wstępu lub w osobnym rozdziale, a materiał i metody stanowią część oddzielną tekstu.

Proporcje między poszczególnymi rozdziałami są właściwe.

Praca napisana jest w sposób klarowny i świadczący o opanowaniu techniki pisania prac naukowych. Błędy edytorskie lub interpunkcyjne są znikome. Te ostatnie znalazłam głównie w spisie literatury, który przygotowany jest dość starannie lecz w niejednorodnym stylu. Na przykład Autorka niekonsekwentnie stosuje rozszerzone (np. pozycja 29, 53) lub skrócone (np. w pozycji 109, 147, 151) nazwy czasopism. W spisie literatury nie znalazłam cytowanej na stronie 10 manuskryptu pracy „Tworzydło i in. 2014”.

4. *Szczegółowa charakterystyka i ocena poszczególnych części rozprawy*

We WSTĘPIE ilustrowanym 6 rycinami Autorka przedstawiła ogólną systematykę pijawek, taksonomię pijawek lekarskich, przytaczając między innymi dane świadczące o monofiletyczności rodzaju *Hirudo* oraz koncepcje na temat pokrewieństwa gatunków pijawek z rodzaju *Hirudo*. W dalszej części Wstępu Doktorantka opisała przebieg gametogenezy, słusznie koncentrując się na spermatogenezie i przedstawiając w zwięzły sposób literaturę dotyczącą spermatogenezy i struktury plemników pijawek lekarskich. Autorka przedstawiła także sposób powstawania zespołów komórek płciowych, struktury i funkcji mostków międzykomórkowych łączących komórki płciowe w zespoły oraz różnorodną architekturę zespołów komórek

płciowych zarówno zwierząt bezkręgowych jak i kręgowych, w tym ssaków. Podrozdział „Cytoszkieleł” zawiera podstawowe informacje o cytoszkielecie aktywnym i mikrotubularnym oraz ich roli w spermatogenezie. Dla jasności nazwałabym ten podrozdział mniej ogólnie np. „Cytoszkieleł aktywny i mikrotubularny w spermatogenezie”. Ostatni z podrozdziałów „Konformacja mitochondriów i ich aktywność” prezentuje informacje o aktualnym stanie wiedzy na temat roli i aktywności mitochondriów.

Podsumowując: Wstęp dysertacji dobrze wprowadza czytelnika w tematykę pracy.

Rozdział 2 „CELE I METODYKA BADAŃ” obejmuje Cele badań oraz Materiał do badań i metody. Z tej części pracy czytelnik dowiaduje się, że do badań wykorzystano 4 z 6 gatunków pijawek z rodzaju *Hirudo*: 3 gatunki europejskie i jeden gatunek pijawki japońskiej. W Tabeli I (strona 22) w sposób przejrzysty przedstawiono zastosowane metody badawcze dla poszczególnych gatunków pijawek z podaną liczbą osobników wykorzystanych do analiz. Opis zastosowanych technik badawczych jest poprawny, umożliwiający powtórzenie wykonanych analiz i uzyskanie porównywalnych wyników. Na uwagę zasługuje zilustrowanie za pomocą 3 rycin (Ryc. 7-9) techniki seryjnej mikroskopii skaningowej powierzchni błoczka (SBEM) i rekonstrukcji trójwymiarowych.

W rozdziale 2 pominięty został opis analizy preparatów całościowych w mikroskopii stereoskopowej, których wyniki w postaci dokumentacji fotograficznej przedstawiono na rycinach 11B i 12.

WYNIKI Doktorantka zdecydowała się zaprezentować pod kątem zastosowanych metod badawczych. Taki sposób omawiania wyników wprowadza do tekstu dużą przejrzystość i ułatwia czytelnikowi analizę kolejnych 16 rycin (Ryciny 10-25) oraz 10 animacji.

Na podkreślenie zasługuje wysokiej jakości starannie wyselekcjonowana dokumentacja fotograficzna szczególnie z TEM, mikroskopii konfokalnej i trójwymiarowej rekonstrukcji. Przy tak wielokomórkowych zespołach uzyskanie odpowiednich obrazów wymagało od Doktorantki ogromnej pracy, staranności i cierpliwości.

W WYNIKACH Pani mgr Natalia Jarosz opisała rezultaty badań molekularnych weryfikujące przynależność gatunkową badanych pijawek, organizację układu rozrodczego, organizację męskich zespołów komórek płciowych, liczbę komórek w tych, zespołach, ultrastrukturę kolejnych pokoleń męskich komórek płciowych, średnicę i długość mostków międzykomórkowych, cytoszkieleł aktywny, mikrotubularny oraz rozmieszczenie i aktywność mitochondriów realizując tym samym wyznaczone cele. Sposób prezentacji wyników jest zwięzły i przejrzysty, bez zbędnych powtórzeń.

DYSKUSJA jest wielowątkowa i obejmuje zagadnienia związane bezpośrednio z tematem recenzowanej rozprawy. Sposób prowadzenia dyskusji jest dojrzały.

W niektórych miejscach niedosyt budzi brak konkluzji lub własnych interpretacji Autorki. Na przykład Doktorantka kilkakrotnie podkreśla fakt, że w żadnym z przebadanych gatunków pijawek podobnie do innych siodełkowców nie zaobserwowano komórek somatycznych otaczających męskie komórki płciowe. Otwarta pozostaje kwestia interpretacji tych wyników, biorąc pod uwagę, co Autorka podkreśla w Dyskusji, że taka sytuacja jest unikatowa w świecie zwierząt. Prosiłabym Doktorantkę o tę interpretację podczas publicznej obrony. Chciałabym też zadać Doktorantce 2 pytania:

1. Jak jest rola transferu mitochondriów przez mostki międzykomórkowe pomiędzy komórkami a cytoforem.
2. wyjaśnienie zmiany pozycji aparatu Golgiego w spermatydach wydłużających się.

PODSUMOWANIE uzyskanych przez Doktorantkę wyników zostało przedstawione w postaci 7 poprawnie sformułowanych wniosków.

Spis LITERATURY obejmuje 161 pozycji. Dobór cytowanych prac jest właściwy i adekwatny do omawianych zagadnień, przemawiający za dobrą znajomością tematu.

Rozprawę doktorską Pani mgr Natalii Jarosz oceniam bardzo wysoko. Doktorantka zaplanowała i przeprowadziła eksperymenty przy użyciu różnorodnych i dobrze dobranych technik badawczych. Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na uzyskanie nowych danych, które w sposób kompleksowy opisują strukturę męskich zespołów płciowych podczas spermatogenezy pijawek z rodzaju *Hirudo*.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej należy:

1. Wykazanie, że spermatogeneza u badanych gatunków pijawek ma taki sam przebieg
2. Wykazanie jednakowej struktury zespołów komórek płciowych badanych gatunków pijawek lekarskich
3. Określenie finalnej liczby komórek w zespołach u 3 gatunków europejskich pijawek lekarskich
4. Zaplanowanie i wykonanie analizy rozmieszczenia mitochondriów w męskich zespołach komórek płciowych pijawek lekarskich z wykorzystaniem seryjnej mikroskopii skaningowej powierzchni boczka i rekonstrukcji trójwymiarowych. Efektem tej analizy jest wykazanie między innymi obecności sieci mitochondrialnych w cytoplazmie spermatogoniów i spermatocytów.
5. Wykazanie zmiennej aktywności energetycznej mitochondriów podczas kolejnych etapów spermatogenezy.
6. Opisanie zmian w strukturze cytoszkieletu aktynowego i mikrotubularnego zespołów komórek płciowych podczas kolejnych stadiów spermatogenezy pijawek lekarskich.

Uwagi krytyczne

1. W WYNIKACH Podrozdział 3.3. MIKROSKOPIA ŚWIETLNA Doktorantka klasyfikuje kolejne generacje męskich komórek płciowych między innymi w oparciu o liczbę i pozycję mitochondriów oraz obecność i pozycję akrosomu. Na rycinach 13 i 14 bardzo dobrze widoczne są regiony, w których występują struktury komórkowe, natomiast z poziomu mikroskopu świetlnego trudno je zidentyfikować. Rozumiem, że zastosowane do klasyfikacji komórek kryteria znajdują uzasadnienie w identyfikacji organelli z poziomu innych technik np. TEM. Dlatego też sugerowałabym raczej klasyfikację komórek w oparciu o więcej niż jedną z wykorzystywanych metod.-
2. Str. 32 Stwierdzenie „Komórki płciowe obserwowane w obrębie jąder nie występują indywidualnie tylko tworzą zespoły...” jest niespójne ze zdaniem widniejącym na stronie 33 „Komórki płciowe są połączone w zespoły do stadium wydłużonych spermatyd, kiedy to późne spermatydy tracą połączenie z cytoforem i dojrzałe plemniki nie tworzą już zespołów komórek płciowych i często występują w pakietach.” Zakładam, że niespójność ta jest klasycznym przykładem skrótu myślowego.
3. Str. 40 Doktorantka omawiając lokalizację cytoszkieletu aktynowego wskazuje na rycinę 21 E-H, podczas, gdy Rycina 21 w załączonej dokumentacji kończy się na zdjęciu F.
4. Str. 64 w tej części pracy pojawia się niespójność. Doktorantka stwierdza, że „Analiza konformacji mitochondriów pozwoliła m. in. odpowiedzieć na istotne pytanie: W jaki

sposób powstaje pojedyncze mitochondrium, które docelowo lokuje się we wstawce plemników pijawek?” A w poniższym akapicie kontynuuje „Na podstawie niniejszych badań nie udało się w pełni odpowiedzieć na postawione pytanie.”

Recenzowana rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego jakim jest organizacja i funkcjonowania męskich zespołów płciowych podczas spermatogenezy pijawek lekarskich z rodzaju *Hirudo*. Ponadto, wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie nauk biologicznych oraz potwierdza umiejętność Doktorantki w zakresie samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, w tym opanowanie odpowiedniego warsztatu metodologicznego.

Reasumując stwierdzam, że **recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Jarosz pt. „Organizacja i funkcjonowanie męskich zespołów komórek płciowych podczas spermatogenezy pijawek lekarskich z rodzaju *Hirudo* (Annelida, Clitellata)”** w pełni odpowiada warunkom Ustawy o stopniach i tytule naukowym określone w artykule 13. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789) w związku z artykułem 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.- Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669) i wnioskuję do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Natalii Jarosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Doceniając wysoki poziom pracy wnoszę również o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Wrocław, 8.032021 r.

dr hab. Izabela Jędrzejowska

