

Recenzja

**rozprawy doktorskiej mgr Natalii Jarosz pt.: „Organizacja i funkcjonowanie męskich zespołów komórek płciowych podczas spermatogenezy pijawek lekarskich z rodzaju *Hirudo* (Annelida, Clitellata)”
wykonanej pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Piotra Świątka**

Zainteresowanie pijawkami lekarskimi w ostatnich latach wzrosło z uwagi na wykorzystywanie ich w hirudoterapii, która powróciła do praktyk lekarskich. Pijawki są także bardzo interesującym obiektem badań taksonomicznych dotyczących cech morfologicznych, genetycznych oraz biologii poszczególnych taksonów, a ich klasyfikacja ciągle jest weryfikowana. W mojej opinii tematyka pracy ocenianej rozprawy doktorskiej traktująca o procesie spermatogenezy pijawek z czterech gatunków rodzaju *Hirudo*, a mianowicie *H. verbana*, *H. orientalis* i *H. nipponia*, bardzo dobrze wpisuje się w nurt tych nowoczesnych badań. Ponadto, nadmierna eksploatacja dzikich populacji *H. medicinalis* w Europie doprowadziła do zmniejszenia ich liczebności. W Polsce, gatunek ten objęty jest ochroną częściową, a w polskiej czerwonej księdze zwierząt, został zaliczony do gatunków wysokiego ryzyka, narażonych na wyginięcie. Pozostałe trzy gatunki pijawek lekarskich, których dotyczą badania, nie występują naturalnie w Polsce, są dostępne z hodowli prowadzonych głównie w celach terapeutycznych.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera 87 stron, 34 strony tablic zawierających 25 rycin oraz 10 animacji nagranych na płycie CD przedstawiających ryciny 24 i 25. Rozprawa doktorska mgr Natalii Jarosz ma układ właściwy pracom naukowym i zawiera rozdziały takie jak: wstęp, cele i metodykę badań, wyniki, dyskusję, podsumowanie z wnioskami, streszczenie w języku polskim i angielskim, literaturę oraz tablice z rycinami.

Pracę doktorską rozpoczyna *Wstęp*, składający się z sześciu podrozdziałów, w którym Autorka wnikliwie analizuje problemy badawcze dotyczące systematyki i filogenezy pijawek, w tym pijawek lekarskich z rodzaju *Hirudo*. Dowiadujemy się o krótkiej historii badań taksonomicznych pijawek lekarskich, o zależnościach filogenetycznych badanych gatunków oraz o metodach, które dotychczas stosowano w klasyfikacji pijawek. Następnie wprowadza do

procesu gametogenezy u pierścienic, charakteryzując szczególnie etapy związane z tworzeniem się zespołów komórek płciowych, ich rodzaje i strukturę oraz rolę cytoszkieletu i mitochondriów podczas spermatogenezy. *Wstęp* napisany jest w sposób jasny, zrozumiałym i zwięzłym językiem.

Cele pracy obejmowały zweryfikowanie i uzupełnienie wiedzy na temat spermatogenezy pijawek lekarskich z rodzaju *Hirudo*, ze szczególnym uwzględnieniem organizacji cytoszkieletu aktywnego i mikrotubularnego oraz przestrzennej organizacji i aktywności mitochondriów. Przedstawione zostały w sposób klarowny co ułatwia śledzenie czytającemu części badawczej. Trochę zaskakujące jest, że *Cele pracy* zostały włączone do rozdziału *Metodyka badań* a nie, jak zazwyczaj, do *Wstępu*.

W podrozdziale *Material do badań i metody* Autorka opisała sposób pozyskania czterech gatunków pijawek lekarskich do badań. W Tabeli 1 w sposób bardzo czytelny zaprezentowała zastosowane metody i liczbę badanych osobników. Następnie zwięźle ale z uwzględnieniem wszystkich szczegółów pozwalających na zrozumienie i powtórzenie przeprowadzonych zadań badawczych opisała zastosowane metody mikroskopowe i molekularne. W celu identyfikacji gatunkowej, pijawki poddano badaniom molekularnym (barcoding DNA, z zastosowaniem sekwencji mitochondrialnej oksydazy cytochromowej COI). Proces spermatogenezy opisano stosując mikroskopię świetlną i fluorescencyjną oraz transmisyjną i skaningową mikroskopię elektronową. Poza tym zastosowano metodę SBEM (seryjna mikroskopia skaningowa powierzchni boczka) oraz rekonstrukcje trójwymiarowe komórek płciowych. Zadziwiająco w metodach dotyczących analiz mikroskopowych Autorka nie zacytowała żadnej pracy, co należy rozumieć, że metody są jej własnymi. Wydaje mi się jednak, że zostały wypracowane przez zespół Pana prof. Świątka, który z powodzeniem je stosuje i opisuje w wielu swoich znakomitych publikacjach. Poza tym w rozdziale 2.2.4.1.1 *Analiza statystyczna* (strona 27), pierwszy akapit, według mnie, nie dotyczy badań statystycznych tylko sposobu zliczania mitochondriów aktywnych i nieaktywnych przy pomocy wybranych programów (ImageJ i Imaris). W mojej opinii przedstawiony opis sposobu liczenia mitochondriów przy pomocy wymienionych programów nie do końca jest zrozumiały. Dobrze byłoby pokazać przykładowe zrzuty ekranu prezentujące serie „wysegmentowanych komórek i cytoforu” oraz „zsumowane obrazy dla dwóch kanałów” z segmentowanymi obiektami. Poza tym, w opisie badań molekularnych sformułowanie „małe kawałki skóry...” (strona 28) lepiej zastąpić „małe kawałki powłok ciała”; pojęcie „skóra” dotyczy tylko zwierząt kręgowych, natomiast u zwierząt bezkręgowych, w języku polskim, nie występuje.

Uzyskane przez Doktorantkę wyniki zostały bardzo starannie udokumentowane i zaprezentowane na dobrej jakości rycinach. Na szczególną uwagę zasługują trójwymiarowe rekonstrukcje zespołów komórek płciowych podczas spermatogenezy, które przestrzennie odwzorowują rzeczywiste ułożenie tych komórek względem siebie. W mojej ocenie istotnym wynikiem jest dokonana weryfikacja przynależności gatunkowej *H. orientalis* w oparciu o badania molekularne - sekwencje COI. W sumie spośród pięciu analizowanych osobników aż cztery okazały się *H. medicinalis*. Do tej części pracy mam pytanie. Czy w związku z podobieństwem morfologicznym gatunków: *H. medicinalis* i *H. orientalis* i doniesieniami naukowymi o możliwości krzyżowaniu się tych dwóch (a nawet trzech, łącznie z *H. verbana*) gatunków w warunkach laboratoryjnych istnieje prawdopodobieństwo występowania mieszańców? Jakkolwiek zasięgi występowania *H. medicinalis* i *H. orientalis* w Europie nie zachodzą na siebie więc krzyżowanie się w naturze nie jest możliwe. To jednak gatunki te są hodowane w celach hirudoterapii stąd wydaje się możliwe ich nielegalne przedostanie się do środowiska naturalnego. Natomiast zasięgi *H. medicinalis* i *H. verbana* w pewnym stopniu nakładają się, więc teoretycznie możliwe jest ich krzyżowanie się w naturze tak jak potwierdziły to badania laboratoryjne. Nadmienię jeszcze, że *H. verbana* nie występuje „na terenie zachodniej Europy” (strona 8, Wstęp) jak podaje Doktorantka, tylko na terenie południowej Europy, czasami nazywana jest pijawką śródziemnomorską. Wiadomo też, że gatunek ten charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem ubarwienia ciała; Kutschera (2012) wyróżnia trzy wzory takiego ubarwienia.

W mojej opinii brakuje w *Metodach* i *Wynikach* opisu dotyczącego budowy zewnętrznej pijawek, natomiast w *Dyskusji* Autorka podkreśla, „że w toku niniejszych badań zaobserwowano, że ubarwienie i wzory kolorystyczne ciała pijawek często różnią się, np. odcieniem, lub rozmieszczeniem wzoru od tych opisywanych w pracach innych autorów”. Proponuje, aby uzupełnić *Metody* i *Wyniki* o opis cech dotyczących ubarwienia ciała; takie zestawienie w połączeniu z molekularną identyfikacją przynależności gatunkowej są bardzo cenne i mogłyby zapoczątkować zebranie danych o różnych wzorach ubarwienia poszczególnych gatunków pijawek lekarskich. Z czystej ciekawości zapytuję, dlaczego fotografie pijawek *H. verbana*, *H. medicinalis*, i *H. orientalis* (Ryciny 2 A, B i C) nie są autorstwa własnego tylko zostały zacytowane, za Petrauskiene i in. 2009?

W dalszej części *Wyników* Autorka posługując się mikroskopią świetlną i elektronową dokładnie charakteryzuje kolejne stadia spermatogenezy, a opisy dopełniają bardzo dobrej jakości elektronogramy. Podaje średnicę i długość mostków międzykomórkowych, mimo, że w *Metodach* nie ma informacji o sposobie ich pomiaru; krótki opis znajduje się w *Wynikach*.

Brakuje też zastosowania testu statystycznego, który pozwoliłby określić, czy uzyskane różnice były istotne statystycznie. W mojej opinii szczególnie interesujące wyniki uzyskane przez Panią mgr Natalię Jarosz dotyczą cytoszkieletu oraz rozmieszczenia i aktywności mitochondriów. Dane te są bardzo nowatorskie, przedstawione bardzo szeroko i wnikliwie, zarówno w postaci rycin uzyskanych przy pomocy mikroskopii fluorescencyjnej, jak i rekonstrukcji trójwymiarowej oraz tabel i wykresów, w których pokazano wyniki przeprowadzonych analiz statystycznych. Doceniam ogrom włożonej pracy aby uzyskać takie dane przy zastosowaniu technik laboratoryjnych, mikroskopowych i wizualizacji. Dzięki tej zmuśnej pracy Autorka wykazała m. in., że mitochondria, które początkowo tworzą sieć, w spermatydach formują pojedyncze mitochondrium, a ich aktywność zmienia się wraz z zachodzącymi podczas spermatogenezy procesami (podziałami komórkowymi).

Dyskusja, obejmująca 18 stron tekstu, poprowadzona jest w sposób bardzo klarowny; napisana jest prostym, zrozumiałym językiem dlatego czyta się ją z zainteresowaniem. Pani mgr Natalia Jarosz wykazała się znajomością specjalistycznej literatury jak i umiejętnością krytycznej oceny uzyskanych wyników na tle dostępnego piśmiennictwa. Autorka, krok po kroku, bardzo wnikliwie analizuje otrzymane wyniki dotyczące przynależności gatunkowej badanych osobników wskazując na różnice w ich identyfikacji uzyskane na podstawie analiz morfologicznych i molekularnych. Opisuje również tworzenie się i budowę zespołów komórek płciowych podczas spermatogenezy u pijawek lekarskich na tle innych gatunków pijawek i skąposzczetów. Na szczególną uwagę, w mojej ocenie, zasługują podrozdziały *Dyskusji* dotyczące cytoszkieletu mikrotubularnego oraz konformacji mitochondriów i ich aktywności. Tym bardziej, że nadal mało wiadomo na temat roli aktywności mitochondriów w procesach, które obejmują zmiany funkcji metabolicznej, np. podczas spermatogenezy. Pijawki mogą stać się dobrym modelem badawczym w kontynuowaniu tych badań.

Po przeczytaniu *Dyskusji* mam kilka pytań, które wynikają z zainteresowania tematem. Jakie są funkcje cytoforu? Czy cytofor można uznać za funkcjonalny odpowiednik komórek Sertolego u innych zwierząt? W pracy pojawiają się informacje na temat funkcji jakie pełni cytofor ale są to informacje raczej rozproszone zarówno we *Wstępie* jak i w *Dyskusji*. Proszę także o zaproponowanie wyjaśnienia dlaczego mitochondria tworzą sieć podczas spermatogenezy pijawek. Poza tym, czy obserwowano w komórkach płciowych jakiegoś symptomy degeneracji komórkowej?

Uzyskane przez mgr Natalię Jarosz wyniki badań przedyskutowane z danymi dostępnymi w pracach innych autorów pozwoliły na sformułowanie siedmiu wniosków.

Uważam, że są one ważnymi osiągnięciami Doktorantki, stanowiącymi Jej oryginalny wkład w wiedzę biologiczną na temat spermatogenezy pijawek.

W pracy wykorzystano 161 pozycji specjalistycznego piśmiennictwa, w zdecydowanej większości anglojęzycznego, aktualnego, zacytowanego i umiejętnie wykorzystanego.

Podsumowując, do najważniejszych osiągnięć Doktorantki można zaliczyć:

- weryfikację przynależności gatunkowej *H. orientalis* i *H. nipponia*,
- opisanie przebiegu procesu spermatogenezy i porównanie jej u czterech gatunków pijawek z rodzaju *Hirudo*,
- szczegółowe określenie rozmieszczenia cytoszkieletu mikrotubularnego i aktynowego w cystach podczas kolejnych etapów spermatogenezy,
- wykazanie, że mitochondria podczas spermatogenezy pijawek lekarskich tworzą sieć a następnie pojedyncze organellum, które najprawdopodobniej jest skondensowaną siecią mitochondrialną;
- udowodnienie, że aktywność mitochondriów w komórkach płciowych wykazuje zmienność związaną z przebiegiem procesu spermatogenezy.

Po zapoznaniu się z treścią rozprawy doktorskiej jestem przekonana, że Pani mgr Natalia Jarosz jest naukowcem zdolnym do planowania i prowadzenia badań, a także prawidłowej interpretacji uzyskanych wyników. Posiada wiedzę i umiejętności niezbędne do uzyskania stopnia doktora nauk biologicznych. Chciałabym podkreślić, że wskazane w recenzji uwagi mogą być przydatne przy przygotowywaniu pracy do druku i nie mają wpływu na wysoką merytoryczną wartość ocenianej pracy doktorskiej.

Podsumowując uważam, że recenzowana rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku (*Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r)*). Na tej podstawie składam wniosek do Rady Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydziału Nauk Przyrodniczych, Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie mgr Natalii Jarosz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

15.03.2021

Dorota Juchimo