

Dr hab. n. med. Monika Frączek, prof. IGC PAN
Instytut Genetyki Człowieka Polskiej Akademii Nauk
Zakład Zaawansowanych Terapii Biomedycznych i Niepłodności
ul. Strzeszyńska 32
60-479 Poznań

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr inż. Aleksandry Wiktorii Cichowskiej-Likszo
pt.: „Białkowe markery jakości nasienia najądrzowego psa”**

Ocena wartości naukowej rozprawy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr inż. Aleksandry Wiktorii Cichowskiej-Likszo została zrealizowana i przygotowana pod kierunkiem dr hab. inż. Marzeny Mogielnickiej-Brzozowskiej, prof. UWM, w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Rozprawa została przygotowana w oparciu o cykl trzech spójnych tematycznie artykułów naukowych, obejmujących jedną pracę przeglądową oraz dwie oryginalne prace badawcze. Wszystkie publikacje wchodzące w skład rozprawy zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych indeksowanych w bazie Web of Science. Tematyka rozprawy koncentruje się na charakterystyce proteomicznej płynu najądrzowego psa, ze szczególnym uwzględnieniem identyfikacji białek mogących stanowić potencjalne markery jakości nasienia najądrzowego. Istotnym elementem podjętych badań była również ocena zmian zachodzących w profilu proteomicznym płynu najądrzowego wraz z wiekiem zwierząt, co umożliwiło analizę wpływu procesów starzenia na środowisko najądrza i jakość plemników. Uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Cichowskiej-Likszo wnosi nową wiedzę na temat molekularnych mechanizmów odpowiedzialnych za kształtowanie potencjału funkcjonalnego plemników psa w trakcie ich dojrzewania w najądrzu. Podjętą problematykę badawczą należy zatem uznać za aktualną i ważną, a uzyskane wyniki za posiadające istotną wartość poznawczą oraz potencjalne znaczenie praktyczne.

Szczegółowa ocena merytoryczna i metodologiczna cyklu publikacji

Publikacja 1. Mogielnicka-Brzozowska M, Cichowska AW. *Molecular Biomarkers of Canine Reproductive Functions. Curr Issues Mol Biol.* 2024;46(6):6139-6168.

Pierwsza z prac wchodzących w skład rozprawy ma charakter przeglądowy i stanowi kompleksowe podsumowanie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego biomarkerów funkcji rozrodczych psa, a także możliwości ich wykorzystania w ocenie jakości nasienia i płodności samców. W pracy szeroko omówiono rolę zarówno białek markerowych, jak i związków oraz cząsteczek o charakterze niebiałkowym, a także jonów. Zwrócono uwagę na ich udział m.in. w regulacji ruchliwości plemników, procesie kapacytacji, reakcji akrosomalnej czy ochronie plemników przed uszkodzeniami. Biorąc pod uwagę kluczową rolę stresu oksydacyjnego w dysregulacji szlaków sygnałowych związanych z potencjałem zapładniającym plemników, w pracy słusznie wyodrębniono jako osobną grupę biomarkerów enzymy o działaniu antyoksydacyjnym, w szczególności peroksydazę glutationową, dysmutazę ponadtlenkową i katalazę. Podkreślono ich znaczenie w ochronie plemników przed uszkodzeniami związanymi z konserwacją nasienia. W odniesieniu do tej części pracy chciałabym zadać Doktorantce pytanie, czy w literaturze dostępne są również dane wskazujące na ochronne działanie niskocząsteczkowych antyoksydantów, w tym witamin, na plemniki psa, szczególnie w kontekście ochrony przed stresem oksydacyjnym i uszkodzeniami ich genomu.

Podsumowując, praca przeglądowa stanowi dobrze uzasadnione wprowadzenie teoretyczne do badań eksperymentalnych przedstawionych w rozprawie, porządkując aktualny stan wiedzy na temat potencjalnych biomarkerów funkcji rozrodczych psa oraz wskazując obszary wymagające dalszej weryfikacji.

Publikacja 2. Cichowska AW, Wisniewski J, Bromke MA, Olejnik B, Mogielnicka-Brzozowska M. *Proteome Profiling of Canine Epididymal Fluid: In Search of Protein Markers of Epididymal Sperm Motility. Int J Mol Sci.* 2023;24(19):14790.

Druga publikacja ma charakter oryginalnej pracy badawczej i dotyczy charakterystyki proteomu płynu ogona najądrza psa w kontekście poszukiwania białek związanych z ruchliwością plemników. Badania przeprowadzono na materiale pochodzącym od 23 psów. Na podstawie wartości ruchu progresywnego plemników zwierzęta przydzielono do jednej z dwóch grup badawczych: grupy o dobrej oraz grupy o obniżonej ruchliwości plemników. Z wykorzystaniem

zaawansowanej techniki instrumentalnej, łączącej nanosprawną chromatografię cieczową z hybrydowym spektrometrem mas typu kwadrupol-czas przelotu (nanoUPLC-Q-TOF/MS) zidentyfikowano łącznie 915 białek oraz wskazano wyraźne różnice w profilu proteomicznym pomiędzy badanymi grupami. Za szczególnie istotne należy uznać wyniki dotyczące czterech białek: albuminy (ALB), CRISP2, białka zawierającego domenę lipokalinową/cytozolową wiążącą kwasy tłuszczowe (LCNL1) i prostaglandyno-H2 D-izomerazy (PTGDS), których wyższe stężenia stwierdzono w środowisku plemników charakteryzujących się dobrą ruchliwością. Dodatkowo, dla białek ALB i PTGDS uzyskane wyniki zostały zwalidowane metodą Western blot. W pracy wykazano również statystycznie istotne zależności pomiędzy zawartością wybranych białek a parametrami kinetyki ruchu plemników, co dodatkowo wzmacnia przesłanki wskazujące na ich potencjalne znaczenie jako markerów jakości nasienia najądrzowego.

Publikacja 3. Cichowska-Likszo AW, Likszo P, Fraser L, Mlynarz P, Mogielnicka-Brzozowska M. *ALB, GPX5 and PTGDS as potential biomarkers for the aging processes of the dog epididymis. Reprod Fertil Dev. 2026 Jan 30;38(2):RD25105.*

Trzecia praca to publikacja eksperymentalna poświęcona analizie zmian zachodzących w proteomie płynu najądrzowego psa wraz z wiekiem zwierząt oraz identyfikacji potencjalnych białkowych markerów starzenia najądrza. Na potrzeby pracy materiał badawczy podzielono na trzy grupy wiekowe: 1–3 lata, 3,5–6 lat oraz 6,5–11 lat. Analiza proteomiczna wykazała różnice w składzie białkowym płynu najądrzowego pomiędzy poszczególnymi grupami, przy czym istotne zmiany dotyczyły ponownie białek ALB i PTGDS, a także epididymalnej peroksydazy glutationowej 5 (GPX5). Walidacja wyników metodą Western blot potwierdziła zależność zawartości wszystkich trzech białek od wieku zwierząt, choć kierunek obserwowanych zmian nie zawsze miał charakter liniowy. Przedstawione w pracy wyniki wskazują, że wymienione białka mogą być potencjalnymi biomarkerami starzenia najądrza, a ich znaczenie może być związane przede wszystkim z regulacją procesów oksydacyjnych oraz metabolizmem jonów istotnych dla prawidłowego funkcjonowania plemników. Na uwagę zasługuje jednak rozbieżność pomiędzy wynikami dotyczącymi GPX5 uzyskanymi metodą spektrometrii mas i Western blot. W rozprawie wskazano, że może ona wynikać z odmiennych podstaw obu technik, jednak zagadnienie to wymaga, w mojej ocenie, szerszego wyjaśnienia. Proszę zatem Doktorantkę o szczegółowe omówienie, w jaki sposób metodyka mogła wpłynąć na obserwowane różnice, oraz o

odniesienie tych obserwacji do danych literaturowych. Czy podobne rozbieżności pomiędzy wynikami analiz proteomicznych i Western blot opisywano również dla GPX5?

W podsumowaniu oceny merytorycznej i metodologicznej prac stanowiących trzon rozprawy doktorskiej można stwierdzić, że postawione zadania badawcze Doktorantka zrealizowała w sposób logiczny i konsekwentny, wykorzystując dobrze zaplanowany i odpowiednio dobrany warsztat badawczy, obejmujący m.in. wysokoprzepustowe techniki biologii molekularnej. Przeprowadzone analizy statystyczne i bioinformatyczne umożliwiły weryfikację postawionych hipotez badawczych oraz właściwą interpretację wyników w kontekście aktualnego stanu wiedzy.

W tym miejscu należy również podkreślić znaczący indywidualny wkład Doktorantki w powstanie publikacji stanowiących podstawę rozprawy. Doktorantka jest pierwszym autorem obu prac eksperymentalnych, a w jednej z nich pełni również funkcję autora korespondencyjnego. W pracy przeglądowej jest natomiast drugim i zarazem ostatnim autorem. Dołączone do publikacji oświadczenia współautorów jednoznacznie wskazują na istotny udział mgr inż. Cichowskiej-Likszo na wszystkich etapach realizacji badań i przygotowania prac, od opracowania koncepcji, poprzez wykonanie analiz laboratoryjnych, interpretację i wizualizację wyników, aż po przygotowanie manuskryptów oraz odpowiedzi na uwagi recenzentów. Zakres tego udziału świadczy o znaczącym i samodzielnym wkładzie Doktorantki w ich powstanie.

Charakterystyka formalna i ocena poprawności redakcyjnej rozprawy

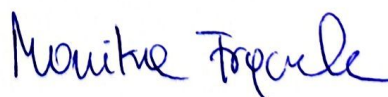
Tekst rozprawy doktorskiej wraz z wykazem piśmiennictwa liczy 127 stron maszynopisu. Rozprawa ma układ typowy dla pracy przygotowanej w formie hybrydowej. Zasadniczą jej część stanowi cykl opublikowanych, powiązanych tematycznie artykułów naukowych, uzupełnionych o oświadczenia wszystkich współautorów. Cykl publikacji poprzedza polskojęzyczna część opisowa, obejmująca wstęp, cel, zakres badań i hipotezy badawcze, opis materiału i metod, omówienie wyników, podsumowanie i wnioski oraz wykaz piśmiennictwa. Rozprawę uzupełniają wymagane streszczenia w języku polskim i angielskim, a także charakterystyka bibliometryczna dorobku Kandydatki. Publikacje stanowiące podstawę rozprawy posiadają łączny współczynnik Impact Factor wynoszący 10 oraz sumaryczną liczbę 350 punktów według punktacji MNiSW, co potwierdza, że wyniki przeprowadzonych badań zostały opublikowane w czasopiśmie o ugruntowanej pozycji naukowej.

Pewien niedosyt pozostawia natomiast część opisowa rozprawy, a w szczególności stosunkowo zwięzły wstęp. W mojej ocenie tak interesująca i wielowątkowa problematyka badawcza zasługiwała na bardziej wyczerpujące wprowadzenie, które lepiej uzasadniałoby wybór problemu badawczego oraz wyraźniej osadzało przeprowadzone badania w szerszym kontekście biologii rozrodu. Doktorantka jest w tej części pracy zdecydowanie zbyt oszczędna w słowach. W przypadku rozprawy opartej na cyklu publikacji autorski komentarz ma bowiem szczególne znaczenie, ponieważ pozwala lepiej prześledzić tok myśli naukowej Doktorantki, sposób, w jaki łączy ona wyniki poszczególnych prac w spójną całość, a także poznać jej własną interpretację uzyskanych wyników i pogląd na dalsze perspektywy badawcze. Bardziej rozbudowana dyskusja umożliwiłaby również pełniejsze wskazanie ograniczeń przeprowadzonych badań oraz kierunków ich kontynuacji. Mam nadzieję, że kwestie te zostaną szerzej omówione przez Doktorantkę podczas publicznej obrony.

Podsumowanie i wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Wiktorii Cichowskiej-Likso jest wartościowym i dobrze udokumentowanym opracowaniem naukowym i spełnia wszystkie wymagania określone w art. 187 ust. 1-3 ustawy - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r., poz. 1571 z późn. zm.). Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Wiktorii Cichowskiej-Likso do dalszych etapów postępowania w sprawie o nadanie stopnia doktora.

Z poważaniem



Monika Frączek