UNIWERSYTET WARSZAWSKI

Wydział Biologii
Instytut Zoologii Doświadczalnej
Zakład Immunologii
Dr hab. inż. Anna Zawistowska-Deniziak
a.zawistowska-deniziak@uw.edu.pl

Warszawa, 11.12.2025r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
mgr inż. **Iwony Polak**
**pt. "Transkryptom *Anisaxis simplex* źródłem informacji o molekularnych podstawach przeżycia nicienia w organizmie żywiciela"**

## 1. Charakterystyka ogólna rozprawy i znaczenie podjętej tematyki

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Iwony Polak poświęcona jest wielopoziomowej analizie mechanizmów molekularnych warunkujących przeżycie pasożytniczego nicienia *Anisakis simplex* sensu stricto (s. s.) w organizmie żywiciela, ze szczególnym uwzględnieniem roli glukozy jako kluczowego substratu metabolicznego oraz czynnika modulującego ekspresję genów, białek i transporterów cukrów. Praca koncentruje się na dwóch istotnych z punktu widzenia patogenezy i epidemiologii stadiach rozwojowych – larwach L3 i L4 – i obejmuje analizę transkryptomiczną, proteomiczną, charakterystykę transporterów glukozy oraz badania biochemiczne metabolizmu węglowodanów.

Rozprawa liczy 91 stron i została oparta na dwóch oryginalnych artykułach naukowych opublikowanych w czasopismach z listy filadelfijskiej (BMC Genomics, Frontiers), o łącznym IF 9,0 i łącznej liczbie 240 punktów MEiN, co świadczy o wysokim poziomie merytorycznym przedstawionych badań. Ponadto tematyka badań odpowiada aktualnym potrzebom nauk biomedycznych i może mieć w przyszłości znaczenie aplikacyjne — zarówno w diagnostyce chorób odzwierzęcych, jak i w poszukiwaniu nowych celów terapeutycznych.

Pod względem zakresu zastosowanych technik badawczych – RNA-seq, analiza alternatywnego splicingu, proteomika LC–MS/MS, modelowanie strukturalne, analizy *in vitro* i *in silico* transporterów cukrów oraz biochemiczna ocena metabolizmu glukozy, trehalozy i glikogenu – praca ma charakter wyraźnie interdyscyplinarny i nowoczesny. Tak szerokie zastosowanie podejścia „multi-omics" w badaniach nad pasożytniczym nicieniem morskiego środowiska jest rzadkością i zasługuje na podkreślenie.

Tematyka ma istotne znaczenie naukowe i potencjalnie aplikacyjne – zarówno w kontekście zrozumienia biologii pasożytów i ich strategii metabolicznych w warunkach beztlenowych i zmiennego dostępu do substratów energetycznych, jak i poszukiwania nowych, selektywnych celów terapeutycznych oraz potencjalnych narzędzi diagnostycznych w anisakiozie. Doktorantka

pokazuje biegłość zarówno w technikach laboratoryjnych, jak i w korzystaniu z zaawansowych narzędzi bioinformatycznych.

**2. Układ rozprawy, język i strona formalna**

Rozprawa ma klasyczny, poprawny układ: streszczenie, wstęp, sformułowanie hipotez, celów i zadań badawczych, metodyka, wyniki, podsumowanie i wnioski, wykaz piśmiennictwa oraz część zawierającą pełne teksty publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej.

Język rozprawy jest w większości poprawny, utrzymany w odpowiednim rejestrze naukowym. Pojawiają się sporadycznie drobne potknięcia stylistyczne oraz niefortunne sformułowania, które nie wpływają istotnie na odbiór merytoryczny pracy, ale mogą być zasygnalizowane jako element do korekty redakcyjnej (przykłady szczegółowe podaję w części „Uwagi szczegółowe").

Warstwa graficzna (ryciny, schematy) jest przejrzysta i dobrze dobrana do omawianych treści, choć w kilku przypadkach podpisy mogłyby być bardziej „interpretacyjne", tj. wskazywać wyraźniej najważniejsze obserwacje (np. kluczowe klastry funkcjonalne genów/białek). Całościowo strona formalna rozprawy jest na dobrym poziomie.

**3. Ocena merytoryczna poszczególnych części rozprawy**

**3.1. Wstęp**

Wstęp jest obszerny, dobrze udokumentowany i w sposób systematyczny wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z:

- epidemiologią anisakiozy i znaczeniem *Anisakis simplex* sensu lato (s. l.). jako pasożyta o rosnącym znaczeniu zoonotycznym,
- budową, cyklem rozwojowym i różnicami morfo-funkcjonalnymi między larwami L3 i L4, w tym istotną informacją o nieaktywnym, „zapadniętym" jelicie u L3 oraz funkcjonalnym jelicie u L4,
- rolą węglowodanów (glukozy, glikogenu, trehalozy) jako głównych substratów energetycznych helmintów jelitowych,
- zastosowaniem nowoczesnych metod omicznych (RNA-seq, proteomika) w badaniach nad nicieniami.

Wstęp dobrze identyfikuje lukę badawczą: brak danych dotyczących bezpośredniego wpływu egzogennej glukozy na transkryptom i proteom larw L3 i L4 *A. simplex* s. s., a także niewyjaśniony dotąd mechanizm pobierania glukozy (transkutikularnie vs jelitowo) w zależności od stadium rozwojowego.

Zastrzeżenie dotyczy głównie proporcji – fragmenty o technikach RNA-seq mają miejscami charakter podręcznikowy i mogłyby być skrócone na rzecz bardziej szczegółowego zaakcentowania specyficznych luk wiedzy dotyczących właśnie *Anisakis* i różnic między helmintami a żywicielem w zakresie metabolizmu cukrów.

**3.2. Hipotezy, cele i znaczenie badawcze**

W części dotyczącej hipotez i celów Autorka formułuje dwie hipotezy badawcze oraz dwa cele główne, rozwinięte następnie w szczegółowe zadania badawcze. Hipotezy w wersji polskojęzycznej, w uproszczeniu, brzmią:

I. Profil transkryptomu *A. simplex* różni się istotnie pomiędzy stadiami L3 i L4 w obecności glukozy.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

II. W transkryptomie larw L3 i L4 występuje ekspresja genów kodujących transportery glukozy, a jej poziom zależy od obecności glukozy w środowisku.

Cele i zadania badawcze obejmują m.in.:

- identyfikację różnic w transkryptomie między L3 i L4, w tym DEGs, DELs i zdarzeń alternatywnego splicingu,
- analizę proteomiczną i integrację danych transkryptomicznych i proteomicznych,
- identyfikację genów transporterów glukozy, analizę ich filogenezy i struktur 3D,
- ocenę ekspresji transporterów glukozy w odpowiedzi na różne stężenia glukozy,
- analizę biochemiczną metabolizmu glukozy, trehalozy i glikogenu oraz aktywności trehalazy.

Zastrzeżenie recenzenckie dotyczy poziomu ogólności i charakteru hipotez. W przedstawionej formie mają one w dużej mierze charakter opisowy i częściowo oczywisty biologicznie: różnice transkryptomiczne między odrębnymi stadiami rozwojowymi (L3 vs L4) można było przewidzieć niezależnie od obecności glukozy, a stwierdzenie, że „występuje ekspresja genów kodujących transportery glukozy" nie stanowi hipotezy wymagającej weryfikacji.

Warto podkreślić, że w anglojęzycznej publikacji dotyczącej transporterów cukrów Autorka formułuje hipotezę znacznie bardziej trafną i mechanistyczną:

*„It is hypothesized that* A. simplex *s. s. utilizes specific glucose transporters to facilitate sugar uptake under varying nutritional conditions."*

Takie ujęcie – odwołujące się do konkretnego mechanizmu adaptacyjnego (specyficzne transportery, zmienne warunki żywieniowe) – lepiej oddaje charakter przeprowadzonych badań oraz nowoczesne standardy formułowania hipotez. W mojej ocenie, już na poziomie części polskojęzycznej warto byłoby sformułować hipotezy w podobnym duchu, nawiązując do różnic strategii pobierania glukozy między L3 a L4 oraz wielopoziomowej regulacji (DEGs, DELs, DASEs, DRPs). Same cele i zadania badawcze są jednak sformułowane jasno, spójne z planem eksperymentalnym i obejmują pełen zakres badań omicznych, bioinformatycznych i biochemicznych.

### 3.3. Metodyka

Metodyka jest przedstawiona syntetycznie, ze zrozumiałym odwołaniem do szczegółowych opisów w opublikowanych artykułach. W rozprawie wyszczególniono:

- sposób pozyskania i hodowli *in vitro* larw L3 oraz ich rozwój do stadium L4 w warunkach z dodatkiem glukozy i bez niej,
- izolację RNA, przygotowanie bibliotek cDNA i sekwencjonowanie RNA-seq,
- analizę transkryptomiczną (DEGs, DELs, zdarzenia splicingowe),
- izolację białek i analizę proteomiczną (nLC-MS/MS),
- analizy *in silico* transporterów cukrów (identyfikacja genów, filogeneza, modelowanie 3D),
- ocenę ekspresji transporterów metodą qPCR,
- oznaczenia biochemiczne glukozy, trehalozy, glikogenu oraz aktywności trehalazy.

Metodyka jest dobrana właściwie i odpowiada postawionym celom.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

## 4. Wyniki

### 4.1.1. Analiza transkryptomiczna, DELs i alternatywny splicing

Część poświęcona analizie transkryptomicznej przedstawia liczby i charakterystykę genów o zróżnicowanej ekspresji (DEGs), długich niekodujących RNA (DELs) oraz zdarzeń alternatywnego splicingu w poszczególnych porównaniach (L3 vs L4, z glukozą i bez niej). Wyniki analizy GO podsumowują główne kategorie funkcjonalne nadreprezentowane w poszczególnych grupach.

Merytorycznie istotne jest to, że analiza DELs i korelacji DEGs–DELs wskazuje na potencjalnie znaczącą rolę długich niekodujących RNA w regulacji transkryptomu *A. simplex* w odpowiedzi na glukozę. Ten wątek jest w anglojęzycznej publikacji dość mocno akcentowany jako dodatkowa warstwa regulacyjna. W polskim tekście wyniki dotyczące DELs są przedstawione poprawnie, ale ich interpretacja mogłaby zostać nieco wzmocniona – np. poprzez wyraźne stwierdzenie, że wysoka liczba korelacji DEGs–DELs sugeruje istotny udział lncRNA w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w metabolizm węglowodanów i adaptację do środowiska żywiciela.

W odniesieniu do alternatywnego splicingu – wyniki są zreferowane poprawnie, jednak ich znaczenie funkcjonalne (np. w kontekście regulacji translacji, organizacji cytoszkieletu czy metabolizmu energetycznego) mogłoby zostać mocniej zarysowane.

### 4.1.2. Proteomika i integracja transkryptomu z proteomem

Analiza proteomiczna uzupełnia dane transkryptomiczne, wskazując na białka o zróżnicowanej ekspresji w odpowiedzi na glukozę i między stadami L3 i L4. Identyfikacja klastrów białek związanych z translacją, metabolizmem energetycznym, cytoszkieletem i macierzą zewnątrzkomórkową stanowi ważny element interpretacyjny.

Silnym punktem pracy jest próba zintegrowania danych transkryptomicznych i proteomicznych, z pokazaniem zarówno przypadków zgodności, jak i rozbieżności między poziomem mRNA a poziomem białka. W anglojęzycznym artykule wyraźnie podkreślono, że brak prostego przełożenia mRNA–białko w wielu przypadkach wskazuje na istotną rolę regulacji potranskrypcyjnej i posttranslacyjnej. W polskiej części rozprawy wniosek o „złożonej sieci regulacyjnej" pojawia się, ale można by go wzmocnić poprzez jednoznaczne stwierdzenie, że:

„W licznych przypadkach nie obserwowano prostego związku między zmianami poziomu transkryptu a poziomem białka, co wskazuje na obecność dodatkowych poziomów regulacji (m.in. alternatywny splicing, kontrola stabilności mRNA i białek, regulacja translacji)."

Taka formuła lepiej oddawałaby wagę przeprowadzonej integracji transkryptomu i proteomu.

### 4.1.3. Transportery glukozy – różnorodność, ekspresja, modelowanie strukturalne

Druga publikacja, dotycząca transporterów cukrów, wnosi do rozprawy bardzo istotny wkład. Autorka identyfikuje rodzinę transporterów FGT oraz SWEET u *A. simplex*, przeprowadza ich analizę filogenetyczną i modelowanie strukturalne 3D, a także bada ekspresję tych genów w różnych stężeniach glukozy i w czasie.

W polskim opisie trafnie przedstawiono różnice między larwami L3 i L4: u L3 odpowiedź ekspresyjna transporterów FGT jest bardziej zależna od czasu i stężenia glukozy, a wzrost poziomu transkryptów jest wyraźny dopiero po 24 godzinach; u L4 większość transporterów reaguje szybciej, a ekspresja stabilizuje się przy relatywnie niskich stężeniach glukozy. Wnioski te są logicznie powiązane z różnicami funkcjonalnymi jelita w obu stadiach.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

Merytorycznie bardzo mocny jest wątek odmiennej strategii pobierania glukozy przez L3 i L4 (prawdopodobne pobieranie transkutikularne u L3, jelitowe u L4). W anglojęzycznej wersji artykułu ważnym argumentem funkcjonalnym jest eksperyment z zastosowaniem iwermektyny u larw L3, który ogranicza aktywność jelita, a jednocześnie nie znosi ekspresji części transporterów FGT, co wspiera hipotezę transkutikularnego pobierania glukozy. W polskim podsumowaniu skrótowo wspomina się o różnicach strategii, ale zabrakło wyraźnego przywołania tego eksperymentu jako mocnego potwierdzenia proponowanego modelu.

#### 4.1.4. Analizy biochemiczne – glukoza, trehaloza, glikogen, trehalaza

Analizy biochemiczne u larw L3 i L4 po 24-godzinnej hodowli w różnych stężeniach glukozy (zawartość glukozy, trehalozy, glikogenu oraz aktywność trehalazy) są spójne z obserwacjami transkryptomicznymi i ekspresją transporterów. Larwy L3 wykazują bardziej stężeniowo-zależne zmiany poziomu węglowodanów, natomiast larwy L4 osiągają wysycenie puli glukozy i trehalozy już przy niższych stężeniach zewnętrznych, co dobrze ilustruje różnice strategii metabolicznych między tymi dwoma stadami.

## 5. Podsumowanie

Rozdział Podsumowanie w sposób przejrzysty podsumowuje główne kierunki badań i podkreśla znaczenie glukozy jako istotnego czynnika metabolicznego w biologii *Anisakis simplex*. Autorka poprawnie umieszcza wyniki w szerszym kontekście oraz wskazuje, że analiza larw L3 i L4 ujawniła różnice w ich strategiach adaptacyjnych. Treść rozdziału jest spójna i w klarowny sposób zamyka pracę.

Jednocześnie Podsumowanie koncentruje się głównie na ogólnych wnioskach biologicznych, podczas gdy bardziej szczegółowe rezultaty badań multiomicznych – zwłaszcza dotyczące różnic w proteomie, alternatywnego splicingu czy dynamiki ekspresji transporterów glukozy – zostały przedstawione dość skrótowo. Nie obniża to poprawności rozdziału, ale sprawia, że nie w pełni oddaje on złożoność i szerokość przeprowadzonych analiz. Rozwinięcie tych elementów pozwoliłoby mocniej wyeksponować naukową wartość pracy, szczególnie w zakresie integracji wyników i ich znaczenia funkcjonalnego.

Pomimo to Podsumowanie spełnia swoją rolę, jest logiczne i zgodne z danymi prezentowanymi w rozprawie, a przedstawione wnioski są trafne i adekwatnie zamykają część badawczą.

## 6. Uwagi szczegółowe (językowe i terminologiczne)

Podsumowując uwagi bardziej techniczne i językowe:

I. Terminologia parazytologiczna – w kilku miejscach pojawia się termin „infekcja” w odniesieniu do nicieni. W parazytologii zaleca się używanie określeń „inwazja” lub „zarażenie” dla pasożytów wielokomórkowych. Warto w przyszłości ujednolicić słownictwo w tym kierunku.

II. Opis RT-PCR / qPCR (str. 15) – stwierdzenie, że „RT-PCR umożliwia monitorowanie amplifikacji PCR w czasie rzeczywistym”, jest nieprecyzyjne. Klasyczne RT-PCR oznacza metodę z odwrotną transkrypcją, natomiast monitorowanie w czasie rzeczywistym odnosi się do techniki real-time PCR (qPCR). Właściwsze byłoby sformułowanie typu „RT-qPCR (real-time PCR poprzedzony odwrotną transkrypcją) umożliwia monitorowanie amplifikacji w czasie rzeczywistym”.

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

III. w kilku miejscach poziom ekspresji mRNA jest nazywany „aktywnością transporterów", co sugeruje pomiar funkcjonalnego transportu, a nie poziomu transkryptu. W przyszłości warto konsekwentnie używać terminów „ekspresja genu" / „poziom transkryptu" dla danych qPCR/RNA-seq, a „aktywność białka" rezerwować dla wyników bezpośrednich testów funkcjonalnych;

IV. Konstrukcje bezosobowe – na stronie 33 „w analizie GO (…) wykazało…" powinno zostać zastąpione przez „w analizie GO (…) wykazano…".

V. Opis złożoności regulacji (str. 40) – sformułowanie „połączenie badań ekspresji RNA, alternatywnego splicingu i proteomu podkreśla złożoną sieć regulacyjną" sugeruje, że samo zastosowanie kilku technik powoduje taki wniosek. Precyzyjniejsze i bardziej poprawne byłoby zdanie odwołujące się do wyników, np.:
„Wyniki uzyskane z analiz ekspresji RNA, alternatywnego splicingu i proteomu ukazują złożoną, wielopoziomową sieć regulacyjną leżącą u podstaw rozwoju larwalnego i adaptacji środowiskowej."

VI. „Zapotrzebowanie w białka" (str. 41) – poprawna forma: „zapotrzebowanie na białka strukturalne", zgodnie z typową rekcją czasownika „potrzebować czegoś" - „zapotrzebowanie (na coś)".

Uwagi te mają charakter redakcyjny i terminologiczny; nie wpływają na zasadniczą wartość naukową rozprawy, ale ich uwzględnienie podniosłoby precyzję wywodu.

**7. Pytania do doktorantki**

Na potrzeby publicznej obrony rozprawy proponuję następujące pytania:

I. W środowisku jelitowym gospodarza dostępność glukozy oraz innych węglowodanów może ulegać znacznym wahaniom, m.in. w odpowiedzi na procesy zapalne. Jak Pani zdaniem takie zmienne warunki metaboliczne mogłyby modulować aktywność transporterów glukozy *A. simplex* oraz jego zdolność do przetrwania pierwszego kontaktu z układem odpornościowym?

II. Który z uzyskanych wyników uważa Pani za najbardziej zaskakujący lub mający największy potencjał do zmiany dotychczasowego postrzegania biologii *A. simplex*? Jakie wnioski wynikające z tych danych mogłyby być podstawą nowej hipotezy badawczej?

III. Biorąc pod uwagę zidentyfikowane różnice w ekspresji transporterów glukozy pomiędzy larwami L3 i L4 *Anisakis simplex*, w które stadium rozwojowe Pani zdaniem powinny celować ewentualne terapie lub inhibitory transporterów glukozy? Czy widzi Pani większy potencjał w opracowaniu takich inhibitorów z myślą o zastosowaniu u ludzi, czy raczej w kontekście bezpieczeństwa żywności i rybołówstwa? Proszę uzasadnić, odnosząc się do cyklu życiowego pasożyta.

**8. Podsumowanie i wnioski**

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr inż. Iwony Polak jest pracą:

- oryginalną – podejmuje temat dotąd nieopracowany w tak szerokim i wielopoziomowym ujęciu,
- metodycznie zaawansowaną – wykorzystuje kompleksowe podejście multi-omics,
- merytorycznie wartościową – wnosi istotny wkład do zrozumienia strategii metabolicznych pasożytniczych nicieni i roli transporterów glukozy,

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl

- interdyscyplinarną – łączy parazytologię, biologię molekularną, bioinformatykę i biochemię.

Zgłoszone uwagi mają charakter konstruktywny i nie podważają wysokiej wartości naukowej pracy ani jakości przeprowadzonych badań.

W mojej ocenie rozprawa w pełni spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, określone w art. 187 Ustawy – Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018r. (tekst jednolity Dz. U. 2024, poz. 1571, ze zm.). **Wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Warmińsko - Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr inż. Iwony Polak do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.**

Jednocześnie, uwzględniając:

- wysoki poziom merytoryczny rozprawy,
- interdyscyplinarność zastosowanych metod badawczych (analizy transkryptomiczne, proteomiczne, modelowanie strukturalne, analizy *in vitro* i *in silico*),
- oryginalność uzyskanych wyników dotyczących transporterów glukozy oraz wielopoziomowej regulacji metabolizmu węglowodanów u *Anisakis simplex*,
- znaczący wkład pracy w rozwój badań nad molekularnymi mechanizmami adaptacyjnymi nicieni pasożytniczych,
- wysoki poziom publikacji stanowiących podstawę rozprawy (240 pkt MEiN, łączny IF 9,0),
- samodzielność i dojrzałość naukową Autorki, widoczną zarówno w doborze metod, jak i w interpretacji wyników,

oceniam, że praca mgr inż. Iwony Polak spełnia kryteria pozwalające na jej **wyróżnienie**.

W związku z powyższym wnioskuję o **przyznanie wyróżnienia rozprawie doktorskiej** mgr inż. Iwony Polak.

Signature Not Verified
Dokument podpisany przez Anna Zawistowska-Deniziak
Data: 2025.12.16 22:16:29 CET

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel.: 22 55 41 104, faks: 22 55 41 106
e-mail: dziekan@biol.uw.edu.pl
http://www.biol.uw.edu.pl