

Prof. dr hab. Jan Udała
Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt
i Higieny Środowiska
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Karoliny Danuty Wasilewskiej-Sakowskiej pt. „Wpływ modyfikacji wybranych etapów technologii kriokonserwacji nasienia knura na właściwości biologiczne plemników” wykonanej w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt Wydziału Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Leylanda Frasera i dr inż. Łukasza Zasiadczyka, jako promotora pomocniczego

Zastosowanie w inseminacji świń nasienia kriokonserwowanego mogłoby przyczynić się do zwiększenia korzyści jakie daje zastosowanie tej biotechniki rozrodu w hodowli zwierząt. Gorsza jednak zapładnialność po sztucznym unasienianiu loch nasieniem poddanym procesom zamrażania i rozmrażania, w porównaniu do nasienia przechowywanego w stanie płynnym, ogranicza jak na razie jego wykorzystanie w praktyce. Stąd też wszelkie próby zmierzające do opracowania skutecznych metod kriokonserwacji nasienia knura zasługują na uwagę. Próby takie podjęła również Autorka niniejszej pracy doktorskiej, rozwijając zainicjowany przez Pana Profesora Jerzego Strzeżka i kontynuowany przez Jego następców w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, nurt badawczy związany z poznaniem procesów biochemicznych zachodzących w czasie zamrażania i rozmrażania nasienia knura. Prowadzone badania przez powyższy Zespół, jak również inne ośrodki badawcze na świecie, doprowadziły do opracowania różnych rozcieńczalników opartych na bazie fosfolipidów wykazujących ochronny wpływ na membrany biologiczne. Jednym z najbardziej efektywnych czynników protekcyjnych okazało się w tym względzie żółtko i frakcja lipoproteinowa żółtka jaja. Nie sposób w tym miejscu nie wspomnieć o opracowanej już w latach 80-tych ubiegłego wieku przez Ośrodek Olsztyński „Kortowskiej metody zamrażania nasienia knura”, wyizolowaniu następnie po niemal dwóch dekadach lipoprotein z żółtka jaja strusia afrykańskiego i otrzymaniu liofilizatu zastosowanego w rozcieńczalniku do mrożenia nasienia. Efektem powyższych prac badawczych było opracowanie w 2010 roku przez wspomniany Zespół nowej technologii mrożenia nasienia knura. Efektywność tej technologii

sprawdzono w praktyce uzyskując zachęcające wyniki, dając tym samym hodowcom możliwość zastosowania nasienia mrożonego do realizacji wybranych celów w hodowli świń.

Wykorzystując zdobytą wiedzę i doświadczenie z minionych lat pracy badawczej, Zespół Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt wprowadził nowe rozwiązania do opracowanych już metod, mogących przyczynić się do poprawy ich efektywności w praktyce. Wybrane modyfikacje polegające na zmianie niektórych etapów w procesie technologicznym konserwacji nasienia i wprowadzeniu nowych czynników o działaniu protekcyjnym w stosunku do plemników, zaprezentowano w czterech publikacjach składających się na niniejszą pracę doktorską:

- 1) Wasilewska K, Zasiadczyk Ł, Fraser L, Mogielnicka-Brzozowska M, Kordan W. 2016. The benefits of cooling boar semen in long-term extenders prior to cryopreservation on sperm quality characteristics. *Reproduction in Domestic Animals* 51(5): 781–788 (IF=1,400; 25pkt).
- 2) Wasilewska K, Fraser L. 2017. Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. *Animal Reproduction Science* 185: 161–173 (IF=1,647; 30pkt).
- 3) Wasilewska-Sakowska K, Zasiadczyk Ł, Fraser L. 2019. Effect of fractionated seminal plasma on sperm characteristics following cryopreservation of boar semen. *Annals of Animal Science* 19(3): 695-712 (IF=1,515; 15pkt).
- 4) Wasilewska-Sakowska K, Zasiadczyk Ł, Fraser L, Strzeżek J, Karpiesiuk K. 2019. Effect of post-thaw supplementation of fractionated seminal plasma on survival of boar spermatozoa. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 22 (3) (IF=0,802; 20pkt).

Jak wynika z powyższego zestawienia publikacji, we wszystkich z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. Swoją udział w ujęciu wskaźnikowym szacuje kolejno na 70 %, 80 %, 75 % i 70 %. Wskazuje to na Jej duże zaangażowanie w cały proces powstania i wydania publikacji. Udział ten polegał na opracowaniu koncepcji badań, kierowaniu zespołami badawczymi, przeprowadzeniu doświadczeń, interpretacji wyników i opracowaniu redakcyjnym prac. Pełnienie znaczącej roli w procesie powstawania prac świadczy o posiadanych zdolnościach organizacyjnych przez Doktorantkę i umiejętnościach współpracy z innymi Członkami Zespołu, co jest bardzo pozytywną cechą, zważywszy

znaczenie wspólnie podejmowanych działań i myśli koncepcyjnej w twórczej działalności naukowej.

Przyjęta forma przygotowania dysertacji na podstawie opublikowanych już prac naukowych w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, ułatwia w znacznym stopniu wykonanie zadania postawionego przed recenzentem w zakresie merytorycznej oceny pracy. Prace te bowiem uzyskały pozytywne opinie niezależnych ekspertów związanych z daną problematyką co świadczy o ich rzetelności i dużej wartości naukowej. Rola oceniającego powinna więc raczej skupiać się na ocenie komplementarności i spójności prac, ich znaczenia dla rozwoju wiedzy w danej dyscyplinie oraz polemice z Autorką na temat uzyskanych wyników.

Powyższe wyniki zamieszczone w czterech publikacjach Autorka zaprezentowała w pracy przygotowanej według obowiązujących wymogów dla tego typu opracowań naukowych. W pracy tej poza załączonymi publikacjami i oświadczeniami zawarła następujące rozdziały: wprowadzenie, hipoteza badawcza oraz cel pracy, materiał i metody, najważniejsze wyniki badań, podsumowanie i wnioski, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim. Jako załączniki zamieszczono publikacje, na podstawie których przygotowano niniejszą dysertację.

We wprowadzeniu, będącym zarazem krótkim przeglądem literatury, Autorka wskazuje na przyczyny ograniczonego wykorzystania mrożonego nasienia knura i wyjaśnia z czego one wynikają. Podkreśla, że obniżenie zdolności zapładniającej plemników po ich rozmrożeniu jest efektem niekorzystnych zmian zachodzących w błonach plazmatycznych tych komórek poddanych procesowi kriokonserwacji. Proces ten indukuje zmiany w składzie lipidów plazmoemy plemników co narusza integralność tej błony, zakłóca proces syntezy energii i w konsekwencji obniża ruchliwość gamet. Wyjaśnienie skutków niekorzystnego oddziaływania kriokonserwacji na stan strukturalny i funkcjonalny plemników przez Doktorantkę wydaje się istotne z punktu widzenia przeprowadzonych badań własnych dotyczących oceny zachodzących zmian w komórkach na poszczególnych etapach procesu technologicznego.

W rozdziale tym Autorka wskazuje także na podstawowe funkcje plazmy nasienia i możliwości wykorzystania jej białkowych komponentów do udoskonalenia technologii jego kriokonserwacji. Zaznacza też, że określenie funkcji biochemicznych poszczególnych komponentów jest niezwykle trudne ze względu na znaczną heterogenność źródła pochodzenia składników plazmy nasienia knura. Stąd też mając na uwadze potrzebę identyfikacji markerów molekularnych powiązanych z przydatnością nasienia do zamrażania,

istnieje potrzeba intensyfikacji badań w zakresie szerszego wyjaśnienia funkcji spełnianych przez białka plazmy nasienia w przebiegu procesów biochemicznych zachodzących w plemnikach. Opierając się na aktualnych materiałach źródłowych Autorka podaje przykłady wykorzystania badań nad ekspresją wybranych białek plazmy w ocenie podatności plemników na kriouškodzenia. Sugestie niektórych badaczy, że dodatek określonej frakcji plazmy nasienia wspomaga kriotolerancję plemników poddanych procesowi zamrażania-rozmrażania skłoniły zapewne Kandydatkę do podjęcia własnych prac w tym kierunku.

W przyjętej hipotezie badawczej założono, że modyfikacje technologii kriokonserwacji nasienia knura zmieniają skład biochemiczny plazmoemy, co wpływa korzystnie na właściwości biologiczne plemników po ich zamrożeniu-rozmrożeniu.

Hipotezę weryfikowano w trzech doświadczeniach mających za zadanie określenie wpływu dokonanych modyfikacji, zarówno na wstępnych etapach technologii zamrażania nasienia jak również po jego rozmrożeniu, na integralność strukturalną i funkcjonalną wyspecjalizowanych domen plazmoemy plemników. W badaniach wykorzystano specyficzne testy mikroskopii fluorescencyjnej oraz testy analizy zmian apoptotycznych tych komórek.

Przyjęta hipoteza jest poprawnie sformułowana w kontekście dokonanego przeglądu wyników prac innych autorów, doświadczeń własnych Zespołu, z którym współpracowała Doktorantka oraz posiadanych możliwości wykonania badań. Poprawnie wyznaczono także trzy szczegółowe cele pracy.

W materiale i metodach, na samym początku Autorka podała co było przedmiotem badań, liczbę i miejsce utrzymywania zwierząt oraz sposób konserwacji nasienia. Opisała ogólnie przebieg każdego doświadczenia, podając jednocześnie publikację, w której zamieszczona jest szczegółowa metodyka. Przyjęcie takiej formy jest dobrym rozwiązaniem, pozwalającym czytelnikowi prześledzić tok postępowania w każdym doświadczeniu.

W drugim podrozdziale zaprezentowano stosowane metody analityczne, pozyskiwanie i sączenie molekularne plazmy nasienia, szacowanie zawartość białka w każdej frakcji, zastosowane metody w badaniach proteomicznych. Podano także metody jakie wykorzystano do oceny właściwości biologicznych plemników, a na koniec rozdziału zaprezentowano metody analizy statystycznej.

Jak zaznaczyłem wcześniej, od strony merytorycznej, w tym doboru materiału i metod badawczych, praca była poddana już ocenie. Należy jednak podkreślić trafność doboru tych metod i wskazać na posiadane możliwości wykonania specjalistycznych badań, pozwalających na dokonanie oceny zmian strukturalnych i funkcjonalnych zachodzących

w plemnikach na poszczególnych etapach procesu kriokonserwacji nasienia. Autorka wykorzystwała szeroki wachlarz technik badawczych, od tradycyjnych metod oceny jakości nasienia powszechnie stosowanych w zakładach unasienniania zwierząt, po nowoczesne metody z zakresu biologii molekularnej, wymagające posiadania specjalistycznego sprzętu oraz posiadania dużej wiedzy i umiejętności analitycznych. Wykorzystany tak szeroki wachlarz technik badawczych, czyni badania wiarygodnymi i użytecznymi dla praktyki inseminacyjnej. Badania te bowiem oprócz znaczenia poznawczego, zwłaszcza w zakresie pogłębienia wiedzy na temat roli komponentów białkowych plazmy nasienia, mają wymiar aplikacyjny. Poprzez modyfikację opracowanych już metod kriokonserwacji nasienia knura, mają na celu zwiększenie zdolności zapładniającej plemników poddanych procesowi konserwacji w niskich temperaturach, a przez to szersze wykorzystanie w praktyce takiego nasienia i osiągnięcie korzyści z tym związanych, zwłaszcza przyspieszeniem postępu hodowlanego.

Na podstawie przeprowadzonych wszechstronnych badań, Autorka uzyskała szereg interesujących wyników, które w zwartej formie zaprezentowała w następnym rozdziale „Najważniejsze wyniki badań”. Wyniki te przedstawiła chronologicznie dla każdego doświadczenia, odpowiednio do zaprezentowanej metodyki i przebiegu badań w materiałach i metodach, co czyni rozdział przystępnym i pozwala lepiej poznać najważniejsze efekty uzyskane po zakończeniu każdego etapu eksperymentu.

Przeprowadzone badania wykazały, że zarówno różne warianty rozcieńczalników jak i temperatura schładzania, miały znaczący wpływ na większość analizowanych parametrów ruchu plemników przed zamrożeniem. Stwierdzono, że substancje zawarte w użytych rozcieńczalnikach wpływają korzystnie na funkcjonalność błon mitochondrialnych oraz integralność plazmoemy plemników po ich zamrożeniu-rozmrożeniu. Wykonane natomiast analizy SDS-PAGE wskazały na występowanie różnic w profilach białek plemnikowych między grupami knurów o dobrej i słabej przydatności nasienia do zamrażania. Daje to podstawę do dalszych prac w tym kierunku i poszukiwania skutecznych wyznaczników przydatności nasienia danego knura do kriokonserwacji. Z praktycznego punktu widzenia ważnym również było wykazanie korzystnego wpływu schładzania prób nasienia w rozcieńczalnikach długoterminowych w temperaturze 10°C przez 24 godziny na właściwości biologiczne plemników po rozmrożeniu.

Obiecujące rezultaty uzyskano po dodaniu frakcjonowanej plazmy nasienia o masie cząsteczkowej powyżej 40 kDa i poniżej 40 kDa przed jego mrożeniem. Zaobserwowano korzystny wpływ dodatku tych frakcji na większość cech charakteryzujących właściwości

biologiczne plemników, ruchliwość i integralność błon akrosomowych oraz żywotność. Pozwala to przypuszczać, że poprzez stabilizację błon plazmatycznych plemników podczas zamrażania – rozmrażania nasienia komponenty obu frakcji plazmy wywierały działanie krioprotekcyjne. Okazało się także, że to działanie, na co wskazywała przeżywalność plemników, najkorzystniejsze było kiedy frakcjonowana plazma nasienia pochodziła od knurów charakteryzujących się dobrą przydatnością nasienia do zamrażania. Podobną zależność zauważono po dodaniu frakcjonowanej plazmy nasienia po jego rozmrożeniu, co było przedmiotem badań w trzecim doświadczeniu. Między próbami pochodzącymi od knurów produkujących ejakulaty o różnej przydatności do kriokonserwacji zaobserwowano znaczne różnice w profilach elektroforetycznych (2D-PAGE). W badaniach tych wykazano także, że dodatek frakcjonowanej plazmy nasienia zawierającej substancje białkowe powyżej 40 kDa oraz poniżej 40 kDa pochodzącej od knurów o dobrej przydatności nasienia do zamrażania przyczyniał się do zachowania funkcjonalności plemników podczas przechowywania zamrażanego-rozmrażanego nasienia. Widoczne to było w lepszej sprawności aparatu ruchu kriokonserwowanych plemników, ich systemu mitochondrialnego, integralności błon plazmatycznych po rozmrożeniu plemników oraz ich żywotności.

Generalnie powyższy rozdział jest poprawnie opracowany. Spośród dużej liczby danych zamieszczonych w czterech publikacjach, Autorka wybrała te najważniejsze, charakteryzując je w trzech podrozdziałach odpowiednio do przyjętych wcześniej celów i metodyki badań. Krótkie reasumpcje na końcu każdego podrozdziału wynikają z głębokich przemyśleń i spostrzeżeń, dowodząc jednocześnie bardzo dobrej znajomości problematyki badawczej przez Doktorantkę.

Duży udział procentowy i pierwsza pozycja wśród autorów we wszystkich opublikowanych pracach składających się na dysertację doktorską, potwierdzają niewątpliwie posiadane przez Kandydatkę umiejętności analizy i weryfikacji oraz krytycznej oceny osiągnięć własnych na tle osiągnięć innych badaczy. Dlatego też można mieć pewien niedosyt, że na tle jasno i przejrzysto zaprezentowanych wyników, Doktorantka nie przeprowadziła dyskusji. Zapewne wyszła z założenia, że zrobiono to w każdej opublikowanej pracy. Prace te wzajemnie się uzupełniają, stanowią monolityczne dzieło naukowe, dotyczą wspólnego rozwiązywanego problemu, co jest niewątpliwie zaletą i świadczy o spełnieniu warunków stawianych dla przygotowanych w tej formie prac doktorskich. Na powyższy problem składa się jednak wiele wątków, np. wybór odpowiedniej temperatury przechowywania nasienia przed jego zamrażaniem, wybór odpowiedniego rozcieńczalnika, czy też dodatek odpowiedniej frakcji białek plazmy nasienia, które rozpatrywane są w różnych pracach.

Dlatego dokonanie krótkiego omówienia wyników własnych na tle dokonań innych badaczy pozwoliłby Autorce bardziej podkreślić istotę rozwiązywanego problemu, podjąć polemikę i przedstawić szerzej własny punkt widzenia, co w publikowanych artykułach ze względu na wymogi redakcyjne jest ograniczone lub niemożliwe.

W związku z powyższym chciałbym Autorkę zapytać:

1. Jak ocenia dokonany postęp w zakresie kriokonserwacji nasienia knura, czy jest on zadowalający, mając na uwadze osiągnięcia w zakresie biologii i biotechnologii rozrodu zwierząt?
2. Które ogniwa w opracowanych metodach kriokonserwacji nasienia wydają się być najbardziej newralgiczne, ograniczające zdolności zapładniające plemników?

Na podstawie uzyskanych wyników Autorka wyciągnęła 3 wnioski, zawarte w rozdziale „Podsumowanie i wnioski”. Moim zdaniem bardziej właściwym byłoby rozdzielenie tego rozdziału na „Podsumowanie” oraz „Wnioski”. W obecnej formie są to raczej spostrzeżenia. W oparciu o nie, można pokusić się o wyciągnięcie konkretnych wniosków o charakterze praktycznym, gdyż uzyskane wyniki w dużym stopniu, poza znaczeniem poznawczym, mają wymiar aplikacyjny.

Zamieszczone sformułowania w trzech punktach w rozdziale „Podsumowanie i wnioski” odpowiadają ogólnie na postawione na początku pracy cele badawcze. Istotnym wydaje się stwierdzenie zawarte w pierwszym punkcie, że „Rezultaty badań mogą przyczynić się do optymalizacji procedury technologii kriokonserwacji nasienia knura”. Dobrze byłoby rozwinąć tok myślowy, precyzując w jaki sposób mogą się przyczynić, co należałoby w tym kierunku zrobić?

Jak zaznaczono wcześniej, w toku realizacji pracy Autorka uzyskała wiele danych o charakterze poznawczym oraz aplikacyjnym, mogących być wykorzystanych w doskonaleniu technologii kriokonserwacji nasienia knura. Na podkreślenie zasługuje:

1. Wskazanie na występowanie różnic w profilach białek plemnikowych między grupami knurów o dobrej i słabej przydatności nasienia do zamrażania, co daje podstawę do dalszych prac w tym kierunku i poszukiwania skutecznych wyznaczników przydatności nasienia knura do kriokonserwacji.
2. Wykazanie korzystnego wpływu schładzania prób nasienia w rozcieńczalnikach długoterminowych w temperaturze 10°C przez 24 godziny na właściwości biologiczne plemników po rozmrożeniu, co może być wykorzystane w doskonaleniu technologii konserwacji nasienia knura.

3. Wykazanie krioprotekcyjnego działania frakcjonowanej plazmy nasienia o masie cząsteczkowej powyżej 40 kDa i poniżej 40 kDa, dodanej zarówno przed jak i po jego mrożeniu oraz powiązanie wpływu tego działania z przydatnością nasienia danego knura do zamrażania.

Niniejsza praca, stanowiąca podsumowanie wyników zamieszczonych w czterech oryginalnych pracach twórczych, napisana jest poprawnym językiem. Autorka w przystępnej i zrozumiałej formie zaprezentowała najważniejsze wyniki, jakie uzyskała w trakcie wykonanych doświadczeń nad wpływem komponentów rozcieńczalników długoterminowych na stopień kriouszkodzeń plemników oraz właściwości krioprotekcyjne wybranych frakcji białkowych plazmy nasienia knura. Powyższe wyniki zachęcają do dalszych badań oraz sprawdzenia dokonanych modyfikacji technologii mrożenia nasienia w praktyce. W przypadku pozytywnych efektów, mogą przyczynić się do szerszego wykorzystania nasienia kriokonserwowanego w inseminacji świń. Całość opracowania, publikacje na nie się składające, jak również pozostały dorobek naukowy Doktorantki, wskazuje na posiadane doświadczenie, umiejętności i kompetencje naukowe w zakresie podjętej problematyki badawczej.


Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest zwartym opracowaniem przygotowanym w oparciu o cztery wzajemnie uzupełniające się publikacje. Na bazie dociekań naukowych Autorka uzyskała interesujące wyniki wzbogacające naszą wiedzę o procesach zachodzących w czasie kriokonserwacji nasienia, zwłaszcza interakcjach między składnikami jego plazmy i plazmolemą. Praca ma znaczenie poznawcze i aplikacyjne. Dokonane modyfikacje technologii kriokonserwacji nasienia knura, mogą przyczynić się do szerszego jej zastosowania w praktyce inseminacyjnej świń. Na szczególne podkreślenie zasługuje wszechstronny dobór metod badawczych, które pozwoliły Doktorantce dokonać oceny stanu strukturalnego i funkcjonalnego plemników na poszczególnych etapach kriokonserwacji nasienia. Przy interesujących rozwiązaniach metodycznych i konsekwencji w realizacji każdego etapu badań pozwoliło to Autorce w pełni wykonać postawione zadania i osiągnąć zamierzony cel. Wykonanie badań wymagało dobrego przygotowania teoretycznego, specjalistycznego sprzętu i umiejętności analitycznych. Uzyskane wyniki zachęcają do podjęcia dalszych prac, są oryginalnym osiągnięciem badawczym Doktorantki i przyczyniają się do rozwoju badań w dyscyplinie zootechniki i rybactwo.

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Karoliny Danuty Wasilewskiej-Sakowskiej pt. „Wpływ modyfikacji wybranych etapów technologii kriokonserwacji nasienia knura na właściwości biologiczne plemników” odpowiada wymaganiom określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. z 2017 r. poz.

1789) w zw. z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669).
Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Danuty Wasilewskiej-Sakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Szczecin, 6 września 2019 roku



Prof. dr hab. Jan Udała