

Anna Wysokińska, post-doctoral degree
Institute of Animal Science and Fisheries
Faculty of Agrobiotechnology and Animal Husbandry
Siedlce University of Natural Sciences and Humanities

Siedlce 05.01.2023

**A review of the doctoral thesis of Anna Żmudzińska
'Age related changes in proteome and quality parameters of sonicated dog
epididymal spermatozoa'
completed at the Department of Animal Biochemistry and Biotechnology
University of Warmia and Mazury in Olsztyn
under
the supervision of Marzena Mogielnicka-Brzozowska, post-doctoral
degree, professor of UWM
and second supervisor Magdalena Zielińska, post-doctoral
degree, professor of UWM**

This doctoral thesis review was undertaken at the written request of Professor Tomasz Daszkiewicz, Chairman of the Scientific Council of the Discipline of Animal Science and Fisheries, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, of 8 November 2022 (no. WBZ-DZ.6350.3.1.2021).

Scientific problem and importance of the research

Due to continually growing interest in dog breeding, there is a need to explore the specifics of reproduction of this animal species, particularly in terms of improving assisted reproduction techniques. Most studies on dog semen involve the use of sperm collected from ejaculates. In cases when it is not possible to evaluate ejaculate sperm, an alternative is to acquire them from the epididymis. This possibility may prove to be highly significant for the further development of assisted reproduction techniques and conservation of genetically valuable animals. Analyses of the properties of semen obtained from the epididymis may prove to be crucial in the conservation of endangered canid species, particularly in the case of the sudden death of an individual with valuable genetic resources. Another important aspect of research on canine semen is the increasing incidence of various diseases which can exclude genetically valuable individuals from reproduction. Therefore there is a need to assess the degree of development of sperm collected from the epididymis. During the passage of semen through the epididymal duct, changes in sperm structures take place. Protein components originating in the epididymal ducts play an important role in this process. Both the interaction

of proteins with the plasma membrane of sperm and the recomposition of internal proteins play a fundamental role in the maturation of sperm in the epididymides. Epididymal sperm differ from ejaculate sperm in that they are coated only with proteins of the epididymal fluid and have no contact with proteins secreted by the accessory glands. Protein functions, which are closely linked to the fertilization capacity of sperm, can be influenced by a variety of factors. Little is known of the molecular mechanisms associated with changes in the composition of proteins and their effect on sperm quality during the maturation of sperm in the epididymides. The doctoral thesis submitted for review, written by Anna Żmudzińska, is clearly in line with these issues, and the research undertaken by the candidate is fully justified.

Formal and substantive evaluation

The doctoral thesis submitted for review, entitled 'Age related changes in proteome and quality parameters of sonicated dog epididymal spermatozoa', is based on a thematically coherent set of two original scientific papers published in journals listed in the Journal Citation Reports database:

1. Żmudzińska, A.; Bromke, M.A.; Strzeżek, R.; Zielińska, M.; Olejnik, B.; Mogielnicka-Brzozowska, M. Proteomic Analysis of Intracellular and Membrane-Associated Fractions of Canine (*Canis lupus familiaris*) Epididymal Spermatozoa and Sperm Structure Separation. *Animals* 2022, 12, 772. DOI: 10.3390/ani12060772 (IF = 3.231; pts = 100).
2. Żmudzińska, A.; Wiśniewski, J.; Młynarz, P.; Olejnik, B.; Mogielnicka-Brzozowska, M. Age-Dependent Variations in Functional Quality and Proteomic Characteristics of Canine (*Canis lupus familiaris*) Epididymal Spermatozoa. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 9143. DOI: 10.3390/ijms23169143 (IF = 6.208; pts = 140).

The candidate is the first author of both papers, and her declared participation in the preparation and development of the manuscripts is high, at 65%, which was confirmed by an appropriate statement. The candidate's contribution to the papers consisted in planning and developing the research methodology, acquiring and describing the research material, adapting the software for the analyses, carrying out the research, analysing and interpreting the results, writing the manuscript, and carrying out the editorial process. Both papers were published in journals with international scope, with an impact factor (total points 240 and IF 9.439). It should be noted that these papers received positive reviews from international experts associated with the subject matter and are of high scientific value.

The doctoral thesis submitted for review is written in English and contains 85 pages. The chapters are as follows: Table of Contents (p. 3), Acknowledgements (p. 4), List of

Papers (p. 5), List of Abbreviations (p. 6), Abstracts (p. 7-10), Introduction (p. 11-12), Aims (p. 13), Material and Methods (p. 14-18), Results and Summary of Papers (p. 19-21), Conclusions (p. 24) and Bibliography (p. 25-30), containing 50 literature references.

The doctoral thesis takes the form of a typescript succinctly describing the research results contained in the series of publications. It forms a coherent and logical whole and contains all the essential elements characterizing this type of work.

The title is correctly formulated, although mainly reflective of publication no. 2, while expressing little of the scope of the research in publication no. 1. In the introduction to the thesis, the candidate has concisely introduced the subject of the research and presented information demonstrating the importance of the issues undertaken. The author has used well-selected literature sources to present the most important questions concerning the role of proteomic analyses in explaining the functions of proteins at various stages of sperm maturation in the epididymal duct and the process of sonication in isolation of sperm proteins and cell structures. The arrangement of content in this chapter is well thought-out and reveals a good knowledge of the subject matter taken up by the candidate in her research.

Following the concise and informative introduction to the most important issues of the paper, the candidate presented the objectives and assumptions of the research. The main research objective was to investigate the relationship between the functional quality and proteome of epididymal spermatozoa of dogs differing in age. This aim was achieved by meeting a set of specific aims (points I-VII). The aims presented in points I-III were achieved in publication no. 1, while aims IV to VII were met in publication no. 2. They concerned analysis of the effects of various sonication parameters on the type and percentage of morphological changes in sperm collected from the dog epididymis and on the total content of intracellular proteins and proteins associated with the sperm membrane, as well as identification of differences in protein composition and identification of selected proteins by mass spectrometry (publication no. 1); and evaluation of the functional quality of sperm and proteome analysis of epididymal sperm depending on the age of the dog (publication no. 2). In my opinion the objectives of the research – both the overall aim and specific aims – were correctly formulated and raise no objectives. However, I believe that in this part of the dissertation, research hypotheses should be formulated before the aim of the research is presented. While such a hypothesis was put forth in one of the papers making up the scientific achievement, there was no such hypothesis in the other paper.

The 'Material and Methods' chapter is developed correctly and in detail. The author describes the procedures and experimental material correctly and in a manner that is easily

understood. The material is described as semen collected from the epididymides of 'from 15 to 30 dogs'. In my opinion it should be precisely stated which analyses were conducted using 15 dogs and which using 30 dogs; is it possible that some individuals were used in the studies described in both papers? The choice of research material and the methods used should be considered adequate to the assumptions made by the candidate when she undertook the research. The material was of sufficient sample size and was analysed using advanced diagnostic techniques. The statistical analysis of the results raises no objections. Given the specifics of this type of research and the difficulties involved in conducting it, including collection of suitable research material, the candidate can be said to have organized and carried out the analyses in a consistent and very well-thought out manner.

In the next chapter, 'Results and Summary of Papers', the candidate describes the results presented in the attached publications in a concise manner. The research presented in publication no. 1 showed the presence of two protein fractions in sperm, intracellular (SIPs) and membrane-associated (SMAPs). These protein fractions were shown to take part in important metabolic pathways in epididymal sperm, which may suggest their potential as biomarkers of semen quality. In this study the candidate also determined the optimal sonication parameters for separating individual morphological structures of sperm and isolating proteins. She found that sonication using an Omni Sonic Ruptor 250 ultrasonic homogenizer with power of 150 W, carried out for 10 minutes, results in successful isolation of sperm structures. It should be noted here that these analyses were carried out using semen collected from the epididymides of dogs in an age range of 1 to 6 years. This raises the question of whether the sonication process may be influenced by the age of the dog. In the second publication included in the series upon which the thesis is based, the candidate did assess the impact of the dogs' age on semen quality and proteomic analysis, but using only one sonication parameter.

In publication no. 2 the candidate attempted to determine the relationship between the functional quality and proteome of epididymal sperm of dogs of various ages. She showed that semen quality parameters were significantly lower in older dogs (78–132 months – group III) than in dogs at the age of 12–41 months (group I). The candidate identified 865 proteins in the first group, 472 in the second, and 435 in the third. Many age-dependent differences were detected in the proteome composition of the sperm, and these were associated with important metabolite pathways, which may suggest that several proteins are involved in sperm maturation and may be potential biomarkers of ageing.

The candidate formulated six conclusions on the basis of the research results. In my opinion, this chapter should be titled 'Findings and Conclusions', because most of the points represent findings rather than conclusions. Reading this part of the thesis alone does not provide a full picture of the research presented. I suggest revising points 1 and 6, and I would also consider combining points 4 and 5. Conclusion 1 is too general. In point 6 it would be good to specify by the type of analysis, so that the reader could have a full picture of the usefulness of these analyses without knowing the entire contents of the paper.

To conclude, the comments and suggestions expressed above are editorial comments which do not in any way diminish the substantive value of the doctoral thesis. I have a positive opinion of the entire thesis, which is a valuable scientific paper. It is indicative of the author's good practical and scientific preparation and her mastery of the skills of developing and editing a scientific work. I am impressed by the wide range of laboratory analyses performed by the candidate, requiring dedication and precision, and her skill in using modern analytical techniques.

Taking into account the usefulness of the research, the means and scope of its realization, and the innovative nature of Ms Anna Żmudzińska's doctoral thesis, I conclude that the thesis submitted for evaluation, 'Age related changes in proteome and quality parameters of sonicated dog epididymal spermatozoa', fully meets the requirements for doctoral theses specified in art. 187 of the Act of 20 July 2018, Law on Higher Education and Science (consolidated text: Journal of Laws of 2022, item 574, as amended).

In view of the above, I present to the Scientific Council of the Discipline of Animal Science and Fisheries, University of Warmia and Mazury in Olsztyn a motion to admit Anna Żmudzińska to the subsequent stages of the doctoral process.

Anna Wysocka

Dr hab. Anna Wysokińska, prof. uczelni
Instytut Zootechniki i Rybactwa
Wydział Agrobioinżynierii i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny w Siedlcach

Siedlce, 05.01.2023r.

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Żmudzińskiej
pt. „Wpływ wieku psa na zmiany w proteomie i parametrach jakości plemników
najądrzowych poddanych sonikacji”
wykonanej w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
pod kierunkiem
dr hab. inż. Marzeny Mogielnickiej-Brzozowskiej, prof. UWM
i dr hab. inż. Magdaleny Zielińskiej, prof. UWM

Recenzję pracy doktorskiej wykonano w odpowiedzi na Pismo Pana prof. dr. hab. Tomasza Daszkiewicza, Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 08.11.2022 r. (nr pisma WBZ-DZ.6350.3.1.2021).

Problem naukowy i znaczenie badań

W związku ze stale rosnącym zainteresowaniem hodowlą psów, istnieje potrzeba pogłębiania wiedzy w zakresie szeroko pojętej specyfiki rozrodu tego gatunku zwierząt, szczególnie w zakresie doskonalenia technik wspomaganego rozrodu. Większość badań prowadzonych na nasieniu psów oparta jest na plemnikach pobieranych z ejakulatu. W przypadkach, kiedy nie można ocenić plemników z ejakulatu, alternatywą jest pozyskanie komórek płciowych z najądrzy. Możliwość taka może okazać się niezwykle istotna dla dalszego rozwoju technik wspomaganego rozrodu i ochrony cennych genetycznie zwierząt. Badania właściwości nasienia pozyskanego z najądrzy mogą okazać się kluczowe w ochronie zagrożonych gatunków psowatych, co może być istotne, zwłaszcza w przypadku nagłej śmierci osobnika o cennych zasobach genetycznych. Innym ważnym aspektem badań na nasieniu psów jest coraz częstsze pojawianie się różnych chorób, które mogą eliminować, cenne pod względem genetycznym, osobniki z rozrodu. Istnieje zatem konieczność oceny stopnia rozwoju plemników pobieranych z najądrzy. Podczas pasażu nasienia przez przewód najądrza zachodzą zmiany w strukturach plemnika. Bardzo ważną rolę w tym procesie odgrywiają składniki białkowe pochodzące z przewodów najądrza. Zarówno interakcja białek z błoną plazmatyczną plemników, jak i rekompozycja białek wewnętrznych odgrywiają

podstawową rolę w dojrzewaniu plemników w najądrzach. Plemniki najądrza różnią się od plemników wytryskujących, ponieważ są pokryte jedynie białkami płynu najądrza i nie mają kontaktu z białkami wydzielanymi przez gruczoły dodatkowe. Na funkcje białek, które są ściśle związane ze zdolnością zapładniającą plemników mogą wpływać różne czynniki. Niewiele wiadomo na temat mechanizmów molekularnych związanych ze zmianami w składzie białek i ich wpływem na jakość nasienia podczas dojrzewania plemników w najądrzach.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Żmudzińskiej doskonale wpisuje się w powyższą problematykę, a badania podjęte przez Doktorantkę są w pełni zasadne i celowe.

Ocena formalna i merytoryczna

Podstawą przedłożonej do recenzji rozprawy doktorskiej zatytułowanej ‘Wpływ wieku psa na zmiany w proteomie i parametrach jakości plemników najądrzowych poddanych sonikacji’ jest spójny tematycznie zbiór dwóch oryginalnych prac naukowych opublikowanych w czasopismach wyróżnionych w bazie Journal Citation Reports:

1. Żmudzińska, A.; Bromke, M.A.; Strzeżek, R.; Zielińska, M.; Olejnik, B.; Mogielnicka-Brzozowska, M. Proteomic Analysis of Intracellular and Membrane-Associated Fractions of Canine (*Canis lupus familiaris*) Epididymal Spermatozoa and Sperm Structure Separation. *Animals* 2022, 12, 772. DOI: 10.3390/ani12060772 (IF = 3.231; pts = 100).
2. Żmudzińska, A.; Wiśniewski, J.; Młynarz, P.; Olejnik, B.; Mogielnicka-Brzozowska, M. Age-Dependent Variations in Functional Quality and Proteomic Characteristics of Canine (*Canis lupus familiaris*) Epididymal Spermatozoa. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 9143. DOI: 10.3390/ijms23169143 (IF = 6.208; pts = 140).

W obu pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a deklarowany przez Nią udział w przygotowaniu i opracowaniu manuskryptów jest wysoki i wynosi po 65%, co zostało potwierdzone stosownym oświadczeniem. Wkład Doktorantki w powstawanie prac polegał na zaplanowaniu i opracowaniu metodyki badań, pozyskaniu i opisanu materiału badawczego, dostosowaniu oprogramowania do analiz, przeprowadzeniu procesu badawczego, analizie i interpretacji wyników, napisaniu publikacji oraz przeprowadzeniu procesu redakcyjnego. Oba opracowania zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym, posiadają współczynnik oddziaływania IF (łącznie suma punktów wynosi 240 i IF 9,439). Należy zaznaczyć, że publikacje te uzyskały pozytywne oceny ekspertów międzynarodowych związanych z daną problematyką i charakteryzują się wysoką wartością naukową.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska napisana jest w języku angielskim i zawiera ogółem 85 stron. Poszczególne rozdziały to: Spis treści (s. 3), Podziękowania (s. 4), Spis prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej (s. 5), Wykaz skrótów (s. 6), Streszczenia (s. 7-10), Wstęp (s. 11-12), Cele pracy (s. 13), Materiał i Metody (s. 14-18), Wyniki i podsumowanie prac (s. 19-21), Wnioski (s. 24) i Piśmiennictwo (s. 25-30) zawierające 50 pozycji literatury. W kolejnych częściach pracy dołączono kopie publikacji i oświadczenia współautorów.

Praca doktorska ma postać zwartej maszynopisu, syntetycznie opisującego uzyskane wyniki badań zawarte w cyklu publikacji. Tworzy ona spójną i logiczną całość i zawiera wszystkie niezbędne elementy charakteryzujące tego typu opracowania.

Tytuł dysertacji jest sformułowany poprawnie, aczkolwiek bardziej ukierunkowany na publikację nr 2, natomiast w niewielkim stopniu zawiera zakres badań przedstawionych w publikacji nr 1. We wstępie pracy Doktorantka w sposób syntetyczny dokonała wprowadzenia w tematykę podjętych badań i przedstawiła informacje uzasadniające znaczenie podjętej problematyki. W oparciu o dobrze dobrane piśmiennictwo Autorka przedstawiła w nim najważniejsze zagadnienia dotyczące znaczenia badań proteomicznych w wyjaśnieniu funkcji białek na różnych etapach dojrzewania plemników w przewodzie najądrza oraz procesu sonikacji w izolowaniu białek i struktur komórkowych plemników. Rozdział ma przemyślany układ treści i dowodzi dobrej znajomości problematyki, którą Doktorantka zajmowała się w swoich badaniach.

Po zwięzłym i informacyjnym wprowadzeniu w najistotniejszą problematykę pracy, Doktorantka przedstawiła cele oraz założenia podjętych badań. Głównym celem badawczym było określenie związku pomiędzy parametrami jakościowymi a proteomem plemników pobranych z najądrza psów różniących się wiekiem. Cel ten był osiągnięty poprzez realizację celów szczegółowych (punkty I.–VII.). Cele określone w punktach I-III zrealizowano w publikacji nr 1, natomiast cele od IV do VII punktu w publikacji nr 2. Dotyczyły one analizy wpływu różnych parametrów sonikacji na rodzaj i odsetek zmian morfologicznych plemników pobranych z najądrza psa oraz na całkowitą zawartość białka we frakcjach wewnątrzkomórkowych i związanych z błoną plemnika oraz wykazania różnic w składzie białkowym i zidentyfikowanie wybranych białek metodą spektrometrii mas (publikacja nr 1) oraz oceny cech jakościowych plemników i analizy proteomu plemników najądrza w zależności od wieku psa (publikacja nr 2). W mojej opinii cele badań, ogólny oraz szczegółowe, zostały sformułowane merytorycznie poprawnie i nie budzą zastrzeżeń. Uważam jednak, że w tej części pracy, przed przedstawieniem celu badań, powinny zostać

sformułowane hipotezy badawcze. Co prawda w jednej z prac, która wchodzi w skład osiągnięcia naukowego, taka hipoteza została wysunięta, ale z kolei w drugiej pracy takiej hipotezy nie przedstawiono.

Rozdział „Materiał i metody” jest opracowany poprawnie i szczegółowo. Autorka w sposób zrozumiały i właściwy opisuje zastosowane procedury badawcze oraz materiał doświadczalny, którym było nasienie pobrane z najądrzy psów: cytuję „od 15 do 30 psów”. Uważam, że należałoby doprecyzować, w której pracy przeprowadzono badania na 15 psach, a w której na 30 psach; czy być może, niektóre osobniki brały udział w badaniach uwzględnionych w obu publikacjach? Dobór materiału badawczego i zastosowanych metod uznać należy za adekwatny do założeń, jakie postawiła sobie Doktorantka rozpoczynając badania. Przeprowadziła je na wystarczająco licznych materiale, który poddała ocenie stosując zaawansowane techniki diagnostyczne. Opracowanie statystyczne wyników również nie budzi zastrzeżeń. Znając specyfikę i trudności w przeprowadzaniu tego typu badań, w tym również w zebraniu odpowiedniego materiału badawczego, stwierdzić można, że Doktorantka bardzo konsekwentnie i w sposób bardzo przemyślany zorganizowała i przeprowadziła zaplanowane analizy.

W kolejnym rozdziale „Wyniki i podsumowanie prac” Doktorantka dokonała zwięzłej charakterystyki uzyskanych wyników, które szczegółowo zostały przedstawione w dołączonych publikacjach. W badaniach zaprezentowanych w publikacji nr 1 wykazano obecność dwóch frakcji białkowych plemników, tj. wewnątrzkomórkowych (SIPs) i związanych z błoną (SMAPs). Wykazano również, że białka te uczestniczą w ważnych szlakach metabolicznych plemników najądrzowych, co może sugerować ich potencjał jako biomarkerów jakości nasienia. W badaniach tych Doktorantka określiła również optymalne parametry sonikacji dla rozdzielenia poszczególnych struktur morfologicznych plemników i izolacji białek. Stwierdziła, że sonikacja przy użyciu homogenizatora ultradźwiękowego Omni Sonic Ruptor 250 o mocy 150 W, przeprowadzona w ciągu 10 minut, powoduje skuteczną izolację struktur plemnika. Należy tutaj zaznaczyć, że analizy te były przeprowadzone na nasieniu pobranym z najądrzy psów, które były w wieku od 1 do 6 lat. Nasuwa mi się tutaj pytanie: czy na proces sonikacji może wpływać wiek psa? Co prawda w kolejnej publikacji, która jest włączona do cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską, Doktorantka zajęła się oceną wpływu wieku psa na jakość nasienia i analizę proteomiczną, ale przy zastosowaniu tylko jednego parametru sonikacji.

W publikacji nr 2 Pani Magister podjęła próbę określenia związku pomiędzy jakością funkcjonalną a proteomem plemników najądrzowych psów w różnym wieku. Wykazała, że

parametry jakości nasienia były istotnie niższe u starszych psów (w wieku 78-132 miesięcy – grupa III) niż u osobników w wieku 12-41 miesięcy (grupa I). Doktorantka zidentyfikowała w grupie pierwszej psów 865 białek, w grupie drugiej 472 i w grupie trzeciej 435 białek. W składzie proteomu plemników wykryto zależne od wieku zmiany, które były powiązane z ważnymi szlakami metabolitów, co może sugerować, że kilka białek jest zaangażowanych w dojrzewanie plemników i mogą być potencjalnymi biomarkerami starzenia.

Na podstawie uzyskanych wyników badań Doktorantka sformułowała sześć wniosków. Myślę, że rozdział ten powinien być zatytułowany „Stwierdzenia i wnioski”, ponieważ większość punktów, są bardziej stwierdzeniami niż wnioskami. Sama lektura tej części dysertacji nie daje pełnego obrazu przedstawionych badań. Sugeruję przeredagowanie punktu 1. i 6.; ponadto rozważyłabym połączenie punktów 4. i 5. Wniosek 1 jest zbyt ogólnie sprecyzowany. W punkcie 6 dobrze by było wskazać konkretny rodzaj badań, tak aby czytający wnioski miał pełen obraz przydatności tych badań bez znajomości całej treści pracy.

Podsumowując, wyrażone powyżej uwagi oraz sugestie wynikające z obowiązku recenzenta, mają charakter uwag korekcyjnych i nie umniejszają w żaden sposób wartości merytorycznej dysertacji doktorskiej. Praca stanowi wartościowe opracowanie naukowe, które w całości oceniam pozytywnie. Świadczy o dobrym przygotowaniu praktycznym i naukowym Autorki, a także o opanowaniu umiejętności opracowania i redagowania pracy naukowej. Wysoko oceniam szeroki zakres analiz laboratoryjnych, które Doktorantka wykonała, wymagających zaangażowania i precyzji, a także umiejętności wykorzystania nowoczesnych technik badawczych.

Biorąc pod uwagę celowość podjętych badań, sposób i zakres ich realizacji, nowatorski charakter przedstawionej do oceny rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Żmudzińskiej, stwierdzam, że oceniana praca pt.: „Wpływ wieku psa na zmiany w proteomie i parametrach jakości plemników najądrzowych poddanych sonikacji” w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.).

W związku z powyższym przedstawiam Radzie Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie mgr inż. Anny Żmudzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Wysocka

