

dr hab. Dariusz Gączarzewicz, prof. ZUT
Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Biotechnologii i Nauk o Zwierzętach
ul. Klemensa Janickiego 29
71-270 Szczecin

Szczecin, 30 sierpnia 2026 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej **mgr inż. Aleksandry Wiktorii Cichowskiej-Likszo**
pt. „Białkowe markery jakości nasienia najądrzowego psa” wykonanej
pod kierunkiem dr hab. inż. Marzeny Mogielnickiej-Brzozowskiej, prof. UWM
w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt na Wydziale Bioinżynierii Zwierząt
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

Podstawa prawna i formalna sporządzenia recenzji

Podstawą przygotowania niniejszej recenzji jest pismo z dnia 26 czerwca 2026 roku Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie – Pani prof. dr hab. Doroty Witkowskiej – o powołaniu mnie uchwałą Rady Naukowej z dnia 8 czerwca 2026 roku na recenzenta w postępowaniu o nadanie stopnia doktora mgr inż. Aleksandrze Wiktorii Cichowskiej-Likszo, wszczętym 28 maja 2026 roku. Ocenę rozprawy wykonano na podstawie dokumentacji dostarczonej mi w formie elektronicznej (nośnik USB, 3 lipca 2026 r.), zgodnie z wymogami art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 roku poz. 1571 z późn. zm.).

Problem naukowy i znaczenie badań

Standardowa ocena seminologiczna, obejmująca przede wszystkim analizę podstawowych parametrów jakości ejakulatu, ma ograniczoną wartość w identyfikacji niektórych zaburzeń funkcjonalnych plemników i nie zawsze pozwala na określenie ich etiologii. Problem ten jest szczególnie istotny w przypadkach niepłodności idiopatycznej, w których obserwowane nieprawidłowości funkcjonalne plemników mogą pozostawać niewykryte w standardowej diagnostyce. Zdolność plemników do osiągnięcia pełnej kompetencji funkcjonalnej jest bowiem kształtowana nie tylko na etapie spermatogenezy, lecz również podczas ich przechodzenia przez najądrze, w którym zachodzą złożone procesy ich dojrzewania związane z dynamiczną przebudową molekularnego środowiska światła przewodu najądrza. Zachodzące w nim zmiany obejmują między innymi selektywne wydzielanie, modyfikację i wymianę składników białkowych pomiędzy płynem najądrzowym a powierzchnią plemników, a tym samym mogą determinować nabywanie przez nie określonych właściwości strukturalnych i funkcjonalnych. Pomimo kluczowego znaczenia tych procesów molekularna charakterystyka płynu najądrzowego, w tym jego złożony i dynamiczny proteom, nadal pozostaje niedostatecznie poznana, zwłaszcza w odniesieniu do zmian zachodzących na poszczególnych etapach życia samca. W tym kontekście proteomika stwarza możliwość wielowymiarowej charakterystyki białkowego środowiska, w którym przebiega dojrzewanie plemników, umożliwiając identyfikację jego komponentów oraz potencjalnych zależności pomiędzy ich obecnością a procesami warunkującymi prawidłową funkcjonalność gamet samca. Szczególnego znaczenia nabiera analiza tych zależności również w kontekście starzenia się organizmu, ponieważ związane z wiekiem zmiany w składzie i funkcjonowaniu mikrośrodowiska najądrza mogą

modyfikować przebieg dojrzewania plemników, ich zdolność do poruszania się, integralność strukturalną oraz zdolność do zapłodnienia. O ile zależne od wieku zmiany jakości ejakulatu i funkcji plemników zostały udokumentowane u różnych gatunków ssaków, o tyle znacznie mniej rozpoznane pozostają mechanizmy molekularne leżące u podłoża tych zmian oraz ich związek z funkcjonowaniem najądrza. Niedostateczny stan wiedzy dotyczy również samca psa, u którego poznanie zależności pomiędzy składem molekularnym płynu najądrzowego, procesami dojrzewania plemników i zmianami związanymi z wiekiem może stanowić istotny element poszerzania wiedzy o biologicznych uwarunkowaniach płodności tego gatunku. W tym kontekście przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w aktualny i interdyscyplinarny nurt badań nad nadal niedostatecznie poznanymi mechanizmami molekularnymi leżącymi u podstaw dojrzewania i funkcjonalności plemników w obrębie najądrza.

Opis i ocena pracy

Przeznaczoną do oceny rozprawę doktorską mgr inż. Aleksandry Cichowskiej-Likso zgodnie z wymogami formalnymi stanowią trzy spójne tematycznie prace naukowe, jedna przeglądowa oraz dwie oryginalne prace twórcze, przedłożone w opracowaniu pod wspólnym tytułem „Białkowe markery jakości nasienia najądrzowego psa”. W skład prac wchodzi następujące publikacje:

1. Mogielnicka-Brzozowska, M., Cichowska, A.W. (2024). Molecular biomarkers of canine reproductive functions. *Current Issues in Molecular Biology*, 46, 6139–6168.
2. Cichowska, A.W., Wisniewski, J., Bromke, M.A., Olejnik, B., Mogielnicka-Brzozowska, M. (2023). Proteome profiling of canine epididymal fluid: In search of protein markers of epididymal sperm motility. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 14790.
3. Cichowska-Likso, A.W., Likso, P., Fraser, L., Mlynarz, P., Mogielnicka-Brzozowska, M. (2026). ALB, GPX5 and PTGDS as potential biomarkers for the aging processes of the dog epididymis. *Reproduction, Fertility and Development*, 38, RD25105.

Powyższe prace zostały opublikowane odpowiednio w latach 2024, 2023 oraz 2026 w recenzowanych, angielskojęzycznych czasopismach naukowych indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR) (*Current Issues in Molecular Biology* IF = 3,0; *International Journal of Molecular Sciences* IF = 4,9; *Reproduction, Fertility and Development* IF = 2,1). Sumaryczny wskaźnik oddziaływania dla tych prac wyliczony zgodnie z rokiem ich publikacji wynosi 10, natomiast ich całkowita wartość punktowa według wykazu czasopism naukowych MNIŚW wynosi 350 punktów. Wskaźniki te świadczą o wysokim poziomie naukowym opublikowanych prac, które aktualnie mają 17 cytowań według bazy Scopus. Pierwsza praca stanowi opracowanie dwuautorskie, w którym Doktorantka jest drugim autorem. W dwóch kolejnych pięcioautorskich publikacjach zajmuje pozycję pierwszego autora, a w jednej z nich pełni również funkcję autora korespondencyjnego. Każda z prac powstała przy kluczowym udziale Kandydatki, co zostało potwierdzone oświadczeniami podpisanymi przez wszystkich współautorów publikacji wchodzących w skład dysertacji. Wkład ten obejmował między innymi współudział w wytyczeniu koncepcji prac, przygotowanie metodyki, przeprowadzenie większości analiz (w pracach oryginalnych) oraz krytyczny przegląd piśmiennictwa (w pracy przeglądowej), a także opracowanie wyników, napisanie i przygotowanie manuskryptów do druku. Wskazuje to na duże zaangażowanie Doktorantki w cały proces powstawania i wydawania tych artykułów.

Integralną częścią pracy doktorskiej jest autorskie, zwarte opracowanie (liczące 46 stron) poprzedzające pełne teksty publikacji, w którym zostały one wspólnie zestawione i omówione (całość

liczy 130 stron). W tej części rozprawy Doktorantka – oprócz wykazu artykułów naukowych stanowiących przedmiot pracy doktorskiej – wyodrębniła charakterystyczne dla tego typu opracowań rozdziały: „Wstęp”, „Cel, zakres badań i hipotezy badawcze”, „Materiał i metody”, „Wyniki i omówienie”, „Podsumowanie i wnioski” oraz „Spis literatury” cytowanej w części opisowej rozprawy (61 pozycji). Dysertację uzupełniają: „Wykaz skrótów”, „Streszczenie” (w języku polskim i angielskim), „Spis rycin”, „Wykaz materiałów uzupełniających”, a także kopie wchodzących w jej skład prac naukowych i oświadczenia współautorów dotyczące udziału w publikacjach. Ponadto Autorka zamieściła informacje i zestawienie bibliometryczne swojego dotychczasowego dorobku naukowego. Rozprawa doktorska zawiera wszystkie niezbędne dla takich opracowań elementy, a ich układ w dysertacji jest przejrzysty i tworzy spójną, logiczną całość, która – podobnie jak tytuł pracy – nie budzi moich zastrzeżeń.

Rozdział „Wstęp”, obejmujący 3 strony, stanowi syntetyczne wprowadzenie do tematyki rozprawy. Doktorantka nakreśliła w nim problem badawczy i uzasadniła znaczenie podjętych badań, podkreślając przy tym aspekty poznawcze i aplikacyjne tematyki pracy. Autorka opisuje między innymi rolę najądrza oraz złożoność morfologicznych i biochemicznych procesów zachodzących w obrębie struktur komórkowych plemnika, które warunkują osiągnięcie funkcjonalności gamet samca. Zwraca uwagę na niepełną wiedzę dotyczącą mechanizmów regulujących, które związane są z przemianami plemników w najądrzu, a także na niewyjaśniony dotąd wpływ procesu starzenia samców na zmiany składu płynu najądrzowego oraz ich oddziaływanie na dojrzewanie i ruchliwość plemników u psa. Podkreśla przy tym znaczenie psa jako gatunku modelowego, który w zakresie wybranych mechanizmów funkcjonowania układu rozrodczego i zaburzeń płodności może stanowić odniesienie do procesów występujących u innych ssaków, w tym człowieka. Wskazuje również na potencjalne znaczenie plemników najądrzowych w ochronie zasobów genetycznych cennych psów hodowlanych oraz gatunków zagrożonych wyginięciem. Ponadto zauważa, że ograniczenia standardowych metod diagnostyki andrologicznej wymagają wykorzystania zaawansowanych metod proteomicznych, które umożliwią identyfikację molekularnych biomarkerów jakości nasienia. Zwięzła i sygnalizacyjna forma opisu zastosowana w rozdziale wprowadzającym – podkreślę, że zasadna ze względu na szeroki zakres problematyki i złożone podłoże procesów dotyczących dojrzewania plemników w najądrzu – zredagowana została przez Autorkę poprawnym, jasnym w odbiorze językiem naukowym, w oparciu o właściwie dobrane materiały źródłowe. W mojej opinii świadczy to o dobrej znajomości przedmiotowego piśmiennictwa, odpowiednim przygotowaniu do pracy badawczej oraz odzwierciedla umiejętności Doktorantki w sprawnym posługiwaniu się warsztatem redakcyjnym.

Mając na uwadze ograniczoną wiedzę dotyczącą składu biochemicznego środowiska zewnątrzkomórkowego plemników w najądrzu oraz wpływu jego komponentów na właściwości funkcjonalne plemników psa, w dalszej części pracy Autorka czytelnie i jasno przedstawiła trzy cele oraz pięć spójnych względem nich hipotez badawczych. Wyjściowym założeniem rozprawy było dokonanie przeglądu dotychczas poznanych biomarkerów molekularnych przydatnych w ocenie jakości nasienia psa (co zawarto w publikacji 1), a następnie przeprowadzenie szczegółowej analizy proteomu płynu najądrzowego w zależności od parametrów ruchliwości plemników oraz wieku samca. Kluczowym celem pracy była selekcja markerów białkowych płynu najądrzowego i wskazanie tych, które związane są z ruchem plemników i wiekiem psa (publikacje 2 i 3). Sformułowane w rozprawie hipotezy badawcze oceniam jako logiczne, merytorycznie uzasadnione oraz precyzyjnie osadzone w dwóch kompleksowo zaplanowanych i skutecznie zrealizowanych przez Autorkę zadaniach badawczych, które bezpośrednio korespondują z obiema oryginalnymi publikacjami prezentowanymi w dysertacji. Pierwsze z nich koncentrowało się na wytypowaniu białek występujących w płynie ogona najądrza o potencjalnym znaczeniu markerowym w odniesieniu do ruchliwości plemników

(publikacja 2). Natomiast w drugim zadaniu badawczym Doktorantka skupiła się na identyfikacji markerów białkowych płynu ogona jako wyznaczników procesu starzenia się tego narządu u psa (publikacja 3).

Sposób realizacji części eksperymentalnej Autorka przedstawiła w kolejnym rozdziale pracy („Materiał i metody”). Został on podzielony na podrozdziały zawierające zrozumiały opis pozyskania i przygotowania materiału do badań, wszystkich zastosowanych metod badawczych oraz struktury układu eksperymentalnego, z właściwymi odniesieniami do ich szczegółowej charakterystyki w poszczególnych publikacjach (2 i 3). Materiał badawczy stanowiły plemniki wraz z płynem zewnątrzkomórkowym aspirowane z segmentu ogona prawego i lewego najądrza (łączonych po pobraniu), które pozyskano od 23 psów mieszańców poddanych orchiektomii w wieku od 1 do 11 roku życia. W pobranym materiale przeprowadzono komputerową analizę ruchliwości plemników (system HTM-IVOS). Oceniono poszczególne parametry kinematyczne, a także wielkość poszczególnych subpopulacji pod względem prawidłowości i prędkości ruchu plemników. Za pomocą komory Bürkera określono ponadto ich koncentrację. W badaniach płynu najądrzowego Doktorantka zastosowała zintegrowaną wysokoprzepustową analizę proteomiczną. W tym zakresie wykorzystwała nano-ultrawysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z kwadropolową spektrometrią mas z pomiarem czasu przelotu (nanoUPLC-Q-TOF/MS), a do walidacji uzyskanych wyników – technikę Western blot (z użyciem SDS-PAGE) (w recenzji zastosowano skróty przyjęte w dysertacji; dla zachowania przejrzystości tekstu niektóre z nich nie są dodatkowo objaśniane). Identyfikację i analizę funkcjonalną białek przeprowadziła za pomocą zaawansowanych specjalistycznych narzędzi bioinformatycznych (Byonic, Swiss-Prot, PANTHER, ToppCluster, STRING, KOBAS 3.0). Uważam, że zastosowane metody pozwoliły Doktorantce na poprawną w kontekście postawionych założeń realizację części badawczej pracy. Ich wybór należy uznać za bardzo trafną decyzję zwiększającą walor aktualności i nowatorskiego podejścia do wykonanych badań, które dzięki temu wpisują się w wysokie standardy współczesnej andrologii i biologii molekularnej.

Poszczególne zadania badawcze zrealizowane zostały w dwóch układach eksperymentalnych. W pierwszym Autorka wykorzystwała wyniki komputerowej oceny ruchliwości plemników. Na ich podstawie wyodrębniła i zestawiała grupę o dobrej ruchliwości plemników, przyjmując jako kryterium co najmniej 55% plemników wykazujących ruch postępowy (GSM, $n = 13$), z grupą o obniżonej ruchliwości plemników, w której stwierdziła niższą wartość wskaźnika kwalifikacyjnego (PSM, $n = 10$) (publikacja 2). W drugim układzie eksperymentalnym, opartym na kryterium wieku samca, wyróżniła grupę psów młodych w wieku 1–3 lat ($n = 8$), dorosłych w wieku 3,5–6 lat ($n = 8$) oraz starych w wieku 6,5–11 lat ($n = 7$) (publikacja 3). Sposób przeprowadzenia analizy statystycznej Doktorantka opisuje w ostatniej części omawianego rozdziału. Nie mam zastrzeżeń do zastosowanych w tej ocenie testów oraz opracowania statystycznego (analiza wariancji ANOVA, test t-Studenta, test U Manna–Whitneya, test Kruskala–Wallisa, współczynnik korelacji rang Spearmana).

Wyniki badań Autorka przedstawiła w kolejnym rozdziale dysertacji adekwatnie do postawionych celów i zadań badawczych (nr 1 i nr 2). Pierwszy cel pracy zrealizowany został w publikacji 1 o charakterze przeglądowym, w której przedstawiono stan wiedzy dotyczącej molekularnych biomarkerów funkcji rozrodczych samca psa. Opracowanie to stanowi szerokie i kompleksowe ujęcie analizowanej tematyki. Zestawia ono informacje o potencjalnych biomarkerach przydatnych w ocenie funkcjonalnych właściwości plemników, jakości ejakulatu i potencjału rozrodczego samca, ze wskazaniem na możliwość ich wykorzystania w praktyce hodowlanej, diagnostyce zaburzeń rozrodu, ocenie przydatności nasienia do kriokonserwacji i technik wspomaganego rozrodu. Publikacja obejmuje różne wyodrębnione przez Autorkę grupy, w których poszczególne biomarkery scharakteryzowano, uwzględniając ich pochodzenie, lokalizację w obrębie układu rozrodczego i plemnika, a także znane i potencjalne funkcje biologiczne. Uczestniczą one

w wielu, często wzajemnie powiązanych procesach warunkujących prawidłowe funkcjonowanie plemników i ich zdolność do zapłodnienia, przede wszystkim w procesach spermatogenezy i dojrzewania plemników, kształtowania i utrzymania integralności błony komórkowej, regulacji ruchliwości, kapacytacji oraz reakcji akrosomowej, a także interakcji plemników z komórkami i środowiskiem układu rozrodczego samicy. Białka markerowe usystematyzowano jako dobrze poznane (AKAPs, ALBs, ALPL, CLU, CPSE, CRISP2, LTF, MMPs, OPN oraz PTGDS) oraz jako nowo rozpoznawane lub dotychczas słabiej scharakteryzowane (m.in. ACRBP, ACTB, CEMIP, ELSPBP1, LOC607874, NPC2). Odrębnie opisano również enzymy antyoksydacyjne (w tym SOD, GPX i CAT), ze względu na ich istotną rolę w utrzymaniu równowagi oksydoredukcyjnej oraz ochronie plemników przed stresem oksydacyjnym. W publikacji zostały ponadto uwzględnione biomarkery niebiałkowe, które podobnie jak markery białkowe zaangażowane są w różne aspekty funkcjonowania plemników, począwszy od utrzymania homeostazy komórkowej podczas ich powstawania i dojrzewania, po nabywanie kompetencji do zapłodnienia. W tym kontekście przedstawiono znaczenie lipidów (w tym kwasów tłuszczowych i fosfatydylocholiny), węglowodanów (przede wszystkim glikozaminoglikanów) oraz jonów (cynku i wapnia).

W publikacji wskazano, że spośród opisanych molekularnych markerów funkcji rozrodczych możliwe jest wyodrębnienie tych, które potencjalnie mogą w przyszłości znaleźć praktyczne zastosowanie w rozrodzie psów. Mogą one uzupełniać standardową ocenę seminologiczną, dostarczać informacji o potencjale reprodukcyjnym samca oraz o przydatności nasienia do procedur wspomaganego rozrodu. Mogą być również wykorzystywane jako biomarkery niektórych chorób narządów rozrodczych (nowotworów gruczołu krokowego i jąder), a także zaawansowania zmian w ich obrębie związanych z wiekiem samca. Niemniej jednak, jak słusznie wskazuje Doktorantka, wartość predykcyjna poszczególnych biomarkerów wymaga dalszych badań, których kierunki zostały poniekąd wyznaczone w omawianej publikacji. W mojej opinii stanowi ona wartościowe opracowanie bazujące na rzetelnie dokonanym przeglądzie piśmiennictwa obejmującym 275 pozycji, co potwierdza szeroki zakres analizowanego zagadnienia oraz świadczy o wnikliwym i dojrzałym naukowo podejściu Doktorantki do rozwiązywania problemów badawczych. Uważam również, że publikacja ta wnosi istotny wkład Autorki w rozwój wiedzy z zakresu andrologii molekularnej psów.

W dalszej części rozdziału przedstawiono wyniki pierwszego zadania badawczego zrealizowanego w publikacji 2, polegającego na identyfikacji białkowych markerów ruchliwości plemników w płynie ogona najądrza. Doktorantka, po przeprowadzeniu porównawczej analizy proteomicznej, wykazała różnice w składzie białkowym płynu najądrzowego pomiędzy badanymi grupami. W grupie o dobrej ruchliwości plemników zidentyfikowano 506 białek, spośród których 6 (przy kryterium obecności białka u ponad 50% samców w badanych grupach) występowało wyłącznie w tej grupie (ACTB, ALPL, CARD6, CLU, GALNT6, OLFM4). W grupie o obniżonej ruchliwości plemników zidentyfikowano 409 białek, a 4 z nich wyodrębniono jako występujące wyłącznie w tej grupie (BOLL, LOC606925, LOC607874, WAPdcp*). Stwierdzono, że białka specyficzne dla grupy o dobrej ruchliwości plemników były funkcjonalnie związane przede wszystkim z procesami ich dojrzewania i różnicowania, organizacją struktur komórkowych oraz mechanizmami regulacyjnymi i ochronnymi związanymi z utrzymaniem prawidłowej ruchliwości i funkcji plemników najądrzowych. Z kolei białka uznane za unikatowe dla grupy o obniżonej ruchliwości plemników powiązano z procesem spermatogenezy, regulacją proliferacji i apoptozy komórkowej oraz starzeniem się najądrza. Zaproponowano ponadto, że ich obecność w płynie najądrzowym może być konsekwencją uwalniania się tych białek z uszkodzonych lub martwych plemników.

Szczególne znaczenie z punktu widzenia celu pracy miała analiza białek wspólnych dla obu badanych grup. Doktorantka zidentyfikowała 11 takich białek, a na podstawie przeprowadzonej analizy półilościowej opartej na intensywności sygnału MS (MS intensity) wykazała, że względna

zawartość 4 z nich – albuminy (ALB), wydzielniczego białka 2 bogatego w cysteinę (CRISP2), białka podobnego do lipokaliny 1 (LCNL1, zawierającego domenę lipokalinową wiążącą kwasy tłuszczowe) oraz syntazy prostaglandyny D2 (PTGDS) – była istotnie wyższa w grupie o dobrej ruchliwości plemników niż w grupie o obniżonej ruchliwości plemników. Białka te pełnią różnorodne funkcje związane między innymi z dojrzewaniem plemników, ochroną przed stresem oksydacyjnym, regulacją właściwości błon plazmatycznych oraz metabolizmem plemników, co może mieć znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania aparatu ruchu plemników najądrzowych. W związku z tym Doktorantka wyniki uzyskane metodą proteomiczną dla białek, które wykazywały istotne zróżnicowanie intensywności sygnału MS pomiędzy badanymi grupami, poddała dodatkowej weryfikacji metodą Western blot. Wykorzystując tę metodę, potwierdziła istotnie wyższą zawartość ALB i PTGDS w płynie najądrzowym grupy o dobrej ruchliwości plemników, natomiast w przypadku CRISP2 nie wykazała istotnych różnic pomiędzy grupami. Należy podkreślić, że ze względu na brak dostępnych przeciwciał nie było możliwe przeprowadzenie analizy dla LCNL1. Mając na uwadze częściową zgodność wyników uzyskanych obiema metodami, przy jednoczesnym braku potwierdzenia różnic w zawartości CRISP2 pomiędzy grupami, Doktorantka wskazała na potencjalne znaczenie ALB i PTGDS jako markerów ruchliwości plemników najądrzowych, a także na potrzebę dalszej weryfikacji każdego z białek w tym zakresie.

Na podstawie analizy funkcjonalnej z wykorzystaniem ontologii genów (Gene Ontology, GO) oraz szlaków metabolicznych Doktorantka stwierdziła, że białka obu badanych grup wykazują podobieństwo w zakresie głównych funkcji molekularnych (wiązaną cząsteczek, aktywność katalityczna), procesów biologicznych, w tym związanych z lokalizacją cząsteczek, oraz klas białek (transportowych/nośnikowych). Jednocześnie w grupie o obniżonej ruchliwości plemników odnotowała większy udział białek związanych z lokalizacją cząsteczek. Doktorantka ponadto w obu badanych grupach zidentyfikowała istotne wzbogacenie szlaków metabolizmu kwasu arachidonowego (PTGDS i GPX5) oraz syntezy hormonów tarczycy (GPX5 i ALB). W grupie o dobrej ruchliwości plemników wykazała wzbogacenie szlaku sygnałowego Hippo (ACTB, AFP) oraz szlaków metabolicznych (PTGDS, GALNT6, GPX5, ALPL), natomiast w grupie o obniżonej ruchliwości – szlaków metabolizmu cholesterolu (NPC2) i glutationu (GPX5).

Za ważny element badań uznać należy analizę zależności pomiędzy względną zawartością białek a poszczególnymi parametrami ruchliwości plemników najądrzowych. Interesujące jest, że w przypadku białek wspólnych dla obu badanych grup istotną dodatnią zależność stwierdzono jedynie pomiędzy zawartością alfa-fetoproteiny (AFP) a odsetkiem plemników poruszających się z małą prędkością (SLOW). W grupie o dobrej ruchliwości plemników istotne dodatnie korelacje stwierdzono między innymi pomiędzy zawartością członka 6 rodziny białek zawierających domenę rekrutacji kaspaz (CARD6) a uśrednioną prędkością ruchu plemnika (VAP), a także ujemne korelacje pomiędzy zawartością fosfatazy alkalicznej (ALPL) a współczynnikiem prostoliniowości ruchu (STR) oraz pomiędzy zawartością olfaktomedyny 4 (OLFM4) a współczynnikami prostoliniowości i liniowości ruchu (odpowiednio STR i LIN). W przypadku białek zidentyfikowanych jako specyficzne dla grupy o obniżonej ruchliwości plemników stwierdzono wyłącznie ujemne istotne zależności korelacyjne, które występowały pomiędzy zawartością homologa białka Boule wiążącego RNA (BOLL) a amplitudą bocznych wychyleń główki plemnika (ALH) oraz pomiędzy zawartością białka zawierającego domenę cystatyny (LOC607874) a uśrednioną prędkością ruchu plemnika (VAP) i prędkością ruchu po linii prostej (VSL).

W ostatniej części omawianego rozdziału Autorka przedstawiła wyniki drugiego zadania badawczego, zrealizowanego w publikacji 3, którego celem było wytypowanie potencjalnych markerów procesów starzenia się najądrza psa. Doktorantka, po przeprowadzeniu analizy zmian w proteomie płynu ogona najądrza w zależności od wieku samca, wykazała zróżnicowanie jego składu

białkowego pomiędzy badanymi grupami. U psów młodych zidentyfikowała 121 białek występujących wyłącznie w tej grupie, natomiast w grupach psów dorosłych i starszych odpowiednio 122 i 56 białek. We wszystkich trzech badanych grupach zidentyfikowano 48 wspólnych białek, spośród których 7 – albuminę (ALB), karboksyloesterazę 5A (CES5A), wydzielniczą peroksydazę glutationową najądrza (GPX5), laktotransferynę (LTF), wewnątrzkomórkowy transporter cholesterolu typu C2 (NPC2), plastynę 3 (PLS3) oraz syntazę prostaglandyny D2 (PTGDS) – wytypowano do dalszej analizy na podstawie kryterium występowania białka u ponad 50% samców w każdej z badanych grup. Porównawcza analiza ilościowa tych białek, oparta na pomiarze intensywności sygnału MS, wykazała występowanie istotnych różnic w ich zawartości względnej pomiędzy grupami wiekowymi w przypadku ALB, GPX5 oraz PTGDS. Najwyższą zawartość wszystkich trzech białek stwierdzono w grupie psów dorosłych, przy czym istotne statystycznie różnice dotyczyły jedynie porównania z grupą psów młodych. Podobnie jak w przypadku pierwszego zadania badawczego, uzyskane wyniki zweryfikowano techniką Western blot. Doktorantka potwierdziła rezultaty otrzymane dla ALB i PTGDS, wykazując ponadto, że zawartość ALB różniła się istotnie pomiędzy wszystkimi grupami wiekowymi, natomiast zawartość PTGDS – również pomiędzy grupami psów młodych i najstarszych. Najniższą zawartość obu białek zaobserwowano w płynie najądrzowym młodych psów. Z kolei w przypadku GPX5, odmiennie niż wynikało z analizy proteomicznej, najniższą zawartość tego białka stwierdzono w grupie psów dorosłych, która różniła się istotnie od grupy psów najstarszych charakteryzującej się najwyższą zawartością GPX5. Dla tego białka istotne różnice występowały ponadto pomiędzy grupami psów młodych i najstarszych. Przyczyny powyższych rozbieżności pozostają niejasne i wymagają wyjaśnienia w przyszłych badaniach. Jak wskazuje Doktorantka, mogą one wynikać ze specyfiki obu zastosowanych metod.

Zidentyfikowane w płynie ogona najądrza trzy białka – ALB, GPX5 oraz PTGDS – których zawartość różnicowała badane grupy wiekowe, Doktorantka wytypowała jako potencjalne markery molekularne zmian związanych z procesami starzenia się najądrza psa. Funkcje tych białek, związane między innymi z utrzymaniem homeostazy oksydoredukcyjnej, oraz przeanalizowane sieci interakcji białko-białko (baza STRING) wykorzystwała do interpretacji uzyskanych wyników. W przypadku GPX5 wykazała powiązania z innymi członkami rodziny peroksydaz glutationowych (GPX1, GPX2, GPX3, GPX6 i GPX8) oraz białkami zaangażowanymi w regulację stresu oksydacyjnego, w tym z reduktazą glutationową (GSR), syntetazą glutationową (GSS) i peroksyredoksyną 6 (PRDX6). W przypadku PTGDS stwierdziła natomiast powiązania z innymi białkami szlaku syntezy prostaglandyn (PTGS1, PTGS2, PTGES, PTGES2, HPGDS) oraz przedstawicielami rodziny lipokalin (LCNL1, LCN9, LCN10).

Doktorantka wskazała, że u młodych psów systemy ochronne oparte na ALB, GPX5 i PTGDS mogą nie być jeszcze w pełni rozwinięte, natomiast zwiększona zawartość tych białek w płynie najądrzowym w grupie psów dorosłych może wiązać się z ich rolą w zapewnieniu optymalnej ochrony plemników w okresie największej aktywności rozrodczej samców. Z kolei zmiany zawartości tych białek obserwowane u najstarszych psów mogą odzwierciedlać odpowiedź kompensacyjną związaną z nasileniem stresu oksydacyjnego towarzyszącego procesom starzenia.

Ponadto Doktorantka stwierdziła podobieństwo głównych funkcji molekularnych i procesów biologicznych (analiza GO) białek zidentyfikowanych w trzech badanych grupach wiekowych, przy czym udział procentowy białek przypisanych do poszczególnych kategorii wykazywał zróżnicowanie pomiędzy grupami. W każdej z nich dominowały białka związane z aktywnością katalityczną, wiązaniem cząsteczek i aktywnością antyoksydacyjną, natomiast w zakresie procesów biologicznych – białka związane z lokalizacją cząsteczek i procesami komórkowymi. W grupach psów dorosłych i starszych wykazano obecność funkcji regulatora aktywności translacji oraz regulatora funkcji molekularnych, a udział białek przypisanych do aktywności antyoksydacyjnej był niższy

w porównaniu z grupą młodych samców. Ponadto wyłącznie w grupach psów dorosłych i starszych stwierdzono obecność białek związanych z procesami rozrodczymi. Wyniki te wskazywać mogą na zmiany funkcjonalne w środowisku plemników najądrzowych zachodzące wraz z wiekiem samca.

Uzupełnieniem analiz porównawczych związanych z wiekiem było również określenie zależności pomiędzy zawartością wytypowanych potencjalnych markerów białkowych (ALB, GPX5 i PTGDS) a parametrami ruchliwości plemników najądrzowych. Zwrócić należy uwagę, że istotne statystycznie związki korelacyjne wskazywały na silne lub bardzo silne zależności pomiędzy badanymi parametrami (przy wartościach bezwzględnych współczynnika korelacji rang Spearmana wynoszących od 0,68 do 1,00). W grupie psów młodych obejmowały one dodatnią korelację pomiędzy zawartością GPX5 a odsetkiem plemników poruszających się z dużą prędkością (RAPID) oraz ujemną korelację z odsetkiem plemników nieruchomych (STATIC). W grupie psów dorosłych stwierdzono ujemną korelację pomiędzy zawartością GPX5 a ruchliwością całkowitą (TMOT), natomiast zawartość ALB korelowała ujemnie z odsetkiem plemników poruszających się z małą prędkością (SLOW) i dodatnio z odsetkiem plemników nieruchomych (STATIC). Z kolei w grupie najstarszych psów wykazano dodatnią korelację pomiędzy zawartością GPX5 a odsetkiem plemników poruszających się z małą prędkością (SLOW) oraz ujemną korelację pomiędzy zawartością PTGDS a prędkością krzywoliniową ruchu plemników (VCL).

Rozdział „Podsumowanie i wnioski” Autorka zredagowała w postaci opisowej i graficznej oraz w formie wypunktowanego zestawienia 8 wniosków wynikających ze zrealizowanych badań. Z zastrzeżeniami przedstawionymi w dalszej części recenzji treść całego rozdziału nawiązuje do uzyskanych wyników i jest zgodna z postawionymi w dysertacji celami i hipotezami. Wnioski kończące rozprawę odnoszą się do najważniejszych aspektów przeprowadzonych badań i zasadniczo są sformułowane poprawnie, jednak w mojej opinii niektóre z nich wymagają niewielkiego przeredagowania i doprecyzowania.

W ramach obowiązków recenzenta oraz mając na uwadze, że prace naukowe wchodzące w skład dysertacji były już oceniane w procesie wydawniczym, poniżej przedstawię niektóre kwestie oraz sugestie, które nasunęły mi się po zapoznaniu się z całością rozprawy doktorskiej:

- W publikacji 3 zamieszczono komentarz o ograniczeniach przeprowadzonych badań, w tym niewielkiej liczbie badanej grupy. Ze względu na brak informacji proszę o wyjaśnienie, ile próbek (samców) ostatecznie uwzględniono w analizach porównawczych po zastosowaniu kryterium występowania białka u ponad 50% samców w każdej z badanych grup?
- W pracy, publikacjach oraz materiałach uzupełniających brakuje informacji dotyczących sposobu przygotowywania materiału pobranego z najądra do oceny ruchliwości plemników (np. jakie medium wykorzystano, jaki był stopień rozrzedzenia zawiesiny plemników, itp.). Ponadto, pomimo że parametry ruchliwości wykorzystano w analizie korelacji z zawartością wybranych białek płynu najądrzowego, w pracy nie przedstawiono wyników oceny ruchliwości plemników dla grup wiekowych – ich zamieszczenie pozwoliłoby ocenić, czy i w jakim stopniu wiek samca wiązał się ze zmianami parametrów ruchliwości plemników.
- Rozdział „Podsumowanie i wnioski” nie pozostaje w pełni proporcjonalny pod względem objętości do wcześniejszych części rozprawy. Obejmuje on 5 stron, wraz z ryciną, podczas gdy rozdział „Wyniki i omówienie” liczy 6 stron. W mojej ocenie niektóre treści zawarte w podsumowującej części pracy mają charakter interpretacji i dyskusji uzyskanych wyników, a zatem powinny zostać przedstawione w rozdziale „Wyniki i omówienie”, w którym Autorka skoncentrowała się przede wszystkim na prezentacji uzyskanych danych. Ponadto przeniesienie części tych treści do rozdziału „Wyniki i omówienie” pozwoliłoby zachować

większą spójność strukturalną rozprawy, a podsumowanie pracy mogłoby wówczas przyjąć bardziej syntetyczną formę.

- Wnioski/stwierdzenia; pkt 6: „Stwierdzono, że proces starzenia się najądrza wpływa na zmiany ekspresji wybranych białek...” – sformułowanie nieprecyzyjne i zbyt daleko idące – mogłoby być np.: „Uzyskane wyniki wskazują na zależne od wieku zmiany względnej zawartości wybranych białek...”; pkt 7: „Zidentyfikowane biomarkery...” – powinno być: „Zidentyfikowane potencjalne biomarkery...” oraz doprecyzowane, jakie?, czego?; pkt 8: „Wyniki badań rozszerzają wiedzę” – niefortunne sformułowanie – powinno być np.: „Uzyskane wyniki poszerzają wiedzę...”.
- W zakresie uzyskanych wyników: interesujące jest występowanie lub brak występowania fosfatazy alkalicznej w badanych grupach (publikacja 2 i 3) – proszę o wyjaśnienie.
- Interesuje mnie opinia Autorki w kwestii zależności między wewnątrzgatunkowym zróżnicowaniem pod względem masy ciała i rasy a tempem starzenia się psów. Czy podjęto próbę analizy uzyskanych wyników z uwzględnieniem masy ciała samca?
- Str. 17: „nasienie najądrzowe” – chociaż sformułowanie jest stosowane, jest ono nieprecyzyjne.
- Str. 20: hipoteza badawcza nr 4 – „...mogą być...” powinno być: „...są...”.
- Str. 26: „Funkcje najważniejszych białek obejmowały poprawę kapacytacji plemników...” – niejasne sformułowanie „poprawa kapacytacji”.
- Str. 29: „Potwierdzono istotne statystycznie różnice w zawartości ALB między trzema grupami eksperymentalnymi...” – jeśli „potwierdzono”, to powinno być: „między dwiema grupami” (lub „Wykazano...między trzema grupami...”).
- Str. 30: „Potwierdzono rozkład poziomów zawartości PTGDS...” – sformułowanie nieprecyzyjne.
- Parametr MEDIUM i określenie „subpopulacja plemników charakteryzująca się ruchem średnim” – sugeruję stosowanie: „subpopulacja plemników poruszających się ze średnią prędkością” lub „subpopulacja plemników o średniej prędkości ruchu”.
- W numeracji stron nie uwzględniono strony tytułowej oraz dwóch kolejnych stron.

Podsumowując, wyrażone powyżej zastrzeżenia oraz sugestie mają charakter uwag korekcyjnych i nie umniejszają w żaden sposób wartości merytorycznej dysertacji doktorskiej. Praca stanowi wartościowe opracowanie naukowe, które w całości oceniam pozytywnie. Jest rozwiązaniem postawionego problemu badawczego i jednocześnie dowodem ugruntowanej wiedzy Autorki w zakresie biologii rozrodu, proteomiki oraz molekularnych aspektów funkcjonowania najądrza. Charakteryzuje się dobrym poziomem merytorycznym, a zastosowane podejście badawcze jest adekwatne do założonych celów. Przeprowadzone przez Doktorantkę badania mają charakter nowatorski, zarówno w aspekcie podejmowanej tematyki, jak i wykorzystania nowoczesnych narzędzi proteomicznych i bioinformatycznych. Badania te wnoszą istotny wkład w poznanie zależności pomiędzy proteomem płynu ogona najądrza a funkcjonalnością plemników, a także w poznanie molekularnych podstaw zmian zachodzących w środowisku najądrza psa wraz z wiekiem. Podkreślić należy, że badania Autorki dostarczyły również pierwszych danych dotyczących identyfikacji wielu białek tworzących środowisko płynu ogona najądrza psa.

Za istotne naukowo-poznawcze, a także praktyczne zalety pracy uznaję między innymi wytypowanie białek ALB, GPX5 i PTGDS jako potencjalne biomarkery jakości plemników i funkcji najądrza psa oraz wykazanie związku pomiędzy składem proteomicznym płynu ogona najądrza a parametrami ruchliwości plemników. Istotnym elementem pracy jest również analiza zależnych od

wieku zmian względnej zawartości wybranych białek, która wskazuje na możliwe modyfikacje środowiska najądrza towarzyszące procesowi starzenia się samców. W całości oceniana dysertacja stanowi spójne opracowanie, poszerzające wiedzę na temat molekularnych mechanizmów funkcjonowania najądrza psa oraz dostarczające nowych danych, które mogą stanowić punkt wyjścia do dalszych badań podstawowych i aplikacyjnych w zakresie biologii rozrodu samców.

Stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr inż. Aleksandry Cichowskiej-Likszo pt. „Białkowe markery jakości nasienia najądrzowego psa” odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn. zm.) i na tej podstawie wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Zootechnika i Rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr inż. Aleksandry Cichowskiej-Likszo do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

