

Prof. dr hab. Stanisław Kondracki
Instytut Zootechniki i rybactwa
Uniwersytet Przyrodniczo-Humanistyczny
w Siedlcach
ul B. Prusa 14, 08-110 Siedlce

2019-08-11

O c e n a

rozprawy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Alicji Dyrda pt. „Analiza fosfoproteomu najądrzowego nasienia ogiera”

Efektywność użytkowania zwierząt zależy od wyników rozrodu. Zastosowanie osiągnięć współczesnej nauki w hodowli zwierząt przyspieszyło postęp hodowlany i przyczyniło się do dużych zmian genetycznych w populacjach różnych gatunków zwierząt udomowionych. Postępowi w zakresie preferowanych cech użytkowych zwierząt nie towarzyszy jednak adekwatny wzrost potencjału rozrodczego zwierząt, a wręcz przeciwnie najbardziej uszlachetnione zwierzęta często wykazują zaburzenia procesów rozrodczych i pozostawiają po sobie mniej potomstwa. Z tego powodu za szczególnie istotne uznaje się badania nad opracowaniem metod wspomagania rozrodu najbardziej wartościowych i wysokowydajnych zwierząt. Przedstawiona do oceny rozprawa wpisuje się w nurt tematyczny takich badań. Autorka podjęła się badań nad proteomiką środowiska najądrzowego ogierów, w aspekcie możliwości wykorzystania nasienia pozyskiwanego z najądrzy w inseminacji koni. Możliwości zastosowania nasienia pozyskiwanego z najądrzy w praktyce inseminacyjnej są jeszcze słabo rozpoznane dlatego podjęty problem badawczy ma istotne znaczenie poznawcze. Tematykę pracy uznaję za ważną, a uzyskanie wyniki mogą mieć także duże znaczenie utylitarne.

Przedstawiona do oceny praca to dzieło obejmujące 97 stron, które zawiera 12 tabel, 4 wykresy i 7 rycin. Elementami pracy są rozdziały: wstęp, przegląd

piśmiennictwa, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski oraz literatura (zawiera alfabetyczny wykaz źródeł wykorzystanych w pracy). Do rozprawy dołączono streszczenia w językach polskim i angielskim. Układ i struktura rozdziałów, ich kolejność i formy nie budzą zastrzeżeń. Są one typowe dla rozpraw naukowych i adekwatne do tematyki oraz charakteru ocenianej rozprawy.

Pracę rozpoczyna krótki wstęp wprowadzający w problematykę rozprawy z zachowaniem zasady „od ogółu do szczegółu”. Znaczną część pracy stanowi przegląd piśmiennictwa, obejmujący 20 stron tekstu. Rozdział ten zawiera obszerną analizę piśmiennictwa, blisko związanego tematycznie z problematyką rozprawy. W przeglądzie piśmiennictwa podobnie jak w rozdziale poprzednim autorka trzyma się zasady „od ogółu do szczegółu” co nadaje temu rozdziałowi logiczny charakter. Zaczyna ona od opisu budowy i funkcji najądrzy, co jest słuszne uwzględniając fakt, że zawartość najądrzy ogiera stanowiła materiał badawczy. W tej części pracy dużo uwagi poświęcono znaczeniu płynu najądrzowego w dojrzewaniu plemników. Najbardziej istotne z punktu widzenia tematyki rozprawy są jednak zagadnienia proteomiki układu rozrodczego samca, w tym fosfoproteomiki płynu najądrzowego. Te zagadnienia, w których autorka szczególny nacisk kładzie na proteomikę nasienia ogiera, stanowią główną i największą część rozdziału Przegląd piśmiennictwa. W przeglądzie piśmiennictwa autorka dostrzega także znaczenie sezonowości rozrodu koni, opisując wpływ pory roku na jakość nasienia ogierów, oraz znaczenie kriokonserwacji nasienia najądrzowego i możliwości wykorzystania kriokonserwowanego nasienia najądrzowego ogierów w inseminacji klaczy. Przegląd piśmiennictwa zaprojektowano logicznie i przejrzysto, posługując się czytelnym i zrozumiałym językiem, przy czym rozdział ten cechuje się zwięzłością formy oraz treści i nie zawiera fragmentów zbędnych, nie powiązanych z tematem rozprawy. W rozprawie wykorzystano łącznie 174 pozycje piśmiennictwa, z których niemal wszystkie to oryginalne prace naukowe opublikowane w języku angielskim, w czasopiśmie o zasięgu światowym. Piśmiennictwo zostało dobrze dobrane i prawidłowo wykorzystane w rozprawie w części wstępnej i w przeglądzie piśmiennictwa jak również w dyskusji wyników prowadzonej w rozdziale

„Dyskusja”. Autorka umiejętnie posługuje się informacjami zaczerpniętymi z piśmiennictwa, opisując stan badań, przytaczając poglądy i podając ważniejsze wyniki. Mgr inż. Katarzyna Alicja Dyrda wykazuje tym samym wiedzę z obszaru zagadnień ściśle związanych z przedmiotem rozprawy i dokumentuje, że spełnia jeden z podstawowych warunków stawianych kandydatom do uzyskania stopnia doktora, który mówi że rozprawa doktorska powinna „*wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata (doktoranta) w danej dyscyplinie naukowej*” (art. 13.1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym...).

Autorka postawiła hipotezę badawczą, że w kolejnych odcinkach najądrzy ogiera zachodzą uwarunkowane sezonowo procesy fosforylacji/defosforylacji białek towarzyszące dojrzewaniu plemników oraz sformułowała cel pracy jako: charakterystyka fosfoproteomu ekstraktów plemnikowych oraz płynów pobranych z poszczególnych segmentów najądrzy ogiera z uwzględnieniem okresów sezonu reprodukcyjnego.

Podstawą wnioskowania w rozprawie są wyniki badań, przeprowadzonych na materiale pobranym od 12 ogierów koni szlachetnych półkrwi w wieku 3-4 lat. Materiał badawczy stanowiły najądrza ogierów kastrowanych w sezonie rozrodczym (6 osobników) i poza sezonem rozrodczym (6 osobników). Z najądrzy pozyskano płyn najądrzowy i plemniki. W pobranych próbach oznaczono zawartość białka całkowitego oraz wyizolowano i oznaczono fosfoproteiny. Analizę białek ekstraktów plemnikowych oraz płynów najądrzowych z poszczególnych segmentów najądrzy przeprowadzono z wykorzystaniem techniki elektroforezy SDS-PAGE w żelach poliakryloamidowych. Na podstawie analizy uzyskanych rozdzielonych elektroforetycznych frakcji fosfoprotein wyizolowanych z ekstraktów plemników oraz płynu najądrzowego autorka wybrała białka, które poddała identyfikacji metodą spektrometrii mas NanoLC-MS/MS. Stosowane metody badawcze zostały szczegółowo opisane w rozdziale Materiał i metody. Z opisu wynika duże zaawansowanie doktorantki w stosowaniu nowoczesnych technik badawczych i zaawansowanej aparatury naukowej. Wybór narzędzi badawczych uważam za trafny oraz adekwatny do celu pracy i postawionej hipotezy.

Do statystycznej interpretacji wyników autorka wykorzystała obliczenia wykonane przy użyciu pakietu Statistica. Zastosowano metodę jednoczynnikowej analizy wariancji uzupełnioną testem U Manna-Whitneya (dla zmiennych: sezon reprodukcyjny x przeciwciało) i testem Kruskala-Wallisa (dla zmiennych: segment najądrza x przeciwciało). Zastosowane narzędzia statystyczne uznaje za prawidłowe i adekwatne do założeń pracy oraz przyjętego układu doświadczalnego. Pewną słabość stanowi relatywnie mała liczebność próby (6 ogierów w podgrupie). Utrudniło to zapewne doktorantce dokumentowanie istotności różnic międzygrupowych, bowiem analizowane cechy charakteryzują się dużą zmiennością, której znaczną część stanowi zmienność osobnicza. Widać to wyraźnie na wykresach 1-4.

Główną część rozprawy stanowi rozdział Wyniki. W rozdziale tym, podzielonym na 6 podrozdziałów, autorka szczegółowo opisuje wyniki badań. Wykazała w nim, że fosfoproteom plemników najądrzowych ogiera zawiera białka regulacyjne, transportowe i opiekuńcze, fosfoproteiny zidentyfikowane wcześniej w najądrzach samców innych gatunków ssaków, u człowieka, buhaja oraz gryzoni. Stwierdziła, że w przypadku większości fosfoprotein plemników najądrzowych ogiera fosforylacji podlegają równocześnie reszty seryny, treoniny i tyrozyny i że zachodzi to zarówno w sezonie rozrodczym jak i poza sezonem rozrodczym koni.

Duże znaczenie ma stwierdzenie, że z sezonem rozrodczym koni związane są zmiany fosforylacji białek o masach cząsteczkowych 75 (β dystrobrewina, DTNB), 50 (białkowa izomeraza disiarczkowa, PDIA3), 32 (białko opiekuńcze retikulum endoplazmatycznego, BiP), 23 (dystonina DST; SYNE-1), 17 (peroksyredoksyna, PRDX) i 15 (homolog białka bikaudalnego 2, BICD2) kDa, a w przypadku fosfoprotein o masach cząsteczkowych 61 (białko E związane z centromerem, CENP-E), 50 (białkowa izomeraza disiarczkowa A3, PDIA3) i 15 (homolog białka bikaudalnego 2, BICD2) kDa czynnikiem różnicującym jest region najądrzy.

Autorka rozprawy udokumentowała, że nasilenie procesu fosforylacji białek płynu najądrzowego jest większe poza sezonem rozrodczym, a fosforylacja białek ekstraktów plemnikowych ma większe nasilenie w okresie sezonu rozrodczego koni.

W ekstraktach plemnikowych autorka rozprawy zidentyfikowała białka związane z ochroną antyoksydacyjną, podlegające zróżnicowanej fosforylacji (białka z rodziny HSP, izomeraza wiązań disiarczkowych A3 i A6 oraz peroksyredoksyna 5).

Wykazała też, że niektóre elementy systemu ubikwitynacji białek nasienia najądrzowego ogiera (enzym aktywujący ubikwitynę, tioesteraza ubikwityny, hydrolaza C-końca ubikwityny, białka z rodziny HSP i receptory sprzężone z białkiem G) podlegają regulacji na szlaku fosforylacja/defosforylacja. Rozdział Wyniki dokumentuje dobre opanowanie warsztatu badawczego przez doktorantkę. Uzyskane wyniki przedstawiane są rzetelnie i w zgodności ze stanem faktycznym oraz szeroko dyskutowane w rozdziale Dyskusja, z wykorzystaniem dobrze dobranego, aktualnego i prawidłowo cytowanego piśmiennictwa naukowego (w nielicznych przypadkach autorka nie zachowała chronologicznego porządku odwołań do cytowanych pozycji).

Całość kończy krótkie podsumowanie i wnioski, wyodrębnione jako osobny rozdział. Wnioski z pracy autorka sformułowała w 6 punktach. Formułując uogólnienia autorka rozprawy trzyma się faktów, a przedstawione wnioski są krótkie, treściwe i mają uzasadnienie w materiale empirycznym.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie konkretnego problemu naukowego, a jej autorka wykazała duże umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa spełnia więc warunki stawiane kandydatom do uzyskania stopnia doktora, wynikające z art. 13.1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym..., który mówi że rozprawa doktorska powinna „*stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.....*” oraz powinna wykazywać „*umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej...*”.

Przedstawiona do oceny rozprawa merytorycznie mieści się w obszarze dziedziny nauk: nauki rolnicze, w dyscyplinie zootechnika i rybactwo i w tym zakresie dokumentuje ona kompetencje naukowe kandydatki. Uwzględniając wartości poznawcze i użyteczne przedstawionej do oceny rozprawy oraz wynikające

z niej udokumentowanie wiedzy i opanowania warsztatu naukowego przez doktorantkę stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca pt. „Analiza fosfoproteomu najądrzowego nasienia ogiera” odpowiada warunkom określonym dla rozpraw doktorskich w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki dnia z 14 marca 2003 roku, a jej autorka mgr inż. Katarzyna Alicja Dyrda wykazała wymagane Ustawą umiejętności. W związku z tym przedstawiam Radzie Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie wniosek o dopuszczenie rozprawy Pani mgr inż. Katarzyny Alicji Dyrda do publicznej obrony. Jednocześnie z uwagi na naukowe znaczenie wyników pracy, zastosowanie zaawansowanych technik badawczych, wymagających dużych umiejętności i solidnego warsztatu naukowego oraz wykazane w pracy umiejętności przejrzystego przedstawiania trudnych kwestii stawiam wniosek o wyróżnienie ocenianej rozprawy.

