



**INSTYTUT ROZRODU ZWIERZĄT I BADAŃ ŻYWNOŚCI
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

ul. Tuwima 10; 10-748 Olsztyn 5, skr poczt.55; tel (89) 523-46-86, 524-03-13

fax: (089) 524 01 24; e-mail: institute@pan.olsztyn.pl; www.pan.olsztyn.pl

Olsztyn, 06. września 2019 r.

Prof. dr hab. n. wet. Dariusz J. Skarżyński
Zakład Immunologii i Patologii Rozrodu
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN
ul. Tuwima 10, 10-748 OLSZTYN

Ocena pracy doktorskiej mgr inż. Karoliny Danuty Wasilewskiej-Sakowskiej

p.t.:

**„WPLYW MODYFIKACJI WYBRANYCH ETAPÓW TECHNOLOGII
KRIOKONSERWACJI NASIENIA KNURA NA WŁAŚCIWOŚCI
BIOLOGICZNE PLEMNIKÓW”**

I. PODSTAWA PRAWNA I OCENA FORMALNA

Recenzja została opracowana na wniosek Wydziału Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, zgodnie z wymaganiami Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki wraz z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2003 r, Nr 65, poz. 595; Dz.U. z 2005 r, Nr 164 poz. 1365 oraz Dz.U. z 2011 r. Nr 84 poz. 4; Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

Przedstawiona do oceny praca spełnia warunki formalne określone w ww. Ustawie i rozporządzeniach Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz Komisji Centralnej ds. do Spraw Stopni i Tytułów. Materiały zostały przygotowane przejrzysto i w sposób umożliwiający właściwą i pełną ocenę oraz zapoznanie się z istotą osiągnięcia naukowego.

II. PROBLEM NAUKOWY I ZNACZENIE BADAŃ

Użycie mrożonego nasienia knura w praktyce hodowlanej jest nadal ograniczone i kształtuje się na bardzo niskim poziomie ogólnej liczby wykonywanych zabiegów inseminacyjnych

wyzwania badawcze oraz pytania, np. jaka jest rola białek opłaszczających na funkcje biochemiczne plemników, które systemy białkowe plazmy nasienia i plazmoemy plemników posiadają właściwości krioprotekcyjne, jakie są mechanizmy tego działania?

W ten szeroki i nowatorski nurt badań włącza się praca doktorska pani mgr inż. Karoliny Wasilewskiej-Sakowskiej. Należy więc podkreślić, że zagadnienia poruszane w pracy doktorskiej są bardzo aktualne. Uważam, że podjęta tematyka badawcza jest oryginalna, nowatorska i ważna zarówno dla badań podstawowych, w zakresie poszerzenia wiedzy na temat biochemii plazmy nasienia knura oraz procesów odpowiedzialnych za jego jakość, przeżywalność, a także ma istotne znaczenie praktyczne w odniesieniu do rozwoju nowych metod biotechnologii rozrodu zwierząt, szczególnie świń.

III. OPIS I OCENA PRACY

Rozprawę doktorską mgr inż. Karoliny Wasilewskiej-Sakowskiej stanowią, wg załączonej dokumentacji, cztery wskazane przez Doktorantkę, monotematyczne, oryginalne prace eksperymentalne, opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych indeksowanych przez Journal Citation Report o współczynniku oddziaływania (*Impact Factor – IF*) od 0,802 do 1,647 (IF wg roku wydania publikacji):

- 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, 100 wg nowej punktacji).
- 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, 100 wg nowej punktacji).
- 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, 100 wg nowej punktacji).
- 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, 40 wg nowej punktacji).

Prace opublikowano w latach 2016-2019. Do rozprawy dołączono oświadczenia współautorów prac, którzy potwierdzili, że sformułowanie problemów badawczych, koncepcja prac, wybór metod badawczych, koordynacja pracy zespołu badawczego, wykonanie badań i analiza wyników oraz prezentacja i przygotowanie manuskryptów w przeważającym procencie były autorstwa Pani mgr inż. Karoliny Wasilewskiej-Sakowskiej.

Rozprawa doktorska - cztery wskazane przez Doktorantkę prace posiadają następujące wartości parametryczne:

1. Sumaryczny Impact Factor = 5,364
2. Punkty oceny parametrycznej MNiSW = 90 (*340 wg nowej punktacji*)

Co jest godne podkreślenia dwie pierwsze prace były już cytowane w literaturze światowej - łączna liczba cytowań wynosi 8 (Web of Science; 06.09.2019 r.)

Dane te są mierzalne i obiektywnie, w sposób jednoznaczny świadczą o wysokiej jakości i znaczeniu dla nauki wyników badań zawartych w rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Karoliny Wasilewskiej-Sakowskiej. Wskaźniki bibliometryczne (dane z bazy WoSci) należy uznać za bardzo wysokie, uwzględniając fakt, iż mamy do czynienia z rozprawą doktorską oraz uwzględniając specyfikę i specjalność naukową - badania z zakresu biotechnik i biotechnologii rozrodu zwierząt gospodarskich.

W mojej ocenie cztery prace zgłoszone jako rozprawa doktorska stanowią zwarty, jednorodny cykl nowatorskich i wartościowych prac badawczych z zakresu badań podstawowych i stosowanych, opisujących parametry i jakość plemników knura oraz ocenę przydatności technologicznej różnych rozcieńczalników stosowanych w technologii konserwacji nasienia, a w szczególności ich specyficznych białkowych komponentów.

Generalnym celem badań było wyjaśnienie czy istnieje i jaki jest wpływ różnych czynników oraz procedur biotechnologicznych (rodzaj, skład i sposób zastosowanie rozcieńczalnika, czasu i temperatury przechowywania, metod opłaszczania plemników) na jakość, właściwości biologiczne i przechowalność kriokonserwowanych plemników knura. Poszczególne wyniki badań układają się w logiczną i konsekwentną całość, dokumentując poprawność postawionych hipotez badawczych, właściwość wyboru metodyki, co pozwoliło na wyciągnięcie wniosków ogólnopoznawczych, ale także wskazań praktycznych mogących znaleźć zastosowanie w biotechnikach i biotechnologii rozrodu świń. Uzyskane wyniki posiadają więc zarówno bardzo wysoki aspekt poznawczy, ale także mają bardzo istotne wartości aplikacyjne.

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały już pozytywnie ocenione przez co najmniej 8-ciu do 12-tu niezależnych specjalistów z zakresu biologii i biotechnologii rozrodu

oraz przez kolegia redakcyjne czasopism naukowych z obszaru nauk o zwierzętach (biologii reprodukcyjnej) oraz weterynarii. Wynika z tego, że badania mgr inż. Karoliny Wasilewskiej-Sakowskiej zawarte w rozprawie doktorskiej znalazły uznanie w nauce, co stanowi najlepsze świadectwo ich wartości poznawczych, nowatorstwa, wartości warsztatu naukowego i aktualności podjętej tematyki. Stąd moja ocena ograniczyć się może, co najwyżej, do podkreślenia znaczenia prac dla rozwoju dziedziny naukowej oraz krótkiej charakterystyki każdej z prezentowanych prac.

Celem pracy nr 1. [*Wasilewska i wsp. The benefits of cooling boar semen in long-term extenders prior to cryopreservation on sperm quality characteristics. Reproduction in Domestic Animals (2016) 51(5):781–788*] było zbadanie wpływu 24-godzinnego okresu przechowywania nasienia knura w 10°C w różnych długoterminowych rozcieńczalnikach na ruchliwość plemników, integralność ich błony oraz żywotności (poprzez pomiar zmian apoptotycznych) przed i po zamrażaniu-rozmrażaniu. W pracy wykazano, że zarówno różne warianty rozcieńczalników jak i ich komponenty oraz temperatura schładzania (HT 1 oraz HT 2) mają wpływ na parametry ruchu plemników przed zamrożeniem. Wskazano, iż komponenty rozcieńczalników wpływają korzystnie na parametry ruchu plemników przed ich zamrożeniem. Ponadto Doktorantka wskazuje, iż substancje zawarte w użytych rozcieńczalnikach wpływają korzystnie na funkcjonalność błon mitochondrialnych (MMP) oraz integralność plazmolemy (PMI) plemników po zamrożeniu-rozmrożeniu. Wynik ten jest bardzo istotny, mając na uwadze fakt, iż ocena integralności błon plazmatycznych plemników jest bardzo ważnym wskaźnikiem jakości i właściwości biologicznych plemników. Doktorantka sugeruje, że przechowywanie nasienia knura w różnych rozcieńczalnikach długoterminowego przechowywania przed zamrożeniem wywiera zróżnicowany wpływ ochronny na funkcję nasienia po rozmrożeniu. Ponadto wyniki sugerują, iż plemniki trzymane w przedłużaczach AHP i ASP przez 24 godziny w 10°C wykazały większą tolerancję na kriokonserwację, co przejawiało się ich większą ruchliwością, właściwymi funkcjami mitochondriów, i stabilną integralnością błony komórkowej oraz ich żywotnością.

W pracy nr 2. [*Wasilewska & Fraser L. Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. Animal Reproduction Science 2017; 185:161–173*] porównano grupy knurów o dobrej i słabej przydatności nasienia do zamrażania określając jakości nasienia przed mrozem i po rozmrożeniu nasienia konserwowanego w różnych typach długoterminowych rozcieńczalników i dla różnych czasów przechowywania. Zaobserwowano, że profile białek plemnikowych ze świeżego oraz kriokonserwowanego nasienia różniły się istotnie pomiędzy ejakulatami o dobrej i złej przydatności do zamrażania pod względem liczby i typów białek związanych z plazmolemą

plemników. Wykazano, iż zastosowanie okresu schładzania prób nasienia w rozcieńczalnikach długoterminowych w temperaturze 10°C przez 24 godziny wpływało korzystnie na właściwości biologiczne plemników po rozmrożeniu.

W pracy trzeciej [Wasilewska-Sakowska i wsp. *Effect of fractionated seminal plasma on sperm characteristics following cryopreservation of boar semen. Annals of Animal Science* 2019; 19(3): 695-712] zbadano wpływ frakcjonowania osocza na cechy nasienia knura po kriokonserwacji porównując profile elektroforetyczne frakcji białkowych plazmy nasienia. Nie zaobserwowano znaczących różnic osobniczych w profilach chromatograficznych ani profilach elektroforetycznych poszczególnych frakcji oraz zmian jakości nasienia świeżego u poszczególnych knurów. Jednakże wykazano, że dodatek do nasienia frakcjonowanej plazmy nasienia przed mrożeniem miało bardzo istotny wpływ na parametry ruchu, integralność błon plazmatycznych i żywotność kriokonserwowanych plemników knura, czyniąc je mniej podatnymi na uszkodzenie przez kriokonserwację. Obecne we frakcjonowanej plazmie nasienia substancje białkowe, jak i niebiałkowe, obniżają wrażliwość plemników na krio-uszkodzenia. Komponenty obu frakcji plazmy nasienia wywierały krio-protekcyjne działanie poprzez stabilizację błon plazmatycznych plemników podczas zamrażania – rozmrażania nasienia. Najkorzystniejszy wpływ na przeżywalność plemników miała frakcjonowana plazma nasienia pochodząca od knurów charakteryzujących się dobrą przydatnością nasienia do zamrażania.

W ostatniej pracy włączonej do rozprawy doktorskiej [Wasilewska-Sakowska i wsp. *Effect of post-thaw supplementation of fractionated seminal plasma on survival of boar spermatozoa. Polish Journal of Veterinary Sciences* 2019; 22(3)] opisano wpływ suplementacji frakcjonowanej plazmy nasienia na przeżycie plemników knurów o dobrej i słabej zdolności zamrażania nasienia. Przy zastosowaniu dwu-kierunkowej elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (2D-PAGE) wykazano wyraźne różnice w profilach białkowych frakcji od knurów o nasieniu o dobrej i słabej zdolności zamrażania. Opisano wpływ dodatku frakcji plazmy nasienia po rozmrożeniu, pochodzących od knurów o dobrej przydatności nasienia do zamrażania na przeżywalność kriokonserwowanych plemników. Stwierdzono wyższą integralność błon plazmatycznych rozmrożonych plemników oraz ich żywotność po dodaniu frakcjonowanego nasienia w porównaniu do prób nasienia konserwowanego samym rozcieńczalnikiem. Wyniki potwierdziły, że w zależności od składu i różnej masy atomowej, obecność ochronnych składników białkowych frakcjonowanej plazmy nasienia knurów charakteryzujących się dobrą przydatnością nasienia do zamrażania, znacznie poprawia przeżycie plemników i przyczynia się do zachowania funkcjonalności plemników podczas przechowywania zamrażanego-rozmrażanego nasienia.

Do szczególnie istotnych, nowatorskich i oryginalnych odkryć zawartych w rozprawie doktorskiej Pani mgr inż. Karoliny Wasilewskiej-Sakowskiej zaliczam:

1. wykazanie, że dodatek frakcjonowanej plazmy nasienia o masie cząsteczkowej powyżej 40 kDa i poniżej 40 kDa na różnych etapach procedury kriokonserwacji moduluje podatność plemników na uszkodzenia kriogeniczne, co przejawia się wyższą przeżywalnością nasienia po rozmrożeniu,
2. wskazanie, iż, obecne we frakcjonowanej plazmie nasienia substancje białkowe, jak i niebiałkowe, obniżają wrażliwość plemników na krio-uszkodzenia,
3. wykazanie, iż komponenty obu frakcji plazmy nasienia wywierają krio-protekcyjne działanie poprzez stabilizację błon plazmatycznych plemników podczas zamrażania – rozmrażania nasienia,
4. opisanie i scharakteryzowanie frakcji białkowych plazmy nasienia w zależności od przydatności nasienia do zamrażania (krio-konserwacji).

W swojej pracy doktorskiej mgr inż. Karolina Wasilewska-Sakowska wykorzystała szereg nowoczesnych i zaawansowanych metod badawczych i analitycznych. Oprócz standardowych metod oceny plazmy nasienia i funkcji plemników, na podkreślenia zasługują zaawansowane analizy proteomiczne, w tym, analizy SDS-PAGE oraz elektroforeza 2D-PAGE oraz analizy funkcjonalności błon mitochondrialnych plemników oraz integralności plazmolemy.

Pracę doktorską mgr inż. Karoliny Wasilewskiej-Sakowskiej oceniam bardzo pozytywnie. Rozprawa wnosi duży wkład w rozwój dziedziny naukowej oraz posiada duże znaczenie aplikacyjne. Wykonanie badań wymagało dużego zaangażowania i wkładu pracy, współpracy oraz bardzo dobrej znajomości wielu technik i metod badawczych. Wyniki badań mogą przyczynić się do znacznego postępu w technologii krio-konserwacji nasienia knura.

IV. PODSUMOWANIE I WNIOSEK KOŃCOWY

Doktorantka podjęła bardzo trudny temat i niezwykle istotny ze względów ogólnopoznawczych i praktycznych. Realizacja postawionych celów badawczych wymagała zaangażowania dużego potencjału metodycznego, jaki i zapewne pracy zespołowej, a także żmudnego zbierania oryginalnego materiału badawczego mogącego na koniec stanowić bazę do przeprowadzenia odpowiednich analiz.

W mojej opinii rozprawa doktorska Pani mgr inż. Karoliny Danuty Wasilewskiej-Sakowskiej wnosi istotny wkład w rozwoju nauki z zakresu biologii i biotechnologii rozrodu świń. Oceniana rozprawa nie tylko dostarcza nowych danych, które wzbogacają już istniejącą wiedzę na temat biochemicznych podstaw regulacji funkcji nasienia, mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za jakość i przeżywalność nasienia w drogach rodnych świni,

ale również stanowi doskonałą podstawą do dalszych badań stosowanych, zmierzających do opracowania nowych strategii doskonalenia kriokonserwacji nasienia, w tym zastosowania czynników białkowych plazmy w optymalizacji kriokonserwacji nasienie knura.

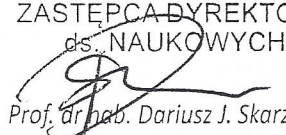
Ponadto, na podstawie analizy wyników ocenianej rozprawy doktorskiej można uznać, że Doktorantka posiada nie tylko zasób wiedzy teoretycznej z zakresu biologii (morfologii i funkcji męskiego układu rozrodczego świni) oraz biotechnologii rozrodu, ale poznała również i przyswoiła wiele nowoczesnych narzędzi badawczych, takich jak: metody biologii molekularnej, metody immunodiagnostyczne i biochemiczne, biotechniki rozrodu oraz wyróżnia ją posiadanie wielu cech istotnych w pracy badacza: motywacja, ambicja, pracowitość, zdolność do pracy zespołowej i dociekliwość. Należy mieć nadzieję, że w niedługim czasie Doktorantka stanie się w pełni ukształtowanym, pełnym inwencji i samodzielności młodym pracownikiem badawczym, z dużym potencjałem badawczym i dydaktycznym.

Przedstawiona do oceny praca doktorska pani mgr inż. Karoliny Danuty Wasilewskiej-Sakowskiej, p.t.: *„Wpływ modyfikacji wybranych etapów technologii kriokonserwacji nasienia knura na właściwości biologiczne plemników”* spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. 2017 nr 65 poz. 1789), w zw. z artykułem 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).

Zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego z wnioskiem o dopuszczenie mgr Karoliny Danuty Wasilewskiej-Sakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wnioskuje również do Wysokiej Rady Wydziału Bioinżynierii Zwierząt o wyróżnienie pracy doktorskiej pani mgr Karoliny Danuty Wasilewskiej-Sakowskiej odpowiednią nagrodą naukową.

ZASTĘPCA DYREKTORA
ds. NAUKOWYCH


Prof. dr hab. Dariusz J. Skarżyński

prof. dr hab. n. wet. Dariusz J. Skarżyński

ZAKŁAD IMMUNOLOGII I PATOLOGII ROZRODU

tel. (089) 539-31-30; fax: (089) 539-31-30; e-mail: d.skarzynski@pan.olsztyn.pl

<http://www.pan.olsztyn.pl/zipr>