

# **AUTOREFERAT**

**opis dorobku i osiągnięć naukowych**

**dr Anna Dziekońska**

**Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt  
Wydział Bioinżynierii Zwierząt  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie**

**ul. Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn  
tel. (89) 523 42 66  
e-mail: [a.dziekonska@uwm.edu.pl](mailto:a.dziekonska@uwm.edu.pl)**

<i><b>Spis treści</b></i>	<i><b>Strona</b></i>
1. Życiorys naukowy	3
2. Prace wskazane jako szczególne osiągnięcie naukowe, o którym mowa w artykule 16 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):	4
3. Omówienie szczególnego osiągnięcia naukowego	5
4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych	25
5. Podsumowanie dorobku naukowego	32
6. Działalność dydaktyczna i organizacyjna	33

## 1. Życiorys naukowy

### 1.1. Imię i nazwisko

**Anna Dziekońska**

### 1.2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej:

- 1990 – tytuł zawodowy: **technik ogrodnik**, specjalność kwiaciarstwo, Policealne Studium Ogrodnicze w Warszawie
- 1995 – tytuł zawodowy: **magister biologii**, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi (BiNoZ), Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
- 2006 – stopień naukowy: **doktor nauk rolniczych**, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, tytuł rozprawy doktorskiej: *Sprawność metaboliczna plemników knura długookresowo konserwowanych w stanie płynnym w temperaturze 5°C i 16°C*, promotor: Prof. zw. dr hab. Jerzy Strzeżek, dr h.c., recenzenci: Prof. dr hab. Jan Udała - Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Prof. dr hab. Jan Glogowski - Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie. (Praca wyróżniona nagrodą JM Rektora UWM w Olsztynie).

### 1.3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

- 09.1996– 10.1996 – Nauczyciel biologii, Szkoła Podstawowa nr 18 w Olsztynie
- 11.1996 – 08.1997 – Technolog, Zakład Enzymów i Alergenów Żywności, Zakład Fizycznych Właściwości Żywności, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie
- 09.1997 – 09.1998 – Nauczyciel biologii, Zespół Szkolno-Przedszkolny w Stawigudzie [05.1998 – 09.1998 – urlop macierzyński]
- 09.2000 – 01.2002 – Technolog, Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt w Olsztynie
- 02.2002 – 01.2007 – Asystent, Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt w Olsztynie [02.2008 –10.2008 – urlop macierzyński]
- 02.2007 – do chwili obecnej – Adiunkt, Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt, Wydział Bioinżynierii Zwierząt w Olsztynie

## 2. Prace wskazane jako szczególne osiągnięcie naukowe

Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

### 2.1. Tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

#### *Ocena wybranych parametrów jakości plemników knura i psa w aspekcie doskonalenia technologii konserwacji nasienia*

### 2.2. Autorzy, tytuł publikacji, nazwa wydawnictwa, rok wydania

Lp.	Autorzy i tytuł publikacji	IF	Punkty MNiSW
1.	<b>Dziekońska A.*</b> , Fraser L., Majewska A., Lecewicz M., Zasiadczyk Ł., Kordan W., <b>2013</b> . <i>Effect of commercial long-term extenders on metabolic activity and membrane integrity of boar spermatozoa stored at 17°C</i> . <b>Polish Journal of Veterinary Sciences</b> 16 (3): 517-525 (liczba cytowań=6).	0,712	20
2.	<b>Dziekońska A.*</b> , Zasiadczyk Ł., Lecewicz M., Strzeżek R., Koziorowska-Gilun M., Fraser L., Mogielnicka-Brzozowska M., Kordan W., <b>2015</b> . <i>Effects of storage in different semen extenders on the pre-freezing and post-thawing quality of boar spermatozoa</i> . <b>Polish Journal of Veterinary Sciences</b> 18 (4): 733-40 (liczba cytowań=0).	0,719	20
3.	<b>Dziekońska A.*</b> , Świąder K., Koziorowska-Gilun M., Mietelska K., Zasiadczyk Ł., Kordan W., <b>2017</b> . <i>Effect of boar ejaculate fraction, extender type and time of storage on quality of spermatozoa</i> . <b>Polish Journal of Veterinary Sciences</b> 20 (1): 77-84 (liczba cytowań=0).	0,697	20
4.	<b>Dziekonska A.*</b> , Kinder M., Fraser., Strzeżek J., Kordan W., <b>2017</b> . <i>Metabolic activity of boar semen stored in different extenders supplemented with ostrich egg yolk lipoproteins</i> . <b>Journal of Veterinary Research</b> 61 (1): 127-133 (liczba cytowań=0).	0,462	15
5.	<b>Dziekońska A.*</b> , Behrendt D., Strzeżek R., Kordan W., <b>2017</b> . <i>Effect of ostrich egg lipoproteins and hen egg yolk on the quality of dog sperm during liquid storage at 5 °C</i> . <b>Annals of Animal Science</b> , DOI: 10.1515/aoas-2017-0032 (liczba cytowań=0).	0,731	15
<b>Łącznie 1–5</b>		<b>3,321</b>	<b>90</b>

Łączna punktacja 5 prac, wchodzących w skład monotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR) wynosi **90 punktów MNiSW**. Łączny współczynnik wpływu (IF) wynosi **3.321**.

Punktację na rok 2017 przyjęto wg aktualnej punktacji MNiSW z dn. 9 grudnia 2016 r. (<http://www.nauka.gov.pl/komunikaty/wykaz-czasopism-naukowych-na-2016-rok.html>)

Liczbę cytowań podano według ISI Web of Science „all databases” (z dn. 1 grudnia 2017 r.).

\*autor korespondujący

Oświadczenia autora i współautorów przedstawionych powyżej prac naukowych wraz z określeniem ich indywidualnego udziału zawarto w **Załączniku nr 9**.

### **3. Omówienie szczególnego osiągnięcia naukowego**

#### **3.1. Wstęp**

Doskonalenie technologii konserwacji nasienia zwierząt jest stale aktualnym zagadnieniem. Konserwacja nasienia musi uwzględniać wiele czynników, które mają istotny wpływ na jakość przechowywanych plemników m.in. specyfikę gatunku, temperaturę i czas przechowywania czy też osobnicze źródło pochodzenia ejakulatu (Johnson i wsp., 2000; Thurston i wsp., 2001, 2002; Yeste, 2017). Różnice w budowie błon komórkowych plemników różnych gatunków zwierząt dotyczące zawartości i składu kwasów tłuszczowych oraz fosfolipidów, a także dotyczące zawartości cholesterolu determinują wybór odpowiedniej metody konserwacji nasienia, a także przeżywalność i jakość przechowywanych plemników (Cerolin i wsp., 2000, 2001; Darin-Bennett i wsp., 1977; De Leeuw i wsp., 1990; Lucio i wsp., 2017; Mandal i wsp., 2014).

Dobór metody przechowywania nasienia jest istotny dla celów reprodukcyjnych i zależy m.in. od podatności plemników na udar chłodowy. Plemniki knura charakteryzują się szczególną wrażliwością na udar chłodowy i z tego powodu przechowywane są zazwyczaj w stanie płynnym (Watson, 2000; Johnson i wsp., 2000). Ponad 90% wszystkich zabiegów inseminacyjnych loch jest wykonywanych na świecie z wykorzystaniem nasienia przechowywanego w stanie płynnym (Didion et al. 2013). Ilość przeprowadzonych zabiegów inseminacyjnych różni się jednak znacząco pomiędzy poszczególnymi krajami. W Europie, wskaźnik sztucznej inseminacji (AI) wynosi średnio od 25 do 98% (Feitsma, 2009). W krajach przodujących w produkcji trzody chlewnej takich jak Dania, Niemcy czy Holandia wynosi on powyżej 90%, w Norwegii ok. 70 – 80% (Anonymous, 1999; Feitsma, 2009; Kommisrud i wsp., 2002). W Polsce wskaźnik ten wynosi zaledwie od kilku do kilkudziesięciu procent (ok. 37 %), a w ostatnich latach obserwuje się nawet pewien regres, co spowodowane jest niekorzystną sytuacją jaka panuje na rynku trzody chlewnej (Mucha i Tyra, 2011). Nasienie knura przechowywane może być w stanie płynnym od kilku do kilkunastu dni, a uzależnione jest to m.in. od temperatury przechowywania i zastosowanego rozcieńczalnika

(Johnson i wsp., 2000; Gadea, 2003). Duża wrażliwość plemników knura na udar chłodowy wymusza konieczność jego przechowywania w temperaturze powyżej 12°C (Althouse i wsp., 1998), jednak nie wyższej niż 20°C (Paulenz i wsp., 2000). W wielu pracach wykazano, że optymalna temperatura przechowywania nasienia knura obejmuje zakres 15-20°C (Johnson i wsp., 2000; Paulenz i wsp., 2002). Przechowywanie nasienia knura w stanie zamrożonym jest znacznie ograniczone i wynosi ok. 1% (Didion i wsp., 2013). Spowodowane jest to znacznym obniżeniem żywotności i zdolności zapładniających plemników po rozmrożeniu.

Z kolei plemniki psa charakteryzują się znaczną opornością na udar osmotyczny i udar chłodowy. Ich plazmolema charakteryzuje się względnie niskim stosunkiem kwasów tłuszczowych wielonienasyconych do nasyconych w porównaniu do plazmolemy plemników np. buhaja, knura czy tryka (Darin-Bennett i wsp., 1974; Lucio i wsp., 2017; Poluos i wsp., 1973). Taka jej budowa czyni ją też mniej wrażliwą na uszkodzenia oksydacyjne w porównaniu np. z plemnikami knura. Ma to istotny wpływ na utrzymanie ich właściwości biologicznych podczas przechowywania. Dlatego też nasienie psa przechowuje się dobrze zarówno w stanie płynnym jak i mrożonym (Goericke-Pesch i wsp., 2012; Linde-Forsberg, 1995).

Stosowanie nasienia schłodzonego zarówno w inseminacji loch, a także suk daje znacznie lepsze wyniki zapładnialności niż nasienia krikonserwowanego, stąd też metoda ta jest powszechnie stosowana w rozrodzie tych gatunków zwierząt (Didion i wsp., 2013, Linde-Forsberg, 1995; Johnson i wsp., 2000; Waberski i wsp., 1994). Ponadto sama procedura przygotowania nasienia do przechowywania w stanie płynnym jest prostsza, tańsza i nie wymaga specjalistycznego wyposażenia jak w przypadku przygotowania nasienia mrożonego.

Podczas przechowywania plemników dochodzi do wielu zmian starzeniowych obejmujących uszkodzenia różnych struktur komórkowych m.in. błon plazmatycznych, akrosomów, mitochondriów, a tym samym upośledzenia sprawności metabolicznej plemników (Johnson i wsp., 2000; Dziekońska i wsp., Załącznik nr 4, poz. II A.3 i A.5.). Sprawność metaboliczna jest to zdolność komórek do przeprowadzenia różnych procesów, w tym glikolizy i fosforylacji oksydacyjnej. Energia wytwarzana podczas tych procesów jest niezbędna dla wielu funkcji plemników m.in. do ich ruchu, podstawowej zdolności plemników umożliwiającej im zapłodnienie (Guthrie i wsp., 2008).

Obecnie do oceny jakości konserwowanego nasienia wykorzystywanego do AI stosuje się wiele testów laboratoryjnych. Jednoczesna analiza wielu parametrów oceny jakości nasienia może dostarczać odpowiednich informacji o zdolności zapładniającej plemników (Waberski i wsp., 2011). Ocena ruchliwości plemników przy zastosowaniu komputerowej metody oceny ruchu (CASA) jest jedną z metod powszechnie stosowanych do oceny jakości nasienia (De Ambrogi i

wsp., 2006; Huo i wsp., 2002; Johnson i wsp., 2000; Nizanski i wsp., 2009; Vyt i wsp., 2004). Ruchliwość plemników jest podstawowym parametrem informującym o sprawności metabolicznej przechowywanych plemników, wyrażonej ich statusem energetycznym i potencjalną zdolnością zapładniającą (Rigau i wsp., 2001; Freour i wsp., 2009). Poza oceną ruchliwości plemników standardowo stosowaną metodą jest ocena funkcjonowania różnych struktur plemnika obejmujących błony komórkowe, akrosomy, DNA czy mitochondria, z zastosowaniem różnych technik barwienia, w tym wykorzystaniem odpowiednich fluorochromów. Ocena ta pozwala na właściwą diagnozę jakości przechowywanego nasienia.

W celu przeciwdziałania niekorzystnym procesom zachodzącym podczas przechowywania plemników stosuje się różne rozcieńczalniki, których skład jest tak skomponowany, aby opóźnić procesy starzenia i zabezpieczać jak najlepiej ich funkcje biologiczne od kilku do nawet kilkunastu dni (Gadea, 2003). Szczególnie rozcieńczalniki długoterminowe mają tak skomponowany skład, który pozwala na znacznie dłuższe przechowywanie plemników (w przypadku knura powyżej 6 dni) z zachowaniem ich zdolności zapładniających (Fantinati i wsp., 2009; Johnson i wsp., 2000). W składzie rozcieńczalników powszechnie stosowanych do przechowywania nasienia stosuje się często żółtko jaja ptaków lub jego komponenty, które chronią plemniki różnych gatunków zwierząt przed udarem osmotycznym i chłodowym (Manjunth i wsp., 2002; Tsutsui i wsp., 2003; Watson i Martin, 1975). Szczególnie wykorzystywane są w składzie rozcieńczalników lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL) izolowane z żółtka jaja kury – HEY (Bergeron i wsp., 2006; Demianowicz i Strzezek, 1996; Plante i wsp., 2016).

Podsumowując, analiza jakości plemników może przyczynić się do oceny przydatności technologicznej różnych rozcieńczalników stosowanych w technologii konserwacji nasienia, czy też ich komponentów, co też jest przedmiotem większości moich prac badawczych, w tym również tych wybranych do zaprezentowania jako szczególne osiągnięcie naukowe.

### **3.1. Omówienie celu naukowego ww. prac i uzyskanych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania w technologii rozrodu**

Rozcieńczalniki długoterminowe w porównaniu do krótkoterminowych pozwalają na znacznie dłuższe przechowywanie plemników knura z zachowaniem ich dobrej jakości (Anil i wsp., 2004; Fantinati i wsp., 2009; Gadea, 2003; Vyt i wsp., 2004). Stąd też rośnie zainteresowanie ich wykorzystaniem w technologii konserwacji nasienia knura. Komercyjne firmy działające na rynku stale opracowują coraz lepsze rozcieńczalniki, które pozwalają na coraz dłuższe przechowywanie nasienia knura. Jednak dopiero porównywanie ich wpływu na tym samym materiale eksperymentalnym może przyczynić się do wyboru właściwego rozcieńczalnika, który spełniałby jak najlepiej oczekiwania producentów ferm hodowlanych.

**Stad też celem prowadzonych przez mnie badań w pierwszej z wybranych prac (pt. *Effect of commercial long-term extenders on metabolic activity and membrane integrity of boar spermatozoa stored at 17°C*) jako szczególne osiągnięcie było zbadanie wpływu długookresowych rozcieńczalników na sprawność metaboliczną i integralność błon komórkowych plemników knura przechowywanych w stanie płynnym.**

W tym celu nasienie knura rozrzedzono komercyjnymi długookresowymi rozcieńczalnikami Androhep Endura®Guard™ (AeG; Niemcy, Minitüb), Dilu-cell (DC; Niemcy, Alfred Hein-K&WB), SafeCell Plus™ (SCP; Francja, IMV Technologies) i Vitasem LD (VLD; Hiszpania, Megapor SL), a następnie przechowywano przez 10 dni w temperaturze 17°C. W celu oceny przydatności ww. rozcieńczalników do konserwacji nasienia knura zbadano sprawność metaboliczną obejmującą analizę ruchliwości plemników metodą CASA (Video Test Sperm 2.1, Rosja), w tym odsetek plemników wykazujących ruch (TMOT) i odsetek plemników wykazujących ruch postępowy (PMOT), potencjał błon mitochondrialnych (MMP) przy zastosowaniu fluorochromu jodku 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraetylobenzimidazolokarbocyaniny (JC-1), JC-1 (Dziekońska i wsp. Załącznik nr 4, poz. II A.3.) oraz zawartość ATP metodą bioluminescencyjną (ATP Bioluminescence Assay CLSII, Roche Molecular Biochemical Company, Niemcy). Ponadto oceniano integralność błon plazmatycznych (PMI) z wykorzystaniem fluorochromów SYBR-14/PI (Live/Dead Sperm Viability Kit; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) i integralność błon akrosomalnych (NAR) z wykorzystaniem barwienia Giemsa (Fraser i wsp., Załącznik nr 4, poz. II A.2.).

W prezentowanych badaniach wykazałam, że ruchliwość plemników obniżała się z czasem przechowywania we wszystkich rozcieńczalnikach, ale różniła się pomiędzy nimi. Rozcieńczalniki AeG i SCP lepiej zabezpieczały ruchliwość plemników (TMOT i PMOT) w porównaniu do DC czy VLD. Otrzymane wyniki wykazały, że składniki rozcieńczalników i warunki przechowywania mogą wywierać różny wpływ na funkcjonowanie aparatu ruchu plemników.

Dodatkowo w prezentowanych badaniach wykazałam, że wartości MMP i zawartości ATP obniżały się we wszystkich rozcieńczalnikach, co było też zależne od czasu przechowywania plemników. Różnice w analizie MMP między rozcieńczalnikami były bardziej wyraźne podczas przedłużonego przechowywania plemników, szczególnie w rozcieńczalnikach AeG i SCP. Należy podkreślić, że utrzymanie wysokich wartości MMP przyczynia się do produkcji ATP, który jest niezbędny do utrzymania ruchu plemników (Gogol i wsp., 2009; Guthrie i wsp., 2008). Jednak w tych badaniach obniżenie ruchliwości plemników i MMP podczas przechowywania rozrzedzonego nasienia nie wiązało się ze spadkiem zawartości ATP, niezależnie od zastosowanego rozcieńczalnika. Zjawisko to może sugerować, że pomiar zawartości ATP jest mało czuły dla



wykrycia różnic w sprawności metabolicznej plemników pomiędzy długookresowymi rozcieńczalnikami stosowanymi do przechowywania nasienia knura w stanie płynnym.

ATP jest wytwarzane zarówno podczas fosforylacji oksydacyjnej jak i w procesie glikolizy, ale ten pierwszy proces jest uważany za bardziej wydajny w zaopatrywaniu plemników knura w energię podczas przechowywania (Medrano i wsp., 2005). Przeprowadzone zatem badania wykazały, że przedłużone przechowywanie nasienia w stanie płynnym przyczyniło się do zaburzenia procesu fosforylacji oksydacyjnej w plemnikach, co związane było z obniżeniem MMP i produkcji ATP, co z kolei mogło wpłynąć na spadek ruchliwości plemników.

W moich badaniach wykazałam również, że rozcieńczalniki AeG oraz SCP lepiej zabezpieczały PMI i NAR podczas przechowywania w porównaniu z rozcieńczalnikami DC czy VLD sugerując, że różnice w składzie rozcieńczalników mogły wpłynąć na opóźnienie zmian starzeniowych w plemnikach zależnych od czasu przechowywania. Istnieje wiele dowodów wskazujących, że pogorszenie żywotności przechowywanych plemników może być związane z nadmiernym wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (RFT) w plemnikach podczas obniżenia temperatury przechowywania, czy też różnicami w składzie rozcieńczalników (Gadea, 2003; Gogol i wsp., 2009; Johnson i wsp., 2000; Kaeoket i wsp., 2010). Pomimo, że dokładny skład rozcieńczalników używanych w tych badaniach nie był w pełni znany to można przypuszczać, że komponenty rozcieńczalników AeG i SCP przyczyniły się do lepszego zabezpieczenia jakości przechowywanego nasienia knura. W wielu pracach wykazano, że dodatek substancji do rozcieńczalników takich jak albumina surowicy bydlęcej (BSA), L-cysteina i EDTA, przyczynia się do polepszenia przeżywalności plemników podczas ich przechowywania, prawdopodobnie poprzez opóźnienie procesów związanych ze starzeniem się plemników (Johnson i wsp., 2000; Kaeoket i wsp., 2010; Waberski i wsp., 1989). Niektóre z wymienionych związków także były obecne w składzie rozcieńczalników AeG i SCP (Gadea, 2003). Wielu autorów podkreśla też istotny wpływ zdolności buforujących rozcieńczalników dla utrzymania żywotności plemników podczas ich długoterminowego przechowywania. Takimi zdolnościami charakteryzują się rozcieńczalniki AeG i SCP (Fantinati i wsp., 2009; Gączarzewicz i wsp., 2010). W moich badaniach zdolności buforujące AeG i SCP mogły zatem także przyczynić się do zachowania lepszej sprawności metabolicznej i integralności błon przechowywanych plemników knura.

**Wyniki prezentowanych badań wyraźnie sugerują, że wybór rozcieńczalnika przeznaczonego do długookresowego przechowywania nasienia knura jest ważny dla przedłużenia przeżywalności plemników i ograniczenia uszkodzeń ich funkcji. Biorąc pod uwagę warunki przechowywania w tych badaniach wykazałam, że rozcieńczalniki AeG i SCP posiadały większe zdolności do zabezpieczenia sprawności metabolicznej i integralności błon plemników knura w porównaniu do rozcieńczalników DC i VLD. Poza aspektem poznawczym**

przeprowadzone badania mają głównie aspekt aplikacyjny Uzyskane wyniki mogą posłużyć do promowania i upowszechnienia zastosowania określonego rozcieńczalnika w technologii konserwacji nasienia knura, co zostało potwierdzone poprzez uwzględnienie prezentowanej pracy na stronie komercyjnej firmy Minitüb (<http://docplayer.net/37434086-Benefits-of-androhep-plus-and-androstar-plus-long-term-extenders-for-boar-semen.html>). (Dziekońska i wsp., poz. 2.2. Publikacja 1, Załącznik nr 4, poz. III B.14., B.17., B.18.).

Przy zastosowaniu długookresowych rozcieńczalników można zachować żywotność plemników knura przez wiele dni, ale do dłuższego zabezpieczenia ich przydatności technologicznej stosuje się metodę kriokonserwacji (Bailey i wsp., 2008; Gerritis i wsp., 2005; Johnson i wsp., 2000). Metoda ta przynosi wiele korzyści m.in. przyczynia się do zapobiegania ewentualnym zagrożeniom biologicznym w produkcji wieprzowiny wysokiej jakości oraz pozwala na odtworzenie rodzicielskich cech genetycznych wyrugowanych podczas epidemii (Bailey i wsp., 2008; Didion i wsp., 2013; Rath i wsp., 2009). Stosowanie jednak tego sposobu konserwacji nasienia napotyka pewne ograniczenia zarówno ekonomiczne jak i techniczne. Do kriokonserwacji wykorzystuje się świeży ejakulat zaraz lub w krótkim czasie po jego pobraniu, a materiał pochodzący od osobników charakteryzujących się wybitnymi cechami często znajduje się w znacznej odległości od laboratorium, co znacznie utrudnia przeprowadzenie procesu kriokonserwacji w stosownym czasie. Dlatego też założyłam, że rozrzedzenie nasienia knura odpowiednim rozcieńczalnikiem i przechowywanie w zalecanej temperaturze przez 24 h pozwoliłoby na uzyskanie odpowiedniego czasu na przewiezienie go do laboratorium i wykonanie analiz oceny jakości oraz na zabezpieczenie właściwości biologicznych plemników przeznaczonych do zamrożenia.

**Zatem, celem drugiej pracy wchodzącej w skład szczególnego osiągnięcia naukowego (pt. *Effects of storage in different semen extenders on the pre-freezing and post-thawing quality of boar spermatozoa*) było zbadanie wpływu zastosowanego rozcieńczalnika na wybrane parametry jakości biologicznej plemników knura przed zamrożeniem, a następnie po rozmrożeniu.**

W badaniach wykorzystano pełne ejakulatory pochodzące ze Stacji Unasienniania Loch w Szczecinku (Polska). Próby nasienia bezpośrednio po pobraniu poddano ocenie ruchliwości plemników (CASA), a następnie rozrzedzono w trzech komercyjnych rozcieńczalnikach: BTS (Minitüb, Tiefenbach, Germany), Androhep (AH, Minitüb, Tiefenbach, Germany) and Gedil (GD, Genes Diffusion, France). Rozrzedzone nasienie przetransportowano do Laboratorium Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt UWM w Olsztynie w temperaturze 17°C i przechowywano przez 24 h w tych samych warunkach. Następnie próby nasienia zamrożono zgodnie z procedurą

kriokonserwacji podaną przez Strzeżka i wsp. (1985) zmodyfikowaną przez Fräsera i Strzeżka (2007).

Analizy oceny jakości plemników przeprowadzono przed mrożeniem i po rozmrożeniu nasienia i dotyczyły one oceny ruchliwości plemników (metodą CASA, Hamilton-Thorne Sperm Analyzer IVOS, wersja 12.3), integralności ich akrosomów, integralności błon plazmatycznych, potencjału transbłonowego mitochondriów, zawartości ATP oraz aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych tj. dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx) przy zastosowaniu metody spektrofotometrycznej z wykorzystaniem odpowiednich testów diagnostycznych.

Przed zamrożeniem nie wykazano znaczących różnic w jakości plemników przechowywanych w różnych rozcieńczalnikach, co prawdopodobnie wynikało z jakości świeżego nasienia użytego w badaniu i krótkiego okresu przechowywania (24h). Ponadto plemniki wykorzystane w tym eksperymencie pochodziły od wyselekcjonowanych knurów, które charakteryzowały się dobrą jakością ejakulatów, a zastosowane rozcieńczalniki dobrze zabezpieczały ich właściwości biologiczne. Po rozmrożeniu jakość biologiczna plemników istotnie spadła, wykazano spadek wartości wszystkich parametrów ruchu, integralności akrosomów, błon plazmatycznych jak również upośledzenie sprawności mitochondriów oraz obniżenie zdolności antyoksydacyjnych, niezależnie od zastosowanego rozcieńczalnika. Liczne badania wykazały, że przechowywanie nasienia knura w stanie płynnym i mrożonym indukuje znaczące zmiany strukturalne i funkcjonalne błon plemników, co przejawia się pogorszeniem ich właściwości biologicznych (Gączarzewicz i wsp., 2010, 2015; Roca i wsp., 2006). Stąd i w tych badaniach niezależnie od zastosowanego rozcieńczalnika obserwowałam również spadek funkcjonalności mitochondriów, co przejawiało się obniżeniem MMP i zawartości ATP oraz ruchliwości rozmrożonych plemników. W przeprowadzonych badaniach odsetek plemników wykazujących ruch wynosił ok 20 - 30 %, co wskazywałoby na znaczne uszkodzenia plemników po rozmrożeniu. W przypadku analizy pozostałych parametrów oceny jakości nasienia (NAR acrosome, PMI, MMP i zawartości ATP) wyniki były podobne do uzyskanych wcześniej dla rozmrożonego świeżego nasienia knura (Fräser i Strzeżek, 2007; Fräser i wsp., 2007, Załącznik nr 4, poz. II A.2.).

W wyniku rozrzedzenia nasienia rozcieńczalnikami, a następnie procedury kriokonserwacji dochodzi do znacznego obniżenia właściwości antyoksydacyjnych plemników. W naszych badaniach w rozmrożonych plemnikach wykazałam istotny spadek aktywności SOD i GPx w porównaniu do plemników przed zamrożeniem, niezależnie od zastosowanego rozcieńczalnika.

Wykazałam również, że rodzaj zastosowanego rozcieńczalnika do przechowywania nasienia przed zamrażaniem miał istotny wpływ na jakość biologiczną plemników po rozmrożeniu. Typ zastosowanego rozcieńczalnika wpłynął istotnie na integralność błon plazmatycznych, MMP,

zawartość ATP i aktywność GPx. Prawdopodobną przyczyną różnic pomiędzy rozcieńczalnikami był odmienny ich skład. Spośród analizowanych rozcieńczalników Androhep, BTS i GEDIL, rozcieńczalnik AH okazał się najbardziej przydatny do przechowywania plemników knura. Stąd też w rozcieńczalniku AH w porównaniu do BTS i GD, wykazałam wyższą integralność błon plazmatycznych, co z kolei pozytywnie wpłynęło na funkcjonowanie mitochondriów i aktywność jednego z enzymów antyoksydacyjnych GPx. Należy nadmienić, że GPx chroni plazmolemę plemników przed uszkodzeniami oksydacyjnymi (Jelezarsky i wsp., 2008). W swoich badaniach wykazałam, że aktywność SOD nie ulegała zmianie w zależności od rozcieńczalnika. To może sugerować, że enzym ten jest bardziej odporny na uszkodzenia kriogeniczne niż GPx. Ponadto jego niska aktywność w rozmrożonych plemnikach w porównaniu do plemników przed zamrożeniem mogłaby wskazywać na niską produkcję RFT, co sugerowali wcześniej Guthrie i Welch (2012).

**Na podstawie otrzymanych wyników badań stwierdziłam, że nasienie knura przechowywane w rozcieńczalnikach komercyjnych przez 24 godziny w temperaturze 17°C może być wykorzystane do procesu kriokonserwacji. Ponadto typ zastosowanego rozcieńczalnika do przechowywania nasienia przed mrożeniem istotnie wpływa na właściwości biologiczne plemników po rozmrożeniu (PMI, MMP, zawartość ATP i aktywność GPx). Rozcieńczalnik Androhep lepiej zabezpieczał jakość plemników niż BTS i GEDL. Należy nadmienić, że badania te zapoczątkowały serię doświadczeń w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt w Olsztynie (Wasilewska i wsp., 2016, Wasilewska i Fraser, 2017), których wyniki mogą przyczynić się do znacznego postępu w technologii kriokonserwacji nasienia knura. (Dziekońska i wsp., poz. 2.2. Publikacja 2, Załącznik nr 4, poz. III B.21.).**

Jednym z czynników, który należy uwzględnić w technologii konserwacji nasienia knura jest frakcja ejakulatu. W wielu doniesieniach wykazano, że frakcja ejakulatu może istotnie wpływać na jakość kriokonserwowanych plemników (Peña i wsp., 2006; Saravia i wsp., 2009; Siqueira i wsp., 2011). Jednak wpływ frakcji ejakulatu na jakość przechowywanych plemników knura w stanie płynnym został opisany tylko w nielicznych pracach i dotyczył tylko kilku godzin przechowywania nasienia (Garcia i wsp., 2009). Stąd też podjęte przeze mnie badania można uznać za nowatorskie. Wczesniejsze badania wykazały, że frakcja ejakulatu bogata w plemniki (**SRF**) stanowi około 30-50 mL ejakulatu; zachowuje lepszą jakość plemników w porównaniu do pozostałej frakcji ejakulatu (**PSRF**) stanowiącej ok. 120-150 mL ejakulatu, co spowodowane jest jakością plazmy nasienia (**SP**) zawartej w tych frakcjach (Garcia i wsp., 2009; Siqueira i wsp., 2011). Podczas rozrzedzania nasienia odpowiednim rozcieńczalnikiem wpływ SP na przechowywane plemniki może być znacznie ograniczony. Obecność różnych składników w składzie rozcieńczalników i SP pochodzącej z różnych frakcji ejakulatu oraz interakcje pomiędzy

tymi komponentami mogą wpływać na przeżywalność plemników przechowywanych w stanie płynnym. Dlatego też założyłam, że typ rozcieńczalnika mógłby wpływać na jakość plemników pochodzących z różnych frakcji ejakulatu, a zwłaszcza z PSRF. Frakcja PSRF stanowi znaczącą objętość pełnego ejakulatu knura wykorzystywanego głównie w konserwacji nasienia knura w celach komercyjnych stąd jej wykorzystanie jest znaczące.

**Biorąc pod uwagę powyższe dane, celem badań w kolejnej pracy (pt. *Effect of boar ejaculate fraction, extender type and time of storage on quality of spermatozoa*) była ocena wpływu frakcji ejakulatu na jakość plemników przechowywanych w różnych rozcieńczalnikach.**

Analizy jakości plemników obejmowały ocenę parametrów ruchu plemników z wykorzystaniem systemu CASA, integralność błon akrosomalnych oraz błon plazmatycznych plemników. Badania te przeprowadzono w dniach przechowywania 1, 3 i 7 (D1, D3 i D7).

Do badań wykorzystano frakcje ejakulatu bogatą w plemniki (F1, 20 ml) i pozostałą frakcję ejakulatu zawierającą resztę frakcji SRF i frakcję PSRF (F2, 100 mL), które rozrzedzono komercyjnymi rozcieńczalnikami: krótkoterminowym BTS (Minitüb, Niemcy) i długoterminowym SafeCel Plus™ (SCP, IMV Technologia, Francja) i przechowywano przez 7 dni w temperaturze 17°C.

W badaniach wykazałam, że typ rozcieńczalnika i frakcji ejakulatu istotnie wpływa na jakość plemników. Jeszcze przed rozrzedzeniem frakcja F1 charakteryzowała się wyższymi wartościami parametrów ruchu w porównaniu do frakcji F2, co związane było z ich składem biochemicznym i było zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (Rodríguez-Martínez i wsp., 2009; Saravia i wsp., 2009). Użyta w badaniach frakcja F1 zawierała całą zawartość frakcji SRF. Z kolei frakcja F2 zawierała tylko nieznaczną jej objętość, a dominowała w niej frakcja PSRF. Wykazane różnice w jakości plemników pomiędzy frakcjami ejakulatu mogły być związane zatem z odmiennym ich składem biochemicznym m.in. dotyczącym ilości i rodzaju jonów, białek, zawartości wodorowęglanów oraz wartości pH (Rodríguez-Martínez i wsp., 2009, 2011; Saravia i wsp., 2009). Plemniki pochodzące z pierwszej porcji SRF (ok. 10-15 mL, P1), są wystawione na działanie wydzielin ogona najądrzy (Rodríguez-Martínez i wsp., 2009). Biorąc pod uwagę te doniesienia można przypuszczać, że obecność pewnych białek we frakcji F1 pochodzących z płynu najądrzowego miała pozytywny wpływ na funkcjonowanie plemników, co potwierdzały wykonane przez ze mnie badania dotyczące analizy proteomicznej frakcji F1 i F2 przy użyciu elektroforezy SDS-PAGE (Dziekońska i wsp., Załącznik nr 4, poz. III B.25.) i inne wcześniejsze doniesienia (Zasiadczyk i wsp., 2015). Zatem należy przypuszczać, że różnice pomiędzy F1 i F2 dotyczące jakości plemników wynikały z obecności tych specyficznych białek i ich koncentracji w analizowanej porcji nasienia.

Fracja F1, bezpośrednio po rozrzedzeniu rozcieńczalnikiem BTS, charakteryzowała się wyższym odsetkiem plemników wykazujących ruch postępowy w porównaniu do F2, co mogło być związane z wpływem wymienionych wcześniej białek SP i z wysoką zdolnością antyoksydacyjną frakcji F1 (Barranco i wsp., 2015). Ponadto wartości innych parametrów oceny jakości plemników (TMOT, VAP, VSL, VCL, ALH, NAR and PMI) dla frakcji F1 były wyższe w porównaniu z F2, szczególnie w przypadku rozcieńczalnika BTS, co związane też było z czasem przechowywania. Natomiast nie wykazałam znaczących różnic pomiędzy frakcjami rozrzedzonymi rozcieńczalnikiem SCP, co wskazywałoby, że wybór rozcieńczalnika jest istotny.

W prezentowanych badaniach wykazałam, że jakość przechowywanych plemników jest uwarunkowana nie tylko frakcją ejakulatu, ale i typem rozcieńczalnika. Rozcieńczalnik BTS posiada prostszy skład niż rozcieńczalnik SCP, który jest wzbogacony w białka i antyoksydanty. Przeprowadzone analizy elektroforetyczne (SDS-PAGE) rozcieńczalników wykazały, że w składzie rozcieńczalnika SCP występują białka w zakresie mas cząsteczkowych 60-66 kDa. (Dziekońska i wsp., Załącznik nr 4, poz. III B.25.). Z kolei wcześniejsze badania pokazały, że dodatek do rozcieńczalników białka BSA (o masie cząsteczkowej około 65-66 kDa) obniża wpływ stresu oksydacyjnego i poprawia istotnie jakość plemników knura przechowywanych w stanie płynnym w temperaturze 17°C (Zhang i wsp., 2015). Otrzymane wyniki badań sugerowały, że dodatek ww. białek do rozcieńczalnika SCP mógł poprawić jakość przechowywanych plemników, szczególnie tych pochodzących z frakcji F2. W analizie parametrów ruchu i integralności błon plemników przechowywanych w SCP nie obserwowałam znaczących różnic pomiędzy frakcjami F1 i F2 niezależnie od czasu przechowywania.

**Podsumowując, w niniejszej pracy wykazałam, że czynniki takie jak frakcja ejakulatu, zastosowany typ rozcieńczalnika, osobnicze źródło pochodzenia ejakulatu, kolejny dzień przechowywania mogą znacząco wpływać na jakość przechowywanych plemników knura w stanie płynnym. Frakcja F1 charakteryzowała się lepszą jakością plemników w porównaniu do frakcji F2, szczególnie podczas ich przechowywania w rozcieńczalniku krótkoterminowym. Obserwowane różnice między frakcjami F1 a F2 mogły być spowodowane obecnością białek SP o różnym pochodzeniu. Badania te wskazują, że rozcieńczalnik długoterminowy zawierający w swoim składzie białka lepiej chroni plemniki knura przed uszkodzeniami podczas przechowywania niż rozcieńczalnik krótkoterminowy, niezależnie od frakcji ejakulatu. Zastosowanie długoterminowych rozcieńczalników pozwala na lepsze wykorzystanie frakcji F2 ejakulatu w technologii konserwacji nasienia knura. (Dziekońska i wsp., poz. 2.2. Publikacja 3, Załącznik nr 4, poz. III B.24., B.25.).**

Jednym ze sposobów służących zachowaniu żywotności plemników przez długi okres czasu z zachowaniem ich zdolności zapładniającej jest spowolnienie metabolizmu plemników, co można osiągnąć poprzez obniżenie temperatury przechowywania plemników (Paulenz i wsp., 2002). Redukcja metabolizmu jest pożądana, gdyż wiąże się ze zmniejszeniem tempa wykorzystania substratów energetycznych oraz nagromadzeniem się produktów ubocznych (Flowers, 2005; Gadea, 2003). Zastosowanie niższych temperatur w konserwacji nasienia knura stało się możliwe poprzez zastosowanie w składzie rozcieńczalnika komponentów o właściwościach protekcyjnych wobec błon plazmatycznych plemników. Taką funkcję pełni żółtko jaja ptaków, a zwłaszcza lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL) izolowane z żółtka jaja kury - HEY (Bergeron i wsp., 2006; Manjunth i wsp., 2002; Plante i wsp., 2016). Jednakże zastosowanie HEY i jego komponentów wzbudza pewne kontrowersje. Stwierdzono bowiem, że HEY zawiera substancje inhibitorowe, które naruszają proces oddychania plemników i ich ruchliwość (Strzeżek i wsp., Załącznik nr 8). Dodatkowo w przypadku knura w plazmie nasienia wykazano obecność specyficznych białek zależnych od jonów cynkowych, które posiadają zdolność precypitacji komponentów HEY, co znacznie ogranicza ich wykorzystanie do przechowywania nasienia (Strzeżek i Hopfer, 1987). Ponadto pełne żółtko jaja kury może być potencjalnym źródłem zanieczyszczeń mikrobiologicznych lub nawet wirusowych, co z kolei powoduje obniżenie zdolności zapładniającej nasienia stosowanego w inseminacji (Strzeżek i wsp., Załącznik nr 8).

W wielu doniesieniach wykazano, że frakcja lipoprotein wyizolowana z żółtka jaja strusia afrykańskiego (*Struthio camelus*) (LPFo), może zastąpić żółtko jaja kury (HEY) i jego komponenty i może być stosowana w formie liofilizowanej w technologii konserwacji nasienia knura zarówno w stanie płynnym jak i w technologii kriokonserwacji (Dziekońska i wsp., Załącznik nr 4, poz. II A.3. i A.5.; Fraser i wsp., 2007, Załącznik nr 4, poz. II A.2.; Strzeżek i wsp., Załącznik nr 4, poz. III B.2. i B.4.). Liczne badania wykazały, że preparat LPFo charakteryzuje się wyjątkowymi właściwościami protekcyjnymi wobec ultrastruktur plemników, wpływa pozytywnie na funkcje metaboliczne plemników oraz ich zdolności zapładniające (Dziekońska i wsp., Załącznik nr 4, poz. II A.3 i A.5; Fraser i wsp., 2010; Strzeżek i wsp., 2011). Ponadto uzyskanie satysfakcjonujących wyników inseminacji loch nasieniem przechowywanym w rozcieńczalniku Kortowo 3 (K3) z dodatkiem LPFo w temperaturze 5°C wskazało na możliwość obniżenia temperatury konserwacji nasienia knura, co może mieć też znaczenie praktyczne w reprodukcji świń (Strzeżek i wsp., Załącznik nr 8).

Biorąc pod uwagę powyższe fakty założyłam, że zastosowanie licencjonowanego dodatku preparatu LPFo, którego jestem współautorem w opatentowaniu (Strzeżek i wsp., Załącznik nr 8), do różnych rozcieńczalników przeznaczonych do przechowywania nasienia knura, mogłoby pozytywnie wpłynąć na sprawność metaboliczną plemników zwłaszcza w obniżonej temperaturze.

**Stad celem pracy (pt. *Effect of ostrich egg lipoproteins and hen egg yolk on the quality of dog sperm during liquid storage at 5 °C*) była ocena wpływu dodatku LPFo do rozcieńczalników Androhep, BTS i MR-A na sprawność metaboliczną plemników knura przechowywanych w dwóch temperaturach 5°C i 16°C.**

Pełne ejakulatory rozrzedzono komercyjnymi rozcieńczalnikami Androhep, BTS i MR-A (Kubus, Hiszpania). Rozcieńczalniki przygotowano zgodnie z procedurą podaną przez producenta i zastosowano w dwóch eksperymentalnych wariantach bez (kontrola) i z dodatkiem 5% dodatku preparatu LPFo. Przygotowanie LPFo zostało przeprowadzone zgodnie z metodą podaną przez Strzeżka i wsp. (Załącznik nr 4, poz. III B.2.).

W celu oceny sprawności metabolicznej plemników zbadano ruchliwość plemników (metodą szacunkową), integralność błon plazmatycznych (z wykorzystaniem fluorochromów CFDA/PI), potencjał transbłonowy mitochondriów, zawartość ATP (metodą bioluminescencyjną) i zużycie tlenu (przy zastosowaniu elektrody Clarke's). Badania przeprowadzono w pierwszym i trzecim dniu przechowywania rozrzedzonego nasienia (D1 i D3).

W badaniach wykazałam, że dodatek LPFo do rozcieńczalników miał korzystny wpływ na wszystkie analizowane parametry jakości plemników knura (tj. ruchliwość, PMI, MMP, zużycie tlenu i zawartość ATP) przechowywanych w stanie płynnym w dwóch różnych temperaturach (5° i 16°C). Obserwowane pozytywne jego działanie związane może być z właściwościami biochemicznymi LPFo wynikającymi ze specyficznego jego składu, w którym dominują lipoproteiny (Strzeżek i wsp., Załącznik nr 4, poz. III B.2., Załącznik nr 8). W składzie LPFo występują komponenty, które mogą pozytywnie wpływać na funkcje plemników jak np. fosfatydyloseryna, która chroni plemniki knura przed udarem chłodowym, co może mieć szczególne znaczenie dla konserwacji nasienia knura w obniżonych temperaturach (Fraser i Strzeżek, 2007, Fraser i wsp., 2010).

W swoich badaniach wykazałam, że zastosowanie dodatku LPFo do rozcieńczalników Androhep, BTS i MR-A korzystnie wpłynęło na PMI i MMP plemników przechowywanych w 5° i 16°C. Otrzymane wyniki potwierdziły wcześniejsze doniesienia, w których wykazano, że frakcja LPFo wywiera zdecydowany korzystny wpływ na strukturę i funkcje plemników knura przechowywanych w stanie płynnym (Dziekońska i wsp., Załącznik nr 4, poz. II A.3.; Dziekońska i Strzeżek, Załącznik nr 4, poz. II A.5.) i poddanych procesowi kriokonserwacji (Fraser i wsp., Załącznik nr 4, poz. II A.2.). Pozytywne działanie LPFo na integralność plazmolemy plemników i sprawność mitochondriów związane było prawdopodobnie z wiązaniem się lipoprotein LPFo z plazmolemą plemników w rejonach główki i wstawki (Fraser i wsp., 2010). Wiązanie LPFo do struktur plemników mogło jednak wykazywać różnice w zależności od rozcieńczalnika i temperatury przechowywania plemników, na co wskazywały wyniki analizy PMI i MMP w



niniejszej pracy. Na podstawie wcześniejszych doniesień można przypuszczać, że mogły one być związane z różnicami w interakcjach pomiędzy składnikami rozcieńczalnika, plazmy nasienia, a lipoproteinami LPFo z plazmolemmą plemników (Fraser i wsp., 2010; Plante i wsp., 2016; Strzeżek i Hopfer 1987). Obecność LPFo i BSA w rozcieńczalnikach stosowanych w niniejszej pracy okazała się chronić integralność błon plazmatycznych plemników, co jest istotne dla utrzymania ich funkcji metabolicznej (Fraser i wsp., 2010; Zhang i wsp., 2015). Dlatego zmiany, które obserwowałam w tych badaniach w analizie PMI i MMP podczas przechowywania plemników w rozcieńczalnikach wzbogaconych w LPFo w różnych temperaturach mogły wpłynąć na tempo metabolizmu energetycznego. Ponadto na wzrost sprawności mitochondrialnej (wzrost MMP i tempa zużycia tlenu) w rozcieńczalnikach z dodatkiem LPFo w porównaniu do kontroli mogła mieć wpływ obecność różnych źródeł energetycznych obecnych w rozcieńczalnikach. W rozcieńczalnikach wykorzystywanych w tych badaniach głównym źródłem energetycznym była glukoza, która jest preferowanym substratem wykorzystywanym dla metabolizmu plemników (Rodríguez-Gil i Bonet, 2016). Plemniki ssaków, w tym i knura, mogą jednak wykorzystywać, oprócz monosacharydów (glukozy i fruktozy), inne substraty takie jak mleczan, pirogronian, cytrynian, glicerol, fosfolipidy czy nawet triacyloglicerole (Jones i Bubb, 2000; Medrano i wsp., 2006; Rodríguez-Gil i Bonet, 2016). Biorąc pod uwagę powyższe fakty prawdopodobne jest, że zawarte fosfolipidy i triacyloglicerole w LPFo mogłyby być też potencjalnym źródłem energii dla przechowywanych plemników knura.

W przeprowadzonych badaniach wyraźnie zaobserwowałam, że obok wpływu rozcieńczalnika i jego wariantu na metabolizm plemników miał wpływ wariant temperatury. W temperaturze 5°C wykazałam wyraźny spadek sprawności mitochondrialnej wyrażony znacznym obniżeniem zużycia tlenu, spadkiem MMP i niższą produkcją ATP. Ponadto spadek zużycia tlenu był skorelowany ze spadkiem zawartości ATP, niemniej jednak nie obserwowałam znaczących różnic pomiędzy rozcieńczalnikami z LPFo, a rozcieńczalnikami bez LPFo.

**Podsumowując w prezentowanej pracy wykazałam, że zastosowanie LPFo do rozcieńczalników Androhep, BTS i MR-A wydaje się poprawiać sprawność metaboliczną plemników knura przechowywanych przez trzy dni, szczególnie w temperaturze 5°C. Badania te potwierdzają, że sprawność metaboliczna przechowywanych plemników uwarunkowana jest typem rozcieńczalnika, temperaturą i czasem przechowywania. Ponadto wykazane różnice w sprawności metabolicznej plemników mogą być związane z interakcjami różnych komponentów rozcieńczalnika i plazmy nasienia z lipoproteinami żółtka jaja strusia podczas przechowywania w stanie płynnym. Zjawisko to wskazuje na potencjalną możliwość wykorzystania LPFo jako dodatku do komercyjnych rozcieńczalników, które można byłoby**

wykorzystać do przechowywania nasienia knura w temperaturze 5°C. (Dziekońska i wsp., poz. 2.2. Publikacja 4, Załącznik nr 4, poz. III B.6.).

Żółtko jaja kury (HEY) i jego komponenty są także powszechnie stosowane w technologii konserwacji nasienia psa (Beccaglia i wsp., 2009; Bencharif i wsp., 2008). W wielu pracach wykazano, że przechowywanie plemników psa w rozcieńczalnikach zawierających w swoim składzie cytrynian czy Tris-żółtko jaja kury zapewnia im dobrą jakość przez wiele dni (Goericke-Pessch i wsp., 2012; Tsutsui i wsp., 2003; Vestegen i wsp., 2001). Jednak zastosowanie HEY jako składnika rozcieńczalników dla psa podobnie jak w przypadku knura może być ograniczone. Dlatego poszukiwanie zastępczego jego komponentu wydaje się wskazane. Wcześniejsze badania wykazały, że preparat LPFo może być wykorzystany w technologii konserwacji nasienia psa w stanie zamrożonym (Strzeżek i wsp., 2012)

**Biorąc pod uwagę powyższe informacje, celem kolejnej pracy (pt. *Effect of ostrich egg lipoproteins and hen egg yolk on the quality of dog sperm during liquid storage at 5 °C*) było przeprowadzenie analizy porównawczej wpływu dodatku LPFo i HEY do rozcieńczalnika TCF na jakość plemników psa przechowywanych w temperaturze 5°C przez 7 dni.**

Do badań wykorzystano frakcje ejakulatu bogatą w plemniki, którą rozrzedzono rozcieńczalnikami: Tris-kwas cytrynowy-fruktoza (kontrola; TCF), Tris-kwas cytrynowy-fruktoza+5% dodatek LPFo (TCF-LPFo), Tris-kwas cytrynowy-fruktoza+20% dodatek żółtka kury (TCF-HEY). Rozcieńczalniki TCF i TCF-HEY przygotowano zgodnie z metodą opisaną przez Rota i wsp. (1995). Plemniki przechowywano w temperaturze 5°C przez siedem dni.

Ocena jakości plemników uwzględniała analizę parametrów ruchu plemników metodą CASA z wykorzystaniem analizatora oceny ruchliwości plemników (Hamilton-Thorne Sperm Analyzer IVOS, wersja 12.3), integralność akrosomu, integralność błon plazmatycznych (z wykorzystaniem SYBR14/PI), aktywność mitochondriów oraz zawartość ATP.

W niniejszych badaniach podczas całego okresu eksperymentu obserwowano stopniowe obniżanie się wartości wszystkich parametrów ruchu plemników. Jednakże znaczące różnice wykazano w poziomie ich spadku zależne od zastosowanego rozcieńczalnika. Stwierdzono także, że dodatek LPFo podobnie jak dodatek HEY do rozcieńczalnika TCF korzystnie wpłynął na analizowane parametry ruchu plemników psa przechowywanych w stanie płynnym. Wartości większości parametrów ruchu plemników (TMOT, PMOT, VSL, VCL, ALH, BCF I LIN) były wyższe dla rozcieńczalników TCF-LPFo i TCF-HEY w porównaniu z rozcieńczalnikiem TCF podczas całego okresu przechowywania nasienia. Nie wykazałam natomiast znaczących różnic w analizie PMOT, VSL, ALH i LIN pomiędzy rozciezczalnikami LPFo-TCF i HEY-TCF niezależnie od czasu przechowywania. Podobne pozytywne działanie wykazywał też dodatek LPFo do

przechowywanego nasienia knura (Dziekońska i wsp., Załącznik nr 4, poz. II A.3., A.5.; Fraser i wsp. 2010, Fraser i wsp., Załącznik nr 4, poz II A.2.). Ponadto LPFo pozytywnie wpłynął na parametry ruchu kriokonserwowanych plemników psa (Strzeżek i wsp., 2012).

Zachowanie prawidłowej ruchliwości plemników jest nierozdzielnie związana z integralnością błon akrosomalnych i plazmatycznych przechowywanych plemników (Dziekońska i wsp., poz.2.2. Publikacja 1; Volpe i wsp., 2009). W przeprowadzonych badaniach wykazałam, że dodatek HEY do przechowywanego nasienia psa pozytywnie wpływał na integralność akrosomów i błon plazmatycznych. Podobne działanie wykazują lipoproteiny LPFo, które wchodzi w interakcję z plazmolemą plemników knura, co może mieć istotne znaczenie dla zabezpieczenia ich funkcji metabolicznych podczas przechowywania (Fraser i wsp., 2010, Dziekońska i wsp., poz. 2.2. Publikacja 4). Dlatego jest prawdopodobne, że obecność zarówno HEY jak i LPFo w rozcieńczalniku TCF odgrywała podobną protekcyjną rolę wobec błon plemników psa, na co wskazują uzyskane wyższe wartości PMI i MMP dla tych rozcieńczalników, w porównaniu z rozcieńczalnikiem TCF podczas badanego okresu.

Z kolei nie wykazałam znaczącego wpływu czasu podczas 5 dni przechowywania na integralność akrosomów, niezależnie od zastosowanego rozcieńczalnika, co w pewnym stopniu korelowało z wynikami dotyczącymi parametrów ruchu plemników. Otrzymane wyniki mogły potwierdzać, że akrosomy plemników psa charakteryzują się znaczną opornością na udar chłodowy (Nizanski i wsp., 2009; Verstegen i wsp., 2005). Zachowanie lepszej integralności błon plazmatycznych plemników jest niezbędne do prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych w tym glikolizy i fosforylacji oksydacyjnej, które są podstawowymi szlakami wytwarzającymi energię w postaci ATP dla plemników (du Plessis i wsp., 2015). W prezentowanych badaniach wykazałam pozytywny wpływ dodatku HEY do rozcieńczalnika TCF na zawartość ATP w plemnikach, co mogło być związane z integralnością błon plazmatycznych i przyczynić się do zapewnienia wyższej ruchliwości plemników podczas ich przechowywania w stanie płynnym.

Otrzymane rezultaty badań wykazały, że rozcieńczalniki TCF-LPFo i TCF-HEY lepiej zabezpieczały MMP w porównaniu do rozcieńczalnika TCF, co mogło mieć też wpływ na obserwowaną wyższą zawartość ATP w plemnikach wytworzoną podczas procesu fosforylacji oksydacyjnej. Ponadto wyższa sprawność metaboliczna plemników przechowywanych w TCF-LPFo i TCF-HEY w porównaniu z rozcieńczalnikiem TCF wyrażona zawartością ATP mogła być związana z obecnością dodatkowych substratów energetycznych wykorzystywanych w metabolizmie plemników psa. W przedstawionych badaniach wykorzystane rozcieńczalniki TCF-LPFo and TCF-HEY w swoim składzie obok fruktozy zawierały dodatkowe substraty energetyczne pochodzące z żółtka jaja takie jak fosfolipidy i triacyloglicerole, czy nawet niewielkie ilości glukozy. Obecność tych substratów mogłaby więc wpłynąć na wzrost zawartości ATP w

przechowywanych plemnikach. Są bowiem doniesienia, że w plemnikach psa fosfolipidy są ważnym źródłem energii (Kmenta i wsp., 2011). Zatem jest możliwe, że ich dodatek do rozcieńczalnika TCF mógł też przyczynić się do lepszej wydajności energetycznej plemników psa przechowywanych w temperaturze udaru chłodowego.

**Podsumowując, frakcja liofilizowanych lipoprotein izolowanych z żółtka jaja strusia (LPFo) może być alternatywnie stosowana zamiast dodatku żółtka jaja kury (HEY) do rozcieńczalnika Tris-kwas cytrynowy-fruktoza (TCF) wykorzystywanego do przechowywania plemników psa w stanie płynnym. W pracy wykazałam, że 5% dodatek LPFo dodany do rozcieńczalnika TCF pozwala przechowywać plemniki w temperaturze 5°C co najmniej 5 dni. W tym czasie plemniki psa zachowują dobrą jakość: ruchliwość, integralność błon, funkcjonalność mitochondriów i zawartość ATP porównywalną z plemnikami przechowywanymi w rozcieńczalniku TCF-HEY. Obecność dodatku LPFo lub HEY w rozcieńczalniku TCF zabezpieczała integralność błon plazmatycznych i mogła przyczynić się do poprawienia statusu energetycznego plemników psa przechowywanych w temperaturze udaru chłodowego. (Dziekońska i wsp., poz. 2.2. Publikacja 5, Załącznik nr 4, poz. III B.20.).**

*Podsumowując, podstawą szczególnego osiągnięcia naukowego są prezentowane, w załączonych 5 publikacjach, wyniki badań dotyczące wpływu różnych czynników: rozcieńczalnika, czasu i temperatury przechowywania, frakcji ejakulatu oraz liofilizowanej frakcji izolowanej z żółtka jaja strusia (LPFo) na jakość plemników knura i psa przechowywanych w stanie płynnym, a w przypadku knura również i kriokonserwowanym (szczególnie na ich sprawność metaboliczną). Uzyskane wyniki posiadają zarówno aspekt poznawczy, ale przede wszystkim aplikacyjny.*

**Do najważniejszych osiągnięć szczególnego osiągnięcia naukowego zaliczam:**

- 1. Wykazanie, że dobór odpowiedniego komercyjnego rozcieńczalnika istotnie wpływa na sprawność metaboliczną i integralność błon plazmatycznych plemników knura przechowywanych w stanie płynnym. Spośród badanych długookresowych rozcieńczalników (Androhep Endura®Guard™, Dilu-cell, SafeCell Plus™ i Vitasem) Androhep i SafeCell Plus™ najlepiej zabezpieczały integralność błon plazmatycznych, ruchliwość i sprawność funkcjonalną mitochondriów.**
- 2. Wykazanie po raz pierwszy, że nasienie knura przechowywane w komercyjnych rozcieńczalnikach (Androhep, BTS i Gedil) przez okres 24 h w temperaturze 17°C może być wykorzystane do kriokonserwacji.**

3. **Wykazanie, że jakość biologiczna plemników knura po rozmrożeniu uwarunkowana jest typem zastosowanego rozcieńczalnika do przechowywania przed kriokonserwacją. Zastosowanie rozcieńczalnika długoterminowego (Androhep) do przechowywania nasienia knura przed jego zamrożeniem przyczyniło się do zachowania lepszej jakości plemników po rozmrożeniu (m.in. zachowania lepszej integralności błon plazmatycznych, sprawności mitochondriów oraz zdolności antyoksydacyjnej), w porównaniu do rozcieńczalników BTS i Gedil.**
4. **Wykazanie, że zastosowanie odpowiedniego typu rozcieńczalnika wzbogaconego w wybrane białka może przyczynić się do lepszego wykorzystania pełnego ejakulatu w technologii konserwacji nasienia knura w stanie płynnym. Zastosowanie rozcieńczalnika SafeCel Plus™ w porównaniu z rozcieńczalnikiem krótkoterminowym BTS pozytywnie wpłynęło na utrzymanie ruchliwości oraz integralności błon przechowywanych plemników knura niezależnie od zastosowanej frakcji ejakulatu.**
5. **Wykazanie po raz pierwszy, że zastosowanie licencjonowanego dodatku preparatu LPFo do komercyjnych rozcieńczalników (Androhep, BTS i MR-A) pozytywnie wpływa na sprawność metaboliczną przechowywanych plemników knura, zwłaszcza w temperaturze 5°C, co wskazuje na potencjalną możliwość jego wykorzystania w składzie komercyjnych rozcieńczalników.**
6. **Wykazanie, że dodatek LPFo może być alternatywnie stosowany do rozcieńczalnika Tris-kwas cytrynowy-fruktoza (TCF) stosowanego do przechowywania nasienia psa zamiast dodatku pełnego żółtka jaja kury.**
7. **Wykazanie, że zastosowanie 5% dodatku LPFo do rozcieńczalnika Tris-kwas cytrynowy–fruktoza korzystnie wpływa na zachowanie ruchliwości plemników, integralności błon i sprawności funkcjonalnej mitochondriów podczas przechowywania nasienia psa w temperaturze 5°C przez okres 5 dni.**

Wiedza dotycząca jakości przechowywanych plemników, w tym ich sprawności metabolicznej może przyczynić się do opracowania nowych bardziej skutecznych metod konserwacji nasienia m.in. dotyczących opracowania nowych rozcieńczalników lub wyboru odpowiedniego rozcieńczalnika spośród szerokiej gamy już dostępnych na rynku, który najlepiej spełniałby oczekiwania każdego hodowcy. Zastosowanie odpowiednich rozcieńczalników z uwzględnieniem różnorodnych czynników takich jak czas, temperatura, frakcja ejakulatu czy czynnik osobniczy może pozwolić na dłuższe przechowywanie plemników oraz lepsze zabezpieczenie ich przydatności technologicznej m.in. do zabiegu sztucznej inseminacji.

## **Literatura**

- Althouse G.C., Wilson M.E., Kuster C., M. Parsley M., 1998.** *Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen.* Theriogenology, 50: 535–543.
- Anonymous:** *Annual fertility statistics in Norway.* Norwegian Pig breeders' Association, Hamar, 1999.
- Anil S.S., Larriestra A., Deen J., Morrison R.B., Minion L., 2004.** *A retrospective study on the preserving capacity of a commercial boar semen extender.* Theriogenology 62: 425–436.
- Barranco I., Tvarijonaviciute A., Perez-Patiño C., Parrilla I., Ceron J.J., Martinez E.A., Rodriguez-Martinez H., Roca J., 2015.** *High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility.* Sci Rep 5: 18538.
- Bailey J.L., Lessard C., Jacques J., Brèque C., Dobrinski I., Zeng W., Galantino-Homer H.L., 2008.** *Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry.* Theriogenology 70: 1251–1259.
- Beccaglia M., P. Anastasi P., S. Chigioni S., G.C. Luvoni G.C., 2009.** *TRIS-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen.* Reprod. Domest. Anim. 44: 345–349.
- Bencharif D., Amirat L., Anton M., Schmitt E., Desherces S., Delhomme G., Langlois M.L., Barrière P., Larrat M., Tainturier D., 2008.** *The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen.* Theriogenology, 70: 1478–1488.
- Bergeron A., Manjunath P. 2006.** *New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk.* Mol. Reprod. Dev. 73: 1338–1344.
- Cerolini S., Maldjian A., Surai P., Noble R., 2000.** *Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage.* Anim. Reprod. Sci. 58: 99–111.
- Cerolini S., Maldjian A., Pizzi F., Gliozi T.M., 2001.** *Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen.* Reproduction 121: 395–401.
- Darin-Bennett A., Poulos A., White I.G. 1974.** *The phospholipids and phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of dog and fowl spermatozoa.* J. Reprod. Fertil. 41: 471–474.
- Darin-Bennett A., White I.G. 1977.** *Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock.* Cryobiology 14: 466–470.
- De Ambrogi M., Ballester J., Saravia F., Caballero I., Johannisson A., Wallgren M., Andersson M., Rodriguez-Martinez H., 2006.** *Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa.* Int. Androl 29: 543–552.
- De Leeuw F.E., Colenbrander B., Verkleij A.J., 1990.** *The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury.* Reprod. Domest. Anim. (Suppl. 1): 95–104.
- Demianowicz W., Strzeżek J., 1996.** *The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state.* Reprod. Domest. Anim. 31: 279–280.
- Didion B.A., Braun G.D., Duggan M.V., 2013.** *Field fertility of frozen boar semen: a retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period.* Anim. Reprod. Sci. 137: 189–196.
- Du Plessis S.S., Agarwal A., Mohanty G., van der Linde M., 2015.** *Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use?* Asian J. Androl. 17: 230–235.
- Fantinati P., Zannoni A., Bernardini C., Forni M., Tattini A., Seren E., Bacci M.L., 2009.** *Evaluation of swine fertilization medium (SFM) efficiency in preserving spermatozoa quality during long-term storage in comparison to four commercial swine extenders.* Animal 3: 269–274.
- Feitsma H., 2009.** *Artificial insemination in pigs, research and developments in The Netherlands, a review. Inseminação artificial em suínos, pesquisa e desenvolvimento nos Países Baixos, uma revisão.* Acta Scientiae Veterinariae. 37 (Supl 1): 61–71.
- Flowers W. L., 2005.** *Semen quality assurance.* 49th Ann. North Carolina Pork Con., Greenville, USA. [https://www.ncsu.edu/project/swine\\_extension/ncporkconf/2005/sessions/flowers.htm](https://www.ncsu.edu/project/swine_extension/ncporkconf/2005/sessions/flowers.htm)
- Fraser L., Strzeżek R., Strzeżek J., 2007.** *Fertilizing capacity of boar semen frozen in an extender supplemented with ostrich egg yolk lipoprotein fractions – a preliminary study.* Pol J Vet Sci 10: 131–135.
- Fraser L., Strzeżek J. 2007.** *Effect of different procedures of ejaculate collection, extenders and packages on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing.* Anim. Reprod. Sci. 99: 317–329.
- Fraser L., Zasiadczyk Ł., Strzeżek J., 2010.** *Interactions of egg yolk lipoprotein fraction with boar spermatozoa assessed with a fluorescent membrane probe.* Folia Histochem. Cytobiol., 48: 292–298.
- Freour T., Jean M., Mirallie S., Langlois M.L., Dubourdieu S., Barriere P., 2009.** *Predictive value of CASA parameters in IUI with frozen donor sperm.* Int. J. Androl. 2009 32: 498–504.
- Gadea J., 2003.** *Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine.* Spanish J. Agric. Res. 1: 17–27.

- García E.M., Calvete J.J., Sanz L., Roca J., Martínez E.A., Vázquez J.M., 2009.** *Distinct effects of boar seminal plasma fractions exhibiting different protein profiles on the functionality of highly diluted boar spermatozoa.* *Reprod. Domest. Anim.* 44: 200–205.
- Gańczarzewicz D., Piasecka M., Udała J., Błaszczuk B., Stankiewicz T., Laszczyńska M. 2010.** *Plasma membrane changes during the liquid storage of boar spermatozoa: a comparison of methods.* *Acta Vet. Hung.* 58: 105–116.
- Gańczarzewicz D., Udała J., Piasecka M., Błaszczuk B., Stankiewicz T., 2015.** *Storage temperature of boar semen and its relationship to changes in sperm plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and oxidoreductive capability.* *Tur. J. Biol.* 39: 582–594.
- Gerrits R.J., Lunney J.K., Johnson L.A., Pursel V.G., Kraeling R.R., Rohrer G.A., Dobrinsky J.R., 2005.** *Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations.* *Theriogenology* 63: 283–299.
- Goericke-Pesch S., Klaus D., Failing K., Wehrend A., 2012.** *Longevity of chilled canine semen comparing different extenders.* *Anim. Reprod. Sci.* 135: 97–105.
- Gogol P., Szcześniak-Fabiańczyk B., Wierzchoś-Hilczer A., 2009.** *The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage.* *Reprod. Biol.* 9: 39–49.
- Guthrie H.D., Welch G.R., 2012.** *Effects of reactive oxygen species on sperm function.* *Theriogenology* 78: 1700–1708.
- Guthrie H.D., Welch G.R., Long J.A., 2008.** *Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility.* *Theriogenology* 70: 1209–1215.
- Huo L.J., Ma X.H., Yang Z.M., 2002.** *Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage.* *Theriogenology* 58: 1349–1360.
- Jelezarsky L., Vaisberg C., Chaushev T., Sapundjiev E., 2008.** *Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen.* *Theriogenology* 69: 139–145.
- Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P., Maxwell W.M., 2000.** *Storage of boar semen.* *Anim. Reprod. Sci.* 2000, 62: 143–172.
- Jones A.R., Bubb W.A., 2000.** *Substrates for endogenous metabolism by mature boar spermatozoa.* *J. Reprod. Fertil.*, 119: 129–135.
- Kaeket, K., Srisowanna, T., Wichaidit U., Chanapiwat P., Manee-in S., 2010.** *Comparative study on six different long term commercial extenders for fresh boar semen.* *Thai J. Vet. Med.* 40: 257–263.
- Kmenta I., Strohmayer C., Müller-Schlösser F., Schäfer-Somi S., 2011.** *Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa,* *Theriogenology*, 75: 1095–1103.
- Kommisrud E., Paulenz H., Sehested E., Grevle I.S., 2002.** *Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days.* *Acta Vet Scand* 43: 49–55.
- Linde-Forsberg C. 1995.** *Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog.* *Semin. Vet. Med. Surg. (Small Anim.)* 10: 48–58.
- Lucio C.F., Brito M.M., Angrimani D., Belaz K., Morais D., Zampieri D., Losano J., Assumpção M., Nichi M., Eberlin M.N., Vannucchi C.I., 2017.** *Lipid composition of the canine sperm plasma membrane as markers of sperm motility.* *Reprod. Domest. Anim.* 52 (2): 208–213.
- Mandal R., Badyakar D., Chakrabarty J., 2014.** *Role of Membrane Lipid Fatty Acids in Sperm Cryopreservation.* *Advances in Andrology 2014*, Article ID 190542: 9 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/190542>.
- Manjunath P., Veronica N., Bergeron A., Menard M., 2002.** *Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk.* *Biol. Reprod.* 67: 1250–1258.
- Medrano A., Fernández-Novell J.M., Ramió L., Álvarez J., Goldberg E., Rivera M.M., Guinovart J.J., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E. 2006.** *Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa.* *Mol. Reprod. Dev.* 73: 369–378.
- Medrano A., Peña A., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E., 2005.** *Variations in the proportion of glycolytic/non-glycolytic energy substrates modulate sperm membrane integrity and function in diluted boar samples stored at 15-17 degrees C.* *Reprod. Domest. Anim.* 40: 448–453.
- Mucha A., Tyra M., 2011.** *Inseminacja trzody chlewnej w latach 2001–2009.* *Wiadomości Zootechniczne, R. XLIX* 1: 149–156.
- Nizanski W., Klimowicz M., Partyka A., Savic M., Dubiel A., 2009.** *Effects of the inclusion of Equex STM into Tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5 °C.* *Reprod. Domest. Anim.* 44: 363–365.

- Paulenz H., Söderquist L., Pérez-Pé R., Berg KA., 2002.** *Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen.* Theriogenology 57: 823–836.
- Peña F.J., Saravia F., Núñez-Martínez I., Johannisson A., Wallgren M., Rodríguez Martínez H., 2006.** *Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation?* Anim. Reprod. Sci. 93: 101–113.
- Plante G., Prud'homme B., Fan J., Lafleur M., Manjunath P., 2016.** *Evolution and function of mammalian binder of sperm proteins.* Cell Tissue Res. 363: 105–127.
- Poulos, A. Darin Bennett A., White I.G., 1973.** *The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa.* Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 46: 541–549.
- Rath D., Bathgate R., Rodríguez-Martínez H., Roca J., Strzezek J., Waberski D., 2009.** *Recent advances in boar semen cryopreservation.* Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 66: 51–66.
- Rigau T., Farre M., Ballester J., Mogas T., Pena A., Rodríguez-Gil J.E. 2001.** *Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates.* Theriogenology 56: 801–815.
- Roca J., Hernández M., Carvajal G., Vázquez J., Martínez E., 2006.** *Factors influencing boar sperm survival.* J. Anim. Sci. 84: 2692–2699.
- Rodríguez-Gil J.E., Bonet S., 2016.** *Current knowledge on boar sperm metabolism: Comparison with other mammalian species.* Theriogenology, 85: 4-11.
- Rodríguez-Martínez H., Kvist U., Saravia F., Wallgren M., Johannisson A., Sanz L., Peña F.J., Martínez E.A., Roca J., Vázquez J.M., Calvete J.J., 2009.** *The physiological roles of the boar ejaculate.* Soc. Reprod. Fertil. Suppl. 66: 1–21.
- Rodríguez-Martínez H., Kvist U., Ernerudh J., Sanz L., Calvete J.J., 2011.** *Seminal plasma proteins: what role do they play?* Am J. Reprod. Immunol. 66 (1): 11–22.
- Saravia F., Wallgren M., Johannisson A., Calvete J.J., Sanz L., Peña F.J., Roca J., Rodríguez-Martínez H., 2009.** *Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks.* Theriogenology 71: 662–675.
- Siqueira AP1, Wallgren M, Hossain MS, Johannisson A, Sanz L, Calvete JJ, Rodríguez-Martínez H., 2011.** *Quality of boar spermatozoa from the sperm-peak portion of the ejaculate after simplified freezing in MiniFlatpacks compared to the remaining spermatozoa of the sperm-rich fraction.* Theriogenology 75:1175–1184.
- Strzeżek J., Glogowski J., Hopfer E., Wojtkiewicz K., 1985.** *The “Kortowska” method of freezing boar semen.* Vet. Med. 41: 349–353 [summary in English].
- Strzeżek J., Hopfer E., 1987.** *Zinc ion-dependent protein in boar semen. I. Egg yolk precipitating activity and some biochemical properties.* Anim. Reprod. Sci. 13: 117–131.
- Strzeżek J., Opilowski T., Puchalski A., Fraser L., Strzeżek R., Wiśniewska B., Wysocki P., Zasiadczyk Ł. 2011.** *Pierwsze knury uzyskane po inseminacji loch nasieniem kriokonserwowanym użytym w fermie zarodowej.* Przeg. Hod. 1: 16–19.
- Strzezek R., Kozirowska-Gilun M., Stawiszyńska M., 2012.** *Cryopreservation of canine semen: the effect of two extender variants on the quality and antioxidant properties of spermatozoa.* Pol. J. Vet. Sci. 15: 721–726.
- Tsutsui T., Tezuka T., Mikasa Y., Sugisawa H., Kirihara N., Hori T., Kawakami E., 2003.** *Artificial insemination with canine semen stored at a low temperature.* J. Vet. Med. Sci. 65: 307–12.
- Thurston L.M., Watson P.F., Holt W.V., 2002.** *Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation?* Cryo Letters 23: 255–262.
- Thurston L.M., Watson P.F., Mileham A.J., Holt W.V., 2001.** *Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation.* J. Androl. 22: 382–394.
- Verstegen J.P., Onclin K., Iguer-Ouada M., 2005.** *Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies.* Theriogenology 64: 720–733.
- Volpe S., Leoci R., Aiudi G., Lacalandra G.M., 2009.** *Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa.* Reprod. Domest. Anim. 44: 275–278.
- Vyt P., Maes D., Dejonckheere E., Castryck F., Van Soom A., 2004.** *Comparative study on five different commercial extenders for boar semen.* Reprod. Domest. Anim. 39: 8–12.
- Waberski D., Henning H., Petrunkina A.M., 2011.** *Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen.* Reprod. Domest. Anim. 46: 45–48.



- Waberski D., Weitze K.F., Lietmann C., Lübbert Zur Lage W., Bortolozzo F.P., Willmen T., Petzoldt R. 1994.** *The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination.* Theriogenology 41: 1367–77.
- Waberski D., Weitze K.F., Rath D., Sallman H.P. 1989.** *Effect of bovine serum albumin and zwitterionic buffers on stored liquid boar semen.* Zuchthygiene 24: 128–133.
- Wasilewska K., Fraser L. 2017.** *Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures.* Anim. Reprod. Sci. 185: 161–173.
- 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.* Reprod. Domest. Anim. 51 (5): 781–788.
- Watson P.F., 2000.** *The causes of reduced fertility with cryopreserved semen.* Anim. Reprod. Sci. 60-61: 481–492.
- Watson P.F., Martin I.C., 1975.** *The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C.* Aust. J. Biol. Sci. 28: 145–152.
- Yeste M., 2017.** *State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state.* Anim. Reprod. 14: 69–81
- Zasiadczyk Ł., Fraser L., Kordan W., Wasilewska K., 2015.** *Individual and seasonal variations in the quality of fractionated boar ejaculates.* Theriogenology 83: 1287–1303.
- Zhang X.G., Yan G.J., Hong J.Y., Su Z.Z., Yang G.S., Li Q.W., Hu J.H., 2015.** *Effects of bovine serum albumin on boar sperm quality during liquid storage at 17°C.* Reprod. Domest. Anim. 50: 263–269.

## 4. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### 4.1 Badania przed uzyskaniem stopnia doktora

Od początku mojego zatrudnienia w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, tj. od września 2000 roku byłam zaangażowana w badania dotyczące konserwacji nasienia knura w stanie płynnym. Obejmowały one m.in. ocenę sprawności metabolicznej plemników knura i świniodzika przechowywanych w stanie płynnym w rozcieńczalniku Kortowo-3 i w jego wariantach. Efektem mojej pracy było współautorstwo w pracach opublikowanych w renomowanych czasopismach oraz doniesienia prezentowane na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych (Załącznik nr 4, poz. II A.1., D1., poz. III B.1., B.2., B.3., B.4, B11, B.12., B.13.).

W okresie od 19 do 30 maja 2003 odbyłam dwutygodniowy staż w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk w Jastrzębcu podczas którego uczestniczyłam w warsztatach naukowych „Manipulation on Mammalian and Avian Embryos”.

W latach 2005-2006 byłam wykonawcą projektu promotorskiego KBN nr. 2 P06D 002 28, którego kierownikiem był prof. zw. dr hab. Jerzy Strzeżek. W ramach projektu wykonywałam badania będące przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej pt.: *Sprawność metaboliczna plemników knura długookresowo konserwowanych w stanie płynnym w temperaturze 5°C i 16°C.* W mojej dysertacji wykazałam, że frakcja lipoprotein o niskiej gęstości (LPF) izolowana z żółtka jaja kury lub strusia afrykańskiego dodana do rozcieńczalnika Kortowo-3 skutecznie chroni plemniki knura przed skutkami udaru chłodowego, zwłaszcza podczas konserwacji nasienia w temperaturze 5°C. Dodatek LPF do rozcieńczalnika Kortowo-3 korzystnie wpływa na metabolomikę i bioenergetykę

plemników knura konserwowanych w temperaturze 5°C i 16°C. W temperaturze 5°C głównym szlakiem przemian bioenergetycznych plemników jest glikoliza fosforylująca, zaś w temperaturze 16°C metabolizm mitochondrialny. Sprawność metaboliczna plemników wykazuje zmienność uwarunkowaną osobniczym źródłem ejakulatu, wiekiem oraz porą roku. Ważnym aspektem pracy było także wykazanie, że proces dializy wpływa korzystnie na właściwości biologiczne przechowywanych plemników. Ponadto zastosowanie odpowiedniego antybiotyku do rozcieńczalnika z uwzględnieniem wariantu konserwacji zapewnia czystość mikrobiologiczną przechowywanego nasienia knura. Wyniki prezentowane w pracy doktorskiej opublikowałam w czasopiśmie naukowych (Załącznik nr 4, poz. II A.3., A.5., A.7., D.2.), a także prezentowałam na międzynarodowej konferencji naukowej (Załącznik nr 4, poz. III B.5.).

#### **4.2 Badania po uzyskaniu stopnia doktora.**

W lutym 2007 roku zostałam zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt. Od tego czasu brałam udział w badaniach zespołu Katedry dotyczących doskonalenia metod konserwacji nasienia knura i psa oraz proteomiki w badaniach funkcji męskiego układu rozrodczego.

Zakres badań obejmował:

##### **4.2.1. Wpływ procesu dializy poprzedzającej kriokonserwację na właściwości biologiczne plemników knura po rozmrożeniu**

Celem badań była ocena wpływu procesu dializy na charakterystykę plemników knura przed i po rozmrożeniu. Zbadano wpływ dializy na wybrane właściwości biologiczne plemników (ruchliwość, integralność błon akrosomalnych i plazmatycznych, sprawność funkcjonalną mitochondriów z wykorzystaniem fluorochromu Rodaminy R123 oraz zawartość ATP) przed i po kriokonserwacji. W badaniach wykazano, że proces dializy istotnie poprawił właściwości biologiczne plemników przed i po zamrożeniu. Po rozmrożeniu nasienia dializowanego wykazano wyższą ruchliwość plemników, integralność błon plazmatycznych i sprawność funkcjonalną mitochondriów oraz zawartość ATP w porównaniu z nasieniem rozmrożonym, które nie zostało poddane dializie. Uzyskane wyniki wykazały, że poprawa właściwości biologicznych plemników zarówno przed jak i po zamrożeniu spowodowana była usunięciem niskocząsteczkowych komponentów z plazmy nasienia. To może sugerować, że proces dializy korzystnie wpływa na właściwości biologiczne plemników knura poddanych kriokonserwacji, co wskazuje na praktyczne możliwości jej zastosowania w technologii konserwacji nasienia. (Załącznik nr 4, poz. II A.2, III B.15).

#### **4.2.2. Wpływ dodatku płytkowego czynnika aktywującego PAF na jakość kriokonserwowanych plemników psa i buhaja**

##### ***Wpływ dodatku płytkowego czynnika aktywującego (PAF) do rozcieńczalnika na żywotność i zawartość ATP w kriokonserwowanych plemnikach psa***

Celem badań było zbadanie wpływu płytkowego czynnika aktywującego (PAF) na jakość kriokonserwowanych plemników psa. Zastosowanie dodatku PAF (o stężeniu  $1 \times 10^{-3}$  M PAF do rozcieńczalnika znacząco poprawiło ruchliwość rozmrożonych plemników inkubowanych przez 120 minut po rozmrożeniu, w porównaniu do kontroli (rozmrożone nasienie bez dodatku PAF). Ponadto wykazano, że dodatek PAF istotnie wpłynął na wzrost zawartości ATP w plemnikach w porównaniu z kontrolą, niezależnie od czasu inkubacji. W badaniach nie stwierdzono istotnego wpływu PAF na sprawność funkcjonalną mitochondriów i integralność błon plazmatycznych. Wyniki tych badań wskazują, że zastosowanie dodatku PAF (w stężeniu  $1 \times 10^{-3}$  M) do rozmrożonego nasienia inkubowanego przez 120 minut istotnie poprawia jakość kriokonserwowanych plemników. Otrzymane wyniki sugerują, że dodatek PAF może być stosowany w kriokonserwacji nasienia psa. (Załącznik nr 4, poz. II A.4.).

##### ***Wpływ dodatku płytkowego czynnika aktywującego (PAF) na wybrane parametry jakości kriokonserwowanych plemników buhaja***

Celem badań było określenie wpływu płytkowego czynnika aktywującego (PAF) na wybrane parametry jakości kriokonserwowanych plemników buhaja o obniżonej ruchliwości wykorzystywane w sztucznej inseminacji. Celem pierwszego eksperymentu było ustalenie optymalnego stężenia PAF, które najlepiej zabezpieczałoby żywotność plemników (ruchliwość, integralności błon, sprawność mitochondriów). Wykazano, że zastosowanie dodatku PAF o stężeniu  $1 \times 10^{-9}$  M do rozmrożonego nasienia inkubowanego przez 120 minut w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$  najkorzystniej wpłynęło na żywotność plemników. Stwierdzono, między innymi, istotny wzrost wartości parametrów ruchu, integralności błon i sprawności mitochondriów. W drugim eksperymencie wykorzystano kriokonserwowane nasienie buhaja o obniżonej ruchliwości (poniżej 70%), do którego dodawano PAF w stężeniu  $1 \times 10^{-9}$  M. Po 120 minutach inkubacji rozmrożonego nasienia z dodatkiem PAF wykazano istotny wzrost odsetka plemników wykazujących ruch, ruch liniowy oraz VSL. Zastosowanie PAF także pozytywnie wpłynęło na integralność błon plazmatycznych i potencjał transbłonowy mitochondriów. Niemniej jednak w analizie tych parametrów nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy próbami z dodatkiem PAF a kontrolą. Wyniki tych badań wskazały na pozytywny wpływ dodatku PAF w stężeniu  $1 \times 10^{-9}$  M na wybrane parametry jakości plemników w rozmrożonym nasieniu buhaja o obniżonej ruchliwości. (Załącznik nr 4, poz. II A.12.).

#### **4.2.3. Metody oceny jakości nasienia i ich znaczenie w technologii reprodukcyjnej**

W pracy opisano różne metody oceny jakości plemników oraz ich przydatność w technologii konserwacji nasienia. Metody te dotyczyły oceny parametrów ruchu plemników z wykorzystaniem komputerowego systemu (CASA), oceny integralności błon plazmatycznych (osmotic resistance test - ORT, hypoosmotic swelling test HOS, barwienia z wykorzystaniem fluorochromów takich jak: diocyanu 6-karboksyfluoresceiny - CFDA, HOECHST 33258, jodku propidyny – PI, SYBR-14), pomiaru ilości dialdehydu malonowego - MDA, oznaczenia aktywności aminotransferazy asparaginowej (test – AspAT), oceny sprawności funkcjonalnej mitochondriów (barwienia fluorochromami JC-1 i Rodamina 123 – R-123, pomiar zawartości ATP w plemnikach, resazurin reduction test – RRT), oceny statusu chromatyny i integralności DNA (metoda radioizotopowa z zastosowaniem znakowanej trytem Aktynomycyny D – 3H-AMD, neutral comet assay – NCA, sperm chromatin dispersion assay – SCSA), oceny zmian apoptotycznych (badania fluorescencyjne z wykorzystaniem fluorescein isothiocyanate labelled Annexin V (Annexin V-FITC) i YoPro-1. Ponadto w pracy uwzględniono biochemiczne metody stosowane w analizie plazmy nasienia m.in. ocena aktywności wybranych białek enzymatycznych takich jak akrosyna czy inhibitory proteinaz, które są uważane za wyznaczniki jakości plemników. Wykazano rolę fosfataz kwaśnej i alkalicznej jako wyznaczników funkcji wydzielniczych najądrzy i dodatkowych gruczołów płciowych. Ponadto w pracy podkreślono znaczenie wybranych technik proteomicznych takich jak elektroforeza dwukierunkowa – (2-D-PAGE) i spektrometria mas – (LC-MS/MS), które są wykorzystywane do identyfikacji właściwości i funkcji białek plazmowych oraz określenia ich roli jaką pełnią w procesach związanych z zapłodnieniem. **(Praca przeglądowa, Załącznik nr 4, poz. II A.6.).**

#### **4.2.4. Wpływ białek wiążących jony cynkowe na wybrane funkcje plemników**

*Wpływ białek wiążących jony cynkowe na ruchliwość i integralność plemników psa przechowywanych w temperaturze 5°C*

Celem badań było określenie wpływu białek wiążących jony cynkowe (ZnBPs) na parametry ruchu, integralność błon plazmatycznych oraz sprawność funkcjonalną mitochondriów ejakulowanych plemników psa przechowywanych w temperaturze 5°C.

Wyniki badań wykazały, że dodatek ZnBPs wyizolowanych z plazmy nasienia psa do mieszaniny inkubacyjnej plemników ejakulowanych i przechowywanych w temperaturze 5°C powoduje istotny ( $P < 0.05$ ) wzrost wartości TMOT, PMOT, VCL, VSL i BCF oraz integralności plazmolemy w porównaniu do próby kontrolnej (bez dodatku ZnBPs). Przy zastosowaniu specyficznych technik fluorescencyjnych wykazano, że ZnBPs opłaszczają plemniki psa głównie w

regionie akrosomu i witki, dzięki czemu mogą zapobiegać uszkodzeniu tych struktur w niekorzystnych warunkach fizjologicznych lub w trakcie przechowywania nasienia. Z kolei dodatek białek niewiążących jony cynkowe (nZnBPs) wyizolowanych z plazmy nasienia do mieszaniny inkubacyjnej wywierał nieznacznie pozytywny wpływ na ruchliwość i integralność plazmolemy plemników psa. Ponadto obserwowano też nieznacznie korzystny wpływ ZnBPs i nZnPPs na sprawność funkcjonalną mitochondriów. Uzyskane wyniki badań podkreślają istotną rolę białek plazmy nasienia w zabezpieczeniu odpowiedniej ilości i dostępności jonów cynkowych jako komponentu wpływającego na ruchliwość i stan plazmolemy plemników psa. (**Załącznik nr 4, poz. II A.8. , poz. III B.7.**)

#### ***Zdolność białek wiążących jony cynkowe z plazmy nasienia knura do wiązania heparyny i fosforylocholiny***

Celem badań było określenie, czy białka ZnBPs wyizolowane z plazmy nasienia knura są zdolne do wiązania dodatkowych ligandów. Przy zastosowaniu metody chromatograficznej, po raz pierwszy wykazano, że ZnBPs knura posiadają powinowactwo zarówno do heparyny (hep) jak i fosforylocholiny (pch). Białka wiążące jony cynkowe i heparynę (ZnBPs+hep) stanowiły około 20%, a wiążące jony cynkowe i fosforylocholiny (ZnBPs+pch) około 45% całkowitej zawartości wszystkich ZnBPs. W obu grupach białek (ZnBPs+hep, ZnBPs+pch) dominowały polipeptydy o masach cząsteczkowych od 6,5 do 14 kDa. Analiza mas niskocząsteczkowych peptydów oraz ich zdolności do wiązania jonów cynku, a także heparyny i fosforylocholiny sugeruje, że należą one do rodziny wielofunkcyjnych spermadhezyn, które pełnią istotne funkcje w procesie zapłodnienia poprzez wiązanie więcej niż jednego ligandu. (**Załącznik nr 4, poz. II A.9.**)

#### **4.2.5. Zależność pomiędzy jakością nasienia knura a obecnością białka sp32 w plemnikach**

Celem pracy była analiza proteomu ekstraktów plemnikowych z ejakulatów pochodzących od knurów dwóch ras Wielka Biała Polska (WBP) i Polska Biała Zwisłoucha (PBZ) i określenie w nim różnic, które w sposób istotny wpływają na jakość nasienia.

W pracy wykazano różnice w proteomie plemników, które dotyczyły m.in. obecności białka o masie cząsteczkowej 30 kDa. Spektrometria mas wykazała, że polipeptyd ten jest najbardziej podobny do białka wiążącego proakrosynę (sp32), a jego obecność była częściej obserwowana w ekstraktach plemnikowych uzyskanych w sezonie wiosenno-letnim. Wykazano zależność pomiędzy obecnością białka podobnego do sp32 w plemnikach a analizowanymi parametrami jakości nasienia. Ejakulatory zawierające omawiane białko charakteryzowały się istotnie wyższą ruchliwością plemników i lepszą zdolnością do hamowania peroksydacji lipidów wyrażoną niższym poziomem

produkcji MDA oraz wyższą aktywnością SOD w plazmie nasienia. Ponadto wykazano, że nasienie knurów rasy WBP, które zawierało białko podobne do sp32 w plemniach, charakteryzowało się także istotnie niższą zawartością ATP w plemnikach, zaś w plazmie nasienia stwierdzono wyższą wartość TAS (całkowita zdolność antyoksydacyjna). Wyniki badań wskazują, że obecność białka w ekstraktach plemnikowych podobnego do sp32 może mieć wpływ na jakość nasienia. **(Załącznik 4, poz. II A.10).**

#### **4.2.6. Wybrane czynniki wpływające na sprawność metaboliczną plemników ogiera przechowywanych w stanie płynnym**

##### ***Wpływ sezonu na sprawność metaboliczną plemników ogiera***

Celem badań było określenie wpływu sezonu rozrodczego na sprawność metaboliczną plemników ogiera przechowywanych w rozcieńczalniku EquiPro™ w 5°C przez 5 dni.

Ejakulaty pobierano od 4 ogierów (w wieku 10 -20 lat) w okresie sezonu rozrodczego (maj-lipiec) i poza sezonem rozrodczym (wrzesień-grudzień). Nasienie rozrzedzano rozcieńczalnikiem EquiPro™ (Minitüb, Niemcy) i przechowywano przez 5 dni w temperaturze 5°C. Analiza sprawności metabolicznej plemników obejmowała ocenę odsetka plemników wykazujących ruch oraz odsetka plemników o ruchu postępowym (TMOT i PMOT), potencjał transbłonowy mitochondriów i zawartość ATP oraz integralność błon plazmatycznych. W badaniach wykazano istotny ( $p \leq 0.05$ ) wpływ sezonu na analizowane parametry sprawności metabolicznej świeżych plemników ogiera z wyjątkiem zawartości ATP. W przypadku nasienia rozrzedzonego nie wykazano istotnego wpływu sezonu na badane parametry sprawności metabolicznej plemników i PMI niezależnie od czasu przechowywania. Wyniki tych badań wskazują, że zastosowanie rozcieńczalnika do przechowywania nasienia może osłabiać wpływ sezonu i korzystnie wpłynąć na poprawę sprawności metabolicznej plemników ogiera, niezależnie od sezonu reprodukcyjnego. **(Załącznik nr 4, poz. III B.8.).**

##### ***Wpływ wieku na sprawność metaboliczną plemników ogiera przechowywanych w rozcieńczalniku EquiPro™***

Celem badań była ocena wpływu wieku ogiera na sprawność metaboliczną plemników przechowywanych w stanie płynnym w temperaturze 5°C.

Ejakulaty pobierano od 8 ogierów w dwóch przedziałach wiekowych tj. : grupa pierwsza (10 do 15 lat), grupa druga (16 do 21 lat). Nasienie rozrzedzano rozcieńczalnikiem EquiPro™ (Minitüb, Niemcy) i przechowywano 5 dni w 5°C. Podczas całego okresu przechowywania plemniki z grupy 1 charakteryzowały się wyższą sprawnością metaboliczną w porównaniu z plemnikami z grupy 2.

W trzecim dniu przechowywania wykazano znacząco wyższe ( $p < 0,05$ ) wartości TMOT, PMOT i MMP oraz PMI dla grupy pierwszej w porównaniu do grupy drugiej. Wyniki tych badań wykazały, że wiek ogiera istotnie wpływa na sprawność metaboliczną plemników przechowywanych w stanie płynnym. (Załącznik nr 4, poz. III B.9.).

#### **4.2.7. Charakterystyka systemu antyoksydacyjnego żółtej frakcji jelenia szlachetnego (*Cervus elaphus L.*)**

Celem pracy była charakterystyka systemu antyoksydacyjnego żółtej frakcji (FŻ) jelenia szlachetnego podczas rykowiska właściwego. Nasienie jelenia, w tym FŻ pozyskano w okresie rykowiska właściwego (od połowy sierpnia do połowy grudnia) z wykorzystaniem sztucznej pochwy. W próbach FŻ zbadano aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich jak dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT) i peroksydaza glutationowa (GPx). Ponadto analizowano zawartość niskocząsteczkowych antyoksydantów takich jak L-glutation (GSH + GSSG), L-askorbinian (ASC) i całkowitą zdolność antyoksydacyjną (TAS). Dodatkowo, w celu identyfikacji form molekularnych badanych enzymów, próby FŻ poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w warunkach niedenaturujących (PAGE), a następnie przeprowadzono barwienie na aktywność SOD i GPx. W badaniach FŻ wykazano najwyższą aktywność SOD i GPx. we wrześniu i październiku. Nie wykazano natomiast aktywności CAT. Przeprowadzone barwienia na aktywność wykazały w przypadku SOD występowanie trzech frakcji białkowych, zaś GPx charakteryzowała się występowaniem jednej frakcji białkowej. Zawartość GSH + GSSG utrzymywała się na podobnym poziomie od października do grudnia w przeciwieństwie do ASC, którego zawartość była najwyższa we wrześniu i w październiku. W badaniach wykazano stabilny poziom TAS podczas całego okresu rykowiska właściwego. Wyniki tych badań wykazały, że FŻ zawiera podstawowe enzymy antyoksydacyjne SOD i GPx oraz antyoksydanty niskocząsteczkowe takie jak GSH i ASC, a obecna we frakcji żółtej SOD należy do podtypu zawierającego w swoim centrum aktywnym miedź i cynk (Cu/Zn-SOD). Próby otrzymane w szczycie rykowiska właściwego (od września do października) charakteryzowały się najwyższą aktywnością enzymatyczną w porównaniu z pozostałymi miesiącami tego okresu, co może przyczynić się do wysokiej jakości nasienia, zapobiegając powstawaniu stresu oksydacyjnego podczas krótkiego okresu intensywnej aktywności seksualnej samca jelenia. (Załącznik nr 4, poz. II, A.11., poz. III B.26.).

#### **4.3. Inne osiągnięcia naukowo-badawcze**

Jestem współautorem patentu na wynalazek pt. *Preparat do konserwacji nasienia zwierząt, zwłaszcza knura* (nr. 217869), którego pełnomocnikiem jest prof. zw. dr hab. Jerzy Strzeżek. Patent

został zgłoszony 15.06.2009 r. do Urzędu Patentowego RP, a następnie opublikowany i wdrożony (Strzeżek i wsp., 2011, poz. autoreferatu str. 24, **Załącznik nr 8**).

W latach 2008-2010 byłam wykonawcą w projekcie badawczym rozwojowym Narodowego Centrum Badań i Rozwoju nr. R12 0014 04 pt. *Kompleksowa technologia kriokonserwacji nasienia knura – badania podstawowe i aplikacyjne*, którego kierownikiem był prof. zw. dr hab. Jerzy Strzeżek.

Od 2016 roku jestem zaangażowana w badania dotyczące przechowywania nasienia jelenia szlachetnego w stanie płynnym i zamrożonym, których wstępne wyniki zostały zaprezentowane na dwóch Sympozjach naukowych - Perspektywy w ochronie bioróżnorodności, Popielno 2016, 2017 oraz na VIII Zjeździe TBR w Olsztynie (**Załącznik nr 4, poz. III K.3., B.31., B.32., B.33.**). Obecnie jestem wykonawcą w projekcie NCN-OPUS (nr rej.: 2017/25/B/NZ9/02544) pt. *Produkcja wybranych hormonów w układzie rozrodczym nieciężarnych i ciężarnych samic, charakterystyka ich oocytów oraz właściwości biologicznych nasienia jelenia szlachetnego (Cervus elaphus L.)*, który będzie realizowany w ramach działalności Konsorcjum Naukowego pomiędzy Instytutem Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, a Wydziałem Bioinżynierii Zwierząt UWM (kierownikiem projektu jest dr hab. inż. Anna Justyna Korzekwa, a kierownikiem zadania badawczego realizowanego w macierzystej Katedrze jest prof. dr hab. Władysław Kordan, prof. zw.). Realizacja projektu jest zaplanowana na lata 2018-2020.

Od 2011 byłam recenzentką dla redakcji międzynarodowych czasopism naukowych m.in. *Animal Reproduction Science; Journal of Applied Animal Research; African Journal of Biotechnology; Reproduction, Fertility and Development; Reproduction in Domestic Animals*. Do tej pory wykonałam recenzje 9 manuskryptów.

## 5. Podsumowanie dorobku naukowego

W skład mojego dorobku naukowego wchodzi **53** pozycje bibliograficzne:

- a) **17** oryginalnych prac twórczych opublikowanych w czasopismach indeksowanych na liście JCR (lista „A” MNiSW), wszystkie w języku angielskim (w tym **16** oryginalnych i **1** przeglądowa; **16** po uzyskaniu stopnia doktora),
- b) **2** prace twórcze opublikowane w czasopismach międzynarodowych lub krajowych innych niż z listy JCR (**1** opublikowana w języku hiszpańskim i **1** opublikowana w języku polskim)
- c) **33** doniesienia i komunikaty naukowe przedstawione na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych (**7** przed i **26** po uzyskaniu stopnia doktora),
  - na konferencjach zagranicznych – **10** (**4** przed i **6** po uzyskaniu stopnia doktora), w tym **6** opublikowanych w recenzowanych materiałach z konferencji



międzynarodowych, uwzględnionych w bazie *Web of Science* (2 przed i 4 po uzyskaniu stopnia doktora),

- na konferencjach krajowych – 23 (3 przed i 20 po uzyskaniu stopnia doktora), w tym 3 referatów naukowych wygłoszonych na konferencjach krajowych (1 przed i 2 po uzyskaniu stopnia doktora).

**d) 1 Patent na wynalazek, który został wdrożony.**

Ogólna wartość przedstawionego do oceny dorobku naukowego (wg aktualnej punktacji MNiSW) wynosi 490 punktów, w tym po uzyskaniu stopnia doktora 440 punktów.

Wartość oryginalnych recenzowanych prac twórczych i przeglądowych indeksowanych na liście JCR (lista „A” MNiSW, wg aktualnej punktacji) stanowi 335 punktów, w tym po uzyskaniu stopnia doktora 320 punktów. Całkowity IF mojego dorobku naukowego wynosi 14.341 (wg aktualnych danych). Szczegółowa analiza dorobku naukowego została przedstawiona w tabeli nr 1 (Załącznik nr 3).

Liczba cytowań wg bazy *Web of Science* „all databases” wynosi 172 („core collection” – 114).

Indeks Hirscha wg bazy *Web of Science* „all databases” wynosi 6 („core collection” – 6).

Liczba cytowań wg bazy *Scopus* wynosi 139.

Indeks Hirscha wg bazy *Scopus* – 6.

**Indeks Hirscha i liczbę cytowań podano na dzień 01.12.2017 (Załącznik nr 11).**

## 6. Działalność dydaktyczna i organizacyjna

Pracę naukową łączę z działalnością dydaktyczną i organizacyjną. Od roku 2001 prowadziłam ćwiczenia laboratoryjne z przedmiotu *Biochemia* dla studentów Wydziału Ochrony Środowiska i Rybactwa (obecnie Wydziału Nauk o Środowisku) na kierunku Ochrona Środowiska. W tym czasie pełniłam funkcję kierownika pracowni studenckiej tego przedmiotu, a w latach 2011-2013 prowadziłam wykłady i byłam jego kierownikiem. Ponadto prowadziłam ćwiczenia laboratoryjne na Wydziale Bioinżynierii Zwierząt na kierunkach: Towaroznastwo i Zootechnika. Obecnie prowadzę ćwiczenia laboratoryjne dla studentów Wydziału Bioinżynierii Zwierząt na kierunku Bioinżynieria Produkcji Żywności (z przedmiotu *Biochemia ogólna z elementami chemii organicznej*) i na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej (z przedmiotu *Biochemia*). Prowadzę także wybrane ćwiczenia laboratoryjne z przedmiotów: *Inżynieria genetyczna* i *Andrologia molekularna* na kierunku Zootechnika - specjalność: Biotechnologia w hodowli zwierząt na studiach magisterskich II stopnia. Jestem autorem treści programowych przedmiotu *Biochemia zwierząt z elementami chemii bioorganicznej* realizowanego na kierunku - Zwierzęta w Rekreacji, Terapii i Edukacji, z którego prowadzę także wykłady. Od roku akademickiego 2016/2017 do chwili obecnej

pełnię funkcję kierownika tego przedmiotu oraz kierownika pracowni studenckiej przedmiotu *Biochemia ogólna z elementami chemii organicznej* realizowanego dla studentów kierunku Bioinżynieria Produkcji Żywności. Od roku akademickiego 2016/2017 jestem także opiekunem roku studentów studiów inżynierskich I stopnia Wydziału Bioinżynierii Zwierząt; kierunek: Bioinżynieria Produkcji Żywności. Byłam promotorem 8 zakończonych prac dyplomowych, a także opiekunem części eksperymentalnej kilku prac magisterskich i recenzentem 1 pracy inżynierskiej.

Aktywnie uczestniczyłam w kursach i warsztatach dotyczących doskonalenia umiejętności naukowych m.in. w warsztatach z zakresu opracowania wyników badań naukowych i przygotowania publikacji naukowej organizowane przez olsztyński oddział Towarzystwa Biologii Rozrodu (2014 r.). Ukończyłam szkolenia organizowane przez Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych w zakresie szkolenia dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie; szkolenia dla osób wykonujących procedury; szkolenia dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach (2015 r.), Uczestniczyłam też w warsztatach organizowanych przez firmę Labsoft pt. *Preparatyka próbek do mikroskopów SEM (TEM)* (2016 r.).

Moja działalność organizacyjna obejmuje między innymi członkostwo w Radzie Wydziału Bioinżynierii Zwierząt w kadencjach 2012-2016 oraz 2016-2020. Byłam członkiem Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, a od 2010 roku jestem członkiem Towarzystwa Biologii Rozrodu (TBR). Byłam także współorganizatorem kilku edycji Olsztyńskich Dni Nauki i Sztuki organizowanych przez Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie oraz ćwiczeń laboratoryjnych organizowanych dla uczniów szkół średnich w ramach współpracy naukowej UWM ze szkołami.

Ponadto od 2010 roku do chwili obecnej jestem pełnomocnikiem Dziekana ds. Osób Niepełnosprawnych na Wydziale Bioinżynierii Zwierząt. Aktywnie uczestniczyłam w wielu szkoleniach, kursach i warsztatach organizowanych na UWM w Olsztynie dotyczących problematyki osób z różnymi dysfunkcjami.

Za moją działalność naukową i organizacyjną byłam kilkakrotnie wyróżniana nagrodami JM Rektora UWM w Olsztynie.



Podpis