



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

Tuwima 10, 10-748 Olsztyn, tel.: (+48 89) 523-46-86; 524-03-13  
Fax (+48 89) 524-01-24; e-mail [instytut@pan.olsztyn.pl](mailto:instytut@pan.olsztyn.pl);  
[www.pan.olsztyn.pl](http://www.pan.olsztyn.pl)

---

## **Autoreferat**

Radostaw Kajetan Kowalski

### **I. Dane biograficzne**

#### Wykształcenie:

1995-2000 – Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa – uzyskany stopień: Magister inżynier.

2006 – Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie – uzyskany tytuł: Doktor nauk rolniczych

#### Kariera zawodowa:

2000-2001 Specjalista Ichtiolog, Gospodarstwo Rybackie w Ełku.

2001-2006 Asystent, Zakład Andrologii Molekularnej, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

2006 - 2008 staż podoktorski, Uniwersytet Tokijski, Misaki Marine Biological Station, Faculty of Science, the University of Tokyo.

2008 – do dziś – Adiunkt w Zakładzie Biologii Gamet i Zarodka, Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

### Współpraca międzynarodowa:

1. W 2006 rozpocząłem współpracę z prof. Manabu Yoshida ze Stacji Morskiej w Misaki należącej do Uniwersytetu Tokijskiego. W czasie mojego dwuletniego pobytu tam, prowadziłem badania naukowe oraz zajęcia dla studentów.

2. W 2012 roku rozpocząłem współpracę z ośrodkiem naukowym w Japonii (University of the Ryukyus, Tropical Biosphere Research Center) tworząc sieć naukową, w której realizujemy badania związane z ochroną bioróżnorodności raf koralowych. Jako partner z Polski, opracowałem i rozwinąłem technologie kriokonserwacji gamet koralowców. Wspólnie z partnerem japońskim, stosując kriokonserwację gamet i krzyżowanie międzygatunkowe, prowadzimy badania dotyczące aspektów ewolucyjnych rafy koralowej. Od 3 lat staramy się wyhodować hybrydy koralowców pochodzące ze skrzyżowania gatunków trących się wiosną i późnym latem. Takie hybrydy pozwoliłyby lepiej zrozumieć proces specjacji jaki doprowadził do izolacji rozrodczej tych koralowców. Nasza współpraca zaowocowała dotychczas dwiema publikacjami (Załącznik IV. Pozycje A.38 i 44) a także wyniki badań prezentowane były na międzynarodowej konferencji (Załącznik IV. Pozycja K.9). W najbliższym czasie planujemy aplikować o fundusze na utworzenie japońskiego banku gamet koralowców.

- 2012 - University of the Ryukyus, Tropical Biosphere Research Center - invited scientist - pobyt 3 miesięczny.
- 2013 University of the Ryukyus, Tropical Biosphere Research Center – JSPS Polish-Japan exchange agreement – invited scientist – pobyt 3 miesięczny.
- 2015 University of the Ryukyus, Tropical Biosphere Research Center – invited scientist – pobyt 3,5 miesięczny.
- 2016 University of the Ryukyus, Tropical Biosphere Research Center – invited scientist – pobyt 4 miesięczny.
- 2017 University of the Ryukyus, Tropical Biosphere Research Center – invited scientist – pobyt 3 miesięczny.

3. W 2017 roku rozpocząłem także z moim zespołem współpracę z Uniwersytetem Szent István w Godollo k/Budapesztu na Węgrzech. Współpracując z prof. Akosem Horvathem, wykonaliśmy badania dotyczące kriokonserwacji nasienia zagrożonego gatunku ryby łososiowatej *Salmo marmoratus* oraz zaprezentowaliśmy metodę pneumatyczną pozyskiwania oocytów ryb. Prezentacja odbyła się w Słowenii w ośrodku zarybieniowym należącym do Ribiška Družina Tolmin.

**II. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):**

**A. Tytuł osiągnięcia naukowego:**

Motoryka oraz wartość biologiczna plemników ryb po krótko i długookresowym przechowywaniu nasienia.

**B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

1. **Kowalski R.K.**, Yoshida M., Shiba K., Glogowski J. (2008): Prostaglandins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) sperm biology – searching for answers. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(4): 487 – 491 doi [10.1111/j.1439-0426.2008.01147.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2008.01147.x) (IF<sub>2008</sub>: 0.638; MSWiN<sub>2008</sub>: 10; cyt. WoS: 1).
2. **Kowalski R.K.**, Cejko B.I., Krejszef S., Sarosiek B., Judycka S., Targońska K., Kucharczyk D., Glogowski J. (2014). Effect of albumin and casein supplementation on the common carp *Cyprinus carpio* L. sperm motility parameters measured by CASA. *Aquaculture International*, 22(1): 123-129 doi [10.1007/s10499-013-9673-2](https://doi.org/10.1007/s10499-013-9673-2) (IF<sub>2014</sub>: 0.984; MSWiN<sub>2014</sub>: 20; cyt. WoS: 5).
3. **Kowalski R.K.**, Cejko B.I., Irnazarow I., Szczepkowski M., Dobosz S., Glogowski J. (2014): Short-term storage of diluted fish sperm in air versus oxygen. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 14: 831-834 doi [10.4194/1303-2712-v14\\_3\\_26](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_3_26) (IF<sub>2014</sub>: 0.384; MSWiN<sub>2014</sub>: 15; cyt. WoS: 2).
4. Sarosiek B., Dryl K., Kucharczyk D., Żarski D., **Kowalski R.K.** (2014): Motility parameters of perch spermatozoa (*Perca fluviatilis* L.) during short-term storage with antioxidants addition. *Aquaculture International*, 22(1): 159-165 doi [10.1007/s10499-013-9679-9](https://doi.org/10.1007/s10499-013-9679-9) (IF<sub>2014</sub>: 0.984; MSWiN<sub>2014</sub>: 20; cyt. WoS: 1).
5. Sarosiek B., Dryl K., Judycka S., Dobosz S., Grudniewska J., **Kowalski R.K.** (2015): Cryopreservation method for whitefish (*Coregonus lavaretus*) semen possible for use in large-scale fertilization. *Aquaculture Research*, 1-5, doi [10.1111/are.12810](https://doi.org/10.1111/are.12810) (IF<sub>2015</sub>: 1.376; MSWiN<sub>2015</sub>: 25; cyt. WoS: 0).
6. Judycka S., Cejko B.I., Dryl K., Dobosz S., Grudniewska J., **Kowalski R.K.** (2016): The effect of supplementation of a trehalose-based extender with KCl on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm freezability and post-thaw motility. *Aquaculture* 465: 303-310, doi [10.1016/j.aquaculture.2016.09.029](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.029) (IF<sub>2016</sub>: 1.893; MSWiN<sub>2016</sub>: 35; cyt. WoS: 2).

Sumaryczny współczynnik oddziaływania (IF -Impact factor) = 6.259

Liczba cytowań = 11

Sumaryczna ilość punktów MNiSW = 125

Przedstawiane osiągnięcie naukowe stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie i poświęconych motoryce plemników ryb ich wybranym parametrom biochemicznym oraz wartości biologicznej po krótko i długookresowym przechowywaniu nasienia. Cykl prac pozwolił, poza poszerzeniem wiedzy na temat motoryki plemników ryb, na opracowanie efektywnych metod przechowywania krótko i długookresowego plemników ryb.

## Wprowadzenie

Właściwości motoryczne plemników są podstawowym wyznacznikiem ich zdolności zapłodniającej. Od czasu wynalezienia mikroskopu przez duńskiego badacza Antonie van Leeuwenhoek w 1677 roku, biolodzy otrzymali jedno z najważniejszych narzędzi ich pracy. To dzięki mikroskopom, zbudowanym ze sferycznych szklanych soczewek (zbliżonych kształtem do kuli), pionierzy badań mikroskopowych obserwowali bakterie i właśnie plemniki, co pozwoliło między innymi ostatecznie obalić arystotelesowską teorię samoródtwa (Gest, 2009). Pierwsze mikroskopy pozwalały na około 300-krotne powiększenie. Wraz z postępem techniki, parametry mikroskopów uległy znacznej poprawie, lecz osiągnęły też swoje naturalne granice związane z prawami optyki falowej. I tak w przypadku światła widzialnego, gdzie długość fali określa się na 550 nm, limit rozdzielczości optycznej wynosi 197 nm, co wynika ze wzoru  $R=0.61\lambda/NA$  gdzie  $\lambda$  to długość światła a NA oznacza przesłonę obiektywu (dla obiektywów przeznaczonych do immersji współczynnik ten wynosi od 0.8 do 1.5). Ze względu na te ograniczenie w praktyce maksymalne powiększenie uzyskiwane za pomocą mikroskopu świetlnego wynosi 1500 razy i pozwala na obserwację najmniejszych elementów obrazu o wielkości 0.2  $\mu\text{m}$ . W przypadku zastosowania innego źródła światła (np. spolaryzowane światło ultrafioletowe o znacznie krótszej fali niż światło widzialne), rozdzielczość optyczna mikroskopu wzrasta ponad dwukrotnie. W mikroskopach takich można stosować powiększenie do 3500 razy i obserwować elementy mniejsze nieco od 0.1  $\mu\text{m}$ . W przypadku plemników ryb, których rozmiary główki osiągają kilka mikrometrów średnicy, powiększenia 300 do 500-krotne są wystarczające dla przeprowadzenia analizy ich ruchu. Jednakże oko ludzkie obserwując dziesiątki poruszających się obiektów nie jest w stanie obiektywnie przeanalizować obrazu. Dlatego też, wraz z postępem technicznym zmierzającym do automatyzacji wielu procesów technologicznych, również i w mikroskopii świetlnej, zastosowanie komputerów do analizy obrazu pozwoliło na wprowadzenie nowej jakości do badań motoryki plemników.

System CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) pozwala na poklatkową analizę nagranych obrazów plemników. Oznacza to, że z obrazu, na którym widać główki plemników, odpowiednie oprogramowanie potrafi „śledzić” pojedyncze komórki i obliczyć ich parametry ruchu. Metoda komputerowej analizy ruchu plemników została pierwotnie zastosowana w przypadku nasienia ssaków ze względu na wysoką wartość diagnostyczną w leczeniu męskiej niepłodności (Boyers i in., 1989). System CASA pozwala na szeroką analizę motoryki plemników mierząc takie parametry ich ruchu jak: MOT: całkowity odsetek poruszających się plemników (%); VCL: prędkość krzywoliniowa plemników ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VSL: prędkość prostoliniowa ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); VAP: prędkość całkowita ( $\mu\text{m s}^{-1}$ ); BCF: częstotliwość uderzeń witi (Hz); ALH: amplituda bocznych wychyleń główki ( $\mu\text{m}$ ); PRG: ruch postępowy (%); LIN: liniowość ruchu (stosunek  $VSL/VCL \times 100$ , %); STR: prostoliniowość ruchu (stosunek  $VSL/VAP \times 100$ , %). Parametry ruchu plemników oznaczane w ten sposób okazały się niezwykle istotne z punktu widzenia jakości biologicznej



nasienia. W przypadku ludzi stwierdzono na przykład, że niepłodność męska, związana z częstym używaniem sauny i tym samym przegrzewaniem plemników, związana jest z zaburzeniem ich motoryki, a w szczególności, obniżeniem wartości parametrów ruchu takich jak: VCL, VAP i ALH (Saikhun i in., 1998). Z badań prowadzonych na rybach (Ciereszko i in., 1996; Kime i in., 2001; Rurangwa i in., 2001, 2002; Jobling i in., 2002) wynika, że największe znaczenie diagnostyczne mają: prędkość krzywoliniowa (VCL) oraz prostoliniowa (VSL). Motoryka plemników ryb może ulegać zmianom pod wpływem stanu ich dojrzałości (Kowalski i in., 2006 i 2012b, Cejko i in., 2014) czasu od aktywacji (Kowalski i in., 2012a), składu buforów aktywujących (Cejko i in., 2013), obecności metali ciężkich i związków toksycznych (Sarosiak i in., 2007; Socha i in., 2008; Dietrich i in., 2010; Dietrich i in., 2012).

Z punktu widzenia dokładności pomiaru niezwykle istotnym parametrem jest ilość klatek na sekundę jaką możemy nagrać. Analogowe urządzenia VHS nagrywały obraz z prędkością 25 klatek na sekundę, standard NTSC pozwalał na zwiększenie tej ilości o 5, czyli do 30 klatek na sekundę. Ze względu na wysoką prędkość, jaką uzyskują plemniki ryb (100-300  $\mu\text{m/s}$ ), ilość nagranych klatek w ciągu jednej sekundy decyduje o dokładności pomiaru parametrów ruchu opisujących jego trajektorię oraz prędkość krzywoliniową. Badania wykazały, że 25 klatek na sekundę jest niewystarczające by uzyskać miarodajne wyniki CASA opisujące ruch plemników pstrąga tęczowego (Boryshpolets i in., 2013) i aby wyniki były dokładne potrzeba w tym przypadku nagrania minimum 40 klatek w ciągu sekundy.

Zarówno całkowita ruchliwość wyrażana w procentach jak i prędkość ruchu plemników są skorelowane z odsetkiem zapłodnienia ikry (Dreanno i in., 1999; Lahnsteiner, 2000; Linhart, 2000; Kime i in., 2001; Gage i in., 2004). Dlatego powszechnie uważa się, że parametry ruchu plemników mogą stanowić pośredni wyznacznik ich wartości biologicznej. Ten aspekt diagnostyczny jest o tyle cenny, że można wykorzystać go w doskonaleniu metod kontrolowanego rozrodu ryb. Jednymi z cenniejszych technik przydatnych w wylęgarni ryb są metody krótko i długookresowego przechowywania nasienia. Metody te mogą być pomocne w sytuacji, gdy samce dojrzewają wcześniej niż samice. W związku z tym, że jakość nasienia po szczycie dojrzałości dosyć szybko spada (Cejko i in. 2010, 2012), najbezpieczniej jest pobrać mlecz ciekących samców i przechować go w warunkach chłodniczych do czasu osiągnięcia dojrzałości przez samice. Przechowywanie takie usprawnia prace hodowlane, gdyż umożliwia zgromadzenie odpowiedniej objętości nasienia od samców przed pobieraniem ikry. Taka praktyka może mieć niebagatelne znaczenie zwłaszcza w przypadku ryb, których ikra w krótkim czasie po pobraniu traci zdolność do zapłodnienia (np. karpowate) (Kucharczyk i in. 2008). Dysponowanie łatwo dostępnym i dobrej jakości nasieniem w czasie wycierania samic, pozwala na natychmiastowe przystąpienie do zaplemnienia ikry tuż po jej pozyskaniu. Możliwość efektywnego przechowywania nasienia może także być doskonałym narzędziem wykorzystywanym w restytucji zagrożonych dzikich populacji ryb. Technika ta pozwala

zgrupować nasienie od wielu samców jeszcze przed akcją tarłową oraz wykorzystywać całą zdeponowaną pulę genetyczną (nasienie wszystkich samców) do zapładniania kolejnych partii ikry. Zabiegi takie chronią populacje przed wystąpieniem inbrodu, który znacznie obniża jakość biologiczną podchowyanego materiału. Postępowanie takie w efekcie sprzyja zachowaniu zmienności genetycznej rozradzanych ryb. Przechowywanie nasienia może w końcu w znaczący sposób ułatwić zarządzanie stadem maskulinizowanych samic ryb łososiowatych. Ryby takie (fenotypowe samce) najczęściej nie posiadają nasieniowodów, dlatego by pobrać nasienie, konieczne jest ich zabicie i wycięcie gonad. Przed uśmierceniem ryby trudno jest oszacować wielkość gonady i najczęściej w czasie takiego chirurgicznego zabiegu pozyskuje się nasienie w nadmiarze. Możliwość jego przechowania pozwala na bardziej ekonomiczne wykorzystanie stad tarłowych, gdyż umożliwia powtórne użycie tej samej porcji nasienia w kolejnym tarle.

O ile kilkudniowe przechowywanie w atmosferze tlenu jest możliwe bez rozrzedzania nasienia (Scott i Baynes 1980, Stoss i Holtz 1983) o tyle przechowywanie w okresie dłuższym stawia przed nami poważniejsze wyzwania. Niezbędne jest zapewnienie plemnikom odpowiednich warunków charakterystycznych dla biologii rozrodu danego gatunku ryb. Podstawowym narzędziem w takiej manipulacji jest wstępne rozrzedzenie plemników w płynie imitującym naturalną plazmę nasienia ryby, od której je pobrano (Kowalski i in. 2009). W przypadku ryb łososiowatych takim płynem jest sztuczna plazma nasienia (Morisawa i Morisawa 1988). Zastosowanie tego typu płynów w przechowywaniu nasienia pozwalać może na wydłużenie czasu, w którym plemniki zachowują swoje funkcje motoryczne oraz zdolność do zapłodnienia. Dlatego jednym z celów prowadzonych prac była analiza wpływu krótkookresowego przechowywania nasienia ryb na wybrane parametry biochemiczne i motorykę plemników. W związku z tym, że technika analizy motorycznej wymaga zastosowania szkła mikroskopowego a plemniki są podatne na przyklejanie się do niego (Jones et al., 1979), jednym z zadań był wybór optymalnego dodatku białek przeciwdziałających przywieraniu plemników do szkła i umożliwiając tym samym prawidłowy odczyt wartości parametrów ruchu plemników. W czasie przechowywania plemników uważa się, że atmosfera czystego tlenu pozwala na dłuższe przechowywanie nasienia ryb (Ravinder et al., 1997). Jakkolwiek zazwyczaj przechowywano nasienie nierozrzedzone. Dlatego celem pracy było również wykazanie wpływu atmosfery czystego tlenu i powietrza na motorykę plemników ryb. Stwierdzony przez nas negatywny wpływ atmosfery czystego tlenu na rozrzedzone plemniki ryb potwierdził negatywny wpływ procesów oksydacyjnych w czasie przechowywania nasienia oraz pozwolił na zadanie kolejnego pytania badawczego. Czy dodatek antyoksydantów do rozcieńczalnika pozwoli na dłuższe przechowywanie nasienia ryb w warunkach *in vitro*?

Pomimo tego, że techniki zamrażania nasienia były prezentowane przez wielu różnych autorów (Lahnsteiner 2000, Richardson i in. 2011) uzyskane dotąd wyniki nie znalazły zastosowania praktycznego. Główną barierą w zastosowaniu kriokonserwacji nasienia na szerszą

skalę jest objętość porcji nasienia poddanych temu zabiegowi oraz szybka utrata zdolności plemników do zapłodnienia po rozmrożeniu. Nasienie może być skutecznie kriokonserwowane w objętościach 0.25 lub 0.5ml, co pozwala w przypadku nasienia ryb łososiowatych na zapłodnienie od 500 do 1000 ziaren ikry. Biorąc pod uwagę fakt, że od samic ryb łososiowatych pozyskuje się do 12 700 ziaren ikry, taka ilość nasienia jest niewystarczająca dla potrzeb praktyki wylęgarniczej. Ze względu na konieczność utrzymania reżimu mrożenia mieszczącego się w wąskim zakresie zmian temperatur, zastosowanie większych objętości nasienia do kriokonserwacji jest jak dotąd niemożliwe (nasienie znajdujące się „na zewnątrz” zamarza szybciej niż to „wewnątrz”). Sam proces kriokonserwacji jest również czasochłonny i pozwala z reguły (w przypadku ryb) na jednoczesną kriokonserwację do 100 porcji nasienia. Rozmrażanie również przebiega dosyć wolno, jedna słomka wymaga około 6 sekund na rozmrożenie jednej porcji (około 0.5 ml). Wyeliminowanie czynnika czasu pozwala więc na przeskalowanie technologii z poziomu laboratoryjnej weryfikacji i jej zastosowanie na szerszą skalę. Dlatego też kolejnymi punktami w mojej pracy było zbadanie wpływu przechowywania nasienia przed kriokonserwacją i po rozmrożeniu na parametry motoryczne plemników i ich wartość biologiczną.

Cel ogólnym pracy było:

- **Określenie motoryki plemników, wybranych aspektów biochemicznych nasienia ryb oraz jego wartości biologicznej w czasie krótko i długookresowego przechowywania gamet.**
- **Opracowanie efektywnych metod krótko i długookresowego przechowywania nasienia ryb.**

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Określenie poziomu prostaglandyn w układzie rozrodczym samca pstrąga tęczowego oraz poznanie wpływu ich dodatku na motorykę plemników ryb w czasie przechowywania w warunkach *in vitro*.
2. Określenie optymalnego stężenia białek w celu ograniczenia adhezji plemników karpia w trakcie analizy motoryki plemników z zastosowaniem systemu CASA.
3. Określenie wpływu warunków tlenowych i aerobowych na zmiany ruchliwości plemników ryb.
4. Określenie wpływu antyoksydantów na motorykę plemników okonia przechowywanych w warunkach *in vitro*.
5. Ustalenie wpływu długookresowego przechowywania nasienia siei na parametry ruchu plemników oraz ich wartość biologiczną. Opracowanie metody kriokonserwacji nasienia siei.
6. Ustalenie wpływu długookresowego przechowywania nasienia pstrąga tęczowego na parametry ruchu plemników oraz ich wartość biologiczną. Opracowanie metody kriokonserwacji nasienia pstrąga tęczowego.

## **1. Określenie poziomu prostaglandyn w układzie rozrodczym samca pstrąga tęczowego oraz poznanie wpływu ich dodatku na motorykę plemników ryb w czasie przechowywania w warunkach *in vitro*.**

W pracy nr 1 zbadałem poziom prostaglandyn w układzie rozrodczym pstrąga tęczowego. Po raz pierwszy wskazałem na obecność odmiennego profilu obecności prostaglandyny  $F_{2\alpha}$  oraz  $E_2$  we krwi, jądrach i nasieniowodach badanego gatunku. We krwi pstrąga dominowała prostaglandyna  $E_2$ , chociaż jej zawartość była relatywnie niska i wynosiła  $0.29 \text{ ng ml}^{-1}$ . Co ciekawe jej zawartość w jądrach była znacznie wyższa i wynosiła aż  $3.1 \text{ ng ml}^{-1}$ , ale już w nasieniowodach było to tylko  $0.23 \text{ ng ml}^{-1}$ . Z kolei zawartość prostaglandyny  $F_{2\alpha}$  we krwi była bardzo niewielka i wynosiła zaledwie  $0.04 \text{ ng ml}^{-1}$ , podczas gdy w jądrach było to już  $0.99 \text{ ng ml}^{-1}$  a w nasieniowodach aż  $1,3 \text{ ng ml}^{-1}$ . Badania profilu zawartości prostaglandyn w badanych tkankach pozwoliło stwierdzić, że w jądrach dominuje prostaglandyna  $E_2$ , podczas gdy w nasieniowodach dominowała prostaglandyna  $F_{2\alpha}$ . Wskazywać to może na udział prostaglandyny  $F_{2\alpha}$  w procesie dojrzewania plemników ryb. W związku z tym, że samice ryb łososiowatych produkują znaczne ilości płynu owaryjnego wydalanego wraz z oocytami, jego skład ma także znaczenie w trakcie procesu zapłodnienia w warunkach naturalnych. Z tego powodu zawartość prostaglandyn określono także w płynie owaryjnym. Okazało się, że zawartość w nim prostaglandyn jest bardzo wysoka i wynosi  $23.85 \text{ ng ml}^{-1}$  dla  $\text{PGE}_2$  i  $82.20 \text{ ng ml}^{-1}$  dla  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Kolejnym zadaniem badawczym było sprawdzenie w warunkach *in vitro* jak dodatek prostaglandyn wpływa na motorykę plemników po krótkookresowym przechowywaniu. Ze względu na to, że prostaglandyny odpowiadają za wywoływanie napływu wapnia do komórek (Schaefer et al., 1998), monitorowałem także zawartość wapnia wewnątrzkomórkowego przed i po przechowywaniu. W warunkach *in vitro* prostaglandyny nie wpłynęły na ruch plemników, co wskazuje, że ich rola najprawdopodobniej nie jest związana z motoryką plemników. Okazało się jednak, że na poprawę ruchliwości plemników decydujący wpływ miał sam proces inkubacji rozrzedzonego nasienia w warunkach *in vitro* w buforze o wysokim pH imitującym skład jonowy plazmy nasienia. W pracy tej po raz pierwszy wskazałem, że w czasie inkubacji rozrzedzonego nasienia w warunkach *in vitro* wzrostowi ruchliwości plemników towarzyszył wzrost zawartości wewnątrzkomórkowego wapnia.

## **2. Określenie optymalnego stężenia białek w celu ograniczenia adhezji plemników karpia w trakcie analizy motoryki plemników z zastosowaniem systemu CASA**

W pracy nr 2 zoptymalizowałem metodykę analizy parametrów ruchu plemników. Parametry motoryki plemników mierzone za pomocą systemu CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), mogą być zależne od składu buforu, w którym inicjujemy ich aktywność (Martinez-Pastor i in., 2008). Efekt ten może być zależny nie tylko od samego składu jonowego buforu, ale od stopnia adhezji do powierzchni szkła jakiej w danym roztworze mogą ulegać plemniki (Jones et al., 1979). Adhezja taka najczęściej uwidacznia się w postaci obniżonego odsetka poruszających się plemników oraz ich mniejszą prędkością. Dane zebrane w takich warunkach pomiaru nie są wiarygodne. Dlatego też dodatek substancji zmniejszających właściwości adhezyjne plemników



jest niezbędnym etapem w przygotowywaniu buforów do określenia ruchliwości plemników. W przypadku ryb, problem ten nie został jeszcze dobrze rozpoznany i różne zespoły stosują inne stężenia i substancje ograniczające adhezję plemników do szkiełka lub też nie uwzględniają tego problemu w swoich badaniach. Jako gatunek modelowy posłużył w tym przypadku karp, gdyż plemniki tego gatunku dosyć łatwo ulegają adhezji do szkła mikroskopowego. Aby lepiej rozpoznać problem adhezji i jej możliwą zależność od składu roztworu aktywującego do badań wybrane zostały dwa roztwory tj. roztwór L (100 mM NaCl, 10 mM Tris; pH: 9.0; 199 mOsm kg<sup>-1</sup>) oraz roztwór P (5 mM KCl, 45 mM NaCl, 30 mM Tris; pH: 8.0; 160 mOsm kg<sup>-1</sup>). Różniły się one zarówno składem jak i osmolalnością a także odczynem pH. Analiza motoryki plemników w obu roztworach wykazała, że parametry ruchu mierzone bez dodatków ograniczających adhezję plemników znacznie się różnią pomiędzy roztworami. W obu roztworach, zastosowanych bez dodatku białek, mierzone parametry ruchliwości plemników były niskie. Odsetek ruchliwych plemników wzrastał, gdy w buforze rozpuszczono albuminę. W przypadku roztworu L już dodatek 0.25% albuminy pozwalał na wzrost ruchliwości z 27.5 do 80.9%, co oznacza, że plemniki w tym roztworze niezwykle łatwo ulegają adhezji. Z kolei w roztworze P efekt adhezji nie był tak silny, gdyż bez dodatku albuminy ruchliwość wynosiła 72.7%. Niemniej po dodaniu odpowiednio 0.25 i 0.5% albuminy, obserwowaliśmy większy odsetek ruchliwych plemników (odpowiednio 83.5 i 90.5%). Również prędkość krzywoliniowa rosła wraz z dodatkiem obu białek. W roztworze L plemniki osiągały maksymalną prędkość równą 205.7  $\mu\text{m s}^{-1}$  przy zastosowaniu dodatku 0.5% albuminy oraz 202.2  $\mu\text{m s}^{-1}$  w obecności 0.5% kazeiny. W roztworze P wartości te były większe i wynosiły odpowiednio 242.2  $\mu\text{m s}^{-1}$  przy zastosowaniu 1% albuminy oraz 246.0  $\mu\text{m s}^{-1}$  przy zastosowaniu 2% kazeiny. Podobne zależności obserwowano także w przypadku parametru ALH, którego wartość bez dodatków białek wynosiła 1.2 oraz 1.6  $\mu\text{m}$  w roztworach L i P. Po zastosowaniu białek już w dawce 0.25% wartości te wyniosły odpowiednio 1.8 oraz 1.9  $\mu\text{m}$ .

Porównanie ruchliwości w obu roztworach pozwoliło stwierdzić, że stopień adhezji plemników w znacznym stopniu uzależniony jest od składu jonowego stosowanych roztworów. Dodatek białek pozwolił mocno zredukować różnice w mierzonych parametrach CASA motoryki plemników, co wskazuje, że główną przyczyną różnic w pomiarach motoryki plemników prowadzonych w różnych roztworach, jest odmienny stopień adhezji samych plemników. Nie wyklucza to oczywistego wpływu składników jonowych roztworów oraz ich osmolalności i pH. Jednakże różnice te nie są tak drastyczne, jak te wynikające z adhezji samych plemników do powierzchni szkiełka mikroskopowego.

Praca ta pozwoliła wystandaryzować ilość stosowanego stężenia białka w testach CASA tak, aby analiza motoryki plemników umożliwiała uzyskiwanie wiarygodnych wyników. W przypadku ssaków często stosowaną strategią w tego typu badaniach jest dodatek nawet 10% albuminy. W przypadku ryb technika ta nie była dotychczas opracowana, a wspomniane stężenie białka negatywnie wpływało na ruchliwość plemników. Z tego powodu w swoich badaniach włączyłem do analizy inne białko, tj. kazeinę. W związku z tym, że białka te mogą wykazywać działanie

podobne do przeciwutleniaczy czy też wiązać reszty cholesterolowe błon komórkowych, a także wykazywać właściwości chelatora jonów, w tym także metali ciężkich, użycie ich minimalnego stężenia niezbędnego do analizy jest konieczne w celu uzyskania wiarygodnych wyników. Badania ruchliwości plemników karpia wykazały, że plemniki ryb podatne są na przyklejanie do szkiełka (obniżony odsetek ruchu w przypadku nie zastosowania dodatku białek) a zastosowanie zarówno albuminy jak i kazeiny w stężeniu odpowiednio 0.5% oraz 0.25% pozwala na wykluczenie tego zjawiska. W badaniach moich po raz pierwszy wskazałem, że zastosowanie białka kazeiny jest bardziej efektywne w ograniczeniu zjawiska adhezji plemników w porównaniu od powszechnie stosowanej albuminy.

### **3. Określenie wpływu warunków tlenowych i aerobowych na zmiany ruchliwości plemników ryb.**

W związku z tym, że warunki *in vitro* wpływają na jakość plemników (praca nr 1), a analiza motoryki ich ruchu jest czasochłonna i od pobrania gamet do ich zbadania upływa często wiele godzin, w kolejnej pracy (praca nr 3) skupiłem się na wpływie warunków tlenowych i aerobowych na krótkookresowe przechowywanie plemników ryb.

Nierozcieńczone nasienie pstrąga tęczowego dłużej zachowuje swoje parametry motoryczne, gdy przechowywane jest w atmosferze czystego tlenu (Billard 1981). W mojej pracy wykazaliśmy, że nasienie pstrąga tęczowego rozcieńczone sztuczną plazmą nasienia (Morisawa i Morisawa, 1988) dłużej zachowuje swoje właściwości motoryczne, gdy przechowywane jest w warunkach aerobowych, jakkolwiek w ciągu pierwszych 10 dni przechowywania nie stwierdzono różnic w parametrach ruchu plemników przechowywanych bez rozrzedzenia jak i tych rozrzedzonych sztuczną plazmą nasienia. Warunki aerobowe oraz rozrzedzenie nasienia sztuczną plazmą, pozwoliły na utrzymanie 50% ruchliwych plemników aż 20 dni od pobrania nasienia. W tym czasie plemniki przechowywane w atmosferze czystego tlenu całkowicie straciły swoją zdolność do ruchu. Podobnie w przypadku sterleta, plemniki przechowywane w atmosferze czystego tlenu traciły swoją zdolność do ruchu już 10 dni po rozpoczęciu przechowywania. W tym czasie plemniki rozrzedzone i przechowywane w atmosferze powietrza (warunki aerobowe) charakteryzowały się ruchliwością na poziomie 70%. Badania te wskazały na wysoką podatność plemników sterleta na uszkodzenia związane z procesami oksydacyjnymi. Może to mieć związek z obecnością struktury akrosomu w tych plemnikach, co jest ewenementem w świecie ryb. Prawdopodobnie delikatna struktura akrosomu może łatwo ulegać uszkodzeniom związanym z peroksydacją lipidów znajdujących się w błonie komórkowej i powodując nieodwracalne zmiany w jego strukturze. W przypadku karpia, jakkolwiek nie potwierdziliśmy negatywnego wpływu atmosfery czystego tlenu na zachowanie właściwości motorycznych plemników, nie stwierdziliśmy także pozytywnego wpływu takiego sposobu przechowywania. W ciągu 4 dni przechowywania w rozrzedzonym nasieniu karpia zmniejszył się odsetek ruchliwych plemników z 60 do 40%.



Przedstawiona praca, po raz pierwszy na przykładzie ryb jesiotrowatych (sterlet), łososiowatych (pstrąg tęczowy) i karpowatych (karp) dowiodła, że warunki tlenowe nie wpływają korzystnie dla utrzymania właściwego poziomu ruchliwości plemników ryb. Moja praca wskazuje na możliwość wystąpienia stresu oksydacyjnego w nasieniu ryb przechowywanym w atmosferze czystego tlenu, o czym świadczą mogły informacje dostarczane wcześniej przez hodowców i praktyków z dziedziny rybactwa.

#### **4. Określenie wpływu antyoksydantów na motorykę plemników okonia przechowywanych w warunkach *in vitro*.**

W związku z tym, że we wcześniej prowadzonych badaniach (praca nr 3) stwierdziłem możliwość zachodzenia zmian oksydacyjnych w nasieniu ryb w czasie krótkookresowego przechowywania, postanowiłem zbadać, czy dodatek antyoksydantów może wydłużyć żywotność plemników ryb oraz ich parametry motoryczne. W pracy numer 4 zastosowałem dodatek antyoksydantów, a także albuminy w czasie krótkookresowego przechowywania nasienia okonia.

Dodatek antyoksydantów do nasienia okonia spowodował znaczące różnice w ALH, którego wartość była najniższa w wariantach z dodatkiem witaminy E i wynosiła 1.69  $\mu\text{m}$ , podczas gdy w próbie bez dodatku antyoksydantów wynosiła ona 2.53  $\mu\text{m}$ . Po 17 dniach przechowywania najwyższa wartość ALH zanotowana została w próbach z dodatkiem glutationu i wynosiła ona 1.51  $\mu\text{m}$ . Niemniej była ona zbliżona do wartości obserwowanej w grupie kontrolnej (1.39  $\mu\text{m}$ ). Podczas przechowywania obserwowane były duże fluktuacje parametrów CASA takich jak VCL, VSL, LIN, STR and PRG. Najprawdopodobniej związane one były z obniżającym się odsetkiem ruchliwych plemników. Możliwe, że subpopulacja plemników o niskich parametrach motorycznych najszybciej traciła zdolność do poruszania się i tym samym, pozostałe plemniki charakteryzujące się wysokimi wartościami parametrów motorycznych, miały wpływ na osiągnięcie wyższych średnich wartości CASA w próbach.

W toku prowadzonych badań okazało się, że dodatek większości antyoksydantów (1 mM witaminy C, 1.5 mg ml<sup>-1</sup> witaminy E, 5 mM cytrynianu sodu, 5 mM glutationu i 5 mM cysteiny) wpłynął negatywnie na motorykę plemników. Jedynie dodatek glutationu nie wykazywał negatywnego wpływu na motorykę plemników. Jakkolwiek dodatek antyoksydantów nie okazał się kluczowy w uzyskaniu wysokiego odsetka ruchliwych plemników, to zastosowany przez nas po raz pierwszy rozrzedzalnik do nasienia ryb pozwolił na przechowanie nasienia okonia aż 17 dni z zachowaniem jego potencjału motorycznego na poziomie 72% z dodatkiem glutationu oraz 64% w roztworze bez dodatku antyoksydantów.

#### **5. Ustalenie wpływu długookresowego przechowywania nasienia siei na parametry ruchu plemników oraz ich wartość biologiczną. Opracowanie metody kriokonserwacji nasienia siei.**

W związku z możliwością dłuższego przechowania nasienia bez utraty jego właściwości motorycznych, podjąłem badania mające na celu opracowanie metod długookresowego przechowywania nasienia ryb. W pracy numer 5 po raz pierwszy opisałem metodę pozwalającą

na efektywne i możliwe do zastosowania w praktyce długookresowe przechowywanie (kriokonserwację) nasienia siei.

Od pobrania nasienia do jego kriokonserwacji często mija kilka godzin. Jak wykazaliśmy we wcześniejszej pracy, nasienie ryb przechowywane w stanie nierozrzedzonym szybko traci swoje własności motoryczne. Jest to zwłaszcza widoczne w przypadku siei, u której ruchliwość plemników spada już w kilkadziesiąt minut po pobraniu nasienia. W związku z tym, w prezentowanej pracy postanowiłem przeanalizować połączenie metody krótkookresowego z metodą długookresowego przechowywania nasienia tak, aby uzyskać wystarczającą ilość czasu na manipulacje nasieniem po jego pobraniu i skuteczne przeprowadzenie procedury kriokonserwacji. W tym celu zastosowano roztwór ASP (Morisawa i Morisawa, 1988) i pobrane próby nasienia zostały w nim rozrzedzone w stosunku 1:1 po czym poddane zostały kriokonserwacji. Stwierdzono, że nasienie wstępnie rozrzedzone buforem ASP zachowuje swoje parametry motoryczne na niezmiennym poziomie w ciągu 24 godzin od jego pobrania. W tym samym czasie nasienie nierozrzedzone charakteryzowało się ruchliwością zredukowaną o nieomal 50%. Istotne zmiany motoryki plemników związane z przechowywaniem nasienia nierozrzedzonego rozpoczęły się już w 2 godziny po jego pobraniu, co wskazuje, że nasienie siei może być jednym z bardziej wrażliwych na przechowywanie w warunkach *in vitro*. Może to także wskazywać na możliwość zanieczyszczenia nasienia moczem, co zazwyczaj prowadzi do szybkiej utraty właściwości motorycznych plemników poprzez przedwczesną aktywację ich aparatu ruchu. W tym przypadku strategia opierająca się na wcześniejszym rozrzedzeniu nasienia w roztworze zawierającym składniki, które skutecznie blokują aparat ruchu plemników i wprowadzając tym samym właściwe dla nasienia warunki osmolalności oraz pH, okazały się skuteczne w krótkookresowym przechowywaniu nasienia.

Poza testem mającym na celu analizę motoryki plemników w trakcie krótkookresowego przechowywania, przeprowadzona została także kriokonserwacja nasienia rozrzedzonego wstępnie buforem ASP. Okazało się, że nasienie siei rozrzedzone dwukrotnie buforem ASP, a następnie rozrzedzone buforem do kriokonserwacji (40 mM KCl, 20 mM Tris, 300 mM trehaloza, 20% metanol) i poddane kriokonserwacji (4cm nad poziomem azotu w czasie 4 minut), pozwoliło na zachowanie aż 77% ruchliwych plemników po rozmrożeniu. W przypadku nasienia wcześniej poddanego krótkookresowemu przechowaniu na lodzie w stanie rozrzedzonym wynik ten utrzymywał się na zbliżonym poziomie tj. 75%. Stwierdziliśmy, że parametry motoryczne plemników takie jak VCL, VAP i ALH uległy obniżeniu po kriokonserwacji. Co ciekawe, parametry takie jak PRG i LIN wzrosły po zastosowaniu kriokonserwacji. Analizując wpływ czasu po rozmrożeniu na motorykę plemników stwierdziłem, że w czasie 30 minut od rozmrożenia nasienia wartość ta zmniejszyła się do około 50%. Przeprowadzone testy barwienia jodkiem propidyny i barwnikiem SYBR-14 wykazały, że po kriokonserwacji w nasieniu pozostało około 70% plemników z nieuszkodzonymi błonami komórkowymi, co potwierdziło wyniki uzyskane z zastosowaniem systemu CASA. Niewielki spadek tej wartości po 30 minutach od rozmrożenia w

stosunku do obserwowanego spadku ruchliwych plemników wskazuje, że za obniżanie odsetka ruchliwych plemników po rozmrożeniu nie są odpowiedzialne procesy związane z uszkodzeniami błony komórkowej plemników. Po przeprowadzeniu testów zapłodnienia ikry z użyciem nasienia kriokonserwowanego stwierdziliśmy, że potencjał biologiczny kriokonserwowanych plemników siei jest porównywalny do nasienia przed kriokonserwacją. Wyniki te wskazują, że zmiany parametrów motorycznych plemników nie wpłynęły negatywnie na ich wartość biologiczną. Pozwala to sądzić, że zmiany tych parametrów w pewnym zakresie wartości nie stanowią bariery w zapłodnieniu ikry w warunkach kontrolowanego rozrodu.

Na podstawie przeprowadzonego przez nas eksperymentu stwierdziliśmy, że zastosowanie końcowego stężenia 13.33% metanolu i 240 mM trehalozy pozwoliło utrzymać wysoką (ponad 50%) ruchliwość plemników, nawet 30 minut po rozmrożeniu. Ostateczna koncentracja plemników w 250  $\mu$ l słomkach wynosiła około  $1.74 \times 10^9$  ml<sup>-1</sup>. Średnio potrzeba około dziesięciu sekund na rozmrożenie jednej próbki nasienia, co oznacza, że w ciągu 30 minut jedna osoba może rozmrozić 180 porcji. W proponowanej metodzie jedna próbka pozwala na unasiennienie około 2100 oocytów. W związku z czym, w ciągu 30 minut będziemy mogli uzyskać ilość nasienia potrzebną do zapłodnienia 378 000 ziaren ikry, co czyni tę metodę godną polecenia w praktycznych zastosowaniach. Opisana przez mnie oryginalna procedura, łącząca krótkookresowe i długookresowe przechowywanie nasienia ryb, wnosi poza wiedzę teoretyczną znaczne walory praktyczne. Długookresowo przechowywane nasienie siei charakteryzowało się zbliżonymi parametrami ruchu plemników, a także podobną do świeżego nasienia wartością biologiczną (stopień zapłodnienia ikry). Opisany w pracy dwustopniowy proces kriokonserwacji w istotny sposób ułatwia zastosowanie tej procedury w przypadku prac w terenie, czy też z dużymi ilościami nasienia. Ze względu na to, że aparatura do kriokonserwacji nasienia ma ograniczoną pojemność, możliwość przechowania nasienia i jego kriokonserwacji partiami może być bardzo cenna i przydatna w praktyce rybackiej.

## **6. Ustalenie wpływu długookresowego przechowywania nasienia pstrąga tęczowego na parametry ruchu plemników oraz ich wartość biologiczną. Opracowanie metody kriokonserwacji nasienia pstrąga tęczowego.**

W kolejnej pracy, stosując wyjściowo rozrzedzalnik do kriokonserwacji o takim samym składzie jak w przypadku siei zbadałem wpływ jego poszczególnych komponentów na skuteczność kriokonserwacji plemników ryb wyrażoną ich parametrami motorycznymi oraz wartością biologiczną.

Próby nasienia po rozrzedzeniu i konfekcjonowaniu w słomkach o pojemności 250  $\mu$ l poddano kriokonserwacji na pływających ramkach (3 cm nad parami ciekłego azotu) w czasie 5 minut. Po tym czasie próby przenoszono do ciekłego azotu. Rozmrażanie odbywało się w łaźni wodnej o temperaturze 40°C przez okres 5 s. Pierwszym etapem prac było przetestowanie wpływu stężenia trehalozy na skuteczność kriokonserwacji. Okazało się, że najlepszymi parametrami motorycznymi charakteryzują się plemniki kriokonserwowane w buforze o stężeniu 175 mM

trehalozy. Następnie zbadany został wpływ stopnia rozrzedzenia na parametry motoryczne plemników poddanych procedurze kriokonserwacji. Do badań wybrano następujące stopnie rozrzedzenia: 1:9, 1:11.5 oraz 1:14 (nasienie : rozcieńczalnik). Stwierdzono, że optymalnym rozrzedzeniem był stosunek 1:11.5. Stosując wybrane rozrzedzenie poddaliśmy analizie wpływ takich komponentów buforu do kriokonserwacji jak jony potasu oraz obecność soli Tris i ustaloną z jej pomocą wartość pH. W tym celu przygotowaliśmy 4 buforu do kriokonserwacji zawierające 10% metanolu każdy:

- A- 175 mM trehalose (186 mOsm, pH 6.39);
- B- 175 mM trehalose, 40 mM KCl (275 mOsm, pH 6.22);
- C- 175 mM trehalose, 40 mM KCl, 20 mM Tris, (300 mOsm, pH 7.5);
- D- 175 mM trehalose, 40 mM KCl, 20 mM Tris, (294 mOsm, pH 8.5).

Nasze badania wykazały, że rozrzedzenie nasienia z każdym z wybranych buforów powodował wzrost wartości takich parametrów motorycznych plemników jak VSL, VCL, LIN czy STR i nieznaczne obniżenie parametru ALH (w przypadku buforu B i C). Po rozmrożeniu, w przypadku buforów nie zawierających Tris (trihydroksyaminometan), parametry motoryczne plemników nie uległy istotnemu obniżeniu. Odsetek ruchliwych plemników, prędkości VCL i VAP kształtowały się na zbliżonym poziomie do nasienia świeżego, z kolei parametry VSL, LIN, STR były wyższe niż w przypadku nasienia świeżego. We wszystkich próbach obniżeniu uległ parametr ALH ruchu plemników. Właściwości motoryczne plemników były znacząco upośledzone po przeprowadzeniu prób kriokonserwacji z udziałem soli Tris. Wskazuje to na potencjalnie wysoką toksyczność tego związku w trakcie procesu zamrażania nasienia. Podczas procesu kriokonserwacji dochodzi bowiem do wzrostu stężenia soli w środowisku wewnątrz i zewnątrzkomórkowym, co jest związane z zamrażaniem wody. W tym procesie ważną ochronną rolę odgrywają krioprotektory, które mają za zadanie obniżyć koncentrację soli w środowisku wewnątrzkomórkowym i zewnątrzkomórkowym. W ten sposób chroni się komórki przed krytycznie wysokim stężeniem soli. W przypadku Tris ten mechanizm ochronny okazał się niewystarczający.

Stwierdziliśmy ponadto, że dodatek jonów potasu, mimo że nie wpłynął na sam proces kriokonserwacji, to miał istotne znaczenie w zachowaniu zdolności motorycznych plemników po ich rozmrożeniu. Okazało się, że obecność jonów potasu w buforze do kriokonserwacji pozwala na zachowanie wysokich wartości parametrów ruchu plemników do 60 minut od rozmrożenia. W przypadku braku jonów potasu w buforze parametry te ulegały obniżeniu po godzinie przechowywania. Badania stabilności błon komórkowych potwierdziły te wyniki, wskazując na wysoki odsetek nieuszkodzonych plemników zarówno tuż po rozmrożeniu, jak i po 60 minutach inkubacji. Na skuteczność kriokonserwacji miała także wpływ końcowa koncentracja plemników w słomce. Stosując nieliniową regresję udało się wyznaczyć optymalną wartość koncentracji plemników w słomce, która wyniosła około 1.2 mld plemników w 1 mililitrze rozrzedzalnika. Kriokonserwowane nasienie charakteryzowało się bardzo wysokimi wartościami motorycznymi



plemników, dlatego też istotnym było postawienie pytania dotyczącego ich wartości biologicznej. Przeprowadzone testy zapłodnienia wskazały, że nasienie kriokonserwowane w wariacie A i B nie różniło się w swojej zdolności zapładniającej od nasienia świeżego. Ponadto wykazaliśmy po raz pierwszy, że wartości parametrów motorycznych plemników takich jak LIN i STR negatywnie korelują z jakością biologiczną plemników.

Podsumowując, w prezentowanej pracy po raz pierwszy wykazałem, że dodatek powszechnie używanego związku buforującego (Tris) wpływa negatywnie na skuteczność kriokonserwacji nasienia pstrąga tęczowego i parametry motoryczne plemników po rozmrożeniu. Dowiodłem także istnienia optymalnej koncentracji plemników w słonce gwarantującej maksymalny odsetek żywotności plemników pstrąga tęczowego. Ponadto po raz pierwszy stwierdziłem, że dodatek soli potasu może w znaczący sposób wydłużyć czas ruchu plemników po ich rozmrożeniu. Dużą wartość poznawczą ma także stwierdzenie zależności pomiędzy wzrostem parametrów związanych z liniowością ruchu plemników ryb łososiowatych, a obniżeniem ich zdolności zapładniającej. Analizując aplikacyjność badania należy zwrócić uwagę, że dotychczasowe prace wskazywały na możliwość wykorzystania kriokonserwowanego nasienia ryb w ciągu kilku minut od jego rozmrożenia. Metoda opracowana przeze mnie pozwala na zachowanie niezmiennych parametrów motorycznych plemników oraz ich zdolności zapładniającej w czasie 60 minut od rozmrożenia. Aplikacyjny charakter przeprowadzonych badań sprawia, że w praktyce rybackiej realnym staje się wykorzystanie kriokonserwowanego nasienia w pracach selekcyjnych czy też krzyżowaniu gatunków w celach produkcyjnych.

## Piśmiennictwo

- Alavi SMH, Cosson J (2006): Sperm motility in fishes. II. Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biol. Int.* 30:1–14.
- Billard R. (1981): Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 23: 287.
- Boryshpolets S., Kowalski R.K., Dietrich G.J., Dzyuba B., Ciereszko A. (2013): Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology* 80(7): 758–765.
- Boyers S.P., Davis R.O., Katz D.F. (1989): Automated semen analysis. Current problems in obstetrics. *Gynecol. Fertil.* 12: 165–200.
- Cabrita, E., Robles, V., Rebordinos, L., Sarasquete, C., Herráez, M.P. (2005): Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 50: 144-153.
- Cejko B.I., Kowalski R.K., Kucharczyk D., Targońska K., Krejszeff S., Źarski D., Glogowski J. (2010): Influence of the length of time after hormonal stimulation on selected parameters of milt of ide *Leuciscus idus* L. *Aquacult. Res.* 41: 804–813.
- Cejko B.I., Kowalski R.K., Źarski D., Dryl K., Targońska K., Chwaluczyk R., Kucharczyk D., Glogowski J. (2012): The influence of the length of time after hormonal treatment with [(D-Ala<sub>6</sub>, Pro<sup>9</sup> NEt)-mGnRH+metoclopramide] i.e. Ovopel on barbel *Barbus barbus* (L.) milt quality and quantity indicators. *J. Appl. Ichthyol.* 28(2): 249–253.

- Cejko B.I., Krejszeff S., Judycka S., Sarosiek B., Dietrich M., Kucharczyk D., Kowalski R.K. (2014): Sperm quality and selected biochemical markers of seminal plasma at the beginning of the reproductive period of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquacult. Inter.* 22(1): 111–122.
- Cejko B.I., Sarosiek B., Kowalski R.K., Krejszeff S., Kucharczyk D. (2013): Application of computer-assisted sperm analysis in selecting the suitable solution for common carp, *Cyprinus carpio* L. sperm motility. *J. World Aquacult. Soc* 44: 466–472.
- Ciereszko A., Toth G.P., Christ S.A., Dabrowski K., (1996): Effect of cryopreservation and theophylline on motility characteristics of lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) spermatozoa. *Theriogenology* 45: 665–672.
- Dietrich G.J., Ciereszko A., Kowalski R.K., Rzemieniecki A., Bogdan E., Demianowicz W., Dietrich M., Kujawa R., Glogowski J. (2012): Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed sperm of Siberian sturgeon after a short-time exposure of fresh semen to mercury and cadmium. *J.App. Ichthyol.* 28: 973–977.
- Dietrich G.J., Dietrich M., Kowalski R.K., Dobosz S., Karol H., Demianowicz W., Glogowski J. (2010): Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. *Aquatic Toxicology* 97: 277–284.
- Dreanno C., Cosson J., Suquet M., Seguin F., Dorange G., Billard R. (1999): Nucleotides content, oxidative phosphorylation, morphology and fertilizing capacity of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa during the motility period. *Mol. Reprod. Dev.* 53: 230–243.
- Gage M.J.G., Macfarlane C.P., Yeates S., Ward R.G., Searle J.B., Parker G.A. (2004) Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Curr. Biol.* 14: 44–47.
- Gest H. (2009) Homage to Robert Hooke (1635–1703): new insights from the recently discovered Hooke Folio. *Perspect. Biol. Med.* 52: 392–399.
- Jobling S., Coey S., Whitmore J.G, Kime D.E., Van Look K.J.W., McAllister B.G., Beresford N., Henshaw A.C., Brighty G., Tyler C.R., Sumpter J.P. (2002) Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biol. Reprod.* 67: 515–524.
- Jones R., Mann T., Sherins R. (1979): Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil. Steril.*, 31(5): 531–537.
- Kime D.E., Van Look K.J.W., McAllister B.G., Huyskens G., Rurangwa E., Ollevier F. (2001): Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 130: 425–433.
- Kowalski R.K., Cejko B.I., Sarosiek B., Demianowicz W., Glogowski J. (2009): Przechowywanie nasienia ryb łososiowatych–przegląd stosowanych metod i ich praktyczne zastosowanie w wylęgarniach. W: *Rozród, podchów, profilaktyka ryb łososiowatych i innych gatunków* (Red. Zakęś Z., Demska-Zakęś K., Kowalska A., Ulikowski D.), Wyd. IRS, Olsztyn: 105–116.
- Kowalski R.K., Cejko B.I., Sarosiek B., Kucharczyk D., Targońska K., Glogowski J. (2012a): Temporal changes in motility parameters of dace *Leuciscus leuciscus* (L.) sperm obtained from spermatid ducts and directly from testicles. *Pol.J.Natur. Sc.* 27(2): 193–201.
- Kowalski R.K., Hliwa P., Andronowska A., Król J., Dietrich G.J., Wojtczak M., Stabiński R., Ciereszko A. (2006): Semen biology and stimulation of milt production in the European smelt (*Osmerus eperlanus* L.) *Aquaculture* 261: 760–770.



- Kowalski R.K., Hliwa P., Cejko B.I., Król J., Stabiński R., Ciereszko A. (2012b): Quality and quantity of smelt (*Osmerus eperlanus* L.) sperm in relation to time after hormonal stimulation. *Reprod. Biol.* 12(2): 231–245.
- Kucharczyk D., Targońska K., Źarski D., Szczerbowski A., Łuczyński M., Szkudlarek M. (2008): Dane dotyczące procedur wylęgarniczych i rozrodu kontrolowanego wybranych gatunków ryb - W: Innowacyjne metody w rozrodzie i wylęgarnictwie ryb – Materiały szkoleniowe (Red) A. Szczerbowski, M.J. Łuczyński, M. Szkudlarek, Wyd. IRS, Olsztyn: 57–78.
- Lahnsteiner F. (2000) Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. *Aquac. Res.*, 31: 245–258.
- Linhart O., Rodina M., Cosson J., (2000): Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology* 41: 241–250.
- Martinez-Pastor F, Cabrita E, Soares F, Anel L, Dinis MT (2008) Multivariate cluster analysis to study motility activation of *Solea senegalensis* spermatozoa: a model for marine teleosts. *Reproduction* 135:449–459.
- Morisawa S., Morisawa M. (1988): Induction of potential for sperm motility by bicarbonate and pH in rainbow trout and chum salmon. *J. Exp. Biol.* 136: 13–22.
- Ravinder K., Nasaruddin S., Majumdar K.C., Shivaji S. (1997): Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. *J. Fish Biol.* 50: 1309–1328.
- Rurangwa E., Biegniewska A., Slominska E., Skorkowski E.F., Ollevier F. (2002): Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comp. Biochem. Physiol.*, 131: 335–344.
- Rurangwa E., Volckaert F.A.M., Huyskens G., Kime D.E., Ollevier F. (2001): Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilisation in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Theriogenology* 55: 751–769.
- Saad, A., R. Billard, M.C., Theron, and Hollebecq, M.G. (1988): Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Aquaculture*, 71: 133.
- Saikhun J., Kitiyanant Y., Vanadurongwan V., Pavasuthipaisit K. (1998): Effects of sauna on sperm movement characteristics of normal men measured by computer-assisted sperm analysis. *Int. J. Androl.* 21: 358–363.
- Sarosiek B., Zdanio G., Kowalski R.K., Glogowski J. (2007): The influence of mercury and cadmium on the activities of some enzymes from siberian sturgeon (*Acipenser baeri brandt* 1869) semen. *Pol. J. Natur. Sc.* 2(1): 137–149.
- Scott A.P., Baynes S.M. (1980): A review of the biology, handling, and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.*, 17: 707–739.
- Socha M., Sokolowska-Mikolajczyk M., Szczerbik P., Chyb J., Dietrich G., Kowalski R., Grabic R., Epler P. (2008): The influence of polychlorinated biphenyls (PCBs) on computer analysed sperm motility of common carp (*Cyprinus carpio* L.) *in vitro*. *Cybium*, 32 (Suppl. 2): 197.
- Stoss J., Holtz W. (1983): Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture* 31: 269–274.

Triwulanningsih E, Situmorang P, Sugiarti T, Sianturi RG, Kusumaningrum DA (2008): The effect of glutathione addition in sperm diluents on the quality of bovine chilled semen. *Indones. J. Agric. Sci.* 1(1): 64-69.

## **Pozostałe osiągnięcia naukowe**

Poza tematyką związaną z przechowywaniem nasienia ryb prowadzone przeze mnie badania dotyczyły głównie zagadnień z zakresu biologii rozrodu ryb oraz andrologii. Moja praca skupiła się wokół charakterystyki plazmy nasienia ryb, właściwości motorycznych plemników, ich wartości biologicznej oraz możliwości poprawy istotnych rozrodczo parametrów nasienia poprzez iniekcje hormonalne. Prace opublikowane w czasopismach recenzowanych składają się na następujące zagadnienia:

### Spis treści

I. Enzymy proteolityczne układu rozrodczego samców ryb.....	18
II. Kriokonserwacja nasienia ryb .....	19
III. Biologia nasienia ryb .....	19
IV. Biologia rozrodu stynki.....	20
V. Aktywność $\beta$ -N-acetyloglukozoaminidazy, fosfatazy kwaśnej i arylsulfatazy w plazmie nasienia ryb i ich rola w zapłodnieniu ikry .....	21
VI. Motoryka plemników i parametry biochemiczne nasienia ryb i ich znaczenie dla kontrolowanego rozrodu ryb.....	22
VII. Wpływ związków toksycznych występujących w środowisku na jakość nasienia ryb.....	25
VIII. Zastosowanie kriokonserwacji nasienia w badaniu ewolucji koralowców oraz zachowaniu ich bioróżnorodności. ....	25
IX. Androgeneza i gynogeneza ryb łososiowatych .....	27
X. Wpływ hamowania i stymulacji aktywności COX na efektywność rozrodu i wybrane parametry immunologiczne medaki ( <i>Oryzias latipes</i> ) .....	27
XI. Metody pozyskiwania i przechowywania gamet ryb i ich zastosowanie w praktyce rybackiej.....	27

## **Przed uzyskaniem stopnia doktora**

### **I. Enzymy proteolityczne układu rozrodczego samców ryb**

Badania dotyczące proteinaz plazmy nasienia rozpocząłem jako magistrant Wydziału Ochrony Środowiska i Rybactwa Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Problem proteolizy w układzie rozrodczym samca jest w przypadku ryb bardzo ważny. Głównymi białkami plazmy nasienia są bowiem inhibitory proteaz serynowych. Wskazuje to na konieczność regulowania aktywności proteolitycznej na poziomie gonady samca. Dzięki prowadzonym przeze mnie po raz pierwszy badaniom można było określić klasy enzymów proteolitycznych

występujących w plazmie nasienia ryb oraz wyznaczyć ich masy cząsteczkowe. Okazało się, że głównymi enzymami proteolitycznymi plazmy nasienia ryb doskonałokostnych (Teleostei) są białka z klasy metaloproteaz i proteaz serynowych. Zidentyfikowano także wysoko i nisko cząsteczkowe proteazy o nieznannej klasie (niehamowane przez żaden z zastosowanych inhibitorów). Ponadto badania te pozwoliły na wskazanie wspólnych dla badanych rodzin ryb profili proteaz. W kolejnych badaniach wskazano także specyficzność niektórych enzymów proteolitycznych dla układu rozrodczego porównując ich profil elektroforetyczny z profilem protez znajdujących się we krwi i śluzie karpia. W pracy tej udało się zidentyfikować dwa pasma aktywności proteolitycznej metaloproteaz charakterystyczne tylko dla plazmy nasienia. Proteazy serynowe okazały się zbliżone do tych występujących we krwi. Określono także specyficzne proteazy serynowe znajdujące się we krwi oraz metaloproteazy śluzu ryb. Stwierdzono, że badania elektroforetyczne profili aktywności proteolitycznej mogą pomagać w diagnostyce zanieczyszczenia nasienia krwią lub śluzem do którego może dochodzić w trakcie pobierania produktów płciowych. (Załącznik IV. Pozycje A.2, 3 i 4). Mając doświadczenie w badaniu aktywności proteolitycznej za pomocą zymogramów wziąłem także udział w badaniach, które pozwoliły przenieść stosowaną przeze mnie metodykę na materiał biologiczny pochodzący od indora. Praca ta pozwoliła na znalezienie proteaz charakterystycznych tylko dla układu rozrodczego i nieobecnych we krwi indora. Ponadto, stwierdzono występowania specyficznych dla nasieniowodów inhibitorów proteaz serynowych (Załącznik IV. Pozycja A.6).

## **II. Kriokonserwacja nasienia ryb**

Od początku zatrudnienia w IRZBZ PAN w Olsztynie brałem udział w pracach zespołu Pana prof. dr hab. Jana Glogowskiego, dotyczących realizacji prac mających na celu utworzenie banku nasienia ryb a finansowanych w ramach dotacji celowej Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi. W trakcie prac związanych z tym projektem wziąłem udział w doświadczeniu opisującym bardzo efektywną metodę kriokonserwacji nasienia jesiotrów. Metoda ta pozwala na zachowanie nieomal niezmienionego potencjału rozrodczego plemników jesiotra i została opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Aquaculture* (Załącznik IV. Pozycja A.1).

## **III. Biologia nasienia ryb**

Podczas współpracy prowadzonej w naszym Zakładzie z Instytutem Rybactwa Śródlądowego brałem także udział w badaniach dotyczących zagadnień sztucznego rozrodu ryb. W jednej z prac określiliśmy wpływ powszechnie stosowanej w rybactwie anestezji na jakość nasienia pstrąga tęczowego. Stwierdziliśmy, że anestezja może skracać czas ruchu plemników a tym samym negatywnie wpływać na zapłodnienie ikry ryb. Ponadto, analizując wpływ czasu po uśmierceniu ryby na jakość nasienia stwierdziliśmy, że już 40 minut od śnięcia ryb obniżają się, istotne z punktu widzenia rozrodu, parametry ruchu plemników (Załącznik IV. Pozycja A.7). Brałem także udział w badaniach określających negatywny wpływ na proces zapłodnienia u ryb łososiowatych, których ziarna ikry są uszkodzone. W powstałej w wyniku badań pracy

wykazaliśmy, że zastosowanie odpowiednich płynów do zapłodnienia (jak na przykład roztwór sody), możliwe jest zniwelowanie tego negatywnego efektu (Załącznik IV . Pozycja A.5).

### **Po uzyskaniu stopnia doktora**

## **IV. Biologia rozrodu stynki**

Po uzyskaniu stopnia doktora rozpocząłem badania dotyczące biologii rozrodu stynki. Gatunek ten znika obecnie z wód w wielu krajach europejskich i chociaż nie należy do zagrożonych, jego lokalne populacje wymagają działań wspomagających ich utrzymanie na właściwym poziomie. Po raz pierwszy opisaliśmy obraz morfologiczny plemników stynki, które jak się okazało, należą do jednych z najmniejszych i najkrócej ruszających się plemników u ryb. Charakterystyka ruchliwości i wpływu jonów potasu na plemniki ryb wskazała, że podobnie jak ryby łososiokształtne, stynkokształtne także posiadają system immobilizacji aparatu ruchu aktywowany poprzez jony potasu. W toku naszej pracy ustaliliśmy, że jest możliwe zwiększenie możliwości reprodukcyjnych samca stynki po iniekcji hormonalnej ludzką gonadotropiną kosmówkową (hCG), ale efekt ten widoczny jest tylko w połączeniu ze stymulacją behawioralną, co obserwowaliśmy w grupach ryb trzymanyh wspólnie z samicami. W związku z niewielkimi ilościami pozyskiwanego nasienia, zdecydowaliśmy się także przeanalizować perspektywę wykorzystania nasienia jądrowego stynki. Nasze wyniki wskazały, że jakkolwiek nasienie jądrowe charakteryzuje się niższym odsetkiem ruchliwych plemników, to ich prędkość prostoliniowa była wyższa od plemników nasieniowodowych. Wyniki te wskazują na możliwość wykorzystania potencjału nasienia jądrowego w sztucznym rozrodzie stynki. Praca opisująca uwarunkowania rozrodcze samca stynki ukazała się w prestiżowym czasopiśmie *Aquaculture* (Załącznik IV. Pozycja A.9). W toku dalszych prac okazało się, że zastosowanie syntetycznych analogów gonadoliberyn (mGnRHa) w połączeniu z inhibitorami dopaminy pozwala na zwiększenie sukcesu rozrodczego samców stynki nawet bez udziału dodatkowej stymulacji behawioralnej jak ma to miejsce przy zastosowaniu hCG. Zastosowanie mGnRHa w połączeniu z metaklopramidem oraz sGnRHa w połączeniu z domperidonem, pozwoliło zwiększyć nie tylko parametry ilościowe i jakościowe nasienia stynki, ale także spowodowało, że 100% samców poddanych hormonalnej stymulacji było gotowych do rozrodu (Załącznik IV pozycja A.18). W kolejnej pracy skupiłem się na dynamice procesu dojrzewania plemników stynki po iniekcji hormonalnej (Załącznik IV pozycja A.25). Poza aspektem badawczym, badania miały pomóc w ustaleniu w jakim czasie po iniekcji hormonalnej następuje szczytowy punkt gotowości tarłowej samców stynki. W badaniach tych ustaliliśmy, że 1. Samce stynki poddane stymulacji hormonalnej zmieniają ubarwienie ciała na ciemniejsze, 2. Po iniekcji hormonalnej następuje intensywne uwodnienie nasienia w jądrach i jego stopniowe uwolnienie aż do 72 godzin po tarle, 3. Szczytowy okres produktywności rozrodczej samców stynki przypada na 48 godzinę po iniekcji hormonalnej, 4. Nasienie pozyskane z jąder samców stynki jest ruchliwe, ale charakteryzuje się odmiennymi parametrami motoryki jak na przykład znacznie wyższą liniowością ruchu w porównaniu do nasienia z

nasieniowodów. Badania te pozwoliły na szczegółowe poznanie biologii rozrodu tego gatunku i zoptymalizowanie protokołu kontrolowanego rozrodu w celach restytucyjnych.

Kontynuacja badań: *Enzymy proteolityczne układu rozrodczego samców ryb*

Mając duże doświadczenie w prowadzeniu badań z zastosowaniem zymogramów we współpracy z Uniwersytetem Warmińsko-Mazurskim, wziąłem udział w badaniach nad profilem elektroforetycznym proteaz plazmy nasienia okonia w czasie sezonu tarłowego. Badania te pozwoliły na określenie proteaz specyficznych dla plazmy nasienia okonia i ponadto wskazały, że aktywność proteolityczna enzymów jest dosyć stałą w ciągu sezonu rozrodczego, a zmianie ulega jedynie aktywność antyproteolityczna (inhibitorów proteaz). Wskazuje to na wiodącą rolę inhibitorów proteaz w kontroli procesów proteolitycznych w plazmie nasienia okonia (Załącznik IV. Pozycja A.24). Badania nad proteazami plazmy nasienia zostały wznowione pod moim kierownictwem w 2015 roku i pozwoliły na dalsze scharakteryzowanie ich roli w procesach biologicznych układu rozrodczego karpia. Prace opublikowane w 2016 i 2017 roku pozwoliły na określenie optimum pH oraz temperatury, w których enzymy proteolityczne plazmy nasienia prowadzą degradację białek. Było to możliwe dzięki zastosowaniu nowatorskiej metody porównawczej bazującej na gęstości optycznej prążków elektroforetycznych aktywności proteolitycznej. Okazało się, że aktywność ta jest widoczna nawet w 4°C, co wskazuje, że mogą one pełnić swoją rolę także zimą, kiedy to najprawdopodobniej zachodzą procesy degradacji zbędnych dla organizmu białek znajdujących się w plemnikach pozostałych w układzie rozrodczym. Kolejna praca pozwoliła uwiarygodnić tą tezę wskazując, że białka plemnika mogą być degradowane przez proteazy serynowe znajdujące się w plazmie nasienia karpia. Udało się to osiągnąć poprzez nowatorskie podejście do metodyki badań, które po raz pierwszy pozwoliło zastąpić syntetyczne substraty (żelatynę czy też kazeinę) natywnymi białkami plemnika uzyskanymi po przeprowadzeniu ich sonifikacji. Białka zostały poddane rozdziałom chromatograficznym by podzielić je na 4 klasy pod względem wielkości (masy) a następnie zostały skopolimeryzowane w żelu poliakrylamidowym tworząc substrat dla proteaz. Podczas inkubacji w warunkach *in vitro* proteazy serynowe plazmy nasienia karpia degradowały wszystkie frakcje białek plemników, co wskazuje, że pełnią one rolę podobną do trypsyny w męskim układzie rozrodczym i mogą brać udział w degradacji plemników (Załącznik IV. Pozycja A 47, 51).

## **V. Aktywność $\beta$ -N-acetyloglukozoaminidazy, fosfatazy kwaśnej i arylsulfatazy w plazmie nasienia ryb i ich rola w zapłodnieniu ikry**

Enzym  $\beta$ -N-acetyloglukozoaminidaza ( $\beta$ -NAG) jest ważnym czynnikiem akrosomalnym w nasieniu kręgowców wyższych. W toku prowadzonych badań nad aktywnością tego enzymu okazało się, że w plazmie nasienia pstrąga tęczowego aktywność  $\beta$ -NAG jest znacznie wyższa w porównaniu do aktywności mierzonej w plazmie nasienia ryb jesiotrowatych. Zwrócić trzeba uwagę na fakt, że plemniki pstrąga, w odróżnieniu do plemników jesiotra, nie posiadają struktury akrosomu. W dalszych badaniach przeprowadzono izolację  $\beta$ -NAG z plazmy nasienia i



ekstraktów plemników jesiotra syberyjskiego oraz pstrąga tęczowego z zastosowaniem chromatografii jonowymiennej oraz filtracji żelowej. Tak oczyszczone formy enzymu scharakteryzowano pod kątem optymalnych wartości temperatury i pH, w których enzym wykazuje najwyższą aktywność. Zbadano także wpływ wybranych krioprotektorów na aktywność tego enzymu. Okazało się, że związki takie jak DMA, DMSO oraz glicerol, wyraźnie hamują aktywność  $\beta$ -NAG. Te pionierskie wyniki badań pozwoliły lepiej zrozumieć efekt obserwowany przez innych badaczy, a związany z kriokonserwacją nasienia jesiotra. Otóż plemniki kriokonserwowane z udziałem DMSO pomimo posiadania wysokiej ruchliwości nie są w stanie zapłodnić oocytów. Nasze badania wskazały, że za ten efekt odpowiedzialne może być działanie DMSO blokujące aktywność  $\beta$ -NAG. W toku dalszych badań przeprowadziliśmy testy zapłodnienia stosując inhibitory  $\beta$ -N-acetylogukozaaminidazy. Uzyskane wyniki pozwoliły wnioskować, że zahamowanie aktywności  $\beta$ -NAG zarówno w plemnikach jak i w ikrze jesiotra i pstrąga tęczowego, spowodowało drastyczne obniżenie odsetka zapłodnienia. Ponadto stwierdzono, że zahamowanie aktywności tego enzymu, obecnego w plemnikach, nie wpływa istotnie na proces zapłodnienia u jesiotra, jest natomiast istotne u ryb łososiowatych. Pomimo tego, iż parametry ruchu plemników pstrąga tęczowego ulegały podwyższeniu w obecności inhibitora  $\beta$ -NAG, zahamowanie aktywności tego enzymu spowodowało prawie całkowite uniemożliwienie zapłodnienia ikry. Najprawdopodobniej dzieje się tak dlatego, że plemniki akrosomalne jesiotra oprócz  $\beta$ -N-acetylogukozaaminidazy posiadają także inne enzymy (akrosyna, arylosulfataza) odgrywające w tym procesie istotną rolę. Plemniki pstrąga tęczowego zaś, pozbawione akrosomu, w momencie zahamowania aktywności  $\beta$ -NAG pozbawione są najprawdopodobniej jednego z ważniejszych komponentów biorących udział w procesie zapłodnienia. W przypadku jesiotra stwierdzono, że zahamowanie aktywności innego enzymu związanego z akrosomem – arylosulfatazy (AS), powoduje znaczny spadek odsetka zapłodnienia. W naszej pracy po raz pierwszy wykazaliśmy, że u jesiotrów AS może być głównym czynnikiem związanym z penetracją mikropyle przez plemnik. Z kolei aktywność fosfatazy kwaśnej (AcP) okazała się istotna dla oocytów jesiotra. Jej zahamowanie w samych plemnikach nie wpływało znacząco na odsetek zapłodnianej ikry, dopiero jej blokada w samej ikrze wywołała drastyczny spadek zapłodnienia (Załącznik IV. Pozycja A. 16, 29, 37, 40).

## **VI. Motoryka plemników i parametry biochemiczne nasienia ryb i ich znaczenie dla kontrolowanego rozrodu ryb.**

Przed wyjazdem na staż podoktorski brałem udział w badaniach dotyczących kontrolowanego rozrodu siei. Prowadzone prace pozwoliły po raz pierwszy scharakteryzować motorykę plemników siei oraz określić jej zależność od stężenia jonów potasu, sodu i wapnia a także wartości pH. Pozwoliły także wskazać, że skuteczną metodą poprawy płodności samców siei jest iniekcja hormonalna z zastosowaniem azagly-nafarelin GnRH $\alpha$  (gonazon). W pracy tej stwierdziliśmy, że stymulacja hormonalna zmienia parametry motoryczne plemników takie jak: prędkość i liniowość ruchu (Załącznik IV. Pozycja A11, 12).



W związku z rosnącym zapotrzebowaniem na materiał zarybieniowy ryb karpowatych, niezbędne staje się obecnie poszerzenie wiedzy z zakresu dojrzewania ich gamet w warunkach kontrolowanych. W praktyce często stosuje się latencję 24 godzin od zastosowania iniekcji hormonalnej do pozyskania produktów płciowych. Nasze wstępne badania wskazały jednak, że nie jest to okres optymalny dla ryb karpowatych. W przypadku jazia (*Leuciscus idus* (L.)), u którego zastosowaliśmy iniekcje hormonalną z wykorzystaniem Ovopelu [(D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-NET)-mGnRH<sub>a</sub>] w połączeniu z metaklopromidem, stwierdziliśmy, że potrzeba aż 60 godzin, by parametry jakościowe i ilościowe nasienia osiągnęły optymalne wartości. Opisaliśmy zmiany zarówno w ilości i jakości pozyskanego nasienia, jego wyznacznikach biochemicznych oraz parametrach ruchu plemników (Załącznik IV Pozycja A. 25). Ponadto określiliśmy zależność odpowiedzi samców po iniekcji hormonalnej zależną od warunków termicznych wody (Załącznik IV Pozycja B.6). Również przedstawiliśmy efektywną metodę przechowywania nasienia tego gatunku w warunkach *in vitro*, która ułatwia prace selekcyjne, istotne zwłaszcza w przypadku kolorowych odmian ryb (Załącznik IV. Pozycja A.24). Z kolei w badaniach nad stymulacją hormonalną samców jelca (*Leuciscus leuciscus* L.) stwierdziliśmy, że spośród preparatów hormonalnych takich jak Ovopel, Ovaprim [(D-Arg<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-NET)-sGnRH+domperidone], LHRHa, hCG czy ekstrakt przysadki mózgowej karpowej (CPE: zawierającej naturalną gonadotropinę) to sGnRH<sub>a</sub> w połączeniu z domperidonem jest najbardziej skuteczny w stymulacji dojrzewania samców tego gatunku (Załącznik IV. Pozycja A.27). Jednakże nie stwierdzono aby poza zmianami ilościowymi (większa ilość nasienia) następowały zmiany motoryki ruchu plemników zależne od rodzaju zastosowanego do stymulacji spermacji preparatu hormonalnego. Wziąłem także udział w pracy opisującej podatność na podobne iniekcje samic jelca, która wykazała, że zarówno przysadka karpowa jak i połączenie gonadoliberynu z inhibitorami dopaminy są skutecznymi sposobami wywołania owulacji u tego gatunku (Załącznik IV. Pozycja A.43).

Innym ważnym gatunkiem karpowatej ryby reofilnej, której rozród był dotychczas słabo poznany i opisany jest brzana (*Barbus barbus* (L.)). W prowadzonych badaniach wzięłem udział w pionierskich pracach dotyczących jej kontrolowanego rozrodu. Analiza stymulacji hormonalnej przeprowadzonej na stadach ryb utrzymywanych w niewoli i dzikich przyniosła bardzo interesujące rezultaty. Podobnie jak w przypadku jelca najskuteczniejszym połączeniem w stymulacji hormonalnej dojrzewania samic było zastosowanie preparatów zawierających analog gonadoliberyny połączonej z inhibitorem dopaminy. W przypadku samców nie stwierdzono wpływu na parametry jakościowe pozyskanego nasienia (Załącznik IV. Pozycja A.22). W kolejnej pracy postanowiliśmy przeanalizować wpływ czasu po zastosowaniu stymulacji hormonalnej na parametry jakościowe i ilościowe nasienia brzany. W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań stwierdziliśmy, że inaczej niż u jelca, największą efektywność w stymulacji spermacji obserwuje się już po 12 godzinach po iniekcji hormonalnej z użyciem preparatu Ovopel [D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-NET)-mGnRH+metoklopromid]. Stwierdziliśmy także, że po 84 godzinach od iniekcji hormonalnej niektóre parametry motoryki plemników ulegają obniżeniu, co sugeruje, że zachodzi proces

starzenia się plemników (Załącznik IV. Pozycja A.26). Procesy degradacyjne plemników w przypadku brzany zachodziły tak szybko, że w kolejnej pracy, mającej na celu optymalizację protokołu stymulacji hormonalnej tej ryby, zdecydowaliśmy się zachować krótsze odstępy czasu między punktami poboru nasienia. Szczegółowa analiza ilości i jakości pozyskanego nasienia pozwoliła jednoznacznie stwierdzić, że 12 godzin po iniekcji hormonalnej z zastosowaniem preparatu Ovopel jest czasem optymalnym biorąc pod uwagę potencjał rozrodczy tego gatunku (Załącznik IV. Pozycja A.35).

W związku z ustępowaniem w polskich jeziorach populacji karasia pospolitego (*Carassius carassius* (L.)) wiele ośrodków zarybieniowych zainteresowanych jest prowadzeniem produkcji materiału zarybieniowego tego gatunku w celu jego reintrodukcji. W związku z tymi pracami brałem udział w optymalizacji protokołu kontrolowanego rozrodu w oparciu o iniekcję hormonalną tego gatunku. Prowadzone przez nas badania pozwoliły stwierdzić, że w przypadku karasia pospolitego najefektywniejszym preparatem hormonalnym w stymulowaniu jego spermacji jest Ovaprim zawierający (D-Arg<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>-NET)-sGnRH<sub>a</sub> oraz inhibitor dopaminy domperidon (Załącznik IV. Pozycja A.30).

Poza pracami związanymi z optymalizacją protokołów kontrolowanego rozrodu nowych dla akwakultury gatunków, prowadziłem także badania związane z gatunkami hodowanymi na dużą skalę, takimi jak karp. Produkcja karpia stanowi około połowę całkowitej produkcji rybackiej w w naszym kraju. Ze względu na fakt, że karp jest również traktowany jako gatunek modelowy w badaniach naukowych, prowadziliśmy prace mające na celu lepsze poznanie biologii jego rozrodu oraz efektywności stymulacji hormonalnej w warunkach kontrolowanych. W pracy dotyczącej efektywności zastosowania preparatu Ovopel na stymulację dojrzewania samców karpia po raz pierwszy wykazaliśmy, że optymalnym czasem do poboru nasienia jest 24 godziny po iniekcji hormonalnej. Zmianie w tym czasie ulegały wszystkie parametry ilościowe nasienia, nie stwierdzono jednak zmian w parametrach motorycznych plemników do 48 godzin po iniekcji hormonalnej (Załącznik IV. Pozycja A.21, 41). W związku z tym, że hodowcy zainteresowani są jak największą efektywnością rozrodu hodowanych przez siebie ryb, w kolejnej pracy iniekcję hormonalną przeprowadziliśmy dwukrotnie w odstępie jednotygodniowym badając czy możliwe jest pozyskiwanie nasienia od samców karpia więcej niż jednokrotnie w ciągu sezonu tarłowego. Stwierdziliśmy, że stymulacja hormonalna z zastosowaniem preparatu Ovopel, pozwala na dwukrotne pozyskanie nasienia od tych samych osobników w odstępie jednego tygodnia. Ponadto stwierdziliśmy, że zarówno w pierwszym jak i drugim pobraniu, jakość nasienia mierzona w oparciu o jego parametry motoryczne była na takim samym poziomie (Załącznik IV. Pozycja A.36). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziliśmy na możliwość znacznego zwiększenia możliwości wykorzystania stad tarłowych karpia a tym samym wzrost ekonomiki produkcji badanego gatunku. Poza jakością nasienia brałem udział w badaniach, które pozwoliły zoptymalizować sam proces zapłodnienia w warunkach hodowlanych. W naszej pracy

wskazaliśmy najefektywniejsze roztwory, w których odsetek zapłodnionych ziaren jest wyższy oraz wskazaliśmy na wiodącą rolę osmolalności w procesie zapłodnienia karpia (Załącznik IV. Pozycja A.31, 42) Poza badaniami dotyczącymi stymulacji hormonalnej zbadaliśmy także naturalne procesy dojrzewania plemników karpia (Załącznik IV. Pozycja A.53). W pracy tej wykazaliśmy, że na początku sezonu tarłowego jakość nasienia jest najniższa. Potwierdziły to badania zarówno parametrów motorycznych plemników jak i badania cytometryczne apoptozy plemników. Po raz pierwszy wskazaliśmy, że proces apoptozy obecny jest w nasieniu karpia na początku sezonu tarłowego. Ponadto wykazaliśmy, że wszystkie parametry motoryki plemnika korelują pozytywnie z osmolalnością plazmy nasienia, potwierdzając, że to osmolalność pełni u ryb karpiowatych kluczową rolę w hamowaniu ruchliwości plemników i tym samym ochronie ich zasobów energetycznych w trakcie przebywania w nasieniowodach. Stwierdziliśmy także, że aktywność enzymatyczna tj. dehydrogenazy mleczanowej (LDH) oraz  $\beta$ -N-acetyloglucozaminydazy jest najwyższa na początku sezonu tarłowego. Ponadto aktywność tych enzymów negatywnie korelowała z najistotniejszymi parametrami motoryki plemników, takimi jak prędkość prosto (VCL) i krzywoliniowa (VSL), co także wskazuje, że enzymy te mogą być markerami jakości nasienia karpia. Z kolei aktywność fosfatazy kwaśnej (AcP) pozytywnie korelowała z ilością plemników apoptotycznych, co potwierdza dane literaturowe, wskazujące na wzrost jej aktywności w tkankach podczas procesu apoptozy.

Brałem także udział w projekcie związanym z optymalizacją protokołu kontrolowanego rozrodu zagrożonego gatunku ryby kozy (*Cobitis taenia* L.). Wstępne wyniki prowadzonych przez nas badań wskazały na możliwość poprawy jakości i ilości nasienia pozyskiwanego od tego gatunku po zastosowaniu iniekcji hormonalnej. Stwierdziliśmy także, że najskuteczniejsza jest iniekcja hCG gdyż pozwoliła na pozyskanie nasienia od wszystkich poddanych stymulacji samców a jego ruchliwość charakteryzowała się wysokimi wartościami parametrów motorycznych (Załącznik IV. Pozycja A.46, 50).

## **VII. Wpływ związków toksycznych występujących w środowisku na jakość nasienia ryb.**

Brałem udział w badaniach, które pozwoliły na określenie wpływu metali ciężkich oraz 4-nonylfenolu, a także polichlorowanych bisfenyli (PCB) na rozród ryb. Okazało się, że metale ciężkie mogą wpływać na parametry motoryczne plemników ryb podobnie jak PCB, a z kolei 4-nonylfenol podawany w paszy spowodował powstanie osobników obupłciowych zmniejszając liczbę samców w populacji. Wyniki prac opublikowane w 6 pracach naukowych (Załącznik IV. A.8, 14, 19, 28 oraz B.1, 4).

## **VIII. Zastosowanie kriokonserwacji nasienia w badaniu ewolucji koralowców oraz zachowaniu ich bioróżnorodności.**

Na podstawie mojej współpracy z Prof. Masaya Morita utworzony został zespół o polsko-japońskim składzie, pracujący nad kriokonserwacją nasienia koralowców. Pierwsza wizyta

robocza odbyła się na zaproszenie strony japońskiej w roku 2012. Dzięki niej, udało się przeprowadzić udaną kriokonserwację nasienia koralowców i utworzyć rezerwar nasienia dwóch gatunków z rodzaju *Acropora* – *A. digitifera* i *A. sp. 1*. Stały się one gatunkami modelowymi gdyż ich rozród dzieli okres ponad dwóch miesięcy, z kolei ich podobieństwo genetyczne jest znaczące. By prowadzić pogłębione badania dotyczące specjacji niezbędne było przeprowadzenie hybrydyzacji pomiędzy tymi gatunkami. Umożliwiło to zgromadzenie nasienia w roku 2012 i pierwsza udana próba krzyżowania z zastosowaniem nasienia *A. digitifera* kriokonserwowanego w czerwcu do zapłodnienia *A. SP. 1* w czasie tarła w końcu sierpnia. W kolejnym roku (2013) wyjazd odbył się w ramach krótkoterminowych wizyt naukowych finansowanych przez JSPS. Wówczas to dokonaliśmy drugiej krzyżówki z wykorzystaniem nasienia zamrożonego w sierpniu 2012 – *A. SP. 1* do zapłodnienia oocytów pozyskanych w czerwcu 2013 od *A. digitifera*. Wyniki badań pozwoliły na opublikowanie pracy dotyczącej kriokonserwacji nasienia koralowców z zastosowaniem metanolu jako krioprotektora (Załącznik IV. Pozycja A.38). Ponadto dzięki poszerzeniu badań genetycznych nad dystansem genetycznym obu gatunków oraz uzyskaniu wyników z ich krzyżowania, możliwe stało się opublikowanie pracy w czasopiśmie Coral Reef (Załącznik IV. Pozycja A.44). Dzięki potwierdzeniu możliwości krzyżowania się obu gatunków wyciągnęliśmy wnioski, że system rozpoznawania gamet u obu gatunków jest podobny, czyli specjacja rozpoczęła się po ich uprzedniej izolacji rozrodczej. W roku 2015 miała miejsce kolejna wizyta na zaproszenie strony japońskiej. W jej trakcie rozpoczęto prace mające na celu podchowanie uzyskanych hybryd koralowców. Opracowano techniki pozwalające na skuteczne zagnieżdżanie się larw koralowców oraz ich metamorfozę do polipu. Prace te potwierdziły możliwość dalszego kontynuowania badań w tym kierunku. W roku 2016 w czasie kolejnej wizyty rozszerzono bank nasienia o nowe próby oraz udoskonalono technikę kriokonserwacji nasienia *A. digitifera*. Ze względu na wysokie temperatury w sierpniu 2016 roku, a co za tym idzie niską jakość gamet koralowców z gatunku *A. SP. 1* nie udało się przeprowadzić wszystkich zamierzonych badań. W tym roku obserwowaliśmy w czasie sezonu rozrodczego masowe bielenie koralowców, co jest następstwem zachodzących w środowisku niekorzystnych zmian klimatycznych. Wskazuje to także na potrzebę jak najszybszego rozpoczęcia masowego bankowania materiału genetycznego raf wokół Okinawy. Obecnie nasze wysiłki skierowane są na pozyskanie środków mających na celu zabezpieczenie dalszych prac na poszerzeniem banku gamet koralowców, w którym obecnie zdeponowanych jest 6 gatunków z rodzaju *Acropora*. Kontynuujemy także starania nad wyhodowaniem hybryd. Hybrydy pomiędzy gatunkiem rozradzającym się wczesnym latem (*A. digitifera*) na większej głębokości i przy niższych temperaturach niż w przypadku koralowców rozradzających się późnym latem (*A. SP1*) mogą stanowić doskonały model do badań nad procesami ewolucji zachodzącymi na rafach koralowych. Hybrydyzacja międzygatunkowa uznana jest za jeden z naturalnych mechanizmów specjacji koralowców. Ponadto tak specyficzne hybrydy jak uzyskane przez nas, mogą stanowić narzędzie w ochronie raf koralowych zagrożonych przez zmiany klimatyczne. *A. SP1* dobrze toleruje



wysokie temperatury, ale zasiedla tylko płytsze partie raf, z kolei *A. digitifera* występuje nieco głębiej, ale jest wrażliwa na wysokie temperatury. Jeżeli hybryda będzie charakteryzować się większą plastycznością w stosunku do swoich wymagań środowiskowych niż gatunki wyjściowe, stanowić może cenny składnik odbudowywanych przez człowieka raf w przypadku, gdy ich obumierania nie będzie już można zatrzymać.

### **IX. Androgeneza i gynogeneza ryb łososiowatych**

Od początku mojej pracy badawczej miałem kontakt z osobami będącymi światowymi pionierami w manipulacjach genomowych u ryb (Prof. dr hab. Krzysztof Goryczko, Prof. dr hab. Jan Glogowski, dr. Igor Babiak) i brałem udział w badaniach dotyczących aspektów rozrodczych tak powstałych organizmów. W swojej pracy doktorskiej opisałem wpływ manipulacji genomowych na parametry biochemiczne i motorykę plemników pstrąga (Załącznik IV. Pozycja B.2). Brałem także udział w badaniach wskazujących na zróżnicowane profile ekspresji aromatazy w jądrach ryb homo i heterogametycznych (Załącznik IV. Pozycja A.13). Od roku 2013 współpracuję także z dr hab. Konradem Ocalewiczem, który zajmuje się aspektami genetycznymi związanymi z manipulacjami genomowymi ryb, a nasza współpraca zaowocowała dotychczas dwiema pracami naukowymi (Załącznik IV. Pozycje A.45 i 52).

### **X. Wpływ hamowania i stymulacji aktywności COX na efektywność rozrodu i wybrane parametry immunologiczne medaki (*Oryzias latipes*)**

Badania te pozwoliły na wskazanie ważnej roli przemian kwasu arachidonowego w dojrzewaniu samic i samców ryb na przykładzie modelowego organizmu, jakim jest ryżanka (określana też jako medaka, *Oryzias latipes*). Badania wykazały, że zahamowanie przemian kwasu arachidonowego prowadzi do obniżenia płodności ryb jednakże może prowadzić do wzrostu ich odporności immunologicznej. Wysokie dawki kwasu arachidonowego z kolei, mogą pozytywnie stymulować aktywność COX w wątrobie ryb i wpływać nie tylko na ich płodność ale także na lepszy wzrost ich potomstwa. Prace z prowadzonych badań opublikowane zostały w cyklu 3 publikacji (Załącznik IV. D3, A. 34, 49).

W związku z moim doświadczeniem w badaniu elektroforetycznym białek oraz motoryki plemników byłem także często zapraszany jako wykonawca do zespołów badawczych zajmujących się tą problematyką. Współpraca zaowocowała kilkoma wartościowymi publikacjami, także dotyczącymi plemników ssaków (Załącznik IV Pozycje A.15, 17, 32, 39).

### **XI. Metody pozyskiwania i przechowywania gamet ryb i ich zastosowanie w praktyce rybackiej**

W swojej pracy zawsze duży nacisk kładłem na współpracę z praktyką, dlatego też technologie, które udało mi się opracować wdrażałem do praktyki rybackiej. Jednym z największych moich praktycznych osiągnięć jest wdrożenie pneumatycznej metody pozyskiwania oocytów ryb. Tarło ryb prowadzone z zastosowaniem ręcznego masażu powłok brzusznych jest

najpowszechniej stosowaną metodą w sztucznym rozrodzie ryb. Jakkolwiek jest to metoda prosta i skuteczna, efekty jej stosowania (czas poświęcony procedurze, ilość i jakość pozyskanego materiału) w znacznym stopniu zależą od indywidualnego doświadczenia osoby, która ją przeprowadza. Ponadto manualny naciska na powłoki brzuszne tarlaków prowadzi często do fizycznych uszkodzeń ikry. Składniki ikry ryb łososiowatych po wydostaniu się z pękniętego ziarna stanowią czynnik ograniczający zdolność zapłodnienia pozostałej, nieuszkodzonej ikry. Jest to związane z wyciekami związków organicznych, które mają właściwości adhezyjne względem plemników oraz mogą stanowić fizyczną barierę w dostępie do mikropyla oocytów. Ponadto zniszczone ziarna ryb łososiowatych obniżają pH płynu owaryjnego, co negatywnie wpływa na ruchliwość plemników. W przypadku ryb łososiowatych, by poprawić odsetek zapłodnienia uszkodzonej ikry, stosować można płyny zapładniające takie jak 10% roztwór sody (zaproponowane przez nasz zespół w pracy Załącznik IV Pozycja A.5). Jednakże znacznie lepszym podejściem jest wyeliminowanie uszkodzeń oocytów w trakcie procedury tarła. Taką możliwość daje nam właśnie zastosowanie procedury tarła pneumatycznego. Do niedawna panowało także przekonanie, że metodą tą można zastosować jedynie w przypadku ryb owulujących ikrę do jamy ciała (łososiowate). Nasze badania wskazują, że metodę tę można stosować także u innych gatunków ryb takich jak na przykład szczupak (*Esox lucius* L), których ikra owulowana jest do jajników (Załącznik IV Pozycja A.48). W trakcie projektu pilotażowego zbadaliśmy wpływ tarła pneumatycznego na jakość produktów płciowych oraz zdrowotność tarlaków. Nasza praca zaowocowała opracowaniem nowej technologii oraz jej wdrożeniem w wielu ośrodkach zarybieniowych w kraju i za granicą (Załącznik IV, Pozycja C.1). Z filmem podsumowującym działania podjęte w projekcie można zapoznać się na stronie internetowej: <https://vimeo.com/130037388>.

Innym praktycznym efektem mojej działalności naukowej jest opatentowanie i wdrożenie do użycia rozrzedzalnika dla nasienia ryb. Płyn ten pozwala nie tylko zachować parametry motoryczne plemników oraz ich zdolność zapładniającą w czasie przechowywania w lodówce liczoną tygodniami, ale również umożliwia dojrzewanie plemników pochodzących z jąder pstrąga tęczowego. Płyn jest obecnie udostępniany zainteresowanym gospodarstwom rybackim w celu jego testowania (Załącznik IV Pozycja B.1).

Poza działalnością naukową i wdrożeniową, biorę aktywny udział w popularyzacji wyników badań naukowych w środowisku hodowców ryb.

### **Współpraca krajowa:**

Od początku swojej kariery zawodowej współpracuję z Instytutem Rybactwa Śródlądowego oraz Uniwersytetem Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie. Współpraca ta znajduje swój wyraz w składzie autorskim wielu moich publikacji naukowych.



Od 2008 roku stale współpracuje także ze Stowarzyszeniem Producentów Ryb Łososiowatych i jako ekspert Stowarzyszenia biorę udział w przygotowaniach i realizacji corocznej Konferencji Stowarzyszenia. Jestem także jednym z autorów Strategii Rozwoju Akwakultury Intensywnej,

Od roku 2012 współpracuje także z Polskim Towarzystwem Rybackim. Aktywnie uczestniczę w konferencjach organizowanych przez PTR oraz na zaproszenie publikuję prace popularnonaukowe na łamach Przeglądu Rybackiego.

Od 2015 roku współpracuje z Instytutem Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego w ramach naszych prac nad rybami łososiowatymi i ich kontrolowanym rozrodem prowadzącym do otrzymywania osobników poliploidalnych oraz hybryd. Nasza współpraca zaowocowała kilkoma pracami naukowymi.

#### **Współpraca z ośrodkami zagranicznymi:**

W czasie swojego pobytu na stażu podoktorskim nawiązałem współpracę z Misaki Marine Biological Station, Faculty of Science, the University of Tokyo. Współpraca zaowocowała wieloma wspólnymi artykułami naukowymi a także moim udziałem w organizacji Konferencji Spermatologicznej, która odbyła się na Okinawie w 2010 roku.

W 2012 roku rozpocząłem współpracę z ośrodkiem naukowym w Japonii (University of the Ryukyus, Tropical Biosphere Research Center) tworząc sieć naukową, w której realizujemy badania związane z ochroną bioróżnorodności raf koralowych. Jako partner z Polski, opracowałem i rozwinąłem technologie kriokonserwacji gamet koralowców. Wspólnie z partnerem japońskim, stosując kriokonserwację gamet i krzyżowanie międzygatunkowe, prowadzimy badania dotyczące aspektów ewolucyjnych rafy koralowej. Od 3 lat staramy się wyhodować hybrydy koralowców pochodzące ze skrzyżowania gatunków trących się wiosną i późnym latem. Takie hybrydy pozwoliłyby lepiej zrozumieć proces specjacji jaki doprowadził do izolacji rozrodczej tych koralowców. Nasza współpraca zaowocowała dotychczas dwiema publikacjami (Pozycje A. 38 i 44), a wyniki badań prezentowane były na międzynarodowej konferencji (Pozycja K. 9).

W 2017 roku rozpocząłem także z moim zespołem współpracę z Uniwersytetem Szent István w Godollo k/Budapeszcie na Węgrzech. Współpracując z Prof. Akosem Horvathem, wykonaliśmy badania dotyczące kriokonserwacji nasienia zagrożonego gatunku ryby łososiowatej *Salmo marmoratus* oraz zaprezentowaliśmy metodę pneumatyczną pozyskiwania oocytów ryb. Współpraca będzie kontynuowana w kolejnych latach i ma doprowadzić do przygotowania wspólnego projektu badawczego.

Pełna lista moich **osiągnięć dotyczących pracy badawczej, dydaktycznej i organizacyjnej** znajduje się w Załączniku IV pt: „*Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki*”.

Podsumowując, brałem udział w realizacji 11 projektów badawczych. W dwóch projektach byłem kierownikiem. Odbywałem staże w zagranicznych ośrodkach naukowych: w: Misaki Marine

Biological Station, Faculty of Science, the University of Tokyo, Japonia oraz University of the Ryukyus, Tropical Biosphere Research Center, Okinawa, Japonia.

Wyniki badań często prezentowałem w formie referatów (10 referatów na konferencjach międzynarodowych, 34 referaty na konferencjach krajowych). Z 76 komunikatów naukowych, w 33 jestem pierwszym autorem.

Współpracując z redakcjami czasopism o zasięgu międzynarodowym z bazy JCR, wykonałam recenzje oryginalnych publikacji eksperymentalnych dla następujących czasopism:

1. Aquaculture (2014-2018): **6**
2. Cryobiology (2014-2018): **4**
3. Animal Reproduction Sciences (2013-2018): **7**
4. Theriogenology (2014): **2**
5. Ecotoxicology and Environmental Safety (2017): **1**
6. Journal of Applied Ichthyology (2014) **1**
7. Czech Journal of Animal Sciences (2014) **1**
8. Neotropical Ichthyology (2014) **1**
9. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences (2014-2017): **3**
10. Asian Fisheries Science Journal (2014): **1**
11. Aquaculture International (2013): **1**
12. Fish Physiology and Biochemistry (2012): **1**
13. Reproductive Biology (2009): **1**
14. Reviews in Fish Biology and Fisheries (2009): **1**

W związku z dużym wkładem w prace recenzenckie w 2018 roku zostałem wyróżniony certyfikatem "Outstanding contribution in reviewing" w czasopismach: Aquaculture, Cryobiology oraz Animal Reproduction Science. Jestem także laureatem licznych nagród i stypendiów naukowych, m.in. stypendium START Fundacji Nauki Polskiej oraz nagrody *Pro Scientia et Vita* Fundacji Członków PAN, Nagrody zespołowej II stopnia Dyrektora Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, nagrody Dyrektora Instytutu za całokształt działalności popularyzatorskiej.

Od początku swojej pracy brałem aktywny udział w pracy dydaktycznej prowadzonej zarówno w kraju jak i za granicą. W latach 2010-2012 brałem udział w realizacji zajęć dla studentów Wydziału Biologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie przy współpracy z Prof. dr hab. Mirosławem Łuczyńskim. Owoce tej współpracy stał się mój udział w przygotowaniu podręcznika akademickiego dla studentów Biotechnologii. Byłem promotorem jednej pracy magisterskiej, opiekunem naukowym w innej pracy magisterskiej oraz pełniłem funkcję promotora

pomocniczego w przewodzie doktorskim prowadzonym w Japonii. Zostałem także dwukrotnie zaproszony do pełnienia roli recenzenta dysertacji doktorskich przez University of South Bohemia in České Budějovice.

### Tabelaryczne zestawienie danych dotyczących dorobku naukowego

Rodzaj opracowania	Przed uzyskaniem stopnia dr nauk	Po uzyskaniu stopnia dr nauk	Ogółem
<b>Oryginalne prace twórcze:</b>			
• W bazie Journal Citation Reports (JCR)	7	53	60
• Spoza listy		10	10
<b>Monografie w języku polskim<sup>‡</sup></b>	12	63	75
<b>Podręczniki akademickie</b>		2	2
<b>Komunikaty naukowe<sup>‡</sup></b>	21	55	76
<b>Patenty</b>		2	2
<b>Ogółem</b>	42	179	<b>221</b>

<sup>‡</sup> wraz z opublikowanymi w postaci komunikatów prezentacjami ustnymi i referatami.

Liczba publikacji pełnotekstowych: 220 oraz 2 patenty ( $\Sigma_{IF} = 68,018$ ;  $\Sigma_{MNI\text{SW}} = 1629$ ), w tym:

- 57 publikacji opublikowanych w czasopismach z IF (w roku publikacji),  $\Sigma_{IF} = 68,018$ ;  $\Sigma_{MNI\text{SW}} = 1265$ , 3 publikacje w czasopismach indeksowanych przez JCR nie posiadających w czasie opublikowania współczynnika IF
- 12 publikacji w czasopismach spoza JCR,  $\Sigma_{MNI\text{SW}} = 50$
- 74 rozdziałów w monografiach,  $\Sigma_{MNI\text{SW}} = 264$
- 2 patenty zastosowane w praktyce  $\Sigma_{MNI\text{SW}} = 50$
- Indeks Hirscha = 14
- Suma cytacji bez autocytacji = 414

Aktualne dane bibliograficzne znajdują się pod adresem: <http://www.researcherid.com/rid/D-9872-2011>

*Andrzej Kowalski*