



Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

<http://merlin.up.poznan.pl/GENETYKA/>

Prof. dr hab. Dorota Cieślak email dorota.cieslak@up.poznan.pl tel 61 846 6117

Poznań, 16.12.2019

Prof. dr hab. Dorota Cieślak
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Ul. Wołyńska 33
60-631 Poznań

Recenzja pracy doktorskiej mgr Joanny Szymanowicz

pt. ” *The impact of nanowater on sperm survival and its biological potential after cryopreservation process*” przygotowanej pod kierunkiem
dr hab. Macieja Murawskiego (promotor) i
dr inż. Tomasza Szwarza (promotor pomocniczy)

Uwagi ogólne

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska **mgr Joanny Szymanowicz** napisana jest w języku angielskim i ma typowy układ monografii naukowej. Praca poświęcona jest analizie szerokiego spektrum parametrów jakościowych plemników tryka owcy domowej (*Ovis aries*) poddawanych standardowej procedurze mrożenia w obecności tzw *nanowody* (NW), którą uzyskuje się po poddaniu wody działaniu zimnej, niskociśnieniowej plazmy w reaktorze próżniowym.

Autorka wyznaczyła 3 cele doświadczalne:

1) ocena wpływu NW na parametry jakościowe plemników (w tym cechy morfometryczne główki oraz wyniki rozrodu) poddanych mrożeniu w standardowym rozrzedzalniku (*Trilladyl*) oraz ocena wielkości powstających kryształów wody (SEM);

2) ocena czynnika rasowego dawcy plemników (4 rasy) oraz czasu deklasteryzacji (*declusterization*) wody w różnym przedziałach czasowych (od 15 do 90 minut) w procesie mrożenia plemników (spektrum parametrów jakościowych)

3) identyfikacja optymalnej kombinacji dwóch czynników - czasu deklasteryzacji oraz udziału glicerolu - w zmodyfikowanym rozrzedzalniku wg Kareta do zastosowania w procedurze mrożenia nasienia tryka.

Uważam, że zakres wykonanych doświadczeń (liczba zwierząt: 16 samców, 128 samic) i wykorzystanych procedur laboratoryjnych są bardzo bogate: podstawowe procedury oceny jakości plemników – ruch postępowy, % wad morfologicznych; mikroskopia skaningowa SEM – wielkość kryształów wody; wspomagana komputerowo analiza plemników CASA – ruchliwość; cytometria przepływowa - % plemników apoptotycznych i martwych; analiza biochemiczna test UV - poziom enzymów akrosomu - ALP, ALT, AspAT. Imponująca jest także liczba grup plemników w doświadczeniach: np. doświadczenie nr 2 –



Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

<http://merlin.up.poznan.pl/GENETYKA/>

Prof. dr hab. Dorota Cieślak email dorota.cieslak@up.poznan.pl tel 61 846 6117

21 grup (4 rasy/linie owiec x 5 czasów deklasteryzacji + grupa kontrolna); doświadczenie nr 3 - 5 grup (1 rasa x 2 czasy deklasteryzacji x 2 stężenia glicerolu + grupa kontrolna). Należy podkreślić, że pozyskane ejakulatory były dzielone na części w liczbie odpowiadającej liczbie grup w doświadczeniu. Dzięki temu uniknięto dodatkowej zmienności wynikającej z efektu ejakulatu. Na podstawie przeglądu baz literatury pragnę nadmienić, że aktualny stan wiedzy na temat interakcji nanowody z żywymi tkankami/komórkami jest bardzo skromny. Jedyna dostępna publikacja autorstwa promotora niniejszej rozprawy dotyczy bardzo zbliżonej tematyki (*Murawski i wsp 2015 The utility of nanowater for ram semen cryopresenation. Experimental Biology and Medicine 240(5):611-617*). Wyniki niniejszej pracy doktorskiej po raz pierwszy dokumentują w tak szerokim zakresie wpływ nanowody na procesy zachodzące w plemnikach tryka owcy domowej poddawanych mrożeniu w kontekście możliwości jej wykorzystania w standardowej procedurze. **Za oryginalny wkład ocenianej rozprawy uważam kompleksową analizę jakości plemników tryka w układzie doświadczalnym obejmującym różne czasy deklasteryzacji wody oraz stężenia glicerolu.** Wykazano jednoznaczny, pozytywny wpływ NW na jakość plemników po rozmrożeniu oraz na skuteczność rozrodu (% ciąży).

Pragnę zwrócić szczególną uwagę na następujące osiągnięcia niniejszej pracy:

1. Wykazanie pozytywnego wpływu stosowania nanowody podczas mrożenia na jakość plemników tryka po rozmrożeniu i na efektywność rozrodu.
2. Stwierdzenie istotnych różnic wielkości pozakomórkowych kryształów powstających podczas mrożenia w środowisku wody dejonizowanej (średnia powierzchnia 0,33 μm^2) i nanowody (powierzchnia 0,94 μm^2).
3. Wykazanie związku czasu deklasteryzacji z aktywnością biologiczną nanowody (najlepsze efekty dla 15 min i 30 min). Odkrycie to wymaga jednak dalszych badań w celu wykazania stosownego mechanizmu.

Uwagi szczegółowe

Zdaję sobie sprawę, że wyniki niniejszej pracy doktorskiej będą publikowane w uznanych czasopismach, jednak jako Recenzent mam obowiązek ocenić przedstawioną do recenzji monografię. Rozprawa doktorska **mgr Joanny Szymanowicz** napisana jest w języku angielskim i ma typowy układ monografii naukowej. Liczy 84 strony z podziałem na: spis treści, wykaz skrótów, wstęp (1-14), cele pracy (15), materiał i metody (16-28), wyniki (29-34), dyskusję (35-41), spis literatury (43-53) 85 pozycji oraz streszczenia w j. angielskim (54-57) i j. polskim (58-61). Praca jest ilustrowana tabelami (21), wykresami (2) oraz rycinami (3), w tym zdjęciami mikroskopowym (SEM Fig.1) oraz barwienia plemników (Fig.2).



Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

<http://merlin.up.poznan.pl/GENETYKA/>

Prof. dr hab. Dorota Cieślak email dorota.cieslak@up.poznan.pl tel 61 846 6117

Wykaz uwag:

1. W rozdziale *Wstęp* brakuje w mojej opinii kilku ważnych informacji:
 - krótkiego podsumowania aktualnej wiedzy na temat oddziaływania nanowody na żywe komórki/tkanki. Należało koniecznie przedstawić wyniki doświadczenia *Murawski i wsp 2015 Experimental Biology and Medicine*
 - informacji na temat wyższej jakości plemników tryka posiadających główkę o wydłużonym (*elongated*) kształcie, tym bardziej, że ważnym elementem doświadczenia nr 1 była morfometria główki
 - danych na temat parametrów standardowego procesu deklasteryzacji wody, szczególnie czasu, skoro testowanie NW uzyskanej w różnych czasach było podstawą doświadczenia nr 2. Dane te są niezbędne do właściwego przedyskutowania wyników
 - krótkiej charakterystyki jakości plemników 4 ras owiec wykorzystywanych w doświadczeniu uzasadniającej ich wybór
 - informacji na temat czasu, w którym NW zachowuje właściwości uzyskane podczas deklasteryzacji. Jest to bardzo ważne skoro różne czynniki (w tym ruch) sprzyjają odtwarzaniu wiązań wodorowych między cząsteczkami wody i jej powrotu do formy zagregowanej. Nie można wykluczyć, że czas deklasteryzacji (15,30,45,60 i 90 min) może również wpływać na trwałość stanu NW i wyniki doświadczenia (np. powstają kryształy o różnej wielkości)
 - informacja na temat temperatury zamrażania NW na str. 14 powinna być uzupełniona o słowo „*minus*”
2. W ocenianej rozprawie nie wyodrębniono hipotezy badawczej.
3. Pomimo, że rozdział *Materiał i Metody* (M&M) jest bardzo szczegółowy, sposób jego prezentacji wymaga od czytelnika dużego skupienia i znajomości układu doświadczalnego. Mam następujące uwagi do tego rozdziału:
 - brakuje danych o liczbie przebadanych ejakulatów
 - brakuje informacji o rasach tryków w doświadczeniu nr 1. Można się domyślać, że są to 4 rasy z doświadczenia nr 2, ale nie mam pewności
4. Rozdział *Wyniki* przedstawia wyniki poszczególnych doświadczeń z uwzględnieniem poszczególnych analiz/parametrów. Moje uwagi są następujące:
 - Autorka stwierdza na str 31, “*Finally, the incidence of proximal cytoplasmic droplet in group NW30' (0.2 ± 0.09%) was greater compared with those in groups NW60' and NW90' in which no proximal droplets were detected*”. Ponieważ zdanie dotyczy analizy plemników po mrożeniu, a w każdej grupie doświadczalnej były plemniki z



Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

<http://merlin.up.poznan.pl/GENETYKA/>

Prof. dr hab. Dorota Cieślak email dorota.cieslak@up.poznan.pl tel 61 846 6117

tęgo samego ejakulatu danego tryka, czy to oznacza, że Autorka dopuszcza możliwość, aby zmiana ta (proksymalna kropla cytoplazmatyczna) mogła powstać podczas mrożenia? Proszę o wyjaśnienie.

- Jak wytłumaczyć wyższy udział apoptotycznych plemników w grupie NW30` w porównaniu do grup NW15` (krótszy czas deklasteryzacji) i NW60` (dłuższy czas)?
 - Ocena ruchu postępowego plemników w różnych czasach po rozmrożeniu przyniosła w moim odczuciu niejednoznaczne wyniki (str 32). Jak wytłumaczyć tak dużą zmienność punktu czasowego, w którym odnotowano istotny spadek ruchliwości w zależności od czasu deklasteryzacji?
 - Na str 33 Autorka stwierdza, że „*only the significant differences between treatment groups and their respective controls were indicated in this section of the thesis*”. Pragnę nadmienić, że w dyskusji naukowej pod uwagę bierze się jedynie zależności istotne statystycznie
 - utrudnieniem podczas analizy wyników był fakt umieszczenia tabel i zdjęć na końcu rozprawy
 - **fotografia SEM (Fig.1) przedstawiająca pozakomórkowe kryształy wody i plemniki została opublikowana w publikacji Murawski i wsp 2015 *The utility of nanowater for ram semen cryopresenation. Experimental Biology and Medicine* 240(5):611-617. Sposób jej prezentacji w ocenianej rozprawie stwarza wrażenie, jakby stanowiła oryginalną jej część, co nie jest zgodne ze stanem faktycznym. Proszę o wyjaśnienie tej sytuacji**
 - W mojej opinii dokumentacja fotograficzna pracy jest bardzo skromna (2 fotografie). Fotografie prezentujące np. różne wady morfologiczne plemników, sposób pomiarów główki etc doskonale uzupełniałyby opisy. Szkoda, że Autorka nie wykonała stosownych zdjęć SEM prób plemników mrożonych z użyciem NW poddanej deklasteryzacji w różnym czasie.
 - Zamiast „genotyp” sugeruję stosować pojęcie „rasa/linia” tryka
5. W rozdziale *Dyskusja* Autorka omawia najważniejsze wyniki swojej pracy na tle literatury z zakresu parametrów/cech plemników oraz ich mrożenia, jednak niewiele jest odniesień do znanych właściwości fizycznych NW np. znacznie niższa temperatura zamrażania NW (-67°C w porównaniu z wodą), bardzo niska gęstość, znacznie wyższa rozpuszczalność substancji (30-40% wyższa niż wody), zdolność do rozpuszczania niepolarnych cząsteczek np. lipidów. Chociaż w niniejszej pracy nie stwierdzono wpływu badanych czynników na morfometrię główki, zastanawia mnie jednak znaczenie wydłużonego kształtu główki plemnika tryka jako cechy o



Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

<http://merlin.up.poznan.pl/GENETYKA/>

Prof. dr hab. Dorota Cieślak email dorota.cieslak@up.poznan.pl tel 61 846 6117

pozytywnym wpływie na wyniki rozrodcze tego gatunku. Bardzo ciekawy wątek dyskusji dotyczy wczesnej zamieralności zarodków, która była znacznie niższa w grupie owiec inseminowanych nasieniem mrożonym w rozrzedzalniku z nanowodą w porównaniu do grupy kontrolnej (woda). Wiadomo, że podczas mrożenia dochodzi do uszkodzeń (pęknięć) nici DNA i obniżenia jego integralności. Ponadto wykazano, że plemniki człowieka z uszkodzonym DNA mogą zachować zdolność zapładniającą, jednak ma to zdecydowanie negatywny wpływ na przeżywalność zarodków. Uważam, że ten wątek badawczy jest bardzo interesujący i warty uwzględnienia w przyszłych badaniach NW.

6. W ocenianej rozprawie nie wyodrębniono rozdziału *Wnioski*. W tym rozdziale Autorka mogłaby się pokusić o przedstawienie optymalnego wariantu procedury mrożenia plemników (czas deklasteryzacji oraz % glicerolu) z uzasadnieniem wyboru bazującego na wynikach doświadczenia.
7. *Abstract* przedstawia bardziej zestawienie niż podsumowanie wyników (3,5 strony tekstu). W pracy znalazłam np. merytoryczne uzasadnienie wyboru 2 czasów deklasteryzacji (15 i 30 min) do doświadczenia nr 3 (na str 37 omawiano niższy poziom enzymu ALP w plemnikach mrożonych z NW15' i 30'). Te informacje powinny się też znaleźć w abstrakcie. Brakuje też jednoznacznego przesłania dla czytelnika, który wariant jest najlepszy i dlaczego.
8. Streszczenie w j. polskim w przypadku tej pracy mogłoby być znacznie obszerniejsze niż *Abstract*, gdyż powinno przybliżyć czytelnikowi obcojęzycznemu istotę przeprowadzonych doświadczeń, także ich układu oraz wyników i wniosków.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że przedstawiona praca doktorska **mgr Joanny Szymanowicz** zawiera elementy w istotny sposób poszerzające dotychczasowy stan wiedzy na temat wpływu nanowody na jakość plemników tryka owcy domowej i wyniki w rozrodzie. Szerokie spektrum badanych parametrów, zaawansowane procedury badawcze oraz uzyskane wyniki sprawiają, że powinny być opublikowane w indeksowanym czasopiśmie. Pragnę zwrócić uwagę na konieczność zastosowania w przygotowywanym manuskrypcie bardziej kompleksowej argumentacji i odniesienia się do znanych właściwości fizycznych NW. Pomimo w/w krytycznych uwag, uważam, że przedstawiona do recenzji praca prezentuje wartościowe wyniki i spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim, a wskazane niedociągnięcia będą zweryfikowane w procesie publikacji.



Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

<http://merlin.up.poznan.pl/GENETYKA/>

Prof. dr hab. Dorota Cieślak email dorota.cieslak@up.poznan.pl tel 61 846 6117

Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytułach naukowych oraz o stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365; z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228; z 2011 r. Nr 84, poz. 455) i wnioskuję do **Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie** o dopuszczenie Pani **mgr Joanny Szymanowicz** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Dorota Cieślak

16.12.2019