

Prof. dr hab. Wojciech Nizański  
Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
UP we Wrocławiu

Wrocław, 11.12.2019 r.

### **Ocena**

**pracy doktorskiej mgr Joanny Szymanowicz pt. „The impact of nanowater on sperm survival and its biological potential after cryopreservation process”**

wszczętej na Wydziale Biologii,  
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych  
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

**prowadzonej pod kierunkiem: dr hab. Macieja Murawskiego (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)**

**promotor pomocniczy dr Tomasz Schwarz (Uniwersytet Rolniczy w Krakowie)**

Kontrola i monitorowanie rozrodu zwierząt jest warunkiem racjonalnej ich hodowli. Wdrażanie technik wspomagania rozrodu przyspiesza postęp hodowli, ogranicza ryzyko szerzenia się chorób zakaźnych, wad wrodzonych oraz daje sposobność reprodukcji zwierząt o pożądanych cechach fenotypu, produktywności oraz innych walorach, przy równoczesnym monitorowaniu genetycznym populacji oraz redukcji liczebności linii wsobnych. Praktyczne zastosowanie zaawansowanych technik wspomagania rozrodu przydatne jest ponadto w programach zwiększania bioróżnorodności genetycznej populacji i w ratowaniu ginących gatunków zwierząt.

Jednym z podstawowych narzędzi biotechnicznych stosowanych od lat w rozrodzie zwierząt jest sztuczna inseminacja. Sztuczna inseminacja nie mogłaby zostać wprowadzona do praktyki hodowlanej i weterynaryjnej, gdyby nie doszło równocześnie do wdrożenia technik konserwacji nasienia. Utrwalenie na dłuższy okres czasu zdolności zapładniającej męskich gamet umożliwia bowiem ciągłość uzyskiwania i wykorzystywania w praktyce dawek inseminacyjnych. Jedną z najczęściej stosowanych metod konserwacji nasienia jest jego mrożenie w niskich temperaturach, zwykle w temperaturze ciekłego azotu ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Optymalizacja technik kriokonserwacji jest swoistym wyzwaniem. Od wielu lat prowadzone są konsekwentne badania mające na celu stworzenie metod konserwacji umożliwiających uzyskiwanie po rozmrożeniu możliwie największej populacji żywych gamet posiadających zdolność zapładniającą. Początkowo prace nad tym zagadnieniem były empiryczne i często prowadzono je na zasadzie „prób i błędów”. W późniejszym okresie, zwłaszcza po sformułowaniu fizykochemicznych podstaw kriobiologii – w tym po opublikowaniu bazy teoretycznej tj. dwuczynnikowej teorii kriouszkodzeń Petera Mazura -

przybrały charakter konsekwentnych i logicznych badań. W kolejnych latach testowano różne komponenty rozrzedzalników, substancje kriochronne tj. ograniczające tworzenie się wewnątrzkomórkowych kryształów lodu ('intracellular crystallization') czy wpływu rosnących stężeń roztworów ('solution effects'), substancje ograniczające tzw. szok chłodowy w temperaturze powyżej 0°C, antyoksydanty, związki stymulujące metabolizm, ruchliwość plemników i inne. Wszystkie te działania gwarantują ciągły postęp w obszarze jakości porozmrożeniowej dawek inseminacyjnych oraz pozwalają na uzyskiwanie coraz lepszych wskaźników płodności i plenności samic poddanych zabiegom sztucznej inseminacji.

Rola tego rodzaju badań jest niebagatelna. Posiadają one bowiem znacznie w rozwoju współczesnej hodowli, w poprawie walorów genetycznych stad, w podnoszeniu produkcji zwierzęcej, a to z kolei powiązane jest z aspektami ekonomicznymi prowadzenia hodowli zwierząt. Z drugiej strony należy dostrzegać walory poznawcze prac prowadzonych na zwierzętach w obszarze poznania zjawisk kriobiologicznych zachodzących w trakcie mrożenia i rozmrażania materiału biologicznego. I właśnie w ten ostatni wątek wpisuje się praca Doktorantki. Podjęcie badań w tym zakresie jest uzasadnione, bowiem obszar ten znajduje się w polu zainteresowania środowiska naukowego i praktyków weterynaryjnych. Zatem praca, oprócz oczywistej wartości poznawczej, posiada niezwykle duży potencjał aplikacyjny. Z uwagi na duże zapotrzebowanie na tego rodzaju badania, jej potencjał publikacyjny jest również duży.

Założeniem pracy było wprowadzenie rozrzedzalnika tj. medium do kriokonserwacji nasienia, opartego na wodzie deklastrowanej (tzw. nanowoda) - specjalnie spreparowanej za pomocą oddziaływania na nią lamp plazmowych. Zadaniem Doktorantki była weryfikacja, czy wprowadzenie nanowody do rozrzedzalnika dla nasienia tryka pozwoli uzyskać lepsze wyniki w zakresie wartości biologicznej plemników po rozmrożeniu. Przesłankami, aby poczynić takie założenie był fakt, iż ten specyficzny rodzaj wody posiada, wg cytowanych przez Autorkę prac, specyficzne cechy fizyko-chemiczne, w tym zmieniony punkt zamarzania, wrzenia oraz posiada własność lepszego przenikania przez błony. Autorka logicznie weryfikuje tezę o potencjalnym wpływie nanowody na właściwości plemników i kontroluje jak zmieniają się one w próbkach poddanych oddziaływaniu badanej substancji, z włączeniem różnego czasu oddziaływania lamp plazmowych w zestawieniu z próbkami kontrolnymi. Wyniki badań są bardzo obiecujące i wskazują, iż zarówno właściwości plemników *in vitro*, jak i *in vivo* tzn. ocenione za pomocą prób inseminacji samic z

zastosowaniem plemników traktowanych badanym medium są korzystne w porównaniu do wyników uzyskanych w próbach kontrolnych.

Podstawą formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej mgr Joanny Szymanowicz (Grygier) jest uchwała Rady Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ podjęta na posiedzeniu w dniu 30 czerwca 2015.

Przedstawiona rozprawa doktorska jest monografią i liczy 84 strony. Została napisana w języku angielskim. Została zrealizowana na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie oraz częściowo na Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie i University of Guelph (Canada) z funduszy NCBR "Badania młodych" oraz funduszy przeznaczonych na realizację badań statutowych uczelni. Przewód doktorski wszczęto na Uniwersytecie Jagiellońskim.

Praca składa się ze spisu treści, wykazu skrótów, wstępu i przeglądu piśmiennictwa, celu badań, materiału i metod, omówienia uzyskanych wyników, dyskusji, wykazu piśmiennictwa, streszczenia, tabel i rycin.

Znajdujące się na końcu pracy streszczenia w języku polskim i angielskim są szerokim opisem pracy. W obu przypadkach streszczenia napisane są poprawnym językiem. Zwraca uwagę dojrzały, profesjonalny język naukowy w obu wersjach.

We Wstępie pracy i Przeglądzie piśmiennictwa Doktorantka wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące historii i ogólnych podstaw sztucznej inseminacji, kriobiologii oraz podstaw konserwacji nasienia. Píše ciekawie na temat zasad i celów bankowania nasienia. Przedstawia interesująco zagadnienia dotyczące badań nad składem i komponentami rozcieńczalników służących konserwacji nasienia. Opisuje ponadto implikacje zmian właściwości plemników w wyniku procesu mrożenia i rozmrażania. Interesująco przedstawia wpływ kriokonserwacji na strukturę i funkcję plemników oraz na rolę plazmy nasienia w aspekcie powodzenia procesu kriokonserwacji i zabiegu unasienniania. Autorka opisuje również rolę czynników krioochronnych i innych składowych mediów do konserwacji nasienia. Píše również o zmianach fizykochemicznych wody do których dochodzi pod wpływem oddziaływania lamp plazmowych.

Wstęp i Przegląd piśmiennictwa pracy są ciekawym, całościowym opracowaniem stanu wiedzy na temat podstaw kriobiologicznych konserwacji plemników tryka, bankowania nasienia i sztucznej inseminacji. Autorka opisuje celowość prowadzenia biotechnik rozrodu u zwierząt, opisuje rys historyczny w tym zakresie, nawiązuje do badań

prowadzonych u różnych gatunków zwierząt. Skupia się także na pochodzeniu uszkodzeń plemników wynikających z obniżania temperatury w zakresie powyżej 0°C oraz z procesu mrożenia i rozmrażania. Opisuje też istotę działania substancji kriochronnych. Przegląd piśmiennictwa jest ciekawym opracowaniem. Sugeruję opublikować go w formie pracy przeglądowej. Przed tym jednak należałoby go nieco skrócić oraz uczynić tekst bardziej ukierunkowanym na zagadnienia związane z opisywanym gatunkiem. Wydaje mi się też, że fragmenty traktujące o historii sztucznej inseminacji są ogólnie dostępne i nie dodają cennych informacji dla przedłożonego opracowania. Sugeruje ponadto w tekście wyraźne rozdzielenie logiczne zjawisk udaru (szoku) chłodowego ( $>0^{\circ}\text{C}$ ) i zjawisk związanych z kriouszkodzeniami zachodzącymi poniżej 0°C.

Pod koniec rozdziału "Przegląd piśmiennictwa" Autorka opisuje unikatowe cechy fizyko-chemiczne nanowody zastosowanej jako medium, w którym rozpuszczano komponenty rozrzedzalnika do nasienia tryka. Jak wspomniano nanowoda otrzymywana jest poprzez traktowanie wody zimną plazmą, co powoduje wg autorów cytowanego przez Autorkę piśmiennictwa, zjawisko przearanżowania klastrów jej cząsteczek. Klastry wody składające się z około 1000 cząsteczek zostają rozbite na mniejsze jednostki. Nanowoda wg. cytowanych prac zwiększa rozpuszczalność wielu gazów (np. tlenu) i substancji organicznych. Woda pozbawiona klastrów jest wg cytowanych prac dobrym nośnikiem substancji odżywczych. Ponadto jej gęstość może być modulowana przez stopień rozbicia klastrów. Niektóre cytowane prace sugerują wg Autorki, że woda deklastrowana może przyczyniać się do przyspieszenia aktywnego przebiegu reakcji chemicznych. Istnieją zatem przesłanki, aby sprawdzić jej oddziaływanie na efektywność procesu kriokonserwacji komórek żywych.

Celem pracy była ocena: 1a) właściwości plemników tryka i ich kriooporności przy zastosowaniu mediów opartych na nanowodzie w porównaniu do kontroli, gdzie wykorzystano wodę dejonizowaną; 1b) ocena korelacji pomiędzy wymiarami główki plemnika tryka i innymi właściwościami męskich gamet po rozmrożeniu; 2) ocena wpływu genotypu tryka i typu rozrzedzalnika, poddanego działaniu lamp plazmowych przez różny okres czasu na właściwości nasienia rozmrożonego; 3) ocena wpływu nanowody dodawanej do rozrzedzalników zawierających 3 i 7% stężenie glicerolu na właściwości mrożonego-rozmrożonego nasienia tryka. Cele prace zatem są przejrzyste. Sugeruję przed opracowaniem przyszłych publikacji połączyć dla przejrzystości cel 1a i 1b, jako że cel 1b jest *de facto* jedynie uszczegółowieniem celu 1a.

Badania przeprowadzono na nasieniu pochodzącym od 16 klinicznie zdrowych trykach – 4 rasy polskiej nizinnej (PON), 4 rasy olkuskiej, 5 linii BCP (Berrichon du Cher x Charolais x PON/Polski Merynos) i 3 linii SCP (Suffolk x Charolais x PON/Polski Merynos) w wieku 4-12 lat utrzymywanych w Lublinie i w Krakowie. Test płodności *in vivo* drogą inseminacji został przeprowadzony na 128 owcach wieloródkach BCP utrzymywanych w stacji Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Owce żywione były w znormalizowany sposób zapewniający uzyskanie rzetelnych i miarodajnych wyników.

Nie znalazłem w tekście informacji na temat płodności samców. Do badań włączono tylko ejakulatory o prawidłowych cechach mikro- (ruchliwość >70%) i makroskopowych. W części 1a i 1 b eksperymentu użyto rozrzedzalnika komercyjnego Triladyl. W części 3 zastosowano rozrzedzalnik fruktoza-mleko-żółtko z 3 i 7% stężeniem glicerolu przygotowany wg metodyki Karety. Doktorantka opisuje czasy oddziaływania lampy plazmowej na wodę wykorzystaną do sporządzenia wspomnianego rozrzedzalnika. Autorka opisuje również metodę mrożenia nasienia. Aspirowano je najpierw do słomek o objętości 0.25 ml i mrożono w parach azotu przez 10 min w temperaturze -120°C, a rozmrażano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 60 sekund.

Samice były poddane zabiegom sztucznej inseminacji metodą laparoskopową. Autorka podaje pełne dane dotyczące procedury inseminacji wraz z metodą synchronizacji rui i zastosowanym znieczuleniem. Rozdział "Materiał i metody" zawiera też opis technik oceny nasienia, w tym szczegóły oceny mikroskopowej ruchliwości plemników oraz oceny morfologii plemników i morfometrii przy użyciu oprogramowania komputerowego. Ocenę ruchliwości plemników prowadzono w systemie CASA za pomocą aparatu Sperm Class Analyser. Wykorzystano też pomiary aktywności enzymatycznej AspAT i AlAT oraz ALP-fosfatazy alkalicznej. Zastosowano ponadto fluorochromy skoniugowane z Anneksyną V w celu oceny na cytometrze przepływowym wczesnej i późnej apoptozy.

Analiza statystyczna została poparta analizą wariancji w testach parametrycznych i testem chi kwadrat jako testem nieparametrycznym. Metodyka eksperymentu jest zaprojektowana poprawnie. Autorka podaje niezwykle dużą liczbę szczegółów badań. Badania obejmują testy oceny jakości nasienia *in vitro* oraz co ważne, uwzględniają próbę biologiczną *in vivo*.

Na stronie 16 wkraść się błąd, gdy Autorka pisze o ocenie makroskopowej ruchliwości nasienia. Przy opisie oceny morfologii plemników nie podano piśmiennictwa dotyczącego metody tej oceny i klasyfikacji wad plemników. Sugeruję podać prace prof. E.

Bloma traktujące o morfologii i podziale wad plemników. Opisując rozmazy nasienia niewłaściwie użyto terminu “histological smears” zamiast ‘cytological’. Sugeruję, aby jaśniej opisać sposób przygotowania rozredzalnika na stronie 17. Podano np. proporcję 1:3:1 i do końca nie jest jasne czy dotyczy to wody djonizowanej, nanowody i żółtka jaja kurzego?

Na str. 17 w opisie przygotowania rozredzalników napisano, że było ich 8, a poniżej, że opis dotyczy jednak nie ośmiu a sześciu ich typów. W opisie metody zamrażania nasienia na stronach 21-22 użyto terminu “ekwilibracja” do opisu zamrażania słomek w parach azotu. Nie znalazłem na str. 23 opisu liczebności grup samic poddanych sztucznej inseminacji porównywanymi rozredzalnikami. Na str. 24 podano długi opis szczegółowy oceny koncentracji plemników. Jest to nieporzebne. To należy do kanonu podstaw bazowych andrologii. Na str. 25 nie podano piśmiennictwa w stosunku do metody oceny morfologii plemników. Na str. 26 nie zauważyłem opisu zastosowanych parametrów CASA, ani danych definiujących nastawy i kalibrację systemu CASA. Podanie takich danych jest ważne, bowiem wyniki ruchliwości mierzonej systemem CASA uzależnione są od nastawów wstępnych urządzenia. Przy opisie oceny aktywności enzymatycznej na str. 26-27 nie znalazłem informacji, gdzie będzie oceniana aktywność enzymów: w przedziale wewnątrzkomórkowym czy zewnątrzkomórkowym? Na str. 28 nie znalazłem informacji o rodzaju użytych detektorów widma fluorescencji cytometru przepływowego - długości emisji i detekcji widma fluorescencyjnego oraz o sposobie bramkowania zdarzeń.

Powyższe uwagi odnoszą się do szczegółów technicznych i mogą zostać poprawione w przyszłości przed oddaniem do druku publikacji. Nie wydają się zatem wpływać na wartość pracy. Wykorzystany materiał i zastosowane metody badawcze uznaję generalnie za trafne. Na podkreślenie zasługuje ogromna liczba ocenianych parametrów określających strukturę i funkcję plemników.

Omówienie wyników zostało przeprowadzone przez Autorkę bardzo skrupulatnie. W rozdziale “Wyniki” znajdujemy opis zmian właściwości plemników w kolejnych etapach doświadczenia. Znajdujemy tu też omówienie wyników unasienniania samic, w dwóch grupach - każdej liczącej po 60 samic. Zarówno wyniki badań *in vitro*, jak i test *in vivo* wskazują, że lepsze wyniki uzyskano z zastosowaniem nanowowody. Wyniki przemawiają również za tym, że traktowanie wody oddziaływaniem plazmy przez 15-60 minut pozwala na uzyskiwanie najkorzystniejszych wyników jakości nasienia po rozmrożeniu. Rozdział napisany jest czytelnie. Wyniki zilustrowane są 21 tabelami opisującymi wyniki oznaczeń wszystkich ocenianych parametrów nasienia oraz 5 rycinami. Rodział został podzielony

wg. opisanych celów pracy na trzy części. Kolejność prezentowanych wyników jest przejrzysta i zrozumiała. Tabele są dobrze opracowane. Różnice statystyczne przedstawiono jasno i czytelnie. Należy jedynie wyjaśnić różnice pomiędzy liczbą samic poddanych inseminacji opisywaną w rozdziale „Material i metody” (n=128) oraz liczbą inseminowanych (n=120) samic opisywanych w rozdziale „Wyniki”.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka pogłębia opis wyników oraz komentuje je. Tłumaczy uzyskane wyniki, zależności i konfrontuje z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów. Ten rozdział oceniam pozytywnie. Jest napisany w taki sposób, że widoczne jest, że Autorka porusza się swobodnie w omawianych zagadnieniach i posiada na tym polu dużą wiedzę. Brakuje mi jednak w rozdziale rozważań na temat potencjalnego wpływu tryka na uzyskane wyniki badań, choć zagadnienia te poruszane są na początku rozprawy. Na końcu rozdziału „Dyskusja” Autorka formułuje syntetycznie podsumowanie badań. Użycie nanowody w składzie rozrzedzalnika do nasienia tryka pozwoliło uzyskać istotną poprawę biologicznej wartości mrożonego-rozmrożonego nasienia tryka. Nanowoda nie tylko wpływa pozytywnie na właściwości strukturalne plemników po rozmrożeniu, ale też redukuje ‘wyciek’ enzymów, poprawia ruchliwość plemników i ich przeżywalność oraz redukuje poziom apoptozy notowany po rozmrożeniu. Poprawia ponadto wyniki unasienniania laparoskopowego nasieniem poddanym kriokonserwacji. Autorka konkluduje, że pomimo iż nanowoda poprawia jakość dawek inseminacyjnych po rozmrożeniu, to istota i mechanizm tego oddziaływania pozostaje niejasny i wymaga dalszych badań. Dalej zaznacza, że wyniki badań wskazują, iż dodawanie do rozrzedzalnika tego składnika powinno być rekomendowane w praktyce. Poprawa jakości dawek inseminacyjnych może skutkować bowiem możliwością redukcji liczby plemników niezbędnych do zdeponowania do narządu płciowego samicy podczas zabiegu sztucznej inseminacji. Badania wskazują także, że czas oddziaływania lamp plazmowych wywiera istotny wpływ na właściwości plemników. Najlepsze wyniki udało się uzyskać podczas oddziaływania trwającego 15-30 minut. Autorka konkluduje wreszcie, że nanowoda wpływa na liczbę formujących się wolnych rodników i na integralność struktury DNA plemników.

Spis piśmiennictwa zawiera 96 pozycji, głównie opublikowanych w liczących się czasopismach z listy JCR. Jak wspomniano, praca uzupełniona jest rycinami, tabelami oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Do szczególnych walorów przedłożonej pracy zaliczam:

1. Ciekawą tematykę badań, aktualną, z dużym potencjałem aplikacyjnym i wdrożeniowym
2. Bogatą, zaawansowaną metodykę dopełniających się wzajemnie badań laboratoryjnych służących ocenie właściwości plemników uzupełnionych o próbę biologiczną
3. Ogrom pracy, jaką należało wykonać dla realizacji tak ambitnego i kompleksowego planu oznaczeń dużej liczby parametrów
4. Dobrze napisany tekst pracy w języku angielskim, swobodne posługiwanie się językiem naukowym pomimo tego, iż jest to język obcy.

Na rozważenie natomiast zasługują następujące zagadnienia:

1. Drobne błędy edycyjne tekstu wspomniane wcześniej w recenzji.
2. W pracy należy dokonać uściśleń i poprawek w rozdziale „Materiał i metody”.

Powyższe uwagi są formą konstruktywnych sugestii wyrażonych z obowiązku recenzenta. Całość pracy oceniam bardzo dobrze Wyrażone drobne uwagi i sugestie nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, są formą konstruktywnych uwag i komentarzy przy dostrzeganiu wartości pracy.

Podsumowując, pracę doktorską mgr Joanny Szymanowicz oceniam pozytywnie. Praca została dobrze zaplanowana, rzetelnie zrealizowana i wnosi nowe dane dziedzinie nauk biologicznych, w dyscyplinie ‘biologia’. Praca posiada nie tylko wartość poznawczą, ale i duży potencjał aplikacyjny. Doktorantka posiada duże umiejętności w posługiwaniu się warsztatem naukowym.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Joanna Szymanowicz odpowiada w pełni wymogom stawianym dysertacjom na stopień naukowy doktora, określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U.z 2003 nr 65, poz. 595; z 2005 r. Nr 164, poz. 1365, z 2010 r. Nr 96, poz. 620, Nr 182, poz. 1228, z 2011r. Nr 84, poz 455).

W oparciu o przedłożoną ocenę przedkładam wniosek Radzie Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ o dopuszczenie mgr Joanny Szymanowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. Wojciech Nizański