

Olsztyn, 3 stycznia 2020 r.

dr hab. Paweł Wysocki, prof. UWM  
Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt  
Wydział Bioinżynierii Zwierząt  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Judyckiej pt.**

**„Wykorzystanie nowoczesnych metod oceny jakości nasienia w celu zrozumienia mechanizmów kriouškodzeń plemników ryb jesiotrowatych i łososiowatych”**

**wykonanej w Instytucie Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza w Olsztynie pod kierunkiem Promotora dr hab. inż. Mirosława Szczepkowskiego oraz Promotora pomocniczego dr inż. Grzegorza Dietricha.**

Kriokonserwacja nasienia jest postępowaniem biotechnologicznym stosowanym od wielu lat w rozrodzie różnych gatunków zwierząt. Także w przypadku nasienia ryb opracowano wiele skutecznych metod zamrażania-rozmrażania nasienia, a pierwsze doniesienia naukowe z tego zakresu opublikowano w latach 50 XX wieku. Specyficzne warunki rozrodu tej gromady kręgowców wymusiły konieczność opracowania odmiennych w porównaniu do ssaków metod kriokonserwacji nasienia. Dodatkowo, różnice w morfologii gamet ryb warunkują konieczność gatunkowego dostosowania procedur w celu uzyskania dobrych efektów zapłodnienia.

Rozprawa doktorska Pani mgr Sylwii Judyckiej pt. „Wykorzystanie nowoczesnych metod oceny jakości nasienia w celu zrozumienia mechanizmów kriouškodzeń plemników ryb jesiotrowatych i łososiowatych” została przedstawiona do recenzji w formie złożonej z czterech oryginalnych prac naukowych oraz poprzedzającego je opracowania o charakterze wprowadzająco-przeglądowym. Prace zostały opublikowane w wysoko indeksowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym i uznanej renomie: *Journal of Applied Ichthyology* (IF – 1,034; MNiSW- 20 pkt.), *Cryobiology* (IF – 2,214; MNiSW- 25 pkt.), *Aquaculture* (IF – 3,256; MNiSW- 35 pkt.), *General and Comparative Endocrinology* (IF – 2,660; MNiSW – 25). Łączny Impact Factor dla publikacji to 9,164 a liczba punktów MNiSW wg punktacji za rok wydania wynosi 105. Dobór publikacji, jako podstawy dla rozprawy doktorskiej nie budzi zastrzeżeń. We wszystkich publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Stosowne oświadczenia współautorów potwierdzające wiodący udział Doktorantki w planowaniu i

realizacji badań oraz przygotowaniu manuskryptu zostały przedstawione Recenzentowi łącznie z egzemplarzem rozprawy doktorskiej. Doktorantka nie pełniła obowiązków autora korespondencyjnego w żadnej z prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. Praca doktorska przedłożona do recenzji liczy 64 strony, z czego 34 stanowi polskojęzyczna część wstępna pracy obejmująca wprowadzenie oraz syntetyczny opis wyników opublikowanych w kolejnych artykułach naukowych. Wiodącym tematem publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej jest doskonalenie metod kriokonserwacji nasienia ryb jesiotrowatych i łososiowatych z wykorzystaniem nowoczesnych metod oceny jakości nasienia.

Prace stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej, zostały zatem już ocenione przez recenzentów. W związku z tym ich ponowna ocena merytoryczna jest w mojej opinii zbędna. Opublikowanie wyników badań w uznanych czasopismach naukowych jest możliwe tylko pod warunkiem pozytywnej oceny redaktorów oraz recenzentów, co świadczy o ich wysokiej jakości. Można zatem przyjąć, że najistotniejsza część rozprawy została zweryfikowana merytorycznie. W pierwszej części mojej recenzji skupię się na podkreśleniu tego, co w kolejnych publikacjach jest moim zdaniem szczególnie cenne i warte odnotowania. Zanim jednak do tego przejdę pozwolę sobie na pewne uogólnienie, według mnie bardzo istotne dla rzetelnej recenzji ocenianej pracy doktorskiej. Odnoszę wrażenie po lekturze prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, że jednym z najistotniejszych celów jakie stawiali sobie Doktorantka oraz zespoły autorskie było doskonalenie metod kriokonserwacji w takim kierunku, aby w możliwie największym stopniu usprawnić i zrationalizować wykorzystanie kriokonserwowanego nasienia jesiotra syberyjskiego i pstrąga tęczowego w warunkach praktyki produkcyjnej. Jest to moim zdaniem bardzo cenne podejście do tematu, szczególnie w przypadku ważnych z punktu widzenia gospodarczego gatunków ryb. Odnoszę jednak wrażenie, że te bardzo istotne osiągnięcia praktyczne nie zostały w wystarczający sposób wyeksponowane w części wstępnej przedstawionej do oceny rozprawy zarówno podczas formułowania ogólnego celu pracy doktorskiej jak i w formułowaniu ogólnych wniosków wynikających z dysertacji.

W pierwszej z prac „Characterization of siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt 1869) sperm obtained out of season” (*Journal of Applied Ichthyology* 31; 34-40, 2015) autorzy podjęli się zadania oceny wybranych parametrów jakości nasienia jesiotra syberyjskiego pozyskanego poza sezonem rozrodczym. Podjęto także próbę kriokonserwacji nasienia oraz określenia zdolności zapładniającej plemników po zamrożeniu-rozmrożeniu. W omawianej

pracy, po raz pierwszy dokonano analizy wybranych wyznaczników jakości nasienia, pozyskanego poza sezonem rozrodczym od samców jesiotra syberyjskiego (koncentracja i ruchliwość plemników, ciśnienie osmotyczne, pH i zawartość białka w plazmie nasienia). Wskazano na niską przydatność takiego nasienia do krótkookresowego przechowywania w stanie płynnym przy dobrej zdolności zapładniającej plemników poddanych kriokonserwacji. W badaniach wykazano, że nasienie pobrane po stymulacji hormonalnej w grudniu różni się pod względem wielu parametrów od nasienia pobranego w kwietniu. Cechą, która szczególnie wyróżniała nasienie pobrane w grudniu była wysoka, spontaniczna ruchliwość plemników w środowisku plazmy nasienia. Wynika to prawdopodobnie z niepełnej dojrzałości nasienia powstającego w gonadach. Tym niemniej, pozytywne wyniki uzyskane po kriokonserwacji nasienia pobranego poza sezonem rozrodczym dają nowe możliwości prowadzenia rozrodu jesiotrów w warunkach chowu na dużą skalę.

W pracy pt. „New extender for cryopreservation of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) semen” (*Cryobiology* 70, 184-189, 2015) celem było opracowanie prostego rozcieńczalnika do kriokonserwacji nasienia jesiotra syberyjskiego, opartego na glukozie i metanolu. Autorzy wykazali, że rozcieńczalnik zawierający 0,1 M glukozę w 15 % metanolu pozwala na uzyskanie dobrych wyników zapłodnienia ikry. Co więcej, 30 minutowa inkubacja przed zamrożeniem ani 30- minutowy okres przechowywania po rozmrożeniu nie wpływa znacząco na jakość nasienia i uzyskiwane efekty zapłodnienia ikry. Daje to możliwość usprawnienia organizacji pracy w warunkach produkcyjnych poprzez nowe możliwości wykorzystania nasienia w zakresie postępowań prowadzonych na skale produkcyjną.

W kolejnej pracy pt. “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, 2016) autorzy opracowali skład rozcieńczalnika do kriokonserwacji nasienia pstrąga tęczowego oparty na trehalozie oraz metanolu. Dodatkowo przeprowadzono analizy dotyczące wpływu dodatku jonów potasowych oraz Tris-HCl na ruchliwość i żywotność plemników po rozmrożeniu oraz ich zdolność zapładniającą. Najlepszą ruchliwość plemników uzyskano w przypadku zastosowania 175 mM trehalozy oraz 175 mM trehalozy z dodatkiem 40 mM KCl. Uwzględnienie dodatku jonów potasowych w składzie rozcieńczalnika pozwalało na utrzymanie ruchliwości plemników przez 60 minut inkubacji po rozmrożeniu. Dodatek Tris-HCl oraz zmiana pH do 7,5 oraz 8,5 powodowała obniżenie ruchliwości plemników. Zastosowanie opracowanego rozcieńczalnika z dodatkiem jonów

potasowych pozwala na przedłużenie czasu na wykorzystanie nasienia po rozmrożeniu w warunkach produkcyjnych.

W pracy „Effect of dilution in sperm maturation media and time of storage on sperm motility and fertilizing capacity of cryopreserved semen of sex-reversed female rainbow trout” (*General and Comparative Endocrinology* 245, 89-93, 2017) przeprowadzano kriokonserwację nasienia neosamców pstrąga tęczowego oraz analizowano wpływ różnych płynów do dojrzewania nasienia na ruchliwość plemników oraz długość przechowywania nasienia po zamrożeniu-rozmrożeniu. Wykazano, że ruchliwość plemników jest hamowana bezpośrednio po rozrzedzeniu nasienia, ale w miarę upływu czasu dochodzi do wzrostu ruchliwości plemników. Opisywana zmiana jest charakterystyczna dla nasienia w trakcie około godziny przechowywania po rozmrożeniu. Nie wykazano istotnego wpływu rodzaju zastosowanego płynu na zdolność zapładniającą plemników po kriokonserwacji. We wszystkich analizowanych przypadkach pozostawała ona na stałym, wysokim poziomie.

W drugiej części recenzji przedstawię swoje uwagi do części wprowadzająco - przeglądowej rozprawy doktorskiej. Mam do niej kilka wątpliwości i z obowiązku wskażę je w swojej recenzji.

1. Wątpliwości moje jako Recenzenta wzbudza sposób sformułowania celu pracy. Na stronie 4 w części „Streszczenie”, Doktorantka pisze: „Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było wykorzystanie nowoczesnych metod oceny jakości nasienia (CASA – komputerowa analiza ruchu plemników oraz cytometria przepływowa) jako narzędzi umożliwiających poznanie mechanizmów leżących u podstaw kriouszkodzeń plemników ryb łososiowatych oraz jesiotrowatych podczas przechowywania, na temat których brak lub są dostępne bardzo ograniczone dane”. Moim zdaniem, wykorzystanie nowoczesnych metod nie powinno być celem, lecz raczej drogą do osiągnięcia celu. Metody laboratoryjne są z reguły narzędziami do osiągania celów naukowych. Moim zdaniem, lepszym byłoby sformułowanie celu jako np. „Analiza mechanizmów kriouszkodzeń plemników ryb łososiowatych oraz jesiotrowatych z wykorzystaniem nowoczesnych metod oceny jakości nasienia”. Poza tym, o ile analizy z wykorzystaniem systemu CASA były przeprowadzane w przypadku wszystkich prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, to analizy cytometryczne przeprowadzono w dwóch z czterech przedstawionych prac stosując jeden typ barwienia fluorescencyjnego. W związku z tym proszę o wyjaśnienie dlaczego analiz cytometrycznych nie przeprowadzono w pracy II i IV chociaż wydaje się, że w świetle postawionego celu pracy należałoby je również w tych pracach wykonać.

2. Doktorantka na stronie 4 formułuje jeszcze jedno stwierdzenie, które moim zdaniem nie do końca znajduje odzwierciedlenie w wynikach. Jest to cyt. „W niniejszej rozprawie doktorskiej skupiono się na poszukiwaniu wyznaczników jakości nasienia ryb jesiotrowatych oraz łososiowatych, które mogą zostać wykorzystane do prognozowania sukcesu kriokonserwacji”. Czy jest to dodatkowy cel pracy, którego nie udało się zrealizować? Wśród wniosków nie udało mi się takich wyznaczników odnaleźć. Jedynym zidentyfikowanym wydaje się być końcowa koncentracja plemników pstrąga tęczowego na poziomie 1,2 - 1,3 mld/ml w przypadku kriokonserwacji w roztworze trehaloza-metanol-KCl. Z drugiej strony, na stronie 15 w podrozdziale „1.6 Wyznaczniki jakości nasienia” opisując czynniki wpływające na przydatność plemników do kriokonserwacji Doktorantka pisze: „Niestety, na podstawie żadnego z tych parametrów potraktowanych indywidualnie nie można dokładnie oraz powtarzalnie określić zdolności plemników do kriokonserwacji”. Bardzo proszę o wyjaśnienie rozbieżności polegającej na tym, że z jednej strony poszukiwanie wyznaczników przydatności do zamrażania jest wskazane jako jeden z głównych problemów na których skupia się praca doktorska, a w dalszej części opracowania pojawia się stwierdzenie że takich parametrów nie da się ustalić, a jedynym wiarygodnym jest zdolność plemników do zapłodnienia oocytów.
3. Proszę o przedstawienie w możliwie krótkiej i treściwej formie (np. w punktach) mechanizmów kriouszkodzeń plemników ryb jesiotrowatych i łososiowatych, które udało się Doktorantce poznać i zrozumieć w efekcie realizacji rozprawy doktorskiej. Takiego krótkiego opisu porządkującego uzyskane efekty w bezpośrednim odniesieniu do tematu pracy moim zdaniem brakuje w polskojęzycznej części opracowania.

Przedstawione powyżej uwagi, obok innych drobnych (edytorskich) nie wpływają w żaden sposób na wysoką ocenę rozprawy doktorskiej przedstawionej do recenzji. Na szczególne podkreślenie moim zdaniem zasługuje praktyczne podejście do analizowanych zagadnień, pozwalające na wykorzystanie wyników rozprawy doktorskiej w praktyce produkcyjnej. Na podstawie sporządzonej recenzji rozprawy doktorskiej stwierdzam, że praca mgr Sylwii Judyckiej wnosi wiele nowych danych z zakresu metod kriokonserwacji nasienia ryb jesiotrowatych i łososiowatych (pstrąg tęczowy i jesiotr syberyjski) szczególnie istotnych z gospodarczego punktu widzenia. Doktorantka całkowicie spełnia wymagania stawiane kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora. Przemyślane podejście do tematu oraz badania ukierunkowane na wdrożenie wyników w praktyce produkcyjnej wskazują na dużą

wiedzę Doktorantki oraz świadczą o bardzo dobrym przygotowaniu mgr Sylwii Judyckiej do efektywnej pracy naukowej.

#### V. Wniosek końcowy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Sylwii Judyckiej *pt.: „Wykorzystanie nowoczesnych metod oceny jakości nasienia w celu zrozumienia mechanizmów kriouszkodzeń plemników ryb jesiotrowatych i łososiowatych”* uzupełnia i poszerza znacznie wiedzę z zakresu kriokonserwacji nasienia ryb jesiotrowatych i łososiowatych. Stanowi dobrą podstawę do ubiegania się Kandydatki o stopień naukowy doktora. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia w pełni wymogi zawarte w ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz. 882, ze zm.). W związku z powyższym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Judyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Paweł Wysocki, prof. UWM

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt

Wydział Bioinżynierii Zwierząt

UWM w Olsztynie