

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Judyckiej pt.

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

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Mirosława Szczepkowskiego, prof. IRS w Olsztynie.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Dyrektora Instytutu Rybactwa Śródlądowego (pismo RN-000-59/2019).

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska stanowi cykl czterech monotematycznych publikacji naukowych, które są oryginalnymi pracami, opublikowanymi w latach 2015-2017 w zagranicznych czasopismach naukowych takich jak Journal of Applied Ichthyology, Cryobiology, Aquaculture and General and Comparative Endocrinology, znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR). W skład cyklu wchodzi następujące publikacje:

1. Judycka S., Szczepkowski M., Ciereszko A., Słowińska M., Bodek G., Dietrich G. 2015. Characterization of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt 1869) sperm obtained out of season. Journal of Applied Ichthyology 31, 34-40. IF: 1.034 (5-letni); MNiSW: 20 pkt.
2. Judycka S., Szczepkowski M., Ciereszko A., Dietrich G. 2015. New extender for cryopreservation of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) semen. Cryobiology 70, 184-189. IF: 2.214 (5-letni); MNiSW: 25 pkt.
3. Judycka S., Cejko B., Dryl K., Dobosz S., Grudniewska J., Kowalski R. 2016. The effects of supplementation of a trehalose-based extender with KCl on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm freezability and post-thaw motility. Aquaculture 465, 303-310. IF: 3,256 (5-letni); MNiSW: 35 pkt.
4. Judycka S., Ciereszko A., Dobosz S., Zalewski T., Dietrich G. 2017. 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. IF: 2,606 (5-letni); MNiSW: 25 pkt.

Łączna wartość tych publikacji, według kryteriów MNiSW (zgodnie z rokiem opublikowania), wynosi 105 punktów a wartość współczynnika wpływu IF (pięcioletniego) według listy JCR wynosi 9,164. We wszystkich wyżej wymienionych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, który to fakt wskazuje na Jej wiodącą rolę w całym procesie powstawania dzieła: od pomysłu, poprzez realizację eksperymentów aż do jego opublikowania, czyli, rzecz można - była *spiritus movens* wszystkich poczynań, które do powstania tych prac doprowadziły. Z oświadczeń współautorów (a jest ich jedenastu) wynika, że Jej udział szacowany jest przez Nich i samą Doktorantkę na 50%.

Ponieważ oryginalne prace, które składają się na rozprawę doktorską ukazały się w indeksowanych czasopismach i były poddane ocenie przez redakcje czasopism i niezależnych recenzentów, moja ocena pracy doktorskiej Pani mgr Judyckiej koncentruje się, siłą rzeczy, na ocenie przedstawionej rozprawy.

Rozprawa doktorska, której podstawą są wymienione wcześniej artykuły naukowe, została zatytułowana „Wykorzystanie nowoczesnych metod oceny jakości nasienia w celu zrozumienia mechanizmów kriouszkodzeń plemników ryb jesiotrowatych i łososiowatych”. Uważam, że tytuł rozprawy nie jest w pełni adekwatny do wyników zawartych w cyklu publikacji. Sugeruje, że Autorka koncentruje się na mechanizmach leżących u podstaw procesów powodujących uszkodzenie plemników w procesie kriokonserwacji, czyli zapowiada coś więcej niż to, co stanowi sedno cyklu prac. Sama Autorka w rozprawie, w pierwszym akapicie rozdziału "Streszczenie" (str 4) oraz rozdziału "Wstęp" (str. 10), pisze: "W niniejszej rozprawie doktorskiej skupiono się na poszukiwaniu wyznaczników jakości nasienia ryb jesiotrowatych oraz łososiowatych, które mogą zostać wykorzystane do prognozowania sukcesu kriokonserwacji." I właśnie to zdanie, po odpowiednim przeformułowaniu, mogłoby być tytułem pracy, brzmiącym na przykład tak: "Wykorzystanie nowoczesnych metod oceny jakości nasienia ryb jesiotrowatych oraz łososiowatych w celu określenia wyznaczników służących do prognozowania sukcesu jego kriokonserwacji."

Rozprawę zaczyna trzystronicowe streszczenie w języku polskim i podobnie w angielskim. W tym fragmencie przedstawione są cele pracy i bardzo syntetycznie wyniki ich realizacji, z końcową sugestią do wdrożenia wyników w praktyce wylęgarniczej.

Kolejny rozdział pracy to "Wstęp" (8 stron tekstu), zawierający trzyzdaniowe wprowadzenie poprzedzające informacje na temat obecnej kondycji populacji ryb jesiotrowatych i łososiowatych (głównie pstrąga tęczowego jako drugiego po karpniu gatunku w polskiej akwakulturze), konieczności stosowania kontrolowanego rozrodu, specyfiki nasienia ryb jesiotrowatych i łososiowatych, krótkookresowego przechowywanie nasienia,

kriokonserwacji nasienia i wyznaczników jego jakości (ruchliwość i parametry cytometryczne).

Cel pracy, a właściwie 4 przedstawione cele reprezentują, każdy jedną z publikacji, wchodzących w skład ocenianej rozprawy.

Opis stosowanych metod (pozyskiwanie gamet, określanie podstawowych parametrów nasienia, krótkookresowe przechowywanie nasienia, kriokonserwacja nasienia, analiza ruchu plemników przy zastosowaniu metody CASA, określenie żywotności plemników, opis metody zapładniania ikry) cechuje zwięzłość usprawiedliwiona tym, że szczegółowe metodyki znajdują się w każdej z publikacji.

Nie ma w rozprawie rozdziału "Wyniki", które zostały na stronie 23 w rozdziale "Wnioski" skwitowane jednym zdaniem: "Wyniki uzyskane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zostały szczegółowo zawarte w oryginalnych pracach naukowych wchodzących w skład niniejszej rozprawy doktorskiej". W mojej opinii rozdział taki powinien się w rozprawie znaleźć. Autorka powinna wyeksponować (nawet bardzo skrótowo) najważniejsze wyniki, które są efektem badań przez nią przeprowadzonych, pomimo tego, że zostały zamieszczone w publikacjach stanowiących cykl. Chyba, że kolejny, dwustronicowy rozdział "Wnioski" miał, w zamyśle Doktorantki, zastąpić uzyskane w publikacjach wyniki i ich omówienie.

W rozprawie nie ma rozdziału "Dyskusja". Uważam, że to istotne niedociągnięcie, ponieważ w tym miejscu Doktorantka mogła wykazać się dojrzałością naukową i zdolnością do kompleksowej interpretacji uzyskanych wyników na tle danych z literatury naukowej.

Spis literatury (73 pozycje) obejmuje aktualne publikacje, ściśle związane z omawianymi w pracy zagadnieniami. I tu Autorka nie ustrzegła się, drobnych wprawdzie, ale niepotrzebnych błędów. W danych bibliograficznych prac zwykle podaje się skróty, a nie pełne nazwy czasopism, a jeżeli już to konsekwentnie stosuje się jeden lub drugi sposób, natomiast Doktorantka czasami używa skrótów nazw z kropką lub bez, a czasami pełnych nazw czasopism, co wywołuje lekkie zamieszanie w tym zestawieniu.

Podsumowując ten fragment mojej oceny dotyczący przedłożonej rozprawy doktorskiej stwierdzam odczucie pewnego niedosytu powodowanego nadmierną skrótowością, zbyt syntetycznym potraktowaniem tego, co wciąż przecież nazywa się „Rozprawą doktorską”, nawet jeśli jej część stanowią samodzielne byty jakimi są, składające się na tę rozprawę publikacje. Szczególnie brakuje mi łącznego omówienia tych wszystkich rezultatów, które są opisane i przedyskutowane osobno w każdej z czterech opublikowanych prac. Każdej z nich przyświecał inny cel (Doktorantka wyróżniła 4 cele swojej rozprawy), więc inna jest dyskusja w każdej publikacji, dotycząca jednego, konkretnego celu. Skoro Doktorantka

postanowiła - kolokwialnie mówiąc - „doktoryzować się z dorobku”, to Jej rozprawa łączyć powinna te cztery problemy badawcze, a więc cztery dyskusje w jeden syntetyczny rozdział stanowiący całość samą w sobie, niezależną od dyskusji w załączonych publikacjach, choć z nimi immanentnie związaną. Naturalne było więc moje oczekiwanie od Doktorantki na zaprezentowanie przez Nią szerszego, całościowego spojrzenia na to co stanowi sedno tych wszystkich prac, które z jakiegoś przecież powodu połączyła w całość, nadając tej całości konkretny tytuł.

Publikacje składające się na ocenianą rozprawę są tematycznie spójne. Stosunkowo słaba jakość załączonych kserokopii tych publikacji (minimalna wielkość czcionki) nie ułatwia ich lektury. Co prawda dostęp do wersji PDF tych prac jest łatwy, jednakże skoro jest wymóg ich załączenia do rozprawy i stanowią jej integralną część, to czytelny tekst byłby ukłonem w kierunku recenzentów.

Tematyka cyklu publikacji jest spójna, aktualna i ma duże znaczenie dla akwakultury, w której możliwość użycia kriokonserwowanego nasienia w rozrodzie różnych gatunków ryb, czy do tworzenia banku genów jest niezwykle użyteczna. Nasienie każdego gatunku wymaga specjalnych procedur, zastosowanie których daje najlepsze parametry jego jakości, przekładające się na wysoką zdolność zapładniającą. Doktorantka zainteresowała się również jakością nasienia neosamców pstrąga tęczowego, które są wykorzystywane do tworzenia jednopłciowych populacji samiczych tego gatunku - problem ważny dla akwakultury.

Wyniki zawarte w pierwszej publikacji (Judycka i wsp. 2015) dotyczą badań jakości nasienia pobranego od jesiotra syberyjskiego poza okresem rozrodczym. Dla tego gatunku okres intensywnego wzrostu zależny jest od temperatury środowiska i mieści się w przedziale kwiecień-wrzesień. Rozród jesiotra w warunkach kontrolowanych ma miejsce od kwietnia do czerwca, co sprawia, że kilka miesięcy pierwszego sezonu (okres szybkiego wzrostu) nie może być przez młodociane stadia jesiotrów wykorzystany, co skutkuje tym, że cykl produkcyjny trwa przynajmniej dwa lata. Możliwość rozradzania jesiotra w okresie listopad-kwiecień pozwoliłaby na znaczne skrócenie cyklu produkcyjnego. Warunkiem koniecznym dla takiej modyfikacji jest możliwość pozyskania produktów płciowych wysokiej jakości poza sezonem rozrodczym. Wyniki badania jakości spermy jesiotra syberyjskiego w tym właśnie okresie wykazały, że pomimo występującej spontanicznie ruchliwości plemników, możliwe jest krótkookresowe przechowywanie nasienia jak też jego kriokonserwowanie w celu użycia go w sztucznym rozrodzie tego gatunku.

W drugiej publikacji (Judycka i wsp. 2015) przedstawione zostały wyniki badań przeprowadzonych w celu potwierdzenia przydatności prostego rozrzedzalnika zawierającego

glukozę-metanol do stosowania w procesie krioprezewacji nasienia jesiotra syberyjskiego. Określano ruchliwość plemników po rozmrożeniu oraz ich zdolność zapładniającą. Wykazano, że 0.1 M glukoza w 15% metanolu daje pozytywny efekt i może być alternatywą dla wcześniej stosowanych metod krioprezewacji nasienia tego jesiotra. Rozrzedzalnik glukoza-metanol nie aktywuje ruchliwości plemników, dlatego też nie ma konieczności dodawania do rozrzedzalnika jonów potasu. Czas ekwilibracji (30 minut) przed kriokonserwacją, nie powodujący negatywnego oddziaływania na jakość nasienia, jest ważnym parametrem pozwalającym na lepszą organizację operacji prowadzonych na dużą skalę w wylęgarni. Uzyskane wyniki są więc ważne zarówno z praktycznego, ale też i poznawczego punktu widzenia.

Wyniki zawarte w trzeciej publikacji (Judycka i wsp. 2016) wskazują na możliwość stosowania rozrzedzalnika na bazie trehalozy do kriokonserwacji nasienia pstrąga tęczowego. Zdolność zapładniająca tego nasienia kriokonserwowanego w rozrzedzalniku zawierającym trehalozę wraz z KCl, przy odpowiednim rozrzedzeniu nasienia, zapewniającego optymalną koncentrację plemników, jest taka sama jak w przypadku świeżego nasienia.

Czwarta publikacja cyklu (Judycka i wsp. 2017) dotyczy kriokonserwacji nasienia maskulinizowanych samic pstrąga tęczowego. Metoda skutecznej krioprezewacji plemników, które pobrane z jąder, przy braku przewodów nasiennych, nie przechodzą procesu dojrzewania, wymaga użycia rozrzedzalnika (glukoza-metanol) i płynów do dojrzewania. Płyny te oddziałują na parametry jakości nasienia - po pierwotnym spadku ruchliwości plemników obserwuje się jej wzrost. Wysoka zdolność zapładniająca plemników kriokonserwowanego nasienia stwarza możliwość użycia tej procedury w rutynowej praktyce wylęgarniczej.

Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej, którą stanowi cykl 4. publikacji (wszystkie z listy JCR) stwierdzam, że mają one wysoką wartość naukową, którą potwierdzają parametry bibliometryczne przedstawione przeze mnie w początkowej części recenzji. Uważam, że na tym etapie rozwoju naukowego, przy staraniu się o uzyskanie stopnia naukowego doktora, są bardzo wysokie. Prace te zawierają oryginalne wyniki dotyczące kriobiologii nasienia ważnych z gospodarczego punktu widzenia gatunków ryb jesiotrowatych i łososiowatych. Ich niezaprzeczalnym atutem jest powiązanie z praktyką wylęgarniczą. Autorka wykazała w nich, że zastosowanie nowoczesnych technik badawczych (metoda CASA, czy cytometria przepływowa) w badaniu jakości nasienia pozwala doskonalić metody jego konserwacji i opracowywać nowe protokoły skutecznego przechowywania nasienia, przy zachowaniu jego żywotności po rozmrożeniu. Warte szczególnego

podkreślenia są wyniki konserwacji nasienia jesiotra syberyjskiego, pobranego poza sezonem rozrodczym, które pomimo stosunkowo niskiej przydatności do przechowywania krótkookresowego, może być kriokonserwowane i z powodzeniem używane do sztucznego rozrodu tego gatunku. Interesujące są też wyniki badania nasienia neosamców pstrąga tęczowego, które może być kriokonserwowane i wykorzystane do produkcji samiczych populacji tego gatunku. Użycie neosamców jest jedną z najskuteczniejszych metod służących temu celowi.

W każdej z prac badanie parametrów kriokonserwowanego nasienia miało związek z badaniem jego zdolności zapładniającej, co uwypukla walor aplikacyjny tych badań, czyli możliwość wdrażania tych procedur do praktyki wylęgarniczej, czy tworzenia banku genów. Niezależnie od zastosowanego protokołu krioprezerwacji badanie zdolności zapładniającej nasienia jest najbardziej miarodajnym testem jego jakości.

Dzięki dalszym badaniom, takim jak te prowadzone, między innymi, przez Panią mgr Judycką w zespole Zakładu Biologii Gamet i Zarodka Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie możliwy jest dalszy postęp w dziedzinie doskonalenia i standaryzacji metod wykorzystania kriokonserwowanego nasienia w coraz silniej rozwijającej się akwakulturze krajowej i światowej.

Moje krytyczne uwagi w stosunku do zbyt syntetycznej, skrótowej formy rozprawy doktorskiej nie mają oczywiście znaczenia w ocenie wartości tej części dorobku naukowego Pani mgr Sylwii Judyckiej, który jest podstawą rozprawy. Przedstawiają jedynie mój punkt widzenia na formę pracy doktorskiej, która w ostatnich latach uległa zmianie i chyba należy ten fakt uznać za znak czasu, nie zapominając jednak o tym, że rozprawa doktorska to nie tylko zbiór kserokopii kilku artykułów opublikowanych w doskonałych nawet czasopismach naukowych. Tytuł tej formy - "Rozprawa" - wciąż obliguje do czegoś więcej!

Przy okazji dwóch publikacji dotyczących jesiotrów syberyjskich, które nie były znieczulane przed pobieraniem produktów płciowych oraz jednej z dwóch publikacji dotyczącej zastosowania rozrzedzalnika na bazie trehalozy do kriokonserwacji nasienia pstrągów tęczowych, które były znieczulane Propiscinem, nasunęło mi się pytanie, na które bez wątpienia Doktorantka zna odpowiedź. Czy stosowanie środków usypiających (2-phenoxy-ethanol, Propiscin, MS-222, olejek goździkowy, czy jeszcze innych) nie oddziałuje na parametry nasienia? Szybki rzut oka na dane z literatury pokazuje, na badania demonstrujące wpływ anestetyków na ruchliwość plemników: według Da Silva i wsp. (2014) średni czas ruchliwości plemników karpia usypianych eugenolem był istotnie wyższy niż u ryb kontrolnych, z kolei Wagner i wsp. 2002 (Aquaculture 211, 353–366) wykazali, że u

pstrąga tęczowego czas ruchliwości plemników obniżał się wraz ze wzrostem koncentracji anestetyku (olej goździkowy, MS-222 czy dwutlenek węgla). Także Dietrich i wsp. 2005 (Fish Physiol. Biochem. 31: 1–9) zaobserwowali skrócenie czasu ruchliwości plemników po 10. minutowej ekspozycji pstrągów tęczowych na anestetyk. Czy te znalezione przeze mnie nieliczne dane, których pewnie jest znacznie więcej (jeśli weźmie się jeszcze pod uwagę inne gatunki zwierząt i ludzi) są na tyle istotne, że należałoby je brać pod uwagę planując doświadczenie, w którym bada się różne parametry jakości nasienia ryb poddawanych znieczuleniu?

### **Wniosek końcowy**

Stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wymagania określone w ustawie (art. 13) z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz. 595, z późn. zm.), § 5 Rozporządzenia MNiSW z dnia 22 września 2011 r. w sprawie szczegółowego trybu przeprowadzania czynności w przewodach doktorskich, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. z 2011 r., Nr 204, poz.1200) i zgłaszam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Judyckiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Mirosława Sokołowska-Mikołajczyk

