

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr inż. Pauliny Stępkowskiej pt.: „Ocena zmian funkcjonalno-strukturalnych plemników z uwzględnieniem zaburzeń równowagi oksydacyjno-redukcyjnej nasienia knurów w aspekcie doskonalenia metod jego konserwacji ” wykonanej w Katedrze Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego (ZUT) w Szczecinie pod kierunkiem dr hab. Dariusza Gączarzewicza, prof. ZUT

Stres oksydacyjny w układzie płciowym męskim, w tym w nasieniu – będący efektem braku równowagi między procesami pro- i antyoksydacyjnymi z przewagą tych pierwszych – to jeden z istotnych czynników ryzyka uszkodzenia męskich komórek rozrodczych, w których nieodwracalnie dochodzi do zmiany struktury molekularnej lipidów, białek i DNA budujących struktury/organelle komórkowe. W konsekwencji ma miejsce upośledzenie funkcji biologicznej tych gamet, w tym ich ruchliwości i zdolności do interakcji z oocytem, niezależnie czy dochodzi do naturalnej koncepcji, czy też wspomaganiej. Patomechanizm tych zmian wiąże się przeważnie z uruchomieniem szlaków skróconej programowanej śmierci komórkowej, do której plemniki w niekorzystnych warunkach są szczególnie predysponowane, np. ze względu na zwiększający się deficyt czynników przeżycia. Zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* plemniki ludzkie i zwierzęce mogą być narażone na patologiczne ilości reaktywnych form tlenu (RFT), a systemy antyoksydacyjne nie zawsze będą efektywne.

W przypadku zwierząt hodowlanych, w tym trzody chlewnej problem ten pozostaje wciąż aktualny, bowiem jedną z najważniejszych i najpowszechniej wykorzystywanych metod biotechnologicznych w hodowli tych zwierząt jest inseminacja, która w przypadku knura wymaga konserwacji rozcieńzonego nasienia w stanie płynnym w odpowiedniej temperaturze (15–17°C). Stosowane rozcieńczalniki mają zapewnić optymalne środowisko dla przeżycia plemników, utrzymać stabilność ich błony komórkowej i potencjał energetyczny a przez to ich żywotność i prawidłową kinetykę. Nie ulega wątpliwości, że sam proces i czas przechowywania nasienia knura mają niebagatelne znaczenie dla kompetencji plemników, których homeostaza biologiczna może być naruszona między innymi przez pojawiający się stres oksydacyjny w środowisku zewnątrzkomórkowym, zwłaszcza, gdy czas przechowywania przedłuża się.

Problem doskonalenia technologii konserwacji nasienia knura pozostaje wciąż kwestią otwartą i niewątpliwie wymaga wielu badań, które monitorowały zmiany męskich gamet zarówno na poziomie ich funkcji, jak i struktury, i wniosłyby praktyczne przesłanki jak zapobiec obniżeniu się jakości plemników. **W tym aspekcie przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska prezentuje temat jak najbardziej aktualny, bowiem Doktorantka podejmuje próbę szerokiej oceny jakości nasienia knura konserwowanego, co więcej wzbogaca skład rozcieńczalnika o antyoksydanty i monitoruje ich efekty, aby wyciągnąć praktyczne wnioski. Sam temat wzbudza ciekawość i zachęca do oceny.**

Praca doktorska obejmuje 111 stron, w ramach których umieszczono 24 tabele. Wyróżniono 9 rozdziałów, zgodnie z wymogami tego typu prac, w kolejności: *Wprowadzenie, Cel pracy i hipoteza badawcza, Materiał i metodyka badań, Wyniki badań, Dyskusja, Stwierdzenia i wnioski, Piśmiennictwo, Spis tabel, Tabele*. Wymienione rozdziały poprzedzone są *Wykazem skrótów używanych w pracy oraz Streszczeniem* w języku polskim i angielskim.

Piśmiennictwo obejmuje 156 pozycji, wśród których zamieszczone są m.in. oryginalne i pogłądowe publikacje polskie i anglojęzyczne zgodnie z tematyką badawczą prezentowaną w rozprawie doktorskiej. Przeważają artykuły anglojęzyczne. Pozycje piśmiennictwa pochodzą z lat **1999–2023**. Przy czym z 1999 r. cytowana była tylko jedna publikacja, z kolei z ostatnich pięciu lat **50** publikacji, w tym **10 z 2019 r., 7 z 2020 r., 18 z 2021 r., 6 z 2022 r. i 9 z 2023 r.** Proporcje objętościowe poszczególnych rozdziałów nie budzą zastrzeżeń.

We *Wprowadzeniu* Doktorantka w sposób **wyczerpujący, kondensacyjny i dydaktyczny**, zawarła informacje **ściśle związane z tematyką dysertacji**. Są one niezbędne do uzasadnienia podjętych badań, zrozumienia uzyskanych danych eksperymentalnych, ich interpretacji, a także wyrażenia własnych komentarzy, opinii i sugestii. Kolejność poszczególnych podrozdziałów jest **logiczna i merytorycznie poprawna**. W pierwszym podrozdziale Pani mgr Paulina Stępkowska wprowadza czytelnika w kluczowe aspekty konserwacji nasienia ze względu na metodę inseminacji wykorzystywaną w przypadku hodowli trzody chlewnej. Zwraca uwagę zarówno na używane do konserwacji nasienia knura w stanie płynnym rozcieńczalniki, jak i temperaturę przechowywania nasienia, uwzględniając biologię plemnika, w tym jego strukturę molekularną.

Dalsze podrozdziały poświęcone są reaktywnym formom tlenu. Doktorantka definiuje pojęcie RFT, podaje wewnątrzkomórkowe/plemnikowe źródła ich powstania, a także skupia się na fizjologicznej i patologicznej ich roli w stosunku do męskich komórek rozrodczych, podając molekularne mechanizmy odpowiedzialne za korzystne i niekorzystne skutki ich działania. Następnie przechodzi do opisu nieenzymatycznych i enzymatycznych procesów antyoksydacyjnych w nasieniu, kluczowych w utrzymaniu równowagi między procesami utleniania i redukcji warunkującej prawidłową funkcję męskich komórek rozrodczych i w konsekwencji ich zdolność do zapłodnienia.

Ostatnie dwa podrozdziały dotyczą ważnych problemów związanych z systemem antyoksydacyjnym nasienia knura w kontekście jego konserwacji oraz monitorowania zmian zachodzących w konserwowanym nasieniu. Pani mgr Paulina Stępkowska, opierając się na danych z piśmiennictwa, słusznie podkreśla, że procedura konserwacji nasienia knura narusza aktywność endogennych antyoksydantów, co prowadzi do niekorzystnych zmian w strukturze i funkcji plemników. Stąd też, celowe monitorowanie tych nieprawidłowości i ocena całkowitej zdolności antyoksydacyjnej nasienia może przyczynić się do udoskonalenia metod konserwacji nasienia knura i wydłużenia czasu jego przechowywania. Autorka, na podstawie cytowanych doniesień, zwraca uwagę, że dodatek antyoksydantów do konserwowanego nasienia, zwłaszcza w przypadku jego długoterminowego przechowywania może korzystnie wpłynąć na jakość nasienia wielu gatunków zwierząt. Zatem **uzasadnia** realizację badań autorskich, w których **jasno sformułowała cel i postawiła hipotezę badawczą**.

Pani mgr Paulina Stępkowska założyła, że „Nasilenie wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych zaburzeń oksydacyjnych związanych z funkcjonalno-strukturalnymi uszkodzeniami plemników podczas długoterminowego przechowywania nasienia knura w stanie płynnym (w rozcieńczalniku komercyjnym, w temperaturze 16°C) jest kompensowane przez dodatek związków o działaniu antyoksydacyjnym do rozcieńczalnika.” Stąd też, sformułowała **adekwatny do postawionej hipotezy cel** badań: „Celem badań była analiza funkcjonalno-strukturalnych zmian zachodzących w plemnikach podczas przechowywania nasienia knura w stanie płynnym z uwzględnieniem oceny zaburzeń oksydacyjnych plemników oraz wpływu wybranych antyoksydantów w aspekcie doskonalenia metod przechowywania nasienia.”

Doktorantka w pierwszym etapie badań, wykorzystując **60** ejakulatów pozyskanych od **52** knurów (rasa duroc, wiek 18–24 miesiące, użytkowane rozplodowo w stacji unasiwienia loch znajdującej się na terenie województwa zachodniopomorskiego) dokonała **wnikliwej** oceny funkcjonalno-strukturalnej plemników podczas długoterminowego przechowywania nasienia knura w stanie płynnym (czas przechowywania 7 dni, komercyjny rozcieńczalnik Vitasem LD, temperatura 16°C). Zgodnie z dostępnym piśmiennictwem **trafnie** wybrała do oceny te parametry plemnika, które podczas konserwacji nasienia mogą ulec niekorzystnej zmianie, ze względu na czas przechowywania i potencjalny stres oksydacyjny w nasieniu, a które decydują o zdolności plemników do zapłodnienia (ruchliwość, integralność, funkcjonalność błony komórkowej, aktywność mitochondriów, peroksydacja lipidów, wewnątrzkomórkowe wytwarzanie H₂O₂). Ponadto, Doktorantka oceniła całkowitą zdolność antyoksydacyjną nasienia, czyli zweryfikowała status oksydacyjny w środowisku zewnątrzkomórkowym plemników. Parametry oceniane były w 1., 3., 5. i 7. dniu przechowywania nasienia. Zarówno wybór **wielu** ocenianych parametrów, jak i dobór **różnorodnych, wzajemnie uzupełniających się, komplementarnych metod** (komputerowa ocena ruchliwości plemników – CASA, wykorzystanie sond fluorescencyjnych i mikroskopii fluorescencyjnej oraz spektrofotometria) pozwoliło Doktorantce **w pełni zrealizować** pierwszą część celu badań: „...analiza funkcjonalno-

strukturalnych zmian zachodzących w plemnikach podczas przechowywania nasienia knura w stanie płynnym z uwzględnieniem oceny zaburzeń oksydacyjnych plemników...”.

Z kolei w drugim etapie badań, przeprowadzonych na 12 ejakulatach knurów, Pani mgr Paulina Stępkowska dokonała także analizy funkcjonalno-strukturalnych zmian zachodzących w plemnikach podczas długoterminowego przechowywania nasienia knura w stanie płynnym, ale w przypadku, gdy do rozcieńczalnika dodała w różnych stężeniach antyoksydanty enzymatyczne (dysmutaza ponadtlenkowa – SOD lub katalaza – CAT). Wybór tych właśnie enzymów jest jak najbardziej **uzasadniony**, bowiem są one pierwszą linią obrony przed RFT. Autorka, opierając się na danych z piśmiennictwa, zastosowała trzy warianty stężenia SOD (25, 50, 75 IU/mL) i trzy CAT (100, 200 i 300 IU/mL), co świadczy o **przemysłanym zaplanowaniu** tej części badań, której otrzymane wyniki miałyby pomóc w **wyborze najbardziej optymalnego środowiska dla przechowywania nasienia knura/doskonalenie metod przechowywania nasienia**. W ten sposób mogła ocenić zarówno wpływ czasu przechowywania, jak i wpływ antyoksydantów na jakość nasienia i tym samym zrealizować drugą część celu badań, który dotyczył potencjalnej protekcyjnej roli wybranych enzymów antyoksydacyjnych wobec męskich komórek rozrodczych.

Pragnę podkreślić, że opis materiału badawczego i metod został **poprawnie i wyczerpująco zredagowany**, zwłaszcza w zakresie szczegółowej charakterystyki kinetyki plemników i kategorii tych komórek barwionych różnymi fluorochromami. Pozwoliło to na **poprawną ocenę** uzyskanych danych, które zostały poddane analizie statystycznej. Liczba wykorzystanych ejakulatów była **wystarczająca** do oceny statystycznej. Zastosowane w tej ocenie testy (test Shapiro-Wilka, ANOVA, Kruskala-Wallisa) nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Należy wspomnieć, że Doktorantka zbadała także wzajemne asocjacje między badanymi parametrami dla nasienia przechowywanego przez 7 dni, obliczając współczynnik korelacji rang Spearmana (r_s). **Wyczerpująca analiza statystyczna zasługuje na uznanie. Była ona rzetelną podstawą stwierdzeń i wniosków zamieszczonych w dysertacji.**

Podsumowując tę część rozprawy doktorskiej uważam, że badania zostały zaplanowane i przeprowadzone w sposób **merytorycznie poprawny**. Są **oparte** na danych z piśmiennictwa naukowego **szeroko** opisanych we *Wprowadzeniu*. Świadczą o **dojrzałości naukowej Doktorantki** i jej **talencie warsztatowym**. **W kontekście weryfikacji wpływu antyoksydantów na jakość przechowywanego nasienia niewątpliwie są nowatorskie**. Nie mogę pominąć faktu, że był to także efekt **wieloletniego doświadczenia, cenionego dydaktyka i pracownika naukowego profesora Dariusza Gączarzewicza, pod którego kierunkiem badania zostały wykonane**. Z kolei Jednostka, w której realizowano badania Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie **szczyli się długą i chlubną tradycją** w zakresie aplikacji najnowszych technik monitorujących wartość biologiczną konserwowanego nasienia samców.

Przechodząc do Wyników badań, pragnę zaznaczyć, że zostały one **logicznie, w sposób chronologicznie poprawny, zgodnie z kolejnością wykonywanych analiz, wyczerpująco i czytelnie** opisane w poszczególnych podrozdziałach i przedstawione w postaci **24** tabel. W przypadku analiz porównawczych wyniki wyrażono w postaci średnich, median, zakresów oraz dolnego i górnego kwartyla z uwzględnieniem istotności różnic porównywanych zmiennych. Z kolei zależności między badanymi parametrami przedstawiono za pomocą wartości współczynnika rang Spearmana wraz z istotnością statystyczną. Opis tabel nie budzi zastrzeżeń recenzenta. Natomiast **podziw budzi dojrzałość redakcyjna Doktorantki, jej umiejętność kompilowania i właściwej interpretacji uzyskanych wielu danych**. Nie można zapomnieć, że Pani mgr Paulina Stępkowska w swoich badaniach analizowała aż **6 zasadniczych parametrów plemników/nasienia w kontekście dwóch zmiennych: czas przechowywania nasienia i stężenie antyoksydantów**. Wykazała się **talentem ich przedstawienia i opisu**.

Pierwsza część opisu wyników dotyczy oceny wpływu czasu przechowywania rozcieńczonego nasienia knura na badane parametry męskich komórek rozrodczych i całkowitą zdolność antyoksydacyjną nasienia. Ponadto Doktorantka odniosła się do uzyskanych korelacji rang Spearmana. Ta część wyników zilustrowana jest za pomocą tabeli 1, 2 i 3. Na podstawie analizy statystycznej, Pani mgr Paulina Stępkowska ujawniła istotny statystycznie spadek ruchliwości plemników, w tym odsetka plemników z ruchem postępowym. Po 7. dniach przechowywania nasienia spadek wynosił około 32%. Na uwagę zasługuje fakt, że Doktorantka **z sukcesem przeanalizowała** szczegółowe

parametry kinetyczne plemnika wykazane za pomocą komputerowej analizy. **Udowodniła**, istotne oddziaływanie czasu konserwacji nasienia na prędkość krzywoliniową, liniową oraz uśrednioną (odpowiednio VCL, VSL, VAP) i na parametry charakteryzujące trajektorię ruchu plemnika (LIN, STR, WOB, ALH, BCF). Pierwsze trzy parametry miały tendencję spadkową, zwłaszcza prędkość krzywoliniowa i uśredniona. Z kolei jedne parametry opisujące trajektorię ruchu ulegały wzrostowi (LIN, STR, WOB, BCF), inne (ALH) obniżeniu (Tabela 1).

Pani mgr Paulina Stępkowska wykazała także, że inne istotne parametry ocenianych gamet odzwierciedlające żywotność plemników i ich potencjał energetyczny również ulegały obniżeniu w miarę czasu konserwacji nasienia. Żywotność męskich komórek rozrodczych, co **zasługuje na uwagę**, badana za pomocą **dwóch niezależnych, ale komplementarnych testów** (SYBR-14/PI oceniający integralność błony komórkowej główki, HOS-test weryfikujący integralność błony komórkowej wtyki) ulegała obniżeniu o około 23–24% po 7. dniach przechowywania. Co więcej, Doktorantka zaobserwowała zwiększenie się uszkodzeń błony komórkowej po każdym dniu konserwacji nasienia. Nic więc dziwnego, że wobec takich uszkodzeń, co jest logicznym ich następstwem, potencjał wewnętrznej błony mitochondrialnej/mitochondrialny potencjał transbłonowy ($\Delta\Psi_m$) ulegał obniżeniu, czego wyrazem był spadek odsetka plemników z aktywnymi mitochondriami i wysokim bądź obniżającym się $\Delta\Psi_m$, ale nie niskim. Konsekwentnie wzrastał odsetek plemników z niską aktywnością i niskim $\Delta\Psi_m$. Spadek aktywności mitochondriów był znaczny, bowiem mediana plemników z aktywnymi mitochondriami w 1. dniu konserwacji wynosiła 88%, a w 7. tylko 55% (Tabela 2).

Weryfikacja następných dwóch parametrów (peroksydacji lipidów błonowych, wewnątrzkomórkowe wytwarzania H_2O_2) jest jak najbardziej **merytorycznie uzasadniona**, wobec założenia Doktorantki, że w trakcie konserwacji nasienia dochodzi do stresu oksydacyjnego. Zgodnie z oczekiwaniem następował istotny wzrost gamet z peroksydacją lipidów (BODIPY-pozytywnych), zarówno żywych, jak i martwych. Odsetek plemników BODIPY-pozytywnych w 1. dniu w stosunku do 7. dnia przechowywania nasienia zwiększał się średnio o około 6%. Podobny wzrost Autorka wykazała w przypadku odsetka komórek wytwarzających wewnątrzkomórkowo H_2O_2 (komórki DCFH-DA – pozytywne). Nie ulega wątpliwości, że **trafnym uzupełnieniem** powyższych wyników była ocena całkowitej zdolności antyoksydacyjnej nasienia, która w miarę czasu jego przechowywania zmniejszała się (mediana w 1 dniu = 0,89 mmol, w 7 dniu = 0,69 mmol), co było zgodne ze zmianami w peroksydacji lipidów błonowych i generowaniem H_2O_2 . Należy zwrócić uwagę, że nie były to jednak zmiany drastyczne, biorąc pod uwagę zmiany we wcześniej opisanych parametrach (Tabela 2).

Jak można tłumaczyć takie wyniki?

Dalsza **poprawna** analiza statystyczna dotyczyła ujawnienia **zależności** między badanymi parametrami gamet męskich przechowywanych przez 7 dni. (Tabela 3). Doktorantka wykazała, że ruchliwość plemników korelowała dodatnio z integralnością ich błony komórkowej bądź aktywnością ich mitochondriów. Wartość współczynników korelacji wskazywała na silną lub bardzo silną asocjację między tymi parametrami ($r_s > 0,7$ – $0,9$ i $> 0,9$). Z kolei ujemne korelacje Doktorantka stwierdziła między oksydacyjnym uszkodzeniem męskich gamet a ruchliwością plemników, integralnością ich błony komórkowej i aktywnością ich mitochondriów. Siła związku była umiarkowana ($r_s > -0,4$ – $0,7$). Ostatnia analizowana zależność dotyczyła całkowitej zdolności antyoksydacyjnej nasienia, która korelowała dodatnio z wymienionymi parametrami plemników (siła asocjacji była słaba – $r_s > 0,2$ – $0,4$), natomiast ujemnie z oksydacyjnym uszkodzeniem plemników (siła asocjacji była umiarkowana). **Uzyskane wyniki wyraźnie wskazywały, że ruchliwość gamet męskich zależna jest od jakości błony komórkowej i mitochondriów a wzrost oksydacyjnego uszkodzenia plemników i obniżenie zdolności antyoksydacyjnej nasienia może być czynnikiem ryzyka nieprawidłowości strukturalno-funkcjonalnych plemników. Uzyskane zależności uzupełniały analizę porównawczą danych parametrów.** Ze względu na wartość współczynników korelacji, które mówią o natężeniu asocjacji między danymi parametrami, recenzent **proponuje uzupełnić** w podrozdziale *Analiza statystyczna* lub pod Tabelą 3 **jakie wartości r_s odpowiadają danej sile związku.**

Obszerna część wyników, zgodnie z wspomnianym już założeniem, że podczas długoterminowego przechowywania nasienia może dojść do ewentualnego upośledzenia zdolności antyoksydacyjnej nasienia, poświęcona jest wpływowi enzymatycznych antyoksydantów dodawanych do rozcieńczalnika, na analizowane już wcześniej parametry plemników. Doktorantka wyniki zawarła

w 21 tabelach (Tabela 4–24) i z sukcesem przeanalizowała cytoprotekcyjną rolę SOD i CAT w zależności od ich dawek i czasu przechowywania nasienia.

Ujawniła, między innymi, że po 7. dniach konserwacji nasienia, najniższa tendencja spadkowa ruchliwości plemników (o około 31%) miała miejsce w przypadku najniższego stężenia SOD, natomiast najwyższa (42%) w przypadku najwyższego, co zgodne było z oceną ruchu postępowego, w tym szybkiego i niektórymi szczegółowymi parametrami kinetyki plemników wykazywanych za pomocą CASA. **Wyniki te sugerują, że zwiększenie dawki SOD niekorzystnie wpływało na ruchliwość plemników.** Niemniej jednak **zaskakujący był fakt**, że pomimo spadku ruchliwości plemników liniowość i prostota ruchu tych komórek wzrastała podczas całego okresu przechowywania nasienia niezależnie od wariantu SOD. W przypadku integralności błony komórkowej plemników Doktorantka nie stwierdziła różnic istotnych między grupą kontrolną a poszczególnymi wariantami SOD, natomiast wykazała je w przypadku oceny $\Delta\Psi_m$. Istotnie więcej męskich gamet z aktywnymi mitochondriami zaobserwowała przy najniższym wariantcie SOD w odniesieniu do wariantu z najwyższą dawką SOD i grupy kontrolnej. **Podobnie, jak w przypadku ruchliwości plemników wydaje się, że wysoka dawka SOD niekorzystnie wpływała na aktywność mitochondriów.** Biorąc pod uwagę peroksydację lipidów plemnika i generowanie przez te komórki H_2O_2 Pani mgr Paulina Stępkowska ujawniła **korzystny wpływ SOD na status błony komórkowej plemników.** Najniższy odsetek męskich gamet z utlenionymi lipidami błonowymi w 7. dniu przechowywania stwierdziła stosując średni wariant SOD (50 IU/mL). Podobne wyniki uzyskała w przypadku analizy liczby gamet wytwarzających H_2O_2 . Zatem w obu badanych parametrach suplementacja SOD, zgodnie z oczekiwaniem Autorki, **miała istotny wpływ na zmniejszenie się oksydacyjnych uszkodzeń męskich komórek rozrodczych.**

Wpływ dodatku CAT do rozcieńczalnika okazał się także **korzystny**, bowiem w 7. dniu konserwacji nasienia odsetek plemników z ruchem postępowym, w tym ruchem postępowym szybkim w grupach z dodatkiem CAT był wyższy w odniesieniu do grupy kontrolnej. Okazało się, że **najkorzystniej działał najniższy wariant CAT (100 UI/mL) i średni (200 UI/mL).** Najwyższy wariant tego antyoksydantu (300 UI/mL) nie miał oczekiwanego efektu, wręcz przeciwnie powodował silniej zaznaczony w końcowym okresie przechowywania spadek plemników z ruchem postępowym. Doktorantka wyraźnie **podkreśliła**, że we wszystkich wariantach rozcieńczalnika z dodatkiem CAT, z wyjątkiem najwyższego wariantu, podczas całego okresu konserwacji nasienia **obserwowała tendencje wzrostowe** wskaźników kinetyki plemnika – liniowość i prostota ruchu. Dalej ujawniła, że w obecności CAT zwiększała się integralność błony komórkowej plemników i podobnie, jak w przypadku ruchliwości męskich gamet, **udowodniła, że najniższe i średnie stężenie tego enzymu okazało się optymalne.** Ponadto, zaobserwowała, że średnie stężenie CAT miało **korzystny** wpływ na aktywność mitochondriów. Najwyższy odsetek plemników z aktywnymi mitochondriami w 7. dniu konserwacji nasienia stwierdziła w przypadku tego wariantu CAT. Wykazała także, że **dodatek CAT do rozcieńczalnika chronił plemniki przed peroksydacją lipidów i zmniejszał generowanie przez nie H_2O_2 .** W 1. i 3. dniu przechowywania nasienia zanotowała niższy odsetek męskich gamet z utlenionymi lipidami błonowymi w grupie z dodatkiem najniższego i średniego wariantu CAT w odniesieniu do grupy bez dodatku CAT. Natomiast najniższy odsetek komórek wytwarzających wspomnianą reaktywną formę tlenu ujawniła w końcowym okresie przechowywania w przypadku najniższej dawki CAT.

Dydaktyczne, kondensacyjne omówienie wyników badań i dyskusja zostały zawarte w rozdziale *Dyskusja*. Biorąc pod uwagę dane z piśmiennictwa Doktorantka dokonała **dokładnej i umiejętnej** analizy uzyskanych danych w świetle wyników badań innych autorów. **Wykazała się talentem ich łączenia i poszukiwania powiązań między nimi.** Prześledziła **obszerną dynamikę zmian strukturalno-funkcjonalnych plemników** knura w proponowanych warunkach doświadczalnych. **Mając wiedzę** z zakresu biologii tych gamet i niekorzystnych procesów/czynników jakie mogą występować podczas długotrwałej konserwacji nasienia przed unasienieniem, jak również mając świadomość, że nie wszystkie zjawiska w tym zakresie są poznane, ostrożnie i z dystansem zinterpretowała swoje wyniki, które w niektórych przypadkach nie zawsze były jednoznaczne i niełatwe do wyjaśnienia. Uwzględniła molekularne mechanizmy uczestniczące w utrzymaniu integralności biologicznej męskich komórek rozrodczych, które podczas konserwacji nasienia mogły być naruszone. W ten sposób zasugerowała ewentualny patomechanizm odpowiedzialny za nieprawidłowości strukturalno-funkcjonalne plemników i przez to ich zwiększoną wrażliwość na

oksydacyjne działanie RFT, co ważne, ich zdolność do generowania RFT. Słusznie zasugerowała, że czynnikiem sprawczym obserwowanych zaburzeń plemników (np. spadek żywotności i ruchliwości plemników, aktywności ich mitochondriów), mogły być RFT, które uszkadzając struktury plemnika przyczyniły się do wtórnego ich generowania (np. uszkodzenie błon mitochondrialnych jest czynnikiem sprawczym tworzenia patologicznych ilości RFT przez upośledzony łańcuch oddechowy zlokalizowany w wewnętrznej błonie tych organelli), czego wyrazem był obserwowany przez Doktorantkę wzrost komórek wytwarzających RFT.

Dalej Autorka zwróciła uwagę, że specyficzna ochrona antyoksydacyjna nasienia knura ma niebagatelne znaczenie w utrzymaniu homeostazy funkcjonalnej plemników, a wzbogacenie rozcieńczalnika w kluczowe antyoksydanty takie jak SOD i CAT w odpowiednich stężeniach może zminimalizować szkodliwe działanie stresu oksydacyjnego, tym bardziej że podczas konserwacji nasienia knura miał miejsce spadek całkowitej zdolności antyoksydacyjnej nasienia. Z drugiej jednak strony Pani mgr Paulina Stępkowska **zdaje sobie sprawę**, że dobór **optymalnej dawki** wymienionych enzymów wymaga dalszych badań, bowiem wzajemne interakcje między strukturami plemnika a czynnikami środowiska zewnętrznego są złożone i nie zawsze do końca klarowne. Zbyt wysoka dawka antyoksydantu może działać niekorzystnie, co wykazała Doktorantka. Dlaczego? Biorąc pod uwagę doniesienia z ostatnich lat recenzent sugeruje, że mogło dojść do **paradoksu antyoksydacyjnego**, czyli stresu redukcyjnego, w którym procesy redukcji przeważają nad utlenianiem, co najprawdopodobniej przyczynia się do obniżenia biologicznej funkcji plemnika, w tym jego zdolności do zapłodnienia¹. Monitorowanie zatem zjawisk, zwłaszcza tych o charakterze patologicznym jakie mogą pojawić się podczas konserwacji nasienia jest uzasadnione i konieczne.

W opinii recenzenta sformułowane w dysertacji stwierdzenia/wnioski **są zgodne z uzyskanymi wynikami i odpowiadają na cele badań. Interpretacja wyników jest poprawna, a praktyczne sugestie z niej wynikające trafne i potrzebne.** Pani mgr Paulina Stępkowska dowiodła, że:

- czas konserwacji miał znaczący wpływ na jakość nasienia knura przechowywanego przez 7 dni w rozcieńczalniku Vitasem LD, a wyrazem tego było uszkodzenie struktur plemnika i nasilenie się oksydacyjnych procesów w tych komórkach przy spadku całkowitej zdolności antyoksydacyjnej w ich środowisku zewnątrzkomórkowym;
- wykazane zależności między parametrami jakości nasienia, w tym wskaźnikami zaburzeń oksydacyjnych wskazują na wieloaspektowe podłoże zmian związanych z uszkodzeniem struktur komórkowych i zaburzeń funkcji plemnika podczas przechowywania dawek inseminacyjnych;
- zaburzenia integralności i funkcji struktur komórkowych plemników w trakcie przechowywania nasienia knura mogą być spowodowane obniżeniem potencjału antyoksydacyjnego środowiska plemników i generowaniem nadmiernej ilości reaktywnych form tlenu; zmiany te mogą być kompensowane przez dodatek do rozcieńczalnika związków o działaniu antyoksydacyjnym (takich jak dysmutaza ponadtlenkowa i katalaza);
- najbardziej optymalne działanie cytoprotekcyjne ma zastosowanie jako dodatek do rozcieńczalnika dysmutazy ponadtlenkowej w stężeniach 25 IU/mL i 50 IU/mL, natomiast katalazy w stężeniach 100 IU/mL oraz 200 IU/mL.

Na podstawie powyższych wniosków Doktorantka zaleca/sugeruje:

- aby minimalizować okres przechowywania dawek inseminacyjnych w celu efektywniejszego wykorzystania potencjału biologicznego nasienia przechowywanego w rozcieńczalniku Vitasem LD;

¹ Dutta S, Sengupta P, Roychoudhury S, Chakravarthi S, Wang CW, Slama P. Antioxidant Paradox in Male Infertility: "A Blind Eye" on Inflammation. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(1):167. doi:10.3390/antiox11010167
Henkel R, Sandhu IS, Agarwal A. The excessive use of antioxidant therapy: A possible cause of male infertility? *Andrologia*. 2019;51(1):e13162. doi:10.1111/and.13162

- potrzebę szerszego wyjaśnienia złożonego podłoża strukturalno-funkcjonalnych zmian plemników podczas przechowywania dawek inseminacyjnych i wykorzystania osiągnięć badawczych w pracach nad modyfikacją środowiska długoterminowo przechowywanych plemników knura;
- zastosowanie dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy jako komponentów rozcieńczalników celem poprawy efektywności metod konserwacji nasienia knura;
- podjęcie szerszych prac badawczych celem określenia oddziaływania wybranych antyoksydantów na jeszcze inne właściwości konserwowanych plemników i potwierdzenia efektywności dokonanych modyfikacji rozcieńczalników po wykonaniu zabiegów inseminacyjnych na lochach.

Ze względu na obowiązek recenzenta poniżej zamieszczam uwagi, które **w żaden sposób nie zmniejszają wartości merytorycznej przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej**. Są to jedynie redakcyjne sugestie:

- w piśmiennictwie polskim skrótem dla reaktywnych form tlenu jest skrót RFT a nie ROS,
- strona 16, Doktorantka używa nazwy „proteazy serynowej” stosując skrót PKC. Skrót ten oznacza kinazę C a nie proteazę (ang. *protein kinase C*). W transdukcji opisywanego sygnału bierze udział kinaza C.

Podsumowując przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską **oceniłam wysoko**. Na uznanie zasługuje **warsztat laboratoryjny** Doktorantki z zakresu **nowoczesnej i trafnej** oceny plemników. Wykazała się Ona **talentem** w planowaniu badań, analizie i interpretacji otrzymanych danych, a także w ich redagowaniu. Poszczególne rozdziały świadczą o **dużej elokwencji Autora**, która poparta jest **rzetelną wiedzą naukową**. Prezentowane badania zdecydowanie uzupełniają wiedzę z zakresu konserwacji nasienia knura i mają nie tylko **istotną wartość poznawczą**, ale i **praktyczną**. Z tego też względu są **innovacyjne**.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w artykule 13 ust. 1 ustawy z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r., poz. 1789). Mam zaszczyt, wnieść do Rady Dyscypliny Naukowej Zootechnika i Rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wniosek o dopuszczenie Pani **mgr Pauliny Stępkowskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. i n. o zdr. Małgorzata Piasecka

Małgorzata Piasecka