Dr hab. inż. Radosław Kowalski
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN
Zakład Biologii Gamet i Zarodka
Zespół Andrologii Molekularnej

Olsztyn dn. 23.01.2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

Recenzja pracy doktorskiej przygotowanej przez Panią Annę Żmudzińską pt.: „Wpływ wieku psa na zmiany w proteomie i parametrach jakości plemników najądrzowych poddanych sonikacji.”

Recenzja została sporządzona w związku z powołaniem przez Radę Naukową Wydziału Bioinżynierii Zwierząt Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie do pełnienia funkcji recenzenta w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora p. mgr Annie Żmudzińskiej.

Zgodnie z art. 187 ust. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.), rozprawa doktorska powinna prezentować ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie albo dyscyplinach oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej. Jej przedmiotem być powinno oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej albo oryginalne dokonanie artystyczne. Rozprawę doktorską może stanowić praca pisemna, w tym monografia naukowa, zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, praca projektowa, konstrukcyjna, technologiczna, wdrożeniowa lub artystyczna, a także samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej. Powinno być do niej dołączone streszczenie w języku angielskim, a do rozprawy doktorskiej przygotowanej w języku obcym również streszczenie w języku polskim. W przypadku, gdy rozprawa doktorska nie jest pracą pisemną, dołącza się opis w językach polskim i angielskim.

Z perspektywy tych właśnie kryteriów zostanie oceniona rozprawa doktorska przedstawiona przez p. mgr inż. Annę Żmudzińską.

Ocena formalna pracy

Rozprawa doktorska stanowi podstawę ubiegania się w postępowaniu o nadanie stopnia doktora na Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie na Wydziale Bioinżynierii Zwierząt. Praca wykonana została w Katedrze Biochemii i Biotechnologii Zwierząt pod kierunkiem dr hab. inż. Marzeny Mogielnickiej-Brzozowskiej, prof. UWM oraz drugiego promotora dr hab. inż. Magdaleny Zielińskiej, prof. UWM. Rozprawę przygotowano w języku angielskim. Praca liczy 76 stron, a wraz z oświadczeniami autorki i współautorów publikacji 85 stron.

Rozprawa doktorska składa się z dwóch prac opublikowanych w czasopismach naukowych. Pierwsza z prac opublikowana została w czasopiśmie Animals (IF=3,231), z kolei druga w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences (IF=6,208). Rozprawa doktorska ma właściwie sformatowaną stronę tytułową, gdzie obok tytułu zamieszczone zostały informacje, przez kogo i gdzie wykonano pracę oraz pod czyją opieką naukową. Pracę otwiera lista dwóch publikacji. Kolejną częścią pracy jest lista skrótów. Następnie doktorantka przedstawia syntetyczne streszczenie pracy w języku polskim i angielskim. Streszczeniu towarzyszy lista słów kluczowych. Kolejną częścią pracy jest wstęp, który kończy się przedstawieniem celu pracy.

Następnie doktorantka przedstawia wykorzystane w pracy materiały i metody. Piątą część stanowi opis wyników opublikowanych w pracach doktorantki oraz konkluzje z nich wynikające. Kolejną częścią, szóstą, jest spis bibliografii użytej we wcześniejszych częściach dysertacji. Po bibliografii, doktorantka przedstawia obie publikacje, w których jest wiodącym autorem, opublikowane w czasopismach naukowych. W związku z tym, że pracę doktorską stanowią publikacje wieloautorskie, jako zbiór załączników do rozprawy doktorantka zamieszcza oświadczenia o stopniu udziału swoim (w obu pracach wynosi on 65%) oraz współautorów w powstaniu dzieła.

W związku z tym, że rozprawę doktorską stanowią publikacje naukowe, przechodzę do omówienia zastosowanej w nich literatury.

W pierwszej pracy na 103 publikacje, 23 stanowią prace opublikowane w ciągu ostatnich 5 lat. W drugiej pracy na 100 zacytowanych publikacji 20 stanowią publikacje z ostatnich 5 lat. Prace cytowane pochodzą z czasopism recenzowanych, wśród których nie brak wiodących w

dziedzinie biologii rozrodu (Biology of Reproduction, Journal of Andrology, Molecular Reproduction and Development).

Praca spełnia kryteria formalne dysertacji naukowej mogącej być podstawą do nadania stopnia doktora.

Ocena merytoryczna pracy

Celem pracy było zbadanie zależności między umowną „jakością funkcjonalną" i proteomem plemników najądrza psów różniących się wiekiem. Ponadto w pracy analizowano proteomicznie wewnątrzkomórkowe i związane z błoną frakcje poddanych sonikacji plemników najądrzy psów. Jednym z celów pracy było także dobranie optymalnych warunków sonikacji dla uzyskania najefektywniejszego rozbicia struktur plemnika umożliwiającego izolację białek.

Celem szczegółowym było:

I. Określenie wpływu różnych parametrów sonikacji na rodzaj i udział procentowy zmian morfologicznych (uszkodzeń) w plemnikach najądrza psa (praca I);

II. Określenie wpływu różnych parametrów sonikacji na całkowitą zawartość białka we frakcjach wewnątrzkomórkowych i związanych z błoną plemników (praca I);

III. Wskazanie różnic w proporcji udziału białek wewnątrzkomórkowych i związanych z błoną w różnych wariantach sonikacji plemników psa (praca I);

IV. Badanie parametrów jakości plemników z ogona najądrza (koncentracja, ruchliwość) oraz poszukiwanie zależności między powyższymi parametrami a wiekiem psów (praca II);

V. Określenie wpływ wieku samca na zmiany morfologiczne w najądrzowych plemnikach psa (praca II);

VI. Porównanie całkowitego proteomu plemników najądrza psa w zależności od jego wieku (praca II);

VII. Identyfikacja białek wykazujących korelację z wiekiem psów w celu wykorzystania białek plemników najądrza, jako potencjalnych markerów starzenia się samców psa (praca II).

Biorąc pod uwagę brak w literaturze naukowej informacji na temat markerów białkowych starzenia się samców psów, merytorycznie, temat podjęty przez Panią Annę Żmudzińską oceniam jako bardzo ambitny i zasługujący na poszukiwania odpowiedzi. Cel ten ponadto doktorantka osiągała dzięki stopniowemu poszerzaniu swojego warsztatu badawczego. Pierwsza praca, miała bowiem charakter metodyczny, optymalizujący proces uzyskiwania wolnych białek (możliwych do identyfikacji) poprzez manipulację parametrami sonikacji. Podejście takie w nauce jest wyjątkowo cenne, gdyż pozwala nie tylko odpowiedzieć na główne

pytanie postawione przez badacza, ale także pomaga dostarczyć narzędzie do dalszych badań innym naukowcom. Jedyne moje zastrzeżenie budzi tytuł pracy, przygotowany na potrzeby złożenia dysertacji do oceny. W mojej ocenie niepotrzebnie użyto słowa sonikacja, co może prowadzić do mylnego wyobrażenia, że praca przedstawi różnice w jakości plemników po sonikacji. Sonikacja sama w sobie jest procesem z natury destruktywnym. W pracy była wykorzystywana jako narzędzie do rozbicia struktur plemników w celu izolacji/separacji białek. Stąd uważam, że jakkolwiek sonikacja i dobór jej parametrów stanowiła ważną część pracy, nie ma konieczności umieszczania słowa sonikacja w tytule rozprawy.

W swoich badaniach doktorantka zastosowała metody uznawane obecnie za klasyczne, takie jak: mikroskopia, elektroforeza SDS-PAGE, CASA (komputerowa analiza ruchliwości plemników), oraz nieco bardziej nowoczesne metody jak spektrometria mas (NanoUPLC-Q-TOF/MS oraz LC-MS). Doktorantka korzystała także z analizy Gene Ontology, dzięki której badaczka przedstawiła funkcjonalną klasyfikację zidentyfikowanych białek plemników najądrzowych psa. Warsztat metodyczny oraz biegłość doktorantki w wykorzystaniu narzędzi statystycznych zasługuje na wysokie uznanie.

W swojej pierwszej pracy, doktorantka zastosowała kilka wariantów sonikacji przy częstotliwości 60 kHz S1—5 min, 50W; S2—10 min, 50W; S3—30 min, 50W; S4—10 min, 150W. Jednym z pierwszych istotnych wyników pracy było stwierdzenie przez doktorantkę, że przy wartościach sonikacji 150W przez 10 minut, możliwe jest odseparowanie główki plemnika i jego ogona. Wśród wyizolowanych białek najądrzowych plemników psa dominowały białka związane z frakcją błonową. Niemniej, wiele białek zidentyfikowanych we frakcji błonowej oraz wewnątrzkomórkowej okazało się być identyczne. Funkcje zidentyfikowanych białek we frakcji wewnątrzkomórkowej dotyczyły głównie szlaku glikolizy oraz szlaku sygnalizacyjnego Wnt.

Doktorantka bardzo dobrze zwizualizowała wyniki analiz wprowadzając ich hierarchiczne i funkcjonalne schematy w oparciu o analizę Gene Ontology. Tabele i wykresy są czytelne, a sposób przedstawienia kluczowych wyników nie budzi zastrzeżeń. Mam jednak jedno zastrzeżenie dotyczące łączenia prób wskazane przy opisie SDS-PAGE. W pracy pod wykresami podawana jest stale liczba n=15, jednakże dla potrzeb elektroforezy i być może analizy spektrometrii mas, próby zostały połączone i analizowane w triplikatach. Ten zabieg zapewne uniemożliwił zestawienie wyników jakości nasienia (CASA) z chociażby ilościowym występowaniem białek u danego osobnika (wyrażonym chociażby poprzez gęstość optyczną w tabeli 1). W mojej ocenie, dla opisanych w pracy wyników wskazujących na funkcje białek zidentyfikowanych we frakcji wolnej (wewnątrzkomórkowej) i związanej z błonami, nie ma to

większego znaczenia. Jednakże zabieg łączenia prób, wynikający zapewne z technicznej konieczności uzyskania większych objętości materiału do badań, zniweczył możliwość realnego poszukiwania markerów jakości plemników psów. Uwaga ta jednak, nie stanowi negatywnej oceny wykonanej przez doktorantkę pracy, a jedynie wyraża nadzieję, że w przyszłości i takie wyzwania badawcze, często zmuszające do pracy na mikro ilościach materiału, podejmie w swojej karierze naukowej Pani Anna Żmudzińska.

W swojej drugiej pracy doktorantka podejmuje się odpowiedzi na pytanie, czy wiek psa ma wpływ na proteom plemników najądrzowych? W pracy wykorzystano materiał pobrany od 30 psów. Psy pogrupowano w 3 grupy wiekowe G1- młode (12-41 miesięcy), G2 – dorosłe (42-77 miesięcy) oraz G3 – stare (78-132 miesięcy). Wyniki jakości plemników określone przez system CASA uzyskane w tych grupach wskazywały wyraźną tendencję spadkową wraz z wiekiem. Ten pierwszy wynik istotnie wskazuje na możliwość istnienia markerów biologicznych starzenia się samców psów w materiale pobranym z ich najądrzy. W dalszych badaniach doktorantka zidentyfikowała liczne białka, za pomocą spektrometrii mas. Obecność białek ACTB, CE10, NPC2, CRISP2, których niska zawartość związana była z grupą G1 (psy młode) oraz G3 (psy stare), badaczka potwierdziła jeszcze metodą western-blot. Według doktorantki wynik ten może wskazywać, że w zależności od wieku psa, różne metaboliczne szlaki w plemnikach najądrzowych psa mogą ulegać intensyfikacji, co może być związane z procesami starzenia się. Ponadto w pracy zidentyfikowane zostały dwa białka charakterystyczne dla nasienia młodych psów (peroksydaza glutationowa oraz hialuronoglukozoaminidaza). Dla nasienia psów dojrzałych zidentyfikowano aż pięć unikalnych białek endo-beta-N-acetyloglukozoaminidazę (ENGASE), ELSPBP1, RNASE9, klusterynę (CLU) oraz PLEKHH1. Z kolei u psów starych stwierdzono obecność trzech białek charakterystycznych w najądrzowych plemnikach: LOC607874, FAM 135A, ASPM. Białka te dotąd nie były identyfikowane w nasieniu i tkankach psa.

Główną funkcją większości zidentyfikowanych białek było wiązanie/przyłączanie (ang. *binding*). W pracy zidentyfikowano główne szlaki metaboliczne, których białka dominowały w poszczególnych grupach wiekowych psów. I tak, dla psów młodych głównymi szlakami były: transport białek, przetwarzanie białek, szlak sygnałowy Ras. Z kolei dla psów dojrzałych były to: białka związane z infekcją Salmonelli, transkrypcyjna dysregulacja w raku oraz połączenia przylegające. Doktorantka biegle posługuje się językiem naukowym oraz bardzo dobrze wykorzystuje narzędzia bionformatyczne w celu jak najdokładniejszego opisania uzyskanych wyników. Wiedza zootechniczna opanowana przez p. Annę Żmudzińską umożliwiła jej napisanie bardzo precyzyjnych akapitów dotyczących płodności psa i podstaw andrologii w

obu publikacjach. Zdobytą w trakcie studiów wiedzę doktorantka aktywnie poszerza, dzięki umiejętnemu wykorzystaniu metod badawczych w trakcie prac związanych z realizacją przedstawionej do oceny dysertacji. Tak dogłębne badania plemników psów są jednymi z pierwszych w literaturze, stąd o ich znaczeniu trudno jeszcze jednoznacznie przesądzić, a w szczególności trudno jeszcze potwierdzić, czy znalezione różnice istotnie mogą stanowić wartość diagnostyczną w przypadku płodności samców psów. W tym miejscu chciałbym zwrócić uwagę, że brak mi w obu pracach krytycznie przedyskutowanego wpływu łączenia prób na wyniki badań. Wydaje się, że w przypadku łączenia prób, może dojść do nadreprezentacji białek, które będą wyrazem jedynie złego stanu zdrowotnego (obecnego lub poprzedzającego badanie), lub lokalnego stanu zapalnego (możliwe, że i nowotworzenia), jednego lub więcej osobników w grupie. Stąd na przykład, obecność białek związanych z infekcją Salmonelli w grupie psów dojrzałych. Także brak grupy psów tej samej rasy w badaniu budzi moje zastrzeżenia, co do szerszych możliwości interpretacyjnych przedstawionych wyników. Doktorantka wyraźnie zdaje sobie sprawę z pewnych ograniczeń grup badawczych, gdyż swoje sugestie co do znaczenia wyników formułuje bardzo ostrożnie. Ograniczenia te są często nie do uniknięcia (wielkość próbki, koszt jednostkowy badania etc.), dlatego też moje krytyczne uwagi absolutnie nie mają na celu umniejszyć przedstawionych w dysertacji badań.

Biorąc pod uwagę cele badawcze, praca p. mgr inż. Anny Żmudzińskiej może mieć duże znaczenie praktyczne w przyszłości. Jeżeli odkryte przez doktorantkę zależności w występowaniu białek określonych szlaków u psów w różnych grupach wiekowych zostaną potwierdzone, możliwe jest przygotowanie testów antygenowych lub podobnych do diagnostyki procesów starzenia u samców psów. Mogłoby to być bardzo przydatne narzędzie zwłaszcza dla osób zajmujących się zawodowo hodowlą psów rasowych, gdzie jakość potomstwa jest bardzo ważnym czynnikiem sukcesu. Sama z kolei optymalizacja procesu sonikacji także może przydać się innym badaczom w prowadzeniu doświadczeń z wykorzystaniem plemników psów.

Podsumowując, recenzowana praca spełnia wszystkie kryteria właściwe dla rozpraw doktorskich, co uzasadnia postawienie wniosku o przyjęcie rozprawy doktorskiej, dopuszczenie jej do publicznej obrony i kontynuowanie czynności w ramach przewodu doktorskiego p. mgr inż. Anny Żmudzińskiej.

Ponadto, biorąc pod uwagę fakt, że obie prace ukazały się w czasopismach naukowych o znaczących wartościach wpływu (IF) oraz fakt, że badaczka bardzo biegle posłużyła się tak klasycznymi, jak i nowymi metodami badawczymi oraz przedstawiła wyniki w sposób

niezwykle czytelny, stosując adekwatne testy statystyczne i co więcej, zachowała racjonalną ostrożność w interpretowaniu osiągniętych wyników, uważam, że doktorat p. mgr inż. Anny Żmudzińskiej zasługuje na wyróżnienie.



Radosław Kowalski, PhD, Eng., *Olsztyn, 23.01.2023*
Institute of Animal Reproduction and Food Research PAS
Department of Gamete and Embryo Biology
Molecular Andrology Team

Review of the doctoral dissertation

Review of the doctoral thesis prepared by Anna Żmudzińska "AGE RELATED CHANGES IN PROTEOME AND QUALITY PARAMETERS OF SONICATED DOG EPIDIDYMAL SPERMATOZOA"

The review was prepared in connection with the appointment by the Scientific Council of the Faculty of Animal Bioengineering of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn to act as a reviewer in the proceedings for granting the degree of doctor to Anna Żmudzińska.

Following article 187(1) Law on Higher Education and Science of 20 July 2018 (consolidated text: Journal of Laws of 2022, item 574, as amended), the doctoral dissertation should present the candidate's general theoretical knowledge in the discipline or disciplines and the ability to independently conduct scientific or artistic work. Its subject should be an original solution to a scientific problem, an original solution to the application of the results of one's scientific research in the economic or social sphere, or an original artistic achievement. Doctoral dissertation may be a written work, including a scientific monograph, a collection of published and thematically related scientific articles, design, construction, technological, implementation or artistic work, as well as an independent and separate part of a collective work. It should be accompanied by a summary in English, and a summary in Polish for a doctoral dissertation prepared in a foreign language. If the doctoral dissertation is not a written work, a description in Polish and English is attached.

It is from the perspective of these criteria that the doctoral dissertation presented by Anna Żmudzińska will be evaluated.

Formal assessment of dissertation

The doctoral dissertation is the basis for applying in the procedure for obtaining a doctoral degree at the University of Warmia and Mazury in Olsztyn at the Faculty of Animal Bioengineering. The work was carried out at the Department of Animal Biochemistry and Biotechnology under the supervision of Prof. Marzena Mogielnicka-Brzozowskaand the second supervisor, Prof. Magdalena Zielińska. The dissertation was prepared in English. The work has 76 pages and together with the statements of the author and co-authors of the publication, 85 pages.

The doctoral dissertation consists of two papers published in scientific journals. The first paper was published in the journal Animals (IF=3.231), while the second was in the International Journal of Molecular Sciences (IF=6.208). The doctoral dissertation has a properly formatted title page where, next to the title, information is placed by whom and where the work was performed and under whose scientific care. The work opens with a list of two publications. The next part of the work is a list of shortcuts. Then the doctoral student presents a synthetic summary of the work in Polish and English. The abstract is accompanied by a list of keywords.

The next part of the work is the introduction, which ends with the presentation of the purpose of the work.

Next, the PhD student presents the materials and methods used in the work. The fifth part is a description of the results published in the doctoral student's work and the conclusions resulting from them. The next part, the sixth, is a list of bibliographies used in the earlier parts of the dissertation. After the bibliography, the doctoral student presents both publications, in which she is the leading author, published in scientific journals. Since the doctoral dissertation consists of multi-author publications, as a set of attachments to the dissertation, the doctoral student includes statements about the degree of participation of herself (in both works it is 65%) and co-authors in the creation of the work.

Since the doctoral dissertation consists of scientific publications, I proceed to discuss the literature used in them.

In the first paper out of 103 publications, 23 are works published in the last 5 years. In the second paper, out of 100 cited publications, 20 are publications from the last 5 years. The cited papers come from peer-reviewed journals, among which there is no shortage of leading ones in the field of reproductive biology (Biology of Reproduction, Journal of Andrology, Molecular Reproduction and Development).

The work meets the formal criteria of a scientific dissertation that may be the basis for awarding a doctoral degree.

Substantive assessment of work

The study aimed to investigate the relationship between conventional "functional quality" and the proteome of sperm epididymis of dogs of different ages. In addition, intracellular and membrane-bound fractions of sonicated sperm epididymis of dogs were analyzed proteomically. One of the goals of the work was also to develop optimal sonication conditions to obtain the most effective breakdown of sperm structures enabling protein isolation.

The specific objectives were to:

I. analyze the effect of various sonication parameters on the type and percentage of secondary morphological changes in the dog's epididymal spermatozoa (Paper I);

II. analyze the influence of various sonication parameters on the total protein content in the intracellular and membrane-associated fractions of the sperm (Paper I);

III. demonstrate the differences in the protein composition of intracellular and membrane-associated fractions of the sperm and identify selected proteins by mass spectrometry (Paper I);

IV. study the parameters of cauda epididymal sperm quality (concentration, motility) and search for the relationship between the above-mentioned parameters and the age of the dogs (Paper II);

V. analyze the effect of male age on morphological changes in the dog's epididymal spermatozoa (Paper II);

VI. analyze the total proteome of the dog epididymal spermatozoa according to the age group (Paper II);

VII. identify proteins showing a correlation with the age of dogs to distinguish epididymal sperm proteins as potential markers of ageing (Paper II).

Taking into account the lack of information in the scientific literature on the protein markers of ageing of male dogs, substantively, I assess the topic taken up by Ms Anna Żmudzińska as very ambitious and deserving of searching for answers. In addition, the doctoral student achieved this goal thanks to the gradual expansion of her research workshop. The first work was methodical, optimizing the process of obtaining free proteins (identifiable ones) by manipulating sonication parameters. Such an approach in science is extremely valuable because it allows not only answers the main question posed by the researcher but also helps to provide a tool for further research to other scientists. My only reservation is the title of the work, prepared for submitting the dissertation for evaluation. In my opinion, the word sonication was used unnecessarily, which may lead to the misconception that the work will present differences in sperm quality after sonication. Sonication itself is an inherently destructive process. In the work, it was used as a tool to break down sperm structures to isolate/separate proteins. Therefore, I believe that although sonication and the selection of its parameters was an important part of the work, there is no need to include the word sonication in the title of the dissertation.

In the research, the doctoral student used methods currently considered classical, such as microscopy, SDS-PAGE electrophoresis, CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), and slightly more modern methods such as mass spectrometry (NanoUPLC-Q-TOF/MS and LC-MS). The PhD student also used the Gene Ontology analysis, thanks to which the researcher presented a functional classification of identified proteins of the dog's epididymal sperm. The methodological skills and proficiency in the use of statistical tools of the doctoral student deserve high recognition.

In her first work, the doctoral student used several variants of sonication at a frequency of 60 kHz S1—5 min, 50W; S2—10 min, 50W; S3—30 min, 50W; S4—10 min, 150W. One of the first important results of the work was the doctoral student's statement that with sonication values of 150W for 10 minutes, it is possible to separate the sperm head and its tail. Among the isolated epididymal proteins of dog sperm, proteins associated with the membrane fraction predominated. However, many of the proteins identified in the membrane and intracellular fractions turned out to be identical. The functions of the identified proteins in the intracellular fraction relate mainly to the glycolysis pathway and the Wnt signalling pathway.

The doctoral student visualized the results of the analyses very well by introducing their hierarchical and functional schemes based on the Gene Ontology analysis. The tables and graphs are legible and the presentation of key results is not objectionable. However, I have one reservation about combining samples indicated in the description of SDS-PAGE. In the work, the number n = 15 is constantly given under the graphs, however, for electrophoresis and perhaps mass spectrometry analysis, the samples were combined and analyzed in triplicates. This procedure probably made it impossible to compare sperm quality results (CASA) with even the quantitative occurrence of proteins in a given individual (expressed, for example, by optical density in Table 1). In my opinion, for the results described in the work indicating the functions of proteins identified in the free (intracellular) fraction and associated with membranes, it does not matter much. However, the procedure of combining samples, probably resulting from the technical need to obtain larger volumes of material for testing, destroyed the possibility of a real search for markers of sperm quality in dogs. This remark, however, does not constitute a negative assessment of the work performed by the doctoral student, but only expresses hope that in the future such research challenges, often forcing to work on micro amounts of material, will be taken up by Ms Anna Żmudzińska in her scientific career.

In the second work, the doctoral student undertakes to answer the question of whether the age of the dog has an impact on the proteome of epididymal sperm proteins. The work used material taken from 30 dogs. Dogs were grouped into 3 age groups: G1 – young (12-41 months), G2 – adult (42-77 months) and G3 – old (78-132 months). The CASA sperm quality scores obtained in these groups showed a clear downward trend with age. The first result significantly

indicates the possibility of biological markers of ageing in male dogs in material taken from their epididymis. In further research, the doctoral student identified numerous proteins using mass spectrometry. The presence of ACTB, CE10, NPC2, and CRISP2 proteins, which low content was associated with the G1 group (young dogs) and G3 (old dogs), was confirmed by the researcher using the western-blot method. According to doctoral research, this result may indicate that, depending on the age of the dog, different metabolic pathways in the dog's epididymal sperm may intensify, which may be related to ageing processes. In addition, two proteins which were characteristic for young dog semen (glutathione peroxidase and hyaluronoglucosaminidase) were identified in this work. As many as five unique proteins endo-beta-N-acetylglucosaminidase (ENGASE), ELSPBP1, RNASE9, clusterin (CLU) and PLEKHH1 were identified for the semen of mature dogs. In turn, in old dogs, the presence of three proteins in epididymal sperm was found: LOC607874, FAM 135A, ASPM. These proteins have not yet been identified in the dog's semen and tissues.

The main function of most of the identified proteins was binding. In the study it was identified the main metabolic pathways whose proteins dominated in individual age groups of dogs. And so, for young dogs, the main pathways were: protein export, protein processing, Ras signaling pathway. For mature dogs, these were: proteins associated with Salmonella infection, transcriptional misregulation in cancer, and adherens junction. The doctoral student is fluent in scientific language and very well uses biocomputing tools in order to describe the obtained results as accurately as possible. Zootechnical knowledge mastered by Anna Żmudzińska enabled her to write very precise paragraphs on dog fertility and the basics of andrology in both publications. The doctoral student actively expands the knowledge gained during the studies, thanks to the skillful use of research methods during the work related to the implementation of the dissertation presented for evaluation. Such in-depth studies of dog sperm are one of the first in the literature, hence their importance is still difficult to determine unequivocally and, in particular, it is difficult to confirm whether the differences found can indeed constitute a diagnostic value in the case of male dog fertility. At this point, I would like to point out that I do not have in both papers critically discussed the impact of pooling samples on research results. It seems that if the samples are pooled, there may be an overrepresentation of proteins that will only be an expression of poor health (current or preceding the study), or local inflammation (possibly cancer), of one or more individuals in the group. Hence, for example, the presence of proteins associated with Salmonella infection in a group of mature dogs. Also, the lack of a group of dogs of the same breed in the study raises my reservations about the wider interpretation possibilities of the presented results. The doctoral student is clearly aware of some limitations of presented data, because she formulates her suggestions as to the significance of the results very carefully. These limitations are often unavoidable (sample size, cost of the single analysis, etc.), therefore, my criticisms are absolutely not intended to diminish the research presented in the dissertation.

Nevertheless, the study of Anna Żmudzińska may have great practical significance in the future. If the relationships discovered by the doctoral student in the occurrence of proteins of specific pathways in dogs in different age groups are confirmed, it is possible to prepare antigens or similar tests for the diagnosis of ageing processes in male dogs. This could be a very useful tool, especially for people professionally engaged in breeding purebred dogs, where the quality of offspring is a very important success factor.

To sum up, the reviewed work meets all the criteria appropriate for doctoral dissertations, which justifies requesting the doctoral dissertation for admission to public defence and continuation of activities within the doctoral dissertation of Anna Żmudzińska.

In addition, taking into account the fact that both papers were published in scientific journals with significant impact values (IF) and the fact that the researcher was very fluent in using both classical and new research methods and presented the results in an extremely clear way, using adequate statistical tests and she kept rational caution in interpreting the achieved results, I think that the doctoral thesis of Anna Żmudzińska deserves to be distinguished.

