Wrocław, 17.09.2023r.

Dr hab. Agnieszka Partyka
Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Ocena pracy doktorskiej
mgr inż. Katarzyny Teresy Rafalskiej pt.: "Analiza fosfoproteomów ejakulatów indorów (Meleagris gallopavo) o zróżnicowanej jakości biologicznej"

Jakość nasienia jest kluczowym determinantem sukcesu reprodukcyjnego ptaków, a badania nad nią odgrywają kluczową rolę w zrozumieniu biologii rozrodu i zachowania wielu gatunków. Jednym z interesujących aspektów w analizie jakości nasienia u indorów jest występowanie syndromu nasienia żółtego, który stanowi istotne wyzwanie dla przemysłu drobiarskiego. Syndrom ten manifestuje się zmienioną barwą nasienia, która z kolei towarzyszy niższym parametrom ilościowym i jakościowym ejakulatów. Jest to problem o potencjalnie dużej ekologicznej i ewolucyjnej doniosłości, która wymaga głębszego zrozumienia.

Jednak to nie wszystko, co stanowi temat tej rozprawy. Analiza fosfoproteomów w nasieniu indorów to kolejny obszar, który przyciąga naszą uwagę. Jest to zagadnienie, które ma ogromne znaczenie dla poznania molekularnych mechanizmów regulujących procesy reprodukcyjne. Poznanie, jak zmienia się skład fosfoproteomów w zależności od koloru nasienia oraz dwóch sezonów wiosenno-letniego i jesienno-zimowego, może rzucić światło na funkcje tych białek i ich roli w zapłodnieniu.

Wszystko to prowadzi do istotnych pytań badawczych: Czy istnieją róznice w składzie fosfoproteomów nasienia indorów pochodzących z ejakulatów prawidłowych i z syndromem żółtego nasienia? Czy sezon może mieć wpływ na fosfoproteom plazm nasienia i plemników indorów? Czy profil ufosforylowania białek nasienia indorów może zależeć od wybranych parametrów ilościowych i jakościowych ejakulatów? Odpowiedzi na te pytania mają znaczenie zarówno w kontekście zwiększenia wskaźników zapłodnienia po sztucznej inseminacji indyczek, jak i w rozwoju naszej wiedzy na temat biologii rozrodu ptaków. W niniejszej pracy doktorskiej przeprowadzona analiza i interpretacja wyników tych badań stanowią istotny krok w zrozumieniu tych skomplikowanych zagadnień.

W przedstawionej do oceny rozprawie Doktorantka podjęła się przeanalizownia fosfoproteomów plazmy nasienia i plemników pochodzących z ejakulatów prawidłowych i z syndromem żółtego nasienia podczas wiosenno-letniego i jesienno-zimowego sezonu. Dodatkowo również zabadała jakość nasienia indorów. Uważam, że podjęta tematyka badawcza jest oryginalna i ważna zarówno dla badań podstawowych w zakresie poszerzenia wiedzy na temat fizjologicznych i biochemicznych podstaw funkcjonowania nasienia ptaków oraz dla badań aplikacyjnych.

Podstawą formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Teresy Rafalskiej jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 21 października 2022 roku.

Przedstawiona rozprawa doktorska liczy 295 stron opisu badań wraz z piśmiennictwem i jest uzupełniona o spis tabel i rycin. Rozprawa została zrealizowana pod kierunkiem dr hab. inż. Pawła Wysockiego prof. UWM oraz Pani promotor pomocniczej dr inż. Aleksandry Orzołek.

Praca składa się ze spisu treści, wykazu skrótów, wstępu i przeglądu piśmiennictwa, hipotezy badawczej i celu pracy, materiału i metod, wyników, dyskusji, wniosków i piśmiennictwa. W dalszej kolejności umieszczono streszczenie pracy w języku polskim oraz angielskim. Praca została wzorowo przygotowana pod względem redakcyjnym.

Omówienie rozprawy

Temat ocenianej pracy doktorskiej jest bardzo aktualny i wpisuje się doskonale w najnowsze trendy badań naukowych dotyczących rozrodu zwierząt.

Wstęp obejmuje sześć podrozdziałów wprowadzających do tematyki rozprawy. Doktorantka przedstawiła charakterystykę gatunku indyka domowego, następnie opisała zagadnienia dotyczące sztucznego unasienniania, przechowywania oraz kriokonserwacji nasienia. W dalszej kolejności skupiła się na potencjalnej sezonowości indyków w chowie i hodowli, nawiązując do zagadnienia stresu cieplnego u ptaków i opisując go obszernie w tym podrozdziale. Kolejno opisała charakterystykę nasienia indorów przedstawioną z dużą dokładnością, bazując na pokaźnej liczbie starszych oraz najnowszych publikacji. W przedostatnim rozdziale Autorka skupiła się na syndromie żółtego nasienia u indorów, a w ostatnim opisała proteomikę, nawiązując do metod stosowanych w tej dziedzinie, a kończąc na opisie fosfoproteomiki i fosfoprotein.

W tej części opracowania Autorka wykazuje się bardzo dobrą znajomością tematu, porusza się bardzo swobodnie w zagadnieniach dotyczących biologii rozrodu ptaków i potwierdza bardzo dobrą znajomość piśmiennictwa. Moim zdaniem przedstawione

zagadnienia zostały opisane wyczerpująco i stosownie do uwarunkowań rozprawy doktorskiej.

W dalszej kolejności Doktorantka zawarła trzy hipotezy badawcze oraz cel pracy, który jednoznacznie wskazuje na zakres prowadzonych badań.

Jak zaznaczono w rozdziale "Materiał i metody" badania zostały wykonane na 100 ejakulatach indorów (*Meleagris gallopavo*) linii BIG-6 (Aviagen, Huntsville, AL, USA) pobranych od ptaków pomiędzy 39 a 42 tygodniem życia. Połowę z nich stanowiło nasienie sklasyfikowane jako białe, a kolejną ejakulaty od indorów z syndromem żółtego nasienia. W tym rozdziale Autorka opisała metodykę pobierania nasienia i oceny koncentracji plemników, parametrów ruchliwości plemników z użyciem systemu CASA, barwienia fluorescencyjne z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej, metod ilościowych: oznaczania aktywności enzymów antyoksydacyjnych takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), peroksydaza glutationowa (GPx), katalaza (CAT), a także oznaczania aktywności zredukowanej formy glutationu (GSH), zawartości mandialdehydu MDA, aktywności fosfataz alkalicznej (ALP) i kwaśnej (ACP). W dalszej kolejności Doktorantka zawarła metodykę izolacji fosfoprotein i analizy mas cząsteczkowych fosfoprotein plazm nasienia oraz ekstraktów plemnikowych za pomocą różnych rodzajów rozdziałów elektroforetycznych (Native-PAGE, Tricine-PAGE, Urea-PAGR, SDS-PAGE, 2D-PAGE). Dodatkowo przedstawiła szczegóły elektrotransferu i immunodetekcji fosfoprotein. Identyfikację fosfoprotein nasienia Autorka wykonała za pomocą spektrometrii mas Nano LC-MS/MS oraz MALDI-TOF/TOF, a na koniec przeprowadziła charakterystykę i analizę zidentyfikowanych fosfoprotein za pomocą ogólnodostępnych darmowych baz internetowych takich jak NCBI, UniProt oraz PhosphoSitePlus®, a także programów ShinyGo 0.77 i STRING 11.5.

Dobór metod oceny materiału należy uznać za trafny, a liczba i wszechstronność badań i analiz proteomicznych oraz zastosowanie czułych i zaawansowanych metod jest imponująca. Opanowanie takiego warsztatu metodycznego jest godne podkreślenia i pochwały.

Omówienie wyników badań Autorka podzieliła na dwanaście działów opisując skrupulatnie uzyskane rezultaty. W ramach tej pracy badawczej Doktorantka wykazała, że nasienie o kolorze żółtym u indorów charakteryzuje się niższymi parametrami jakościowymi w porównaniu do nasienia o kolorze białym. Pani Magister po raz pierwszy przedstawiła wpływ sezonu na wybrane parametry biologiczne i biochemiczne nasienia indorów. Ponadto, badania Autorki potwierdziły, że zarówno obecność syndromu żółtego nasienia, jak i sezon mają wpływ na profil i stopień fosforylacji reszt serynowych i tyrozynowych białek. W

analizowanym nasieniu indorów zidentyfikowała łącznie 142 fosfoproteiny. Wśród nich znalazły się białka kodowane przez geny takie jak UBB, RPS27A, SPATA18, CDC42, ACTN, TBB, ACTA, ODF2, GAPDH, PGAM, PGK, TPI, ALDOC, LDH, SDHA, FASN, APOA, CKM, GOT, CA, CALM, TRFC, FTH, HSPA, HSP, GST, PRDX, QSOX, ASTL, ANXA, ACR, GSN, VDAC oraz PLCZ1. Doktorantka przedstawiła różnorodne funkcje zidentyfikowanych fosfoprotein, takie jak udział w interakcji i wiązaniu się plemnika z komórką jajową, w procesie zapłodnienia, organizacji cytoszkieletu, metabolizmie plemników, transporcie wewnątrzkomórkowym oraz ustalaniu składów proteomów w poszczególnych przedziałach komórkowych.

Rozdział „Dyskusja", zawiera interpretację uzyskanych wyników i pokazuje, że Doktorantka jest bardzo dobrze zorientowana w omawianej problematyce. W mojej ocenie wykorzystała wszystkie prace istotne dla analizy przeprowadzonych badań. Dużym wyzwaniem tej części rozprawy była mnogość uzyskanych wyników oraz ich duża zmienność w zależności od poszczególnego wyznacznika. Autorka zdecydowała się na podzielenie dyskusji na podrozdziały odpowiadające wynikom, co należy uznać za korzystne. Następnie, w oparciu o wyniki badań sformułowała 8 wniosków.

W streszczeniu napisanym zarówno w języku angielskim jak i polskim Doktorantka przedstawiła syntetycznie i bardzo jasno uzyskane w doświadczeniach wyniki.

Do szczególnych walorów przedłożonej pracy zaliczam:

1. Zaawansowana, nowoczesna i bogata metodyka badań proteomicznych.
2. Wkład i nowatorstwo w reprezentowaną dziedzinę wiedzy; wyniki stanowią oryginalny wkład twórczy w rozwój dziedziny.
3. Zdolność do syntetycznego i zrozumiałego opisu trudnych zależności i umiejętność prowadzenia dyskusji naukowej.

Z obowiązku recenzenta chciałabym jednak podkreślić pewne zagadnienia do rozważenia dla Doktorantki oraz przedstawić moje uwagi:

1. We wstępie, rozdziale 1.2. nie do końca zgadzam się z przedstawionym opisem, np. „Pierwsze próby zamrażania nasienia przeprowadzano na ejakulatach kogutów. Próby zakończyły się częściowym sukcesem (Blesbois 2007, Iaffaldano i in. 2016)." Pierwsze próby mrożenia nasienia nie miały miejsca w latach z załączonych publikacji cytowanych. Jeśli wzięlibyśmy wyniki z cytowanych prac, to próby mrożenia nasienia kogutów oraz indorów były całkiem udane. Dalej możemy przeczytać: „W przypadku

ptaków kriokonserwacja wykorzystywana jest niezwykle rzadko. Przyczyną takiego stanu rzeczy jest brak odpowiedniego rozcieńczalnika, który utrzymałby jakość nasienia po przeprowadzeniu procedury mrożenia/rozmrożenia ejakulatu." Moim zdaniem przyczyną takiego stanu rzeczy jest zastosowany środek krioochronny a nie rozrzedzalnik. Oraz „Dostępnych jest kilka rozcieńczalników komercyjnych, można także przygotować je samodzielnie. Żaden z nich nie wpływa jednak na utrzymanie właściwości plemników przy 24 czy 48-godzinnym okresie przechowywania nasienia." Istnieje wiele prac pokazujących, że przechowywanie nasienia przez 24-48 godz jest bardzo efektywne.

2. W materiałach i metodach nasuwają mi się następujące pytania oraz przemyślenia:
   - Dlaczego w ocenie integralności błon komórkowych plemników opisano, że ewaluacji poddaje się tylko rejon akrosomowy, jeśli zastosowany barwnik ma możliwość wnikania do główki plemnika na całej jej powierzchni?
   - Zastosowany do oceny funkcjonalności mitochondriów barwnik JC-1 posiada właściwości różnicowania plemników na takie z wysokim potencjałem mitochondrialnym oraz niskim, natomiast w pracy określenie odsetek plemników z funkcjonalnymi mitochondriami nie wskazuje, która populacja była brana pod uwagę.
   - Barwienie YO-PRO1 i PI zakłada, że apoptotyczne plemniki barwią się na zielono, natomiast jeśli w plemniku pojawia się kolor czerwony pochodzi on z PI co automatycznie powinno kwalifikować komórki jako plemniki martwe. Zakwalifikowanie plemników z czerwoną wstawką jako żywe w tym barwieniu jest moim zdaniem błędne.
3. W rozdziale wyników zastanowiło mnie czy w analizie parametrów biologicznych plazm i plemników indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym (4.2) brano pod uwagę występowanie syndromu żółtego nasienia? Ten fakt uwzględniono wyraźnie w tabeli 4.74, natomiast nie wspomniano o tym w tabelach tego podrozdziału.
4. Dlaczego w porównaniu profili białkowych wybranych plazm nasienia indorów w sezonach wiosenno-letnim i jesienno-zimowym uzyskanych metodą Native-PAGE w białym nasieniu analizowano 4 próbki, a w nasieniu żółtym 8 próbek?
5. W dyskusji bardzo ciekawym fragmentem omawianym przez Doktorantkę było zagadnienie dotyczące kapacytacji plemników. Niemniej jednak zabrakło mi wypowiedzi/opinii Pani mgr czy na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić

że kapacytacja plemników indorów ma miejsce, czy definitywnie plemniki indorów temu procesowi nie podlegają.

6. Zastanawia mnie również fakt zamiennego stosowania terminu „reszty tyrozylowe/serylowe" z „resztami tyrozynowymi". To drugie określenie wydaje się być poprawne z uwagi na tyrozynę, serynę, a nie tyrozylę, serylę.

Wyszczególnione wyżej niedoskonałości mają charakter wyłącznie porządkowy i nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Praca została zrealizowana z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych i wnosi nowe elementy poznawcze dotyczące funkcjonowania układu rozrodczego i rozwoju gamet ptaków. Wyniki posiadają dużą wartość poznawczą, jak i praktyczną.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Teresy Rafalskiej odpowiada w pełni wymogom stawianym dysertacjom na stopień naukowy doktora, określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2023 r. poz. 742).

W oparciu o powyższą ocenę przedkładam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Teresy Rafalskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego. Jednocześnie uwzględniając wysoką jakość przeprowadzonych badań, ogrom pracy włożonej przez Doktorantkę w powstanie dysertacji, przydatność uzyskanych wyników zarówno w celach poznawczych jak i praktycznych, składam wniosek o wyróżnienie wymienionej pracy.

Dr hab. Agnieszka Partyka, prof. UPWr

Agnieszka Partyka