

Wrocław, 03.01.2023

Dr hab. Agnieszka Partyka

Department of Reproduction and Clinic of Farm Animals

Faculty of Veterinary Medicine

Wroclaw University of Environmental and Life Sciences

**Evaluation of doctoral dissertation
of Anna Żmudzińska M.Sc entitled "Age related changes in proteome and quality
parameters of sonicated dog epididymal spermatozoa"**

The issues related to the influence of males age on the quality of their semen, conception rates, unfavourable pregnancy outcomes, and the health of offspring are beginning to be addressed more and more frequently in animals. Previous studies confirm only a gradual decrease in reproductive potential in aging males, without further and advanced attempts to explain the nature and mechanism of age-related changes and to find a link between impaired sperm function and the possibility of a higher risk of developmental defects in offspring.

Dogs seem to be a very good biomedical model for research in this area. There is the possibility of easy access to semen samples or epididymal sperm, the possibility of comparing the assessment of the semen or/and sperm quality using in vitro methods with biological tests such as the results of artificial insemination, and the possibility of checking the functional ability of sperm to fertilize using competence tests, which can be extremely difficult or simply impossible for humans. We also have the ability to create uniform groups of males divided according to their age and exclude individuals with health disorders to avoid ambiguous results.

In this context, the research conducted by the PhD student on the dogs epididymal sperm meets the needs of current biology science, human medicine, and veterinary medicine. The author examined the influence of the age of dogs on changes in the proteome and the quality parameters of epididymal sperm subjected to sonication, and presented the proteomic analysis of intracellular protein fractions (SIPs) and membrane-associated proteins (SMAPs) along with the determination of optimal sonication parameters for separation of morphological structures of epididymal sperm and isolation of sperm proteins.

The formal basis for evaluation of Anna Żmudzińska's doctoral thesis is the resolution of the Scientific Council of the Discipline of Zootechnics and Fisheries of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn of October 27, 2022.

The presented doctoral thesis consists of 76 pages of research description along with copies of published works constituting a series submitted for evaluation with the references and is supplemented with statements of all authors of these works. The dissertation was carried out under the supervision of two Mrs. Supervisors: dr hab. Marzena Mogielnicka-Brzozowska prof. UWM and dr hab. Eng. Magdalena Zielińska, prof. UWM during interdisciplinary doctoral studies in the field of "Bioeconomy", conducted in English. The doctoral dissertation is also written in English.

The work consists of a table of contents, a list of bibliographic data of two publications on the basis of which the dissertation was prepared, a list of abbreviations, abstracts in English and Polish, introduction, aims, material and methods, results and summary of papers, conclusions, and bibliography. Subsequently, complete copies of two published articles and statements regarding the authors' participation in their preparation were placed. On the bibliographic data page of publication, there is information that the research was carried out as part of the financial support of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn No. 11.610.003-300.

The doctoral dissertation consists of two original papers published in very good journals from the JCR list: *Animals* and *International Journal of Molecular Sciences*. The total Impact Factor of the works included in the doctoral dissertation is 9.439 and 240 MEiN points. The papers were published in 2022 and the PhD student is the first author in them and was responsible for developing the research concept and carrying out the main part of the work. The works are thematically coherent and concern the same issue.

In an abstract written in English and Polish, the doctoral student presented the results obtained in the experiments in a synthetic and very clear way.

In a two-page introduction, the PhD student described the potential of using dog epididymal sperm in assisted reproductive techniques (ART). It also indicates that the dog can be a good research model in human reproduction, and research on the presented issue can affect the development of ART methods in humans. The PhD student presents that there are grounds for research aimed at examining the effect of age on the quality of semen in dogs, because in this species such relationships in males have not been fully understood. An interesting and not fully understood problem is also the change in protein composition during the aging of the epididymis and epididymal spermatozoa. The PhD student describes the role of the epididymis

in sperm maturation, the characteristics of epididymal sperm, and emphasizes the importance of learning the functions of sperm proteins that would allow to determine their biological value in reproductive processes. In addition, the author describes sonication as a method that allows cell damage and isolation of its components. It is emphasized that in the presented dissertation, this method was used to improve the extraction of proteins from the epididymal sperm of dogs.

In this part of the study, the author demonstrates a very good knowledge of the subject, moves very freely in issues related to reproductive biology, and confirms a very good knowledge of the literature.

The primary objective of the study was to determine the relationship between functional quality and proteome of epididymal sperm of dogs of different ages. In addition, the PhD student set herself the goal of finding the optimal sonication parameters of epididymal spermatozoa and analyzing the fractions of intracellular proteins and sperm membranes. Detailed objectives are presented in 7 points.

As noted in the "Material and Methods" chapter, the research was based on the opinion of the Local Ethical Committee for Animal Experiments in Olsztyn. The research was carried out on a total of 45 mixed breed dogs aged 1 to 11 years, weighing between 9 and 33 kg. The dogs were routinely castrated and the collected testes and epididymis were transported in 0.9% NaCl at 4°C to the laboratory of the Department of Animal Biochemistry and Biotechnology. Sperm collected from the tails of the epididymis constituted the research material in both publications. This part of the dissertation was described by the author as common to both publications.

After isolation, the spermatozoa were assessed for quality, which included the study of their concentration and motility parameters. Sperm morphology was assessed by Spermac staining. First, the sperm were pre-prepared for sonication, and then the sonication procedure was performed. After this stage, the material was prepared for further analysis. It assessed, among others, the total protein content. For proteomic analysis, polyacrylamide gel electrophoresis was performed. Proteins were identified using ultra-performance nanoliquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry (NanoUPLC-Q-TOF/MS) and bioinformatics tools. Western blot analysis was performed to confirm the identified proteins.

Statistical analysis was performed using the Statistica 13.1 computer program and statistical differences were determined using various and appropriately selected statistical tests, according to the distribution of data and the type of data being compared, using Student's t-test and ANOVA.

The selection of methods for assessing the material should be considered accurate, and the number and versatility of proteomic studies and analyzes as well as the use of sensitive and advanced methods is impressive. Mastering such a methodological workshop is worth emphasizing and praising.

The author divided the discussion of the research results into two sections, focusing on two articles. In this chapter, the author synthesizes and concisely explains the results obtained.

In the first article, the PhD student showed that the sonication of dog epididymal sperm for 10 minutes at 150 W is a good method of separation of sperm structures. It is noteworthy that for the first time the PhD student isolated 42 intracellular proteins and 153 epididymal sperm cells bound to the cell membrane of a dog. Based on the analysis of gene ontology, she determined their dominant molecular functions, indicating their participation in important metabolic pathways. In the case of SIP, these were the catalytic activity and the function of binding other substances. However, in the SMAP fraction, hydrolase and transferase activity were dominant.

The second article shows that the parameters of sperm quality, such as sperm concentration, total motility, progressive motility, as well as the kinetic parameters of sperm movement, such as VSL, VCL, VAP, deteriorate with the age of the dogs. Furthermore, the oldest dogs showed a significant decrease in the content of sperm with normal morphology. The mass spectrometry used in these studies allowed the identification of 1772 epididymal sperm proteins in three age groups of dogs. In dogs aged 1 to 3.4 years, the presence of 865 proteins has been demonstrated; from 3.5 to 6.4 years 472 proteins and in dogs from 6.5 to 11 years 435 proteins. The UniProt database allowed to identify 2 unique proteins in the youngest dogs, 5 unique proteins in middle-aged dogs, and 3 unique proteins in the oldest dogs. Seven proteins were found to be present in the three age groups of dogs tested, and four of these proteins showed significant variation between the groups. The analysis of Gene ontology (GO) showed similar molecular functions, biological processes, and cellular components for all age groups of dogs studied. In turn, the use of KEGG databases showed that in different age groups of dogs, various metabolic pathways in epididymal sperm are intensified, which may be related to aging processes in male dogs.

Based on the results of the study, six conclusions were formulated: 1) Sonication of dog epididymal sperm for 10 minutes at 150 W can be used to separate individual sperm structures and improve protein extraction. 2) The use of mass spectrometry and bioinformatics tools to analyze the proteome of dog epididymal spermatozoa allowed to obtain profiles of intracellular proteins and the membrane-bound fraction of gametes. 3) The results indicate the presence of

proteins with different expression in individual fractions of sperm proteins, which are crucial for the proper functioning of sperm and their ability to fertilize. It has been confirmed that these proteins are involved in important sperm metabolic pathways. 4) Dog aging is associated with a decrease in the functional quality of epididymal sperm, which can result in reduced fertility and even infertility of the examined individuals. 5) Differences in sperm protein profiles were found in young, middle-aged and older dogs related to changes in sperm metabolic pathways. This may affect the fertilization capacity of the cells mentioned above. 6) The results of the above studies on the marker proteins of epididymal sperm maturation and aging may be used in clinical andrology and in canine reproductive techniques.

The description of the works constituting the doctoral dissertation was supplemented with 50 references. Subsequently, the author presents copies of the publications constitute the dissertation.

In the final part of the work there are statements proving that the author has a 65% share in the preparation of publications constituting the cycle indicated in the doctoral dissertation. The participation of the PhD student in the preparation of the work was crucial, as it concerned the development of the research concept, laboratory tests, analysis and interpretation of results, and writing/participation in writing the manuscript. This illustrates the ability of the PhD student to independently conduct scientific work.

The special advantages of the submitted work include:

1. Very good publications that constitute the dissertation cycle, published in journals on the JCR list with a high impact factor.
2. Modern and advanced proteomic research methodology, often used for the first time in dog sperm research.
3. Contribution and innovation in the represented field of knowledge; The results are an original creative contribution to the development of the field.

It is worth emphasizing the diligence and good mastery of the scientific workshop of the PhD student.

As a reviewer, however, I would like to highlight some issues for the PhD student to consider and present my comments:

1. I would suggest the reverse numbering of publications constituting the basis of the dissertation, due to the implementation of the main goal of the doctoral thesis in publication No. 2, and the goals described as additional in publication No. 1.
2. I believe that the study of sperm concentration, motility, and morphology does not fully exhaust the concept of sperm functional quality. Assessment of the quality of gametes

could be broader (supplemented, for example, by sperm viability, mitochondrial activity). For this reason, conclusion No. 4 was drawn too hastily.

3. In the materials and methods, I would combine the assessment of sperm concentration, motility and morphology - because sperm morphology is the assessment of sperm quality.

4. The sperm morphology described in Article I should be named as an assessment of sonication-induced sperm damage.

5. In point 3.4.1. there was no explanation of what sperm parameters were tested using the CASA system. For a person familiar with this technique, of course, this is not a mystery, but the sentence "The sperm samples were subsequently assessed using a CASA system" does not give the reader any information on the assessment of sperm quality at this point.

6. In the materials and methods, in the section describing the collection of sperm from the epididymis, I miss the volume of the samples obtained, especially since such ranges are given by the PhD student for sperm concentration.

7. In the section of statistical analysis of the results there is no description of the correlation (publication no. 2) - however, such statements appear in the results of this work.

8. Chapter 6 References lacks the numbering of the works used in the dissertation.

9. I would also suggest adding at the end of the dissertation the consent/statement of the Local Ethics Committee for the research.

The above comments do not affect the substantive value of the work, and are only of an orderly nature. The research was carried out using modern research methods and introduced new cognitive elements related to the functioning of the reproductive system and the development of gametes. The results have great cognitive and practical value.

I hereby declare that Anna Żmudzińska's doctoral dissertation fully meets the requirements for doctoral degree dissertations, as set out in Art. 187 of the Act of 20 July 2018 Law on Higher Education and Science (consolidated text: Journal of Laws of 2022, item 574, as amended).

Based on the above assessment, I am submitting a proposal to the High Scientific Council of the Discipline of zootechnics and fisheries of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn to admit Anna Żmudzińska to the next stages of the doctoral procedure.

Dr hab. Agnieszka Partyka, prof. UPWr

Wrocław, 03.01.2023r.

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

Ocena pracy doktorskiej

mgr Anny Żmudzińskiej pt.,, Age related changes in proteome and quality parameters of sonicated dog epididymal spermatozoa"

Zagadnienia związane z wpływem wieku samców na jakość ich nasienia, wskaźników poczęć, niekorzystne wyniki ciąży i zdrowie potomstwa u zwierząt zaczynają być coraz częściej podejmowane. Dotychczasowe badania potwierdzają jedynie stopniowe zmniejszanie się potencjału rozrodczego u starzejących się samców, bez dalszych i zaawansowanych prób wyjaśnienia charakteru i mechanizmu zmian związanych z wiekiem oraz znalezienia związku między upośledzeniem funkcji plemników a możliwością większego ryzyka wad rozwojowych potomstwa.

Psy wydają się być bardzo dobrym modelem biomedycznym do badań w powyższym zakresie. Mamy możliwość łatwego dostępu do próbek nasienia czy samych plemników, możliwość porównania oceny jakości nasienia i plemników metodami *in vitro* z badaniami biologicznymi w postaci prób sztucznej inseminacji, możliwość sprawdzenia funkcjonalnej zdolności plemników do zapłodnienia za pomocą testów kompetencyjnych, które mogą być niezwykle trudne lub po prostu niemożliwe do wykonania u ludzi. Mamy także możliwość tworzenia jednolitych grup samców podzielonych ze względu na ich wiek oraz wykluczenie osobników z zaburzeniami zdrowotnymi, aby uniknąć niejednoznacznych wyników.

W tym kontekście badania prowadzone przez Doktorantkę na plemnikach najądrzowych psów trafiają w zapotrzebowanie współczesnej biologii, medycyny i weterynarii. Autorka zbadała wpływ wieku psów na zmiany w proteomie oraz parametrów jakości plemników najądrzowych poddawanych sonikacji oraz przedstawiła proteomiczną analizę frakcji białkowych wewnątrzkomórkowej (SIPs) i związanej z błoną (SMAPs) wraz z określeniem optymalnych parametrów sonikacji do separacji struktur morfologicznych plemników najądrzowych i izolacji białek plemników.

Podstawą formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej mgr Anny Żmudzińskiej jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 27 października 2022 roku.

Przedstawiona rozprawa doktorska liczy 76 stron opisu badań wraz z kopiami opublikowanych prac stanowiących cykl przedłożony do oceny wraz z piśmiennictwem i jest uzupełniona o oświadczenia wszystkich autorów niniejszych prac. Rozprawa została zrealizowana pod kierunkiem dwóch Pań Promotor: dr hab. inż. Marzeny Mogielnickiej-Brzozowskiej prof. UWM i dr hab. inż. Magdaleny Zielińskiej, prof. UWM podczas interdyscyplinarnych studiów doktoranckich z zakresu „Biogospodarki”, prowadzonej w języku angielskim. Rozprawa doktorska również jest napisana w języku angielskim.

Praca składa się ze spisu treści, zestawienia danych bibliograficznych dwóch publikacji, na podstawie których opracowano rozprawę, wykazu skrótów, streszczenia w języku angielskim i języku polskim, wstępu, celu badań, materiału i metod, omówienia i podsumowania uzyskanych wyników, wniosków i piśmiennictwa. W dalszej kolejności umieszczono kopie całościowe dwóch opublikowanych prac oraz oświadczenia dotyczące udziału autorów w ich przygotowanie. Na stronie zestawienia danych bibliograficznych publikacji zamieszczona jest informacja, że badania były wykonane w ramach finansowego wsparcia Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie nr 11.610.003-300.

Na rozprawę doktorską składają się dwie oryginalne prace opublikowane w bardzo dobrych czasopismach z listy JCR: *Animals* oraz *International Journal of Molecular Sciences*. Łączny IF prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej to 9,439 i 240 punktów MEiN. Prace opublikowane w 2022 roku, zostały wykonane zespołowo, jednak Doktorantka jest w nich pierwszym autorem i odpowiadała za opracowanie koncepcji badań oraz wykonanie zasadniczej części prac. Prace są spójne tematycznie i dotyczą tego samego zagadnienia.

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

W dwustronicowym wstępie Doktorantka opisała potencjał wykorzystania plemników najądrzowych psa w technikach wspomaganego rozrodu (ART) u zwierząt. Wskazuje również, że pies może być dobrym modelem badawczym w rozrodzie człowieka, a badania dotyczące prezentowanego zagadnienia mogą wpłynąć na rozwój metod ART u ludzi. Doktorantka przedstawia, iż istnieją przesłanki do badań mających na celu zbadanie wpływu wieku na jakość nasienia psów, ponieważ u tego gatunku takie zależności u samców nie zostały do końca poznane. Ciekawym i nie do końca poznany zagadnieniem, na które

zwraca uwagę Autorka dysertacji jest także zmiana w składzie białek podczas starzenia się najądrzy oraz plemników najądrzowych. Doktorantka opisuje rolę najądrzy w dojrzewaniu plemników, charakterystykę plemników najądrzowych oraz podkreśla wagę poznania funkcji białek tych plemników, które pozwoliłyby na wyznaczenie ich wartości biologicznej w procesach rozrodczych. Dodatkowo Autorka opisuje sonikację jako metodę pozwalającą na uszkodzenie komórek i izolację ich komponentów. Podkreśla, że w prezentowanej dysertacji użyła tej metody do udoskonalenia ekstrakcji białek z plemników najądrzowych psów.

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

Nadrzędnym celem pracy było określenie związku pomiędzy jakością funkcjonalną a proteomem plemników najądrzowych psów w różnym wieku. Dodatkowo Doktorantka postawiła sobie za cel znalezienia optymalnych parametrów sonikacji plemników najądrzowych oraz przeanalizowania frakcji białek wewnątrzkomórkowych i związanych z błonami plemników. Szczegółowe cele zostały przedstawione w 7 punktach.

Jak zaznaczono w rozdziale "Materiał i metody" badania zostały wykonane w oparciu o opinię Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie. Badania zostały wykonane na łącznie 45 psach mieszańcach w wieku od 1 roku do 11 lat o masie ciała od 9 do 33 kg. Psy zostały poddane rutynowej kastracji, a pobrane jądra oraz najądrza były transportowane w 0,9% NaCl w temperaturze 4°C do laboratorium Katedry Biochemii i Biotechnologii Zwierząt. Plemniki pobrane z ogonów najądrzy stanowiły materiał badawczy w obu publikacjach. Tą część dysertacji Autorka opisała jako wspólną dla obu publikacji.

Plemniki po izolacji zostały poddane ocenie jakości, która zawierała badanie ich koncentracji oraz parametrów ruchliwości. Morfologię plemników oceniano na podstawie barwienia Spermac Stain. Plemniki najpierw były wstępnie przygotowywane do sonikacji, a następnie przeprowadzona była procedura sonikacji. Po tym etapie materiał został przygotowany do dalszych analiz. Oceniono w nim m.in. całkowitą zawartość białka. Do analizy proteomicznej wykonano elektroforezę w żelu poliakrylamidowym. Białka zidentyfikowano za pomocą ultrasprawnej chromatografii cieczowej o nano przepływach połączonej z tandemową spektrometrią mas typu kwadrupol z analizatorem czasu przelotu (NanoUPLC-Q-TOF/MS) i narzędzi bioinformatycznych. Do potwierdzenia zidentyfikowanych białek wykonano analizę Western blott.

Analiza statystyczna została wykonana za pomocą programu komputerowego Statistica 13.1 a różnice statystyczne określono przy użyciu różnych i właściwie dobranych testów statystycznych, zgodnie z rozkładem danych i rodzajem porównywanych danych, z wykorzystaniem testu t Studenta i ANOVA.

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 dwa działy, skupiające się na dwóch artykułach. W tym rozdziale Autorka syntetycznie i zwięźle wyjaśniła uzyskane rezultaty.

W pierwszym artykule Doktorantka wykazała, że sonikacja plemników najądrzowych psa przez 10 min przy 150 W jest dobrą metodą separacji struktur plemnikowych. Na uwagę zasługuje fakt, iż Doktorantka po raz pierwszy wyizolowała 42 białka wewnątrzkomórkowe oraz 153 związane z błoną komórkową plemników najądrzowych psa. Na podstawie analizy ontologii genów określiła ich dominujące funkcje molekularne, wskazując na ich udział w ważnych szlakach metabolicznych. W przypadku SIP były to aktywność katalityczna i funkcja wiązania innych substancji. Natomiast we frakcji SMAP dominujące były aktywność hydrolazowa i transferazowa.

Drugi artykuł pokazuje, że wraz z wiekiem psów pogarszają się parametry jakości plemników, takie jak koncentracja plemników, ich ruchliwość całkowita, ruchliwość progresywna, a także parametry kinetyczne ruchu plemników jak VSL, VCL, VAP. Ponadto u psów najstarszych wykazano istotne obniżenie zawartości plemników o prawidłowej morfologii. Wykorzystana w tych badaniach spektrometria mas pozwoliła na zidentyfikowanie 1772 białek plemników najądrzowych w trzech grupach wiekowych psów. U psów w wieku od 1 roku do 3,4 roku wykazano obecność 865 białek; od 3,5 do 6,4 lat 472 białek i u psów od 6,5 do 11 lat 435 białek. Baza UniProt pozwoliła na zidentyfikowanie u najmłodszych psów 2 unikalnych białek, u psów w średnim wieku 5 unikalnych białek, a u psów najstarszych 3 unikalnych białek. Wykazano, że 7 białek było obecnych w trzech badanych grupach wiekowych psów, a 4 z tych białek wykazywały istotną zmienność pomiędzy grupami. Analiza ontologii genów (GO) wykazała podobne molekularne funkcje, procesy biologiczne i komponenty komórkowe dla wszystkich badanych grup wiekowych psów. Z kolei wykorzystanie baz danych KEGG wykazało, że w różnych grupach wiekowych psów różne

szlaki metaboliczne w plemnikach najądrzowych są nasilone, co może mieć związek z procesami starzeniowymi u samców psów.

W oparciu o wyniki badań sformułowano 6 wniosków: 1) Sonikacja plemników najądrzowych psa wykonywanej przez 10 minut przy 150 W może być zastosowana do oddzielenia poszczególnych struktur plemników i poprawiają ekstrakcję białek. 2) Wykorzystanie spektrometrii mas i narzędzi bioinformatycznych do analizy proteomu plemników najądrzowych psa pozwoliły na uzyskanie profili białek wewnątrzkomórkowych i frakcji związanej z błoną gamet. 3) Wyniki wskazują na obecność białek wykazujących różną ekspresję w poszczególnych frakcjach białek plemników, które są kluczowe dla prawidłowego funkcjonowania plemników i ich zdolności do zapłodnienia. Potwierdzono, że białka te biorą udział w ważnych szlakach metabolicznych plemników. 4) Starzenie się psów wiąże się z obniżeniem jakości funkcjonalnej plemników najądrzowych, co może skutkować obniżeniem płodności, a nawet bezpłodnością badanych osobników. 5) Stwierdzono różnice w profilach białkowych plemników u psów młodych, w średnim wieku i starszych związane ze zmianami szlaków metabolicznych plemników. Może to wpływać na zdolność zapłodnieniową wyżej wymienionych komórek. 6) Wyniki powyższych badań nad białkami markerowymi procesu dojrzewania i starzenia się plemników najądrzy mogą znaleźć zastosowanie w andrologii klinicznej oraz w technikach rozrodu psów.

Opis prac stanowiących rozprawę doktorską uzupełniony został o 50 pozycji piśmiennictwa. W dalszej kolejności Autorka przedstawia kopie publikacji stanowiących rozprawę.

W końcowej części pracy znajdują się oświadczenia świadczące, że Autorka posiada 65% udział w przygotowaniu publikacji stanowiących cykl wskazany w rozprawie doktorskiej. Udział Doktorantki w przygotowaniu prac był kluczowy, bowiem dotyczył opracowania koncepcji badań, wykonywania badań laboratoryjnych, analizy i interpretacji wyników, napisania/współudziału w pisaniu manuskryptu. Obrazuje to umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej Doktorantki.

Do szczególnych walorów przedłożonej pracy zaliczam:

1. Bardzo dobre publikacje stanowiące cykl rozprawy, opublikowane w czasopismach z listy JCR o wysokim wskaźniku impact factor.
2. Zaawansowana i nowoczesna metodyka badań proteomicznych, często wykorzystana po raz pierwszy w badaniach plemników psa.

3. Wkład i nowatorstwo w reprezentowaną dziedzinę wiedzy; wyniki stanowią oryginalny wkład twórczy w rozwój dziedziny.

Na podkreślenie zasługuje pracowitość i opanowanie warsztatu naukowego Doktorantki.

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

1. Sugerowałabym odwrotną numerację publikacji stanowiących podstawę dysertacji, z uwagi na realizację głównego celu pracy doktorskiej w publikacji nr 2, a celów opisanych jako dodatkowe w publikacji nr 1.
2. Uważam, że badanie koncentracji plemników, ich ruchliwości i morfologii nie wyczerpuje w pełni pojęcia jakości funkcjonalnej plemników. Ocena jakości gamet mogłaby być szersza (uzupełniona chociażby o żywotność plemników, aktywność mitochondriów). Z tego względu wniosek nr 4, moim zdaniem był wyciągnięty zbyt pochopnie.
3. W materiałach i metodach połączyłabym ocenę koncentracji plemników ich ruchliwości oraz morfologii – ponieważ morfologia plemników jak najbardziej stanowi ocenę jakości plemników.
4. Morfologia plemników opisana w artykule I powinna być nazwana jako ocena uszkodzeń plemników wywołanych sonikacją.
5. W punkcie 3.4.1. zabrakło wyjaśnienia jakie parametry plemników były zbadane przy użyciu systemu CASA. Dla osoby zaznajomionej z tą techniką nie jest to oczywiście zagadką, jednak zdanie „The sperm samples were subsequently assessed using a CASA system....” nie daje czytelnikowi informacji na temat oceny jakości plemników w tymże punkcie.
6. W materiałach i metodach, w punkcie opisującym pobieranie plemników z najądrzy brakuje mi podania objętości uzyskiwanych próbek, szczególnie iż takie zakresy są podane przez Doktorantkę dla koncentracji plemników.
7. W podpunkcie dotyczącym analizy statystycznej wyników nie opisano zastosowania badania korelacji (publikacja nr 2) – natomiast w wynikach tej pracy pojawiają się takie stwierdzenia.
8. W rozdziale 6 Piśmiennictwo zabrakło numeracji wykorzystanych w dysertacji prac.
9. Sugerowałabym również dodanie na końcu dysertacji zgody/oświadczenia Lokalnej Komisji Etycznej na wykonanie badań.

Powyższe uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, a mają jedynie charakter porządkowy. Praca została zrealizowana z wykorzystaniem nowoczesnych metod badawczych i wnosi nowe elementy poznawcze dotyczące funkcjonowania układu rozrodczego i rozwoju gamet. Wyniki posiadają dużą wartość poznawczą jak i praktyczną.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Anny Żmudzińskiej 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 2022 r. poz. 574 ze zm.).

W oparciu o powyższą ocenę przedkładam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie o dopuszczenie mgr Anny Żmudzińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Agnieszka Partyka, prof. UPWr