

Ocena

osiągnięcia naukowego przedstawionego w postaci cyklu publikacji pt.: „Wybrane zmiany strukturalne i funkcjonalne plemników w aspekcie doskonalenia metod konserwacji i oceny nasienia knurów” oraz istotnej aktywności naukowo-badawczej, dorobku dydaktycznego i działalności organizacyjnej Pani dr Moniki Trzcíńskiej ubiegającej się o nadanie stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie zootechnika i rybactwo

Do przygotowania opinii wykorzystano dokumentację zawierającą:

- wniosek dr Moniki Trzcíńskiej o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo z dnia 21 października 2020 r.,
- dane wnioskodawcy (załącznik 1),
- odpis dyplomu uzyskania stopnia doktora (załącznik 2),
- autoreferat (załącznik 3);
- wykaz osiągnięć naukowo-badawczych wraz z pozostałymi osiągnięciami (załącznik 4),
- oświadczenia współautorów określające indywidualny wkład w powstanie poszczególnych prac naukowych wchodzących w skład osiągnięcia naukowego (załącznik 5),
- kopie publikacji składających się na osiągnięcie naukowe (załącznik 6),
- forma elektroniczna wniosku wraz z załącznikami (załącznik 7).

1. Wykształcenie i przebieg pracy zawodowej Habilitantki

Dr Monika Trzcíńska jest absolwentką Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego. W dniu 5 czerwca 2020 roku obroniła pracę magisterską pt. **„Morfologia jajowodu świni”** uzyskując dyplom magistra biologii. W latach 2001-2009 pracowała jako biolog w Instytucie Zootechniki Państwowym Instytucie Badawczym, do roku 2005 w Zakładzie Fizjologii Rozrodu Zwierząt a następnie w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt. W okresie od 2003 roku do 2005 roku była doktorantką w Instytucie Zootechniki Państwowym Instytucie Badawczym. W 2008 roku, na podstawie rozprawy doktorskiej

pt. „**Wykrywanie i ocena wpływu apoptozy na zdolność zapładniającą plemników knura**” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Zdzisława Smorąga, uzyskała stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika. Od 2009 roku pracuje na stanowisku adiunkta w Instytucie Zootechniki Państwowym Instytucie Badawczym, do 2017 roku w Dziale Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, a od 2018 roku do chwili obecnej w Zakładzie Biotechnologii i Kriokonserwacji. Habilitantka pełni funkcję kierownika Krajowego Banku Materiałów Biologicznych.

2. Ocena osiągnięcia naukowego

Podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi cykl czterech, powiązanych tematycznie, oryginalnych prac naukowych, opublikowanych w latach 2011 – 2020 w czasopismach wyróżnionych w bazie *Journal Citation Reports*, ujętych przez Habilitantkę pod wspólnym tytułem: „**Wybrane zmiany strukturalne i funkcjonalne plemników w aspekcie doskonalenia metod konserwacji i oceny nasienia knurów**”.

Prace wyróżnione jako osiągnięcie naukowe są opracowaniami 2-4 autorskimi, w których dr Monika Trzcńska jest pierwszym i korespondencyjnym autorem a jej wkład w ich powstanie jest wiodący i wynosi 70-80%, co potwierdzają dołączone do wniosku oświadczenia współautorów. W większości prac udział Habilitantki polegał na opracowaniu koncepcji badań, przygotowaniu metodyki i wykonaniu analiz, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu do druku oraz pełnieniu funkcji autora korespondencyjnego. Na tej podstawie można stwierdzić, że udział Habilitantki w realizację i powstanie prac stanowiących osiągnięcie naukowe jest wiodący i znaczący, co świadczy o dużych umiejętnościach organizowania pracy badawczej, podejmowania nowych wyzwań naukowych i pracy w zespole.

Prace stanowiące osiągnięcie naukowe zostały opublikowane w renomowanych czasopismach naukowych, takich jak: *Animal Reproduction Science* (IF: 1,750), *Polish Journal of Veterinary Sciences* (IF: 0,719), *Theriogenology* (IF: 1,838) i *Annals of Animal Science* (IF: 1,572). Sumaryczna wartość współczynnika wpływu (**IF**) prac wynosi **5,879**. Łączna wartość punktowa prac naukowych uwzględnionych we wskazanym osiągnięciu naukowym według wykazu czasopism MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **185 punktów**.

Przedmiotem badań opublikowanych w pracach stanowiących osiągnięcie naukowe było doskonalenie metod konserwacji i oceny nasienia knurów z wykorzystaniem nowoczesnych metod z zakresu diagnostyki andrologicznej. Prace wyróżnione jako osiągnięcie naukowe dotyczą ważnych problemów związanych z doskonaleniem metod przechowywania nasienia knura, szczególnie w zakresie kriokonserwacji. W związku z tym, że w inseminacji świń nadal dominuje wykorzystanie nasienia w stanie płynnym, prace nad doskonaleniem technik kriokonserwacji nasienia u tego gatunku zwierząt są bardzo aktualne i mają duże znaczenie praktyczne. Podjęta przez Habilitantkę problematyka badawcza ma zatem niezwykle ważne znaczenie poznawcze i aplikacyjne.

W pierwszym etapie badań Habilitantka określiła zależności pomiędzy jakością nasienia knurów a odsetkiem i jakością pozyskanych zarodków w stadium blastocysty. Wykorzystując do inseminacji nasienie konserwowane w stanie płynnym Habilitantka wykazała, że inseminacja loszek nasieniem o ruchliwości plemników wynoszącej około 30% i obniżonych parametrach strukturalno-funkcjonalnych plemników skutkuje uzyskaniem zwiększonego odsetka zarodków zdegenerowanych.

Kolejny cykl badań dotyczył opracowania skutecznej metody kriokonserwacji nasienia knurów w oparciu o wykorzystanie rozcieńczalników mrozeniowych, do których wprowadzono modyfikacje stosując różne stężenia egzogennych związków o działaniu antyoksydacyjnym, takich jak: zredukowany glutation (GSH), katalaza (CAT) i dysmutaza ponadtlenkowa (SOD). W badaniach tych Habilitantka wykorzystała dotychczas nie stosowane metody diagnostyczne w ocenie kriokonserwowanego nasienia knura. Oprócz ruchliwości plemników, wykonanej przy użyciu CASA, przeprowadzono badania parametrów strukturalno-funkcjonalnych plemników z wykorzystaniem technik fluorescencyjnych. W ocenie uwzględniono: integralność błon komórkowych (YO-PRO-1/PI), stopień ekspozycji reszt fosfatydyloseryny w błonach plazmatycznych plemników (aneksyna V-FITC/PI), poziom zmian w ich mitochondrialnym potencjale transbłonowym (JC-1) i stopień fragmentacji DNA (TUNEL). Habilitantka wykazała, że suplementacja rozcieńczalnika 5,0 mM GSH korzystnie wpływa na wybrane parametry strukturalno-funkcjonalne plemników oraz chroni plemniki knura przed apoptozą. Ponadto dr Monika Trzcńska wykazała, że rozcieńczalniki zawierające w swoim składzie SOD i CAT, niezależnie od zastosowanego stężenia, mają korzystny wpływ na jakość plemników po rozmrożeniu.

Kontynuując badania nad opracowaniem skutecznego rozcieńczalnika do mrożenia nasienia knura Habilitantka zastosowała dodatek do rozcieńczalnika butylowanego

hydroksytoluenu (BHT). Należy podkreślić, że procedurę kriokonserwacji nasienia przeprowadziła wykorzystując opracowaną przez siebie metodę. Do zweryfikowania wpływu antyoksydantu BHT w rozcieńczalniku na jakość nasienia, kriokonserwowano je w czterech wariantach: bez dodatku BHT, z dodatkiem: 0,5 mM, 1,0 mM i 2,0mM. W analizie jakościowej nasienia uwzględniono ocenę odsetka plemników wykazujących ruch całkowity i postępowy, ocenę integralności błony komórkowej plemników, stanu przepuszczalności błony akrosomalnej plemników oraz na podstawie pomiaru indukowanej luminescencji plemników określono uszkodzenia plemników spowodowane stresem oksydacyjnym. Na podstawie tych badań Habilitantka wykazała, że nasienie mrożone konserwowane rozcieńczalnikiem z dodatkiem BHT charakteryzuje się lepszą jakością plemników niż nasienie rozcieńczane rozcieńczalnikiem kontrolnym, bez dodatku BHT. Szczególnie konserwacja nasienia rozcieńczalnikiem mrożeniowym uzupełnionym 1,0 mM BHT pozwoliła na uzyskanie najlepszych parametrów jakościowych plemników, co zagwarantowało uzyskaniem wysokiego odsetka cięż i liczby prosiąt w miocie. Dr Monika Trzcńska wykazała także, że niezależnie od ilości zastosowanego stężenia, dodatek BHT w rozcieńczalniku w istotny sposób zabezpiecza plemniki przed negatywnymi skutkami obecności reaktywnych form tlenu (RFT), powstałych podczas kriokonserwacji nasienia.

Interesującym cyklem badań, jaki Habilitantka podjęła, była próba określenia potencjalnych markerów jakościowych plemników w nasieniu świeżym pozwalającym na ocenę przydatności ejakulatu do kriokonserwacji. Wykazała, że ejakulatory, w których 70% plemników wykazuje ruch postępowy mogą być skutecznie mrożone. Stwierdziła ponadto, że oprócz ruchliwości plemników do potencjalnych markerów, które mogą być skutecznym wskaźnikiem określającym przydatność ejakulatu do kriokonserwacji można zaliczyć ocenę stopnia integralności błony komórkowej i stanu przepuszczalności błon akrosomalnych plemników.

Podsumowując stwierdzam, że osiągnięcie naukowe dr Moniki Trzcńskiej dotyczy zagadnień bardzo aktualnych i ważnych, zarówno z naukowego jak i praktycznego punktu widzenia. Wnosi ono istotny wkład w rozwój dziedziny naukowej i spełnia wymagania stawiane kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

3. Ocena aktywności naukowo-badawczej

Dorobek naukowy dr Moniki Trzcńskiej, bez publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, obejmuje ogółem **102** pozycje (77 po uzyskaniu stopnia doktora), w tym:

- **32** oryginalne prace twórcze (24 po uzyskaniu stopnia doktora), w tym **11** w czasopiśmie znajdujących się w bazie JCR (2 przed i 9 po uzyskaniu stopnia doktora);
- **6** rozdziałów w monografiach naukowych (2 przed i 4 po uzyskaniu stopnia doktora) i **1** monografii;
- **1** redakcja naukowa monografii;
- **2** instrukcje wdrożeniowe;
- **1** patent;
- **19** doniesień na konferencje międzynarodowe opublikowane w czasopiśmie posiadających IF (5 przed i 14 po uzyskaniu stopnia doktora);
- **40** doniesień na konferencje krajowe i międzynarodowe opublikowane w materiałach konferencyjnych (10 przed i 30 po uzyskaniu stopnia doktora).

Sumaryczna wartość dorobku bez publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego wg punktacji MNiSW wynosi **643,5** punktów (z osiągnięciem naukowym **828,5**), w tym **601,5** punktów po uzyskaniu stopnia doktora (z osiągnięciem naukowym **786,5**). Całkowity IF tych prac wynosi **15,953**. Liczba cytowań wszystkich prac według bazy *Web of Science (All databases)* wynosi **109** a Indeks Hirscha **7**.

Jej prace były publikowane w specjalistycznych czasopiśmie naukowych, takich jak: *Polish Journal of Veterinary Sciences, Annals of Animal Science, Animal Reproduction Science, Theriogenology, Animal Science Papers and Reports, Folia Biologica, Journal of Animal and Feed Sciences*.

Dr Monika Trzcńska była wykonawcą w trzech projektach badawczych (w tym: w dwóch przed i w jednym po uzyskaniu stopnia doktora), w czterech programach wieloletnich (w tym: w dwóch przed i w dwóch po uzyskaniu stopnia doktora) i w ośmiu tematach statutowych (w czterech przed i czterech po uzyskaniu stopnia doktora). Jest współautorem jednego uzyskanego patentu nr PL 228192 B1 na wynalazek pt. „Rozcieńczalnik do mrożenia nasienia knura i sposób mrożenia nasienia” i jednego złożonego wniosku patentowego.

Habilitantka wykonała dotychczas dziewiętnaście recenzji artykułów naukowych dla międzynarodowych czasopiśmie, m.in. Plos ONE, Reproduction Fertility and Development, Reproduction in Domestic Animals, Research in Veterinary Science, Journal of Medical

Systems, Annals of Animal Science, Nigerian Journal of Clinical Practice, Antioxidants, Reproductive Biology, Cryobiology, Molecules.

Obszar zainteresowań naukowych dr Moniki Trzcińskiej dotyczy głównie zagadnień związanych z biotechnologią rozrodu zwierząt gospodarskich, a w szczególności z doskonaleniem metod konserwacji nasienia. Od początku pracy w Instytucie Zootechniki – Państwowym Instytucie Badawczym Habilitantka aktywnie uczestniczyła w badaniach zespołu pod kierunkiem prof. dr hab. Zdzisława Smorąga, w których zajmowała się oceną jakości plemników knura. Badania te stały się przedmiotem grantu promotorskiego KBN 2P06D02330 a wyniki zostały wykorzystane do przygotowania pracy doktorskiej pt. "Wykrywanie i ocena wpływu apoptozy na zdolności zapładniającej plemników knura". Wyniki tych badań zostały przedstawione w formie dwóch doniesień na konferencjach naukowych i dwóch publikacji.

Po obronie pracy doktorskiej Habilitantka kontynuowała badania w obszarze biotechnologia rozrodu zwierząt gospodarskich. Uczestniczyła w badaniach, które koncentrowały się na ocenie kompetencji rozwojowych hodowanych *in vitro* zarodków świni. Wykazała, że zarodki które uzyskały w siódmym dniu hodowli *in vitro* stadium blastocysty ekspandującej, charakteryzowały się najlepszą jakością i miały większe możliwości poimplantacyjnego rozwoju. Stwierdzono także, że blastocysty świni uzyskane w wyniku hodowli *in vitro* w porównaniu z zarodkami *in vivo* miały mniejszą liczbę jąder komórkowych oraz większy indeks apoptotyczny. Badania z tego zakresu przedstawiono w postaci dwóch publikacji naukowych.

W ramach współpracy z zespołem Prof. dr hab. Ryszarda Słomskiego z Katedry Biochemii i Biotechnologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu oraz Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu Habilitantka uczestniczyła w badaniach nad zmodyfikowanymi genetycznie zwierzętami. Istotnym osiągnięciem z tego zakresu badań było wykazanie, że wprowadzona modyfikacja genetyczna układu immunologicznego knurów, wykazujących ogólnoustrojową ekspresję transgenu *pCMVFUT*, nie indukuje zaburzeń w procesie spermatogenezy i nie prowadzi do wzrostu odsetka plemników apoptotycznych i nekrotycznych oraz odsetka plemników z fragmentacją DNA. Ponadto stwierdzono, że inseminacja loszek nasieniem knurów transgenicznych i nietransgenicznych nie wpływa na jakość zarodków. Efektem tej współpracy było opublikowanie dwóch prac naukowych.

Istotnym elementem rozwoju naukowego dr Moniki Trzcińskiej były badania związane z opracowaniem skutecznej metody kriokonserwacji nasienia knura, co ma niezwykle istotne

znaczenie aplikacyjne. Habilitantka powyższy zakres badań realizowała w ramach projektu badawczego przyznanego przez NCN pt. "Antyoksydanty i nowe związki osłaniające w kriokonserwacji nasienia knura przy zastosowaniu markerów apoptotycznych". Badania dotyczyły modyfikacji rozcieńczalników do mrożenia nasienia knura poprzez zastąpienie żółtka jaja kurzego białkami roślinnymi i lecytyną sojową. W wyniku badań wykazano, że białko jaja kurzego w rozcieńczalniku może być zastąpione składnikiem pochodzenia roślinnego. Suplementacja rozcieńczalnika mieszaniną białek roślinnych i lecytyny sojowej nie wpływa negatywnie na jakość plemników po rozmrożeniu. Również dodatek do rozcieńczalnika 1% hialuronianu sodu wpłynął korzystnie na plemniki knura. Efekty tych badań przedstawiono w trzech publikacjach.

Badania z zakresu konserwacji nasienia Habilitantka kontynuowała w ramach interdyscyplinarnego projektu BIOSTRATEG2. Udział dr Moniki Trzcńskiej w pracach dotyczył głównie zastosowania w procedurze mrożenia nasienia knura wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Wykazano, że zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w kriokonserwacji nasienia knura poprawia efektywność mrożenia. Dodatkowo zastosowanie nowych kryteriów selekcji ejakulatów umożliwia wybór właściwego rozwiązania technologicznego, które pozwala na uzyskanie wysokiej jakości nasienia po rozmrożeniu. Wyniki z tego zakresu przedstawiono w formie dwóch publikacji. Efektem badań Habilitantki dotyczących kriokonserwacji nasienia knura było uzyskanie patentu na wynalazek pt. „Rozcieńczalnik do mrożenia nasienia knura i sposób mrożenia nasienia”. Jest to niewątpliwie duże osiągnięcie Habilitantki, tym bardziej, że zostało ono wdrożone do praktyki inseminacyjnej. W oparciu o przeprowadzone badania zostały przygotowane dwie instrukcje wdrożeniowe dotyczące technologii konserwacji nasienia knura i wykonywania chirurgicznego zabiegu domacicznej inseminacji loszek.

W kolejnych badaniach z zakresu biotechnologii rozrodu knurów dr Monika Trzcńska zajmowała się modyfikacją składu rozcieńczalników stosowanych do konserwacji nasienia w stanie płynnym. Wykazała, że rozcieńczalnik z dodatkiem antybiotyku w postaci florfenikolu zapewnia najwyższą jakość nasienia podczas 6-dniowego przechowywania. Ponadto stwierdziła, że równoczesna suplementacja rozcieńczalnika gentamycyną i florfenikolem wpływa na wysoką aktywność mitochondrialną plemników i gwarantuje uzyskanie wysokich wskaźników rozrodczych. Wyniki z tego zakresu badań zostały opublikowane w dwóch pracach naukowych.

W badaniach nad oceną czynników sezonowych oddziałujących na jakość nasienia knura wykazano, że w miesiącach jesienno-zimowych nasienie knura wykazuje najlepszą jakość, co odzwierciedla się najmniejszym odsetek plemników apoptotycznych. Takie nasienie po siedmiu dniach przechowywania posiada mniejszy odsetek plemników z uszkodzoną błoną komórkową w porównaniu do nasienia pobieranego w okresie wiosenno-letnim. Rezultaty tych badań opublikowano w jednej pracy naukowej.

Habilitantka w trakcie pracy badawczej zajmowała się także konserwacją nasienia innych gatunków zwierząt. Były to prace dotyczące oceny jakości nasienia królików (jedna publikacja) i kriokonserwacji nasienia tryków (jedna publikacja).

W ramach współpracy z Zakładem Biologii i Patologii Rozrodu Człowieka Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie dr Monika Trzcńska uczestniczyła w badaniach dotyczących opracowaniu metod cytometrycznych identyfikacji mikropęcherzyków w osoczu nasienia ludzkiego, jako potencjalnego markera diagnostyki niepłodności męskiej oraz procesów zapalnych. Rezultaty tych badań przedstawiono na konferencji naukowej.

Podsumowując uważam, że osiągnięcia naukowo-badawcze dr Moniki Trzcńskiej posiadają wysoką wartość poznawczą i aplikacyjną. Efektem jej działalności naukowej są liczne artykuły publikowane w wysoko indeksowanych czasopismach. Ma doświadczenie w pozyskiwaniu środków finansowych na badania naukowe a podejmowane badania z zespołami innych ośrodków naukowych świadczą o dużych umiejętnościach organizowania warsztatu badawczego, podejmowania nowych wyzwań i pracy w zespołach badawczych. Wyżej wymienione osiągnięcia charakteryzują Habilitantkę jako samodzielnego pracownika naukowego zdolnego do proponowania i rozwiązywania oryginalnych problemów naukowych.

4. Ocena działalności dydaktycznej i organizacyjnej

Dr Monika Trzcńska posiada doświadczenie w prowadzeniu zajęć dydaktycznych. Przeprowadziła cykl wykładów i ćwiczeń na studiach doktoranckich oraz kursach organizowanych przez jednostkę, w której jest zatrudniona. Tematyka prowadzonych przez Habilitantkę zajęć dotyczyła zagadnień z zakresu biologii rozrodu samców różnych gatunków ssaków. Pełniła funkcję promotora pomocniczego pracy doktorskiej dr inż. Katarzyny Poniedziałek-Kempy zatytułowanej "Wpływ zmodyfikowanych warunków dojrzewania *in*

vitro oocytów oraz jakości i sposobu przygotowania nasienia knura na pozustrojowe zapłodnienie u świń”, której obrona odbyła się w 2019 roku.

Jej doświadczenie praktyczne w zakresie oceny i konserwacji nasienia zwierząt gospodarskich pozwoliło na nawiązanie współpracy z podmiotami komercyjnymi w tym zakresie. Od 2018 roku Habilitantka pełni funkcję Kierownika Krajowego Banku Materiałów Biologicznych, w którym przechowywany jest kriokonserwowany materiał biologiczny pochodzący od różnych gatunków zwierząt, taki jak: nasienie, zarodki oraz komórki jajowe. Popularyzacja wiedzy z zakresu kriokonserwacji materiału biologicznego zwierząt gospodarskich jest istotnym elementem w dorobku organizacyjnym dr Moniki Trzcńskiej. Współpracuje z Europejską Siecią Banków Genów (EUGENA), która jest koordynowana przez Europejski Regionalny Punkt Kontaktowy (EREP), działający w ramach Organizacji Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO). W ramach tej współpracy w roku 2018 uczestniczyła w Zagrzebiu w spotkaniach grupy roboczej EREP ds. ochrony zasobów genetycznych zwierząt metodami *ex situ*.

5. Wniosek końcowy

Przedstawiony do recenzji monotematyczny zbiór 4 publikacji naukowych stanowiący osiągnięcie naukowe dr Moniki Trzcńskiej pt.: „Wybrane zmiany strukturalne i funkcjonalne plemników w aspekcie doskonalenia metod konserwacji i oceny nasienia knurów” oraz jej istotna aktywność naukowa wnoszą nowe i ważne dla praktyki hodowlanej elementy z zakresu biotechnologii rozrodu. Stanowi to zatem pełne uzasadnienie do ubiegania się Kandydatki o stopień naukowy doktora habilitowanego nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Stwierdzam zatem, że osiągnięcie naukowe, jak również istotna aktywność naukowo-badawcza, dydaktyczna i organizacyjna dr Moniki Trzcńskiej spełniają wymagania określone w art. 219 ust. 1 pkt. 2 i 3 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (t.j. Dz. U. z 2020 roku poz. 85 ze zm.). W związku z powyższym popieram wniosek Pani dr Moniki Trzcńskiej o nadanie jej stopnia doktora habilitowanego nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Anna Wysokińska