

# Autoreferat

## 1. Dane osobowe

Dr inż. Alicja Kowalczyk  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt  
Katedra Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt  
ul. Chełmońskiego 38C, 51-630 Wrocław  
✉ alicja.kowalczyk@upwr.edu.pl

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

**2 grudnia 2017 r.** dyplom magistra inżyniera zootechniki, specjalność hodowla i użytkowanie zwierząt gospodarskich, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**13 listopada 2018 r.** dyplom doktora nauk rolniczych w Dyscyplinie Zootechnika i Rybactwo, specjalność: andrologia, rozród zwierząt, hodowla i użytkowanie zwierząt, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

## 3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych

**1.06 - 31.11.2019 r.** asystent w Katedrze Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, pół etatu

**1.12.2019 r. – obecnie** adiunkt (pracownik badawczo-dydaktyczny ze stopniem doktora) w Katedrze Higieny Środowiska i Dobrostanu Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, pełen etat

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

4.1 Tytuł szczególnego osiągnięcia naukowego

***Możliwości zwiększenia wydajności reprodukcyjnej buhajów użytkowanych w stacjach hodowli i unasieniania***

4.2 Prace wskazane jako szczególne osiągnięcie naukowe

**Cykl publikacji:**

1. **Kowalczyk A.** (2021). The role of natural antioxidant mechanism in sperm cells. Reproductive Sciences, Vol. 29, Issue 5, 1387-1394, IF 3,060; 70 pkt. MEiN
2. **Kowalczyk A.,** Gałęska E., Czerniawska-Piątkowska E., Szul A., Hebda L. (2021). The impact of regular sperm donation on bulls' seminal plasma hormonal profile and response to phantom. Scientific Reports, Sci Rep., 11, 11116, IF 4,379; 140 pkt. MEiN
3. **Kowalczyk A.,** Czerniawska-Piątkowska E. (2021). Antioxidant effect of Elamipretide on bull's sperm cells during freezing/thawing process. Andrology, 9(4), 1275-1281, IF 3,842; 140 pkt. MEiN
4. **Kowalczyk A.,** Gałęska E., Bubel A. (2022). The concentration of proAKAP4 and other indicators of cryopotential of spermatozoa cryopreserved in extender with *Holothuroidea* extract addition. Animals, 12(4), 521, IF 2,752; 100 pkt. MEiN

4.3 Omówienie szczególnego osiągnięcia naukowego

4.3.1 Cel badań

Celem badań przedstawionych w prezentowanym szczególnym osiągnięciu naukowym było wykazanie możliwości zwiększenia wydajności reprodukcyjnej buhajów użytkowanych w stacjach hodowli i unasieniania. Cel zrealizowano po przez następujące zadania:

- dokonanie przeglądu obecnego stanu wiedzy na temat znaczenia systemu antyoksydacyjnego nasienia samców w kontekście zdolności reprodukcyjnej
- ustalenie, czy parametry stresu oksydacyjnego mierzone we krwi buhajów mogą mieć związek z wiekiem samców i porą roku

- analiza efektywności zastosowania tetrapeptydu aromatyczno-kationowego (Elamipretide) w technologii produkcji dawek inseminacyjnych zmniejsza skutki stresu oksydacyjnego w plemnikach buhajów poddanych kriokonserwacji
- ocena potencjału nowoczesnego biomarkera do analizy stężenia proAKAP4 w standardowych protokołach kriokonserwacji nasienia w ocenie skuteczności stosowania rozcieńczalników do długoterminowej konserwacji plemników.

#### 4.3.2 Omówienie problemu

##### 4.3.2.1 Wprowadzenie

Plemniki ssaków są wysoce wyspecjalizowanymi komórkami, których jedynym zadaniem jest zapłodnienie oocytu. Zbudowane są z głowy, w której haploidalny ładunek genetyczny komórki jest ciasno zagęszczony w jądrze, wstawki mieszczącej mitochondria oraz witki ułatwiającej komórce poruszanie się [1]. We wstawce zlokalizowana jest centriola, która ma zasadnicze znaczenie dla prawidłowego rozwoju embrionalnego, ponieważ dostarczana przez plemniki kieruje wszystkimi podziałami komórkowymi u potomstwa [2]. Wraz z materiałem DNA plemnik transferuje kodujące i niekodujące RNA, a także szereg białek, lipidów, węglowodanów i metabolitów małocząsteczkowych związanych z funkcją komórki [3]. Po zakończeniu spermatogenezy plemniki wydają się strukturalnie kompletne, ale nie są jeszcze zdolne do zapłodnienia, tę zdolność uzyskują dopiero po pasażu najądrza [4]. Po ejakulacji plemniki są transportowane w plazmie nasienia, która zawiera mieszaninę wydzielin z jąder, najądrza i dodatkowych gruczołów płciowych [5].

Podczas kopulacji plemniki buhaja zostają zdeponowane w pochwie krowy. Z uwagi na znaczną odległość pochwy od miejsca zapłodnienia, wymagana jest dobra ruchliwość plemników ze względu na konieczność przemieszczenia się tych komórek do jajowodu oraz zlokalizowania i zapłodnienia oocytu [6]. Stąd też uważa się, że niska (niedostateczna) ruchliwość plemników stanowi główną przyczynę obniżonego potencjału rozrodczego buhajów [7].

Poza badaniem fizykalnym i pomiarem obwodu moszny, ocena morfologii oraz ruchliwości plemników jest aktualnie kluczowym elementem badania kondycji reprodukcyjnej buhajów i obowiązkowym elementem selekcji oraz kwalifikacji samców do rutynowej produkcji dawek inseminacyjnych w stacjach hodowli i unasienniania [8, 9].

Oszacowano, że jeden na pięć buhajów nie spełnia wymagań kwalifikacyjnych i nie może być użytkowany komercyjnie z powodu niskiej jakości nasienia i/lub słabej kondycji fizycznej [10].

Należy podkreślić, że zdolność zapładniająca plemników jest złożoną, wieloczynnikową cechą, której nie można dokładnie ocenić, dokonując tego wyłącznie przy pomocy badania wzrokowego (makro-, czy mikroskopowego) [11]. Bowiem, zadowalająca ruchliwość i prawidłowe wyniki w zakresie morfologii nie gwarantują wspomnianej zdolności zapłodnienia, a buhaje cechujące się dobrą jakością nasienia i tak mogą nie wydać ostatecznie potomstwa [12, 13]. Stąd niemal oczywiste jest, że do zapłodnienia i prawidłowego rozwoju zarodka muszą przyczynić się również inne czynniki. Niezwykle trudne jest oszacowanie odsetka buhajów hodowlanych z obniżoną płodnością lub bezpłodnością, ponieważ wiele z nich pozostaje niezidentyfikowanych. Te niezidentyfikowane samce (o obniżonej płodności) mogą generować olbrzymie straty ekonomiczne, zwłaszcza przy niskim współczynniku poczęcia, co albo skutkuje wielokrotnym powtarzaniem inseminacji i wydłużonym okresem międzywycieleniowym, albo brakowaniem samic z powodu potencjalnych problemów z ich płodnością.

Obecnie, mając do dyspozycji rozmaite narzędzia dąży się do rutynowego włączenia diagnostyki molekularnej i nowoczesnych markerów diagnostycznych, tak aby skuteczniej szacować i doskonalić wydajność rozrodczą buhajów. Badania molekularne nad możliwymi przyczynami obniżonej płodności samców wykazały, że stres oksydacyjny (OS), który jest definiowany jako brak równowagi w stanie redoks organizmu spowodowany jest albo zbyt wysokim poziomem utleniaczy, albo odwrotnie, zbyt małą ilością przeciwutleniaczy, co odgrywa tu kluczową rolę. W czasie, gdy wytwarzane są nadmierne ilości reaktywnych form tlenu (ROS), albo aktywność przeciwutleniaczy zanika, równowaga między utlenianiem, a redukcją ulega zakłóceniu, powodując stres oksydacyjny. Plemniki są szczególnie wrażliwe na OS, głównie z uwagi na fakt, iż zawierają bardzo niski poziom antyoksydantów enzymatycznych, które są niewystarczające do ochrony nasienia przed wysokimi poziomami ROS, a z kolei w cytoplazmie występuje tylko niewielkie stężenie enzymu zdolnego do ich neutralizacji. Coraz więcej dowodów wskazuje, że brak równowagi między utleniaczami i przeciwutleniaczami w nasieniu prowadzi do zaburzeń metabolicznych i czynnościowych męskich komórek rozrodczych co może być główną przyczyną

zaburzeń ich płodności [14]. Należy zwrócić uwagę, że ROS to pewnego rodzaju „miecz obusieczny”, ponieważ z jednej strony niewielkie ilości ROS zapewniając korzystne efekty funkcjonalne, w tym inicjację kapacytacji plemników, regulację ich dojrzewania oraz wzmocnienie szlaków sygnalizacji komórkowej [15]. Udowodniono także, że biorą udział w kondensacji chromatyny plemników, regulując liczbę komórek rozrodczych poprzez indukowanie apoptozy lub proliferacji spermatogonii [16]. Jednak z drugiej strony mogą wpływać niekorzystnie na funkcjonowanie plemników poprzez inicjację uszkodzeń DNA, peroksydację lipidów, utratę integralności błony i zwiększoną przepuszczalność błony, inaktywację enzymów komórkowych i apoptozę komórek [17-19], ostatecznie prowadząc do niepłodności samców [20].

Powszechnie wiadomo, że na równowagę oksydacyjną w organizmie wpływa szereg różnych czynników. Jednym z nich jest temperatura otoczenia w jakiej przebywają buhaje, drugim zaś wiek rozplodników. Balić i in. [21] wykazali, że młodsze buhaje są bardziej wrażliwe na podwyższoną temperaturę otoczenia latem, kiedy wzmożone procesy prooksydacyjne w osoczu nasienia i plemnikach powodują zmniejszenie ruchliwości plemników, a w konsekwencji pogorszenie jakości nasienia. Inni badacze [22, 23] donoszą, że młodsze osobniki osiągają gorsze parametry jakościowe nasienia niż starsze, a pora roku znacząco wpływa zarówno na ruchliwość jak i żywotność ich plemników. Określenie parametrów antyoksydacyjnych i oksydacyjnych w surowicy buhajów może pomóc w ustaleniu stanu antyoksydacyjnego i oksydacyjnego poszczególnych zwierząt narażonych na różne czynniki mogące potencjalnie zaburzać równowagę redoks tj. różne warunki/systemy utrzymania, zmienne pory roku (w tym wahania temperatur), czy regularność oddawania nasienia. Otrzymane informacje pozwolą zarówno na dostosowanie tych czynników w celu zwiększenia wydajności reprodukcyjnej zwierząt, jak i manipulację procesem wytwarzania i przechowywania nasienia buhajów w taki sposób aby zmaksymalizować potencjał zapładniający plemników w dawce inseminacyjnej.

Należy również zwrócić uwagę na fakt, że konwencjonalnie oceniane parametry jakości biologicznej nasienia są uznawane za niezadowalające, ponieważ nie korelują dobrze z płodnością, co powoduje problemy z przewidywaniem potencjału rozrodczego samców [24]. Pomocne mogą stać się ostatnio opracowywane innowacyjne metody badawcze umożliwiające bezpośrednie rozpoznanie związku między fizjologią plemnika,

a jego cechami czynnościowymi. Wobec powyższego wskazuje się, że proAKAP4 jest obecnie kandydatem na kluczowy marker płodności [25]. Białko kotwiczące kinazę A4 (ProAKAP4) jest polipeptydem prekursorowym, który musi być transformowany przez żywe i ruchliwe plemniki w dojrzałym AKAP4, a jego specyficzna regulacja podczas spermatogenezy wydaje się konieczna do zwiększenia wskaźnika zapłodnienia w warunkach sztucznego unasieniania [26, 27]. Liczne badania wykazały potencjalne zastosowanie proAKAP4 jako odpowiedniego biomarkera ogólnej jakości nasienia w warunkach klinicznych [27, 28, 29].

Ponadto wykazano, że stężenia ProAKAP4 są skorelowane z całkowitą i progresywną ruchliwością plemników u mężczyzn, ogierów i buhajów [30, 31, 32]. Wyraźnie widać, że ruchliwość plemników odzwierciedla stężenie proAKAP4, a zatem pomiar tego stężenia dostarcza bardziej obiektywnych wartości niż standardowa analiza. Co więcej, różni badacze wykazali, że pomiary stężenia proAKAP4 dostarczają ważnych informacji dotyczących zachowania jakości biologicznej nasienia i mogą być wykorzystywane do przewidywania płodności samców [33, 34]. **W świetle dotychczasowych badań zaproponowano rozwiązania, które miały na celu poprawę wydajności reprodukcyjnej buhajów użytkowanych komercyjnie. W niniejszym cyklu zaproponowano nowatorskie działania, zmierzające do skuteczniejszego użytkowania rozrodczego samców w stacjach hodowli i unasieniania.**

#### 4.3.2.2 *Naturalne systemy antyoksydacyjne w nasieniu (publikacja 1)*

Badania z ostatnich lat wykazały, że stres oksydacyjny, wywołany przez reaktywne formy tlenu i wolne rodniki, może leżeć u podstaw wielu zaburzeń rozrodu i jest bezpośrednio związany z niepłodnością lub całkowitą bezpłodnością [35]. Wskazać więc należy, że do utrzymania optymalnego funkcjonowania plemników niezbędne jest utrzymanie równowagi redoks, czyli kontrolowanie poziomu ROS przez bezpośrednie działanie antyoksydantów [36]. Można je zidentyfikować w płynie nasiennym, który jednocześnie pełni funkcje odżywcze i ochronne dla plemników. Przeciwutleniacze występują w dwóch formach; enzymatyczne i nieenzymatyczne układy antyoksydacyjne [37]. Układ enzymatyczny składa się z peroksydazy glutationowej (GPX), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT). Z drugiej strony układ nieenzymatyczny składa się z wielu związków, które są dostarczane do organizmu wraz z pożywieniem lub w wyniku suplementacji bezpośrednio do nasienia w warunkach *in vitro*.

Złożona przestrzenna struktura cząsteczek enzymu determinuje zarówno zdolności katalityczne, jak i wrażliwość na wiele czynników środowiskowych. Podstawowy mechanizm działania enzymu związany jest z przestrzennym dopasowaniem substratu do katalitycznego centrum enzymu. Działanie wszystkich antyoksydantów w organizmie ostatecznie sprowadza się do przeciwdziałania skutkom procesów utleniania. Czy to bezpośrednio poprzez katalizowanie reakcji enzymatycznych, czy pośrednio jako związki dezaktywujące wolne rodniki i zatrzymujące kaskadę reakcji łańcuchowych. Do układów antyoksydacyjnych niewątpliwie zaliczają się również grupy związków biorących udział w ciągłym przywracaniu potencjału antyoksydacyjnego, ponieważ wszystkie cząsteczki biorące udział w reakcjach są zużywane i muszą zostać odtworzone [38].

Niewątpliwie, ważnym wyzwaniem medycyny rozrodu jest zapobieganie zaburzeniom reprodukcyjnym wywołanym przez ROS, a także przywrócenie homeostazy redoks w przypadku wykrycia nieprawidłowości podczas użytkowania rozplodowego samców. **Aktualne kierunki badań wskazują, że terapie antyoksydacyjne stanowią potencjalną alternatywę profilaktyczną i terapeutyczną w postępowaniu z buhajami obciążonymi ryzykiem zaburzeń równowagi ROS oraz obniżoną płodnością. Niestety wciąż brakuje badań dostarczających jasnych informacji na temat potencjalnego mechanizmu działania antyoksydacyjnego, co opóźnia rozwój skuteczniejszych i szerszych terapii antyoksydacyjnych.** Dlatego konieczne jest prowadzenie dalszych doświadczeń w tym kierunku, aby móc określić dawkowanie suplementacji antyoksydantami (oralnej, a także *in vitro* – do nasienia). Należy zwrócić uwagę, że nieuregulowana (niewłaściwa) suplementacja może również prowadzić do patologicznego nagromadzenia antyoksydantów, powodując także rozregulowanie redoks i hamowanie ważnych procesów rozrodczych. **Mając na uwadze perspektywę rozwoju nauk andrologicznych postanowiono ustalić, czy parametry stresu oksydacyjnego mierzone we krwi buhajów mogą mieć związek z wiekiem samców i porą roku (publikacja 2).**

#### 4.3.2.3 *Wybrane czynniki wpływające na wydajność rozrodczą samców (publikacja 2)*

Zaburzenia rozrodcze buhajów wykorzystywanych w stacjach hodowli i unasieniania sprawiają wiele trudności związanych nie tylko z obsługą tych zwierząt, czy opóźnionym włączeniem ich do bieżącej produkcji dawek inseminacyjnych, ale

przede wszystkim generują duże straty finansowe, ponieważ rozplodniki, których wydajność reprodukcyjna jest dramatycznie niska nie przynoszą zysku i kierowane są najczęściej na ubój [39].

**W przedmiotowych badaniach po raz pierwszy podjęto się kompleksowej analizy różnych czynników wpływających na wydajność reprodukcyjną buhajów** i m.in. wykazano, że parametry stresu oksydacyjnego (PCC protein carbonyl content; TBARS thiobarbituric acid reactive substrates) mierzone we krwi obwodowej buhajów zmieniają się wraz z porą roku. Co więcej zaobserwowano statystycznie istotne różnice pomiędzy PCC a TBARS dla ekstremalnych sezonów (zima – lato), przy czym najniższe wartości PCC (12,3 mmol/L i 16,3 mmol/L) notowano latem, a najwyższe wiosną (17,2 mmol/L u młodych buhajów). U buhajów starszych stężenie PCC osiągnęło najwyższą wartość zimą (20,2 mmol/L). Różnice między grupami wiekowymi pod względem zawartości PCC były statystycznie wysoce istotne ( $P < 0,01$ ). Statystycznie istotnie wyższe ( $P < 0,01$ ) wartości TBARS odnotowano dla buhajów młodszych w sezonie wiosenno-zimowym (1,1 mmol/L i 1,2 mmol/L) w porównaniu z sezonem letnim (0,5 mmol/L). Ponadto u buhajów starszych zaobserwowano, że koncentracja TBARS wykazywała odwrotną tendencję zmian niż u buhajów młodych, w sezonie zimowo-wiosennym była najniższa (0,4 mmol/L), natomiast w okresie jesienno-zimowym wyższa (0,9 mmol / l i 1,0 mmol / l). Nie odnotowano istotnych różnic pomiędzy zawartością TBARS w grupach wiekowych dla sezonów lato-jesień. Korelacja między PCC a TBARS wyniosła 0,812 i była istotna statystycznie ( $P < 0,01$ ).

Analizując stężenie TP (Total protein) we krwi stwierdzono, że wzrasta wraz z cieplejszymi porami roku. Różnica między starszymi i młodszymi buhajami była istotna ( $P < 0,05$ ) w sezonach wiosenno-zimowych, a w kolejnych sezonach nie stwierdzono istotnych różnic między grupami wiekowymi. W zakresie stężenia ALB (Albumins) wyniki utrzymywały się na podobnym poziomie przez cały okres badań, osiągając najniższe wartości odpowiednio zimą i wiosną (młode: 32,0; starsze: 34,4 g/L i młode: 33,2; starsze: 37,1 g/L), a najwyższy latem i jesienią (młode: 36,1; starsze: 35,0 g/L i młode: 34,7; starsze: 34,5 g/L). Najniższe wartości AU (Uric acid) w obu grupach wiekowych buhajów zaobserwowano zimą (młode: 40,3; starsze: 55,1 mmol/L), a najwyższe latem (młode: 52,2; starsze: 63,6 mmol/L), różnice te były istotne statystycznie ( $P < 0,05$ ). Wyższą wartość GSH (Reduced glutathione) w zakresie



koncentracji zaobserwowano u buhajów starszych w porównaniu z buhajami młodymi. Najniższe stężenie GSH w obu badanych grupach wiekowych zaobserwowano w okresie letnim. Z kolei najwyższy wiosną (młode: 26,1; starsze: 28,6mmol/L).

Ponadto wykazano, że w sezonie zimowym świeże nasienie pozyskane od starszych samców miało istotnie ( $P<0,05$ ) większą objętość (7,1 ml) i wyższą koncentrację ( $2598 \times 10^6/\text{mm}^3$ ) w porównaniu z młodymi buhajami (4,9 ml i  $1646 \times 10^6/\text{mm}^3$ ). W zakresie parametrów ruchliwości i żywotności nasienia świeżego i mrożonego nie zaobserwowano istotnych różnic w okresie zimowym w badanych grupach wiekowych. Natomiast w okresie wiosennym, zarówno objętość świeżego ejakulatu, jego koncentracja, jak i odsetek plemników żywych i ruchliwych były istotnie ( $P<0,05$ ) wyższe w grupie buhajów starszych. Mrożone nasienie buhajów młodszych było statystycznie istotnie ( $P<0,05$ ) słabszej jakości pod względem żywotności niż buhajów starszych i zawierało średnio o 8,04% mniej żywotnych plemników niż mrożone nasienie starszych samców. W sezonie letnim objętość ejakulatu i koncentracja plemników różniły się istotnie ( $P<0,05$ ) między młodszymi i starszymi buhajami, odpowiednio 1,2 ml i  $962 \times 10^6/\text{mm}^3$  plemników. Ponadto w zakresie koncentracji plemników zaobserwowano, że w sezonie letnim wartość ta była najniższa spośród wszystkich analizowanych sezonów użytkowania. Podobnie pod względem żywotności i ruchliwości plemników analizowane ejakulatory były najslabszej jakości w okresie letnim. Jednak w sezonie jesiennym zaobserwowano istotne różnice ( $P<0,05$ ) pod względem ruchliwości i żywotności plemników między starszymi i młodszymi samcami, analizując ich zamrożone nasienie. Buhaje starsze charakteryzowały się istotnie ( $P<0,05$ ) lepszymi parametrami nasienia mrożonego niż młodsze samce. Najwyższą ruchliwość masy plemników zaobserwowano w okresie zimowym i wiosennym.

Uzyskane wyniki wskazują na korelację pomiędzy zmianami temperatur zewnętrznymi (zależnych od pory roku), a profilami oksydacyjnym i antyoksydacyjnym krwi buhajów oraz jakością biologiczną ich nasienia. Ponadto udowadniają, że badane parametry mają związek z wiekiem rozplodników. Wyniki sugerują, że kriopotencjał plemników rośnie wraz z wiekiem samców oraz, że najkorzystniejszym sezonem do mrożenia dawek inseminacyjnych jest zima oraz wczesna wiosna. Zatem niniejsze badania przyczyniły się do lepszego zrozumienia dynamiki zmian systemu anty- i prooksydacyjnego w organizmie buhajów i jego zależności od czynników

środowiskowych oraz osobniczych. **Nadal główny problem stanowią mogą ejakulatory, które w procesie kwalifikacji jakościowej nie uzyskują zadowalających parametrów w zakresie żywotności, czy ruchliwości. Wciąż pozostają one zdyskwalifikowane z procesu produkcji dawek inseminacyjnych i generują straty ekonomiczne. Należy zadać sobie pytanie, czy można poprawić ich jakość na etapie linii produkcyjnej? W związku z powyższym podjęto się dalszych badań poszukujących odpowiedzi na stawiane pytanie.**

#### *4.3.2.4 Możliwości modyfikacji środowiska przechowywania nasienia w celu poprawy jego jakości (publikacja 3)*

Na jakość nasienia wpływać mogą również procesy technologiczne, związane bezpośrednio z jego przygotowaniem, porcjowaniem a następnie przechowywaniem w niskich temperaturach. Jest to związane przede wszystkim z drastycznymi zmianami jakich komórki doświadczają podczas kriokonserwacji. Tworzenie się kryształków lodu i różnego rodzaju stres (chemiczny, fizyczny, osmotyczny i oksydacyjny) podczas procesu zamrażania, poważnie pogarsza jakość i zdolność zapładniającą plemników [40-42]. Chociaż ciągła optymalizacja metod kriokonserwacji poprawiała jakość plemników po zamrożeniu, to zmiany w strukturze plemników, modyfikacja epigenetyczna i długofalowe skutki spowodowane mrożeniem, w tym inaktywacja enzymów, zmiany jonowe i stres oksydacyjny, nie mogą być ignorowane, a dopracowanie procesu kriokonserwacji nadal jest zadaniem wymagającym dalszych badań i ciągłego doskonalenia [43, 44].

**Biorąc pod uwagę powyższe zdecydowano o pionierskim użyciu tetrapeptydu aromatyczno-kationowego (Elamipretide) w technologii produkcji dawek inseminacyjnych w celu zbadania jego potencjału cytoochronnego. Udowodniono m.in., że Elamipretide pozytywnie wpływa na zmiany biochemiczne parametrów stresu oksydacyjnego w plemnikach. Po kriokonserwacji aktywność enzymów antyoksydacyjnych SOD (Superoxide dismutase) i CAT (Catalase) uległa obniżeniu w grupach testowych (z dodatkiem tetrapeptydu) w porównaniu z grupą kontrolną, również stężenie MDA (Malondialdehyde) wykazało istotny spadek ( $P < 0,05$ ). Istotne różnice pomiędzy badanymi grupami zawierającymi dodatek Elamipretide a grupą kontrolną w zakresie aktywności SOD zaobserwowano w próbkach zawierających 1; 5; i 10  $\mu\text{M}$ . Pod względem aktywności enzymatycznej CAT istotne różnice ( $P < 0,05$ )**

zaobserwowano w próbkach zawierających 0,1; 1; 5; i 10  $\mu\text{M}$  Elamipretide w porównaniu z grupą kontrolną. Stężenie MDA w próbkach zawierających 1; 5; i 10  $\mu\text{M}$  Elamipretide istotnie się ( $P < 0,05$ ) obniżyło w stosunku do grupy kontrolnej odpowiednio o 0,63, 0,64 i 0,72 nmol/ml.

Analizowane próbki nasienia przed kriokonserwacją nie wykazywały istotnych różnic pod względem ruchliwości i żywotności plemników w żadnej z badanych grup. Największy odsetek ruchliwych plemników zaobserwowano w grupie z dodatkiem 10  $\mu\text{M}$  Elamipretide (wzrost o 8,98% w stosunku do grupy kontrolnej). Istotnie wyższą ( $P < 0,05$ ) ruchliwość komórek zaobserwowano w próbkach zawierających 1; 5; i 10  $\mu\text{M}$  Elamipretide w stosunku do grupy niezawierającej dodatku. Stabilność błony plazmatycznej wzrosła w grupach testowych, najwyższy wynik żywotności plemników uzyskano w grupie z dodatkiem 10  $\mu\text{M}$  Elamipretide (50,50%), który był wyższy o 10,84% od wyniku uzyskanego w grupie kontrolnej (39,66%).

W badaniach własnych odkryto, że zastosowanie Elamipretide w technologii kriokonserwacji plemników zmniejsza uszkodzenia strukturalne i biochemiczne nasienia wywołane stresem oksydacyjnym. Ponadto, żadne z badanych stężeń tetrapeptydu nie działało toksycznie na plemniki. Niniejsze badanie dostarczyło istotnych informacji na temat potencjalnego mechanizmu cytoochronnego testowanego dodatku i możliwości jego wykorzystania w długoterminowym przechowywaniu nasienia. **Wobec powyższego Elamipretide może stać się w przyszłości potencjalnym antyoksydacyjnym terapeutycznym i zostać wykorzystany w konserwacji plemników w celu utrzymania prawidłowego poziomu ROS podczas krioprezerwacji.**

#### *4.3.2.5 Ocena efektywności kriokonserwacji plemników przechowywanych w różnym środowisku przy użyciu biomarkera proAKAP4 (publikacja 4)*

Tradycyjne analizy jakości nasienia mają ograniczoną wartość prognostyczną dla sukcesu reprodukcyjnego określonych dawek nasienia [45, 46]. Dopiero połączenie kilku analiz pozwoliło na lepsze przewidywanie płodności [45]. Główną przyczyną tych różnic i braku korelacji jest fakt, że dawki inseminacyjne składają się ze zróżnicowanej populacji plemników [47, 48]. Oznacza to, że plemniki różnych samców wykazują znacząco różne reakcje na ten sam proces przygotowania - kriokonserwację. Jest to jeden z ważnych problemów w standaryzacji protokołów kriokonserwacji plemników [49, 50]. Podczas zabiegów konserwujących osocze nasienia i białka plemników modułują ich

przeżycie i funkcjonalność, determinując także ich zdolność do zamrażania. Określone biomolekuły mogą działać jako biomarkery zamrażania, dostarczając nowych informacji na temat mechanizmów leżących u podstaw kriourazowania plemników.

W ostatnim czasie scharakteryzowano nowe technologie oparte na biocząsteczkach zdolnych do przewidywania powodzenia zapłodnienia i wskazywania czynników sprawczych, takich jak stres oksydacyjny, które mogą być ukierunkowane na zapobieganie niepowodzeniom rozrodu [51]. Nowo odkryte białko nasienia i jego prekursor, odpowiednio AKAP4 i proAKAP4, zostały wcześniej uznane za molekularne markery jakości nasienia u różnych gatunków (myszy [52], ogierów [34], knurów [53] i mężczyzn [54, 55]) ze względu na ich wysoką korelację z ruchliwością plemników. AKAP4 i proAKAP4 to białka włóknistej osłonki plemnika o największej ekspresji u wszystkich ssaków, będące częścią głównego fragmentu wici [56-58].

**Jak dotąd nie podjęto się badań nad wykorzystaniem tego nowoczesnego biomarkera do analizy stężenia proAKAP4 w standardowych protokołach kriokonserwacji nasienia w celu oceny skuteczności stosowania rozcieńczalników do długoterminowej konserwacji plemników. W badaniach własnych podjęto się określenia stężenia proAKAP4 w nasieniu rozrzedzonym (I) konwencjonalnym rozrzedzalnikiem i (II) wzbogaconym ekstraktem z *Holothuroidea*. Analiza spektrofotometryczna wykazała istotnie wyższe ( $P < 0,05$ ) stężenie proAKAP4 we wszystkich próbkach rozrzedzonych rozrzedzalnikiem uzupełnionym o ekstrakt. Średnie stężenie proAKAP4 w grupie kontrolnej wynosiło 22,55 ng/ml i było niższe odpowiednio o 14,94; 20,26 i 32,51 ng/ml, w porównaniu z pozostałymi grupami testowymi. Najwyższe stężenie proAKAP4 zaobserwowano w grupie z dodatkiem 6  $\mu$ l ekstraktu, przy 55,06 ng/ml. Istotny efekt ( $P < 0,05$ ) testowanego rozrzedzalnika z ekstraktem zaobserwowano również pomiędzy grupami traktowanymi 2 i 6  $\mu$ l ekstraktu (37,49 vs. 55,06 ng/mL). Ponadto, zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia ekstraktu z *Holothuroidea* odsetek plemników z nienaruszonym akrosomem wzrósł o 4,24%; 6,91% i 7,15%. Istotny spadek ( $P < 0,05$ ) odsetka plemników uszkodzonych zaobserwowano w próbkach z dodatkiem 4 i 6  $\mu$ l ekstraktu. Średnia żywotność plemników w grupie kontrolnej była niższa niż w badanych próbkach, z dodatkiem ekstraktu z *Holothuroidea* odpowiednio o 1,53%; 2,56% i 4,93%; jednak tylko próbki zawierające 6  $\mu$ l ekstraktu były istotnie ( $P < 0,05$ ) bardziej żywotne niż grupa kontrolna.**

Podobne wyniki zaobserwowano dla odsetka martwych (apoptycznych) plemników. W badanej grupie zawierającej 6  $\mu$ l ekstraktu odnotowano znacznie mniej ( $P < 0,05$ ) plemników z uszkodzoną błoną cytoplazmatyczną.

**W opisywanym badaniu po raz pierwszy zastosowano biomarker proAKAP4 do oceny skuteczności zamrażania nasienia w różnych środowiskach konserwujących i udowodniono, że może być z powodzeniem wykorzystywany do oceny skuteczności zastosowania różnych środków do kriokonserwacji plemników.** Niniejsze doświadczenie przyczyniło się do pogłębienia wiedzy w zakresie możliwości wykorzystania nowoczesnych markerów do identyfikacji (i selekcji) materiału biologicznego o dobrej i obniżonej jakości.

Podsumowując wysoka wydajność reprodukcyjna buhajów użytkowanych w stacjach hodowli i unasienniania jest jednym z najważniejszych aspektów opłacalności produkcji materiału biologicznego. Zarówno czynniki środowiskowe, osobnicze, jak i technologiczne mają znaczący wpływ na jakość produkowanego i przechowywanego nasienia (dawek inseminacyjnych). Obniżoną wydajność rozrodczą samców można poprawić poprzez odpowiednie zarządzanie stadem oraz produkcją, doskonaleniem środowiska przechowywania plemników i wczesną identyfikację ejakulatów nieprzydatnych w procesie technologicznym.

#### 4.3.3 Wnioski

Wnioskując, w ramach badań będących przedmiotem osiągnięcia ustalono, że:

- 1) zmiany profili oksydacyjnych i antyoksydacyjnych we krwi buhajów związane z porą roku sugerują, że rozplodniki mogły być narażone na stres cieplny latem i wczesną jesienią z uwagi na wysoką, niekorzystną temperaturę powietrza notowaną w tych okresach. Skutkowało to obniżeniem jakości biologicznej nasienia oraz jego kriopotencjału
- 2) użytkowanie rozrodcze samców w stacjach hodowli i unasienniania należy intensyfikować w okresie zimowym i wczesnowiosennym, bowiem koncentracja plemników notowana w tych okresach sprzyja ilości możliwych do wyprodukowania dawek inseminacyjnych a wyższy kriopotencjał nasienia zapewnia lepsze wyniki jego mrożenia w tych okresach

- 3) ejakulatory buhajów, wykazujące słabszą zdolność do mrożenia z uwagi na notowany wzrost aktywności enzymów przeciwutleniających i akumulację malondialdehydu (i tym samym podlegające dyskwalifikacji z procesu produkcji dawek inseminacyjnych) można poprawić poprzez zastosowanie 5 lub 10  $\mu\text{L}$  Elamiptretide jako dodatku do rozrzedzalnika do nasienia przed kriokonserwacją
- 4) równowagę redoks należy badać w sposób integracyjny, w połączeniu z innymi markerami jakości plemników (np. koncentracja proAKAP4), aby uzyskać więcej wartości predykcyjnych dotyczących powodzenia zapłodnienia
- 5) potencjał zapładniający plemników przechowywanych w różnych środowiskach można rutynowo badać stosując nowoczesny biomarker proAKAP4. Co więcej udowodniono, że wskaźnik ten stał się pomocny w identyfikacji plemników o słabej jakości biologicznej, bowiem wyższa koncentracja proAKAP4 przekłada się na lepszą funkcjonalność komórek.

## Literatura

1. Buffone, M.G., et al., Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Molecular Reproduction and Development*, 2012, 79(1), p. 4-18.
2. Navara, C.S., First, N.L., Schatten, G., Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis, and nuclear transfer: the role of the sperm aster. *Dev. Biol.*, 1994, 162(1), p. 29-40.
3. Immler, S., The sperm factor: paternal impact beyond genes. *Heredity*, 2018, 121(3), p. 239-247.
4. Sullivan, R., Mieusset, R., The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human Reproduction Update*, 2016, 22(5), p. 574-587.
5. Memili, E., Moura, A.A., Kaya, A., Metabolomes of sperm and seminal plasma associated with bull fertility. *Animal Reproduction Science*, 2020, 220, 106355.
6. Bissonnette, N., et al., Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality. 2009, 138(1), p. 65.
7. Barth, A.D., Case-based studies of infertility in bulls. in 45th Annual Conference. American Association of Bovine Practitioners, 2012. Montreal, Canada.
8. Koziol, J.H., Armstrong, C.L., Society for theriogenology manual for breeding soundness examination of bulls. 2018: Society for Theriogenology.
9. Kowalczyk, A., Gałęska, E., Czerniawska-Piątkowska, E., et al., The impact of regular sperm donation on bulls' seminal plasma hormonal profile and phantom response. *Sci. Rep.*, 2021, 11, 11116. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90630-8>
10. Barth, A.D., Review: The use of bull breeding soundness evaluation to identify subfertile and infertile bulls. *Animal*, 2018, 12, p. s158-s164.
11. Kastelic, J., Thundathil J., Breeding Soundness Evaluation and Semen Analysis for Predicting Bull Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008. 43, p. 368-373.
12. De Jonge, C., Attributes of Fertile Spermatozoa: An Update. *Journal of Andrology*, 1999, 20(4), p. 463-473.

13. DeJarnette, J.M., The Effect of Semen Quality on Reproductive Efficiency. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 2005, 21(2), p. 409-418.
14. Fraczek, M., Kurpisz, M., Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *J. Androl.*, 2007, 28, 325-33.
15. Ford, C.E., Jones, K.W., Miller, O.J., Mittwoch, U., Penrose, L.S., Ridler, M., et al., The chromosomes in a patient showing both mongolism and the Klinefelter syndrome. *Lancet*, 1959, 1, 709-10.
16. Aitken, R.J., The Amoroso Lecture. The human spermatozoon—a cell in crisis? *J. Reprod. Fertil.*, 1999, 115, 1-7.
17. Henkel, R., Schill, W.B., Sperm separation in patients with urogenital infections. *Andrologia*, 1998, 30(Suppl 1), 91-97.
18. Sanocka-Maciejewska, D., Ciupinska, M., Kurpisz, M., Bacterial infection and semen quality. *J. Reprod. Immunol.*, 2005, 67, 51-56.
19. Schuppe, H.C., Meinhardt, A., Allam, J.P., Bergmann, M., Weidner, W., Haidl, G., Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia*, 2008, 40, 84-91.
20. Hull, M., Glazener, C., Kelley, N., Conway, D., Foster, P., Hunton, R., Coulson, C., Lambert, P., Watt, E., Desai, K., Population study of causes, treatment and outcome of fertility. *Br. Med. J.*, 1985, 291, 1693-7.
21. Majić Balić, I., Milinković-Tur, S., Samardžija, M., Vince, S., Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in simmental bulls, *Theriogenology*, 2012, Volume 78, Issue 2, Pages 423-431.
22. Nongbua, T., Utta, A., Am-In, N., Suwimonteerabutr, J., Johannisson, A., Morrell, J.M., Effects of season and single layer centrifugation on bull sperm quality in Thailand. *Asian-Australas J. Anim. Sci.*, 2020, 33(9), 1411-1420.
23. Murphy, E.M., Kelly, A.K., O'Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., Fair, S., Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre, *Journal of Animal Science*, 2018, Volume 96, Issue 6, p. 2408-2418.
24. Khatun, A., Rahman, M.S., Pang, M.G., Clinical assessment of the male fertility. *Obstet. Gynecol. Sci.*, 2018, 61, 179-191.
25. Nixon, B., Bernstein, I.R., Cafe, S.L., Delehedde, M., Sergeant, N., Anderson, A.L., Trigg, N., Eamens, A., Lord, T., Dun, M.D., et al., A kinase anchor protein 4 is vulnerable to oxidative adduction in male germ cells. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2019, 7, 319.
26. Luconi, M., Cantini, G., Baldi, E., Forti, G., Role of a-kinase anchoring proteins (AKAPs) in reproduction. *Front. Biosci.*, 2011, 16, 1315-1330.
27. Sergeant, N., Briand-Amirat, L., Bencharif, D., Delehedde, M., The sperm specific protein proAKAP4 as an innovative marker to evaluate sperm quality and fertility. *J. Dairy Vet. Sci.*, 2019, 11, 1-19.
28. Delehedde, M., Bloomaert, D., Jouy, N., Scabello, J., Miersman, H., Franck, T., Serteyn, D., Mitchell, V., Sergeant, N., Concentration of proAKAP4 as a pertinent read-out of sperm quality in mammals. *Anim. Reprod. Sci.*, 2019, 194, 224.
29. Delehedde, M., Demouveau, B., Remy, G., Selleslagh, M., Dewulf, Q., Desseyn, J.L., Moreau, P., Gosset, P., Pichavant, M., Sergeant, N., ProAKAP4 concentrations as an indicator of good spermatogenesis and sperm quality under oxidative stress conditions. *Andrology*, 2019, 7, 86.
30. Blommaert, D., Sergeant, N., Delehedde, M., Franck, T., Lejeune, J., Serteyn, D., Significant correlation between the proAKAP4 concentration and the total and progressive motility in stallion sperm after thawing. *J. Equine Vet.-Sci.*, 2018, 66, 43.

31. Jumeau, F., Sigala, J., Dossou-Gbete, F., Frimat, K., Barbotin, A.L., Buee, L., Béhal, H., Sergeant, N., Mitchell, V., A-kinase anchor protein 4 precursor (pro-AKAP4) in human spermatozoa. *Andrology*, 2018, 6, 854-859.
32. Vijayaraghavan, S., Goueli, S.A., Davery, M.P., Carr, D.W., Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 4747-4752.
33. Ruelle, I., Charreaux, F., Bencharif, D., Thorin, C., Michaud, S., Delehedde, M., Briand-Amirat, L., Sergeant, N., Schmitt, E., Assessment of the sperm specific protein proAKAP4 as a marker to evaluate sperm quality and fertility in Holstein bulls. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 2019, 43, 472.
34. Blommaert, D., Sergeant, N., Delehedde, M., Jouy, N., Mitchell, V., Franck, T., Donnay, I., Lejeune, J., Serteyn, D., Expression, localization, and concentration of A-kinase anchor protein 4 (AKAP4) and its precursor (proAKAP4) in equine semen: Promising marker correlated to the total and progressive motility in thawed spermatozoa. *Theriogenology*, 2019, 131, 52-60.
35. Barati, E., Nikzad, H., Karimian, M., Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2020, 77, 93-113.
36. Aitken, R.J., Clarkson, J.S., Fishel, S., Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol. Reprod.*, 1989, 41, 183-97.
37. Sies, H., Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, 1993, 215, 213-9.
38. Peeker, R., Abramsson, L., Marklund, S.L., Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 1997, 3, 1061-1066.
39. Kumar, A., Singh, J., Dhaliwal, G.S., Singh, P., (2008) Incidence and factors associated with poor libido in breeding buffalo bulls. *Indian Journal of Animal Sciences*, 2008, 78 (2), 143-145.
40. Watson, P.F., Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1995, 7, 871-891.
41. Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani Nashtaei, M., Khodarahmian, M., Nekoonam, S., The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank*, 2016, 17, 745-756.
42. Ezzati, M., Shانهbandi, D., Hamdi, K., Rahbar, S., Pashaiasl, M., Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. *Cell Tissue Bank*, 2020, 21, 1-15.
43. Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H.M., et al., Sperm cryopreservation: a review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reprod. Biomed.*, 2018, 37, 327-339.
44. Zeng, C., Peng, W., Ding, L., et al., A preliminary study on epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology*, 2014, 69, 119-127.
45. Petrunkina, A.M., Waberski, D., Günzel-Apel, A.R., Töpfer-Petersen, E., Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction*, 2007, 134, 3-17.
46. Palomar Rios, A., Molina Botella, I., Sperm parameters that play a major role in the assessment of semen quality after cryopreservation. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 2017, 34, 1271-1276.
47. Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M., Herraez, P., Anel, L., de Paz, P., Sperm Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm and Their Changes Through the Cryopreservation Process. *Biol. Reprod.*, 2005, 72, 316-327.



48. Rodríguez-Martínez, H., Can We Increase the Estimative Value of Semen Assessment?. *Reprod. Domest. Anim.*, 2006, 41, 2-10.
49. Ramón, M., Pérez-Guzmán, M.D., Jiménez-Rabadán, P., Estesó, M.C., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Anel-López, L., Soler, A.J., Fernández-Santos, M.R., Garde, J.J., Sperm Cell Population Dynamics in Ram Semen during the Cryopreservation Process. *PLoS ONE*, 2013, 8, e59189.
50. Thurston, L.M., Watson, P.F., Mileham, A.J., Holt, W.V., Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.*, 2018, 22, 382-394.
51. Aitken, R.J., Baker, M.A., Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int. J. Dev. Biol.*, 2013, 57, 265-272.
52. Fang, X., Huang, L.-L.L., Xu, J., Ma, C.-Q.Q., Chen, Z.-H.H., Zhang, Z., Liao, C.-H.H., Zheng, S.-X.X., Huang, P., Xu, W.-M.M., et al., Proteomics and single-cell RNA analysis of Akap4-knockout mice model confirm indispensable role of Akap4 in spermatogenesis. *Dev. Biol.*, 2019, 454, 118-127.
53. Kwon, W.S., Oh, S.A., Kim, Y.J., Rahman, M.S., Park, Y.J., Pang, M.G., Proteomic approaches for profiling negative fertility markers in inferior boar spermatozoa. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 13821.
54. Rahamim Ben-Navi, L., Almog, T., Yao, Z., Seger, R., Naor, Z., A-Kinase Anchoring Protein 4 (AKAP4) is an ERK1/2 substrate and a switch molecule between cAMP/PKA and PKC/ERK1/2 in human spermatozoa. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 37922.
55. Nixon, B., Bernstein, I.R., Cafe, S.L., Delehedde, M., Sergeant, N., Anderson, A.L., Trigg, N.A., Eamens, A.L., Lord, T., Dun, M.D., et al., A Kinase Anchor Protein 4 Is Vulnerable to Oxidative Adduction in Male Germ Cells. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2019, 7, 319.
56. Huang, Z., Somanath, P.R., Chakrabarti, R., Eddy, E.M., Vijayaraghavan, S., Changes in Intracellular Distribution and Activity of Protein Phosphatase PP1 $\gamma$ 2 and Its Regulating Proteins in Spermatozoa Lacking AKAP41. *Biol. Reprod.*, 2005, 72, 384-392.
57. Pereira, R., Sá, R., Barros, A., Sousa, M., Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J. Androl.*, 2015, 19, 5.
58. Carrera, A., Moos, J., Ning, X.P., Gerton, G.L., Tesarik, J., Kopf, G.S., Moss, S.B., Regulation of Protein Tyrosine Phosphorylation in Human Sperm by a Calcium/Calmodulin-Dependent Mechanism: Identification of A Kinase Anchor Proteins as Major Substrates for Tyrosine Phosphorylation. *Dev. Biol.*, 1996, 180, 284-296.

#### 4.4 Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Przedmiotem mojej pozostałej aktywności naukowej jest analiza (I) czynników wpływających na zdrowie reprodukcyjne, ocena (II) wpływu różnych czynników na zmiany strukturalne i funkcjonalne plemników ssaków oraz preferencje hodowców dotyczące rodzaju nasienia (schłodzone, mrożone), poszukiwanie (III) nowoczesnych biomarkerów wykorzystywanych w diagnostyce stanów fizjologicznych i chorobowych

w odniesieniu do reprodukcji oraz analiza (IV) uwarunkowań genetycznych i środowiskowych wydajności produkcyjnej zwierząt.

Dokonując obszernego przeglądu literatury [1] stwierdzono, że monitorowanie występowania i stężenia metali toksycznych w środowisku jest niezwykle istotne dla zachowania zdrowia reprodukcyjnego, bowiem przewlekłe narażenie bydła na metale toksyczne może powodować embriotoksyczność, zaburzenia spermatogenezy i rozwój oocytów. Z kolei wnikliwe studiując aktualny stan wiedzy na temat wydajności reprodukcyjnej krów [2] ustalono, że narażenie krów na przewlekły stres, w tym niekorzystne warunki środowiskowe takie jak zbyt wysoka temperatura powietrza i niewłaściwe żywienie może prowadzić do kosztownych skutków w postaci spadku wskaźnika zapłodnialności samic, wzrostu wskaźnika utraty ciąży i sprzyja rozwojowi zaburzeń reprodukcyjnych. Stwierdzono także, że wydajność systemu reprodukcyjnego zarówno u samic jak i samców można poprawić stosując różnego rodzaju bioekstrakty [3, 14]. W przedstawionym przeglądzie zebrano stwierdzone przez różnych badaczy pozytywne działanie ekstraktów roślinnych i podkreślono możliwość stworzenia dzięki nim nowych możliwości wykorzystania bioodpadów, które są produktem ubocznym w różnych sektorach produkcyjnych. Jednocześnie podkreślając także, że opracowanie odpowiedniej dawki dla konkretnego ekstraktu może być utrudnione ze względu na zmienny skład chemiczny poszczególnych gatunków roślin oraz różne rodzaje ekstraktów z nich wytwarzanych i wykorzystywanych metod ekstrakcji.

Na podstawie aktualnego stanu wiedzy, zwrócono uwagę na stałą konieczność doskonalenia środowiska do przechowywania nasienia buhajów z uwagi na wciąż jeszcze niską skuteczność konserwacji ich nasienia [4]. Ważnym osiągnięciem była analiza wpływu octanu busereliny na jakość biologiczną plemników buhajów [5]. W przedmiotowych badaniach własnych udowodniono, że suplementacja rozrzedzalnika do kriokonserwacji nasienia wspomnianą substancją poprawia żywotność plemników oraz ogranicza uszkodzenia DNA komórek podczas zamrażania w niskich temperaturach. Z kolei prowadząc analizę rynku (międzynarodowego) po raz pierwszy udowodniono, że sposób użytkowania koni (sportowy, hodowlany, rekreacyjny) oraz metoda przechowywania nasienia przeznaczonego do inseminacji są zależne od jakości dostępnego na rynku nasienia [6]. W badaniach własnych wskazano, że popularność stosowania schłodzonego nasienia do sztucznej inseminacji klaczy w Europie stopniowo wzrasta

w grupie klaczy sportowych, natomiast w grupie klaczy hodowlanych w ostatnich latach zyskuje na popularności nasienie mrożone. W pozostałej grupie klaczy (niezaklasyfikowanych jako sportowe ani hodowlane) dominowało unasiennianie schłodzonym nasieniem. Ustalono, że popularność rodzaju nasienia używanego do inseminacji jest determinowana przede wszystkim skutecznością inseminacji wybranym rodzajem dawki (schłodzona lub mrożona) oraz jakością biologiczną ejakulatu przechowywanego w stanie płynnym lub zamrożonym, co wpływa na tę skuteczność.

Szczególne zainteresowanie rozrodem zwierząt skierowano na nowoczesne techniki diagnostyki wykorzystywane w reprodukcji zwierząt i ludzi oraz ich efektywność. Biomedyczny potencjał egzosomów [7] omówiono na podstawie najnowszej literatury. W niniejszej pracy podkreślono, że identyfikacja egzosomów jako markerów pomoże zrozumieć zaburzenia płodności spowodowane dysfunkcją narządów płciowych i gruczołów dodatkowych. Co więcej, wykorzystanie egzosomów w terapii jako nośników leków wydaje się być przyszłością leczenia, co również zaznaczono w niniejszym artykule. Z kolei potencjał diagnostyczny interferonu (IFNT) - Tau [8] został omówiony w innej publikacji, w której wyjaśniono proces wydłużania zarodka (podczas jego rozwoju) i jego znaczący związek z wytwarzaniem odpowiedniej ilości IFNT. We wspomnianym przeglądzie zwracano także uwagę na możliwość jego wczesnego wykrywania w płynach obwodowych położonych dystalnie od żyły macicy jako kandydata na wiarygodny i konkurencyjny biomarker do wykrywania wczesnej ciąży.

Poza główną specjalizacją, jaką jest rozród zwierząt, systematycznie poszerzano wiedzę z zakresu ich hodowli oraz wydajności produkcyjnej. Wiele uwagi poświęcono także wpływowi czynników genetycznych oraz środowiskowych na jakość wybranych produktów pochodzenia zwierzęcego. W badaniach własnych stwierdzono, że podroby stanowiące produkty uboczne produkcji mięsa są bogatym źródłem pierwiastków śladowych, których poziomy/ilości są zwykle znacznie wyższe niż w przypadku tkanek mięśniowych [9]. Ponadto, w ramach rozszerzenia dotychczasowego pola badawczego podjęto się badań nad związkiem polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP) z jakością produkowanego nasienia oraz cechami reprodukcyjnymi zwierząt gospodarskich, jak również ich wydajnością produkcyjną [10, 11, 12]. Udowodniono m.in., że heterozygotyczne genotypy wszystkich analizowanych polimorfizmów (genu CRH) determinowały najbardziej ekstensywną masę ciała analizowanych zwierząt. Co

więcej, odkryto zależność między polimorfizmem genu PRL, potencjałem rozrodczym a masą ciała krów i cieląt. Dzięki czemu wyniki te można wykorzystać w selekcji genetycznej zwierząt gospodarskich. Z kolei w badaniach dotyczących zależności między wybranymi czynnikami fizjologicznymi a parametrami doju krów przy użyciu robota udojowego [13] odkryto, że naturalna zmienność fizjologiczna budowy wymienia i strzyków, a także przebieg laktacji istotnie wpływa na indywidualny skład i przepływ mleka podczas doju. Co więcej, możliwość regulowania przepływu mleka poprzez regulację odpowiedniego podciśnienia podczas pracy robota, w obserwowanej zmienności poszczególnych ćwiartek gruczołu mlekowego, zwiększa efektywność doju, a w efekcie zmniejsza ryzyko wystąpienia *mastitis* u krów.

Prowadzone liczne badania przyczyniają się do lepszego zrozumienia wpływu różnych czynników na wydajność rozrodczą i produkcyjną zwierząt oraz pogłębiają wiedzę na temat nowoczesnych technik diagnostycznych oraz terapeutycznych wykorzystywanych we wspomagającym rozrodzie.

#### Literatura

1. Wrzecińska M., **Kowalczyk A.**, Cwynar P., Czerniawska-Piątkowska E. (2021). *Disorders of the reproductive health in cattle as a response to exposure to toxic metals*. Biology, vol. 10, nr 9, s.1-16, Numer artykułu:882.
2. Wrzecińska M., Czerniawska-Piątkowska E., **Kowalczyk A.** (2021). *The impact of stress and selected environmental factors on cows' reproduction*. Journal of Applied Animal Research Article vol. 49, nr 1, s.318-323.
3. **Kowalczyk A.**, Kupczyński R., Gałęska E., Jose Pedro A., Czerniawska-Piątkowska E. (2022). *Clinical application of bio-extracts in supporting the reproductive system of animals and humans - potential and limitations*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Vol. 2022, s.1-12, Numer artykułu:4766409
4. **Kowalczyk A.**, Kuczaj M., Czerniawska-Piątkowska E. (2020). *The role of environmental optimization for storing bulls' sperm cells*. System Biology of Reproductive Medicine. Systems Biology in Reproductive Medicine, 66, 5, 300-310.
5. **Kowalczyk A.**, Czerniawska-Piątkowska E., Kuczaj M. (2020). *Buserelin acetate reduces mortality and DNA defragmentation of bovine sperm cells exposed to oxidative stress*. Pakistan J. Zool., vol. 52(5), 1795-1799.
6. **Kowalczyk A.**, Czerniawska-Piątkowska E., Kuczaj M. (2019). *Role of stallion sperm production technology in popularity of artificial insemination of mares in Europe*. Animals, 9, 460, 1-8.
7. **Kowalczyk A.**, Wrzecińska M., Czerniawska-Piątkowska E., Kupczyński R. (2022). *Exosomes - spectacular role of membrane vesicles in reproduction*. Biomedicine & Pharmacotherapy, vol. 148, s.1-12, Numer artykułu:112752.
8. **Kowalczyk A.**, Czerniawska-Piątkowska E., Wrzecińska M. (2021). *The importance of interferon-tau in the diagnosis of pregnancy*. BioMed Research International, vol. 2021, s.1-6, Numer artykułu:9915814.

9. Biel W., Czerniawska-Piątkowska E., **Kowalczyk A.** (2019). *Offal chemical composition from calves, beef and lambs maintained in organic production systems.* *Animals*, 9, 489, 1-10.
10. Kowalewska-Łuczak I., Czerniawska-Piątkowska E., **Kowalczyk A.** (2021). *Relationship between polymorphism in the CRH gene and the traits of body conformation of Salers cows.* *Animal Biotechnology*, 32, 1, 38-42.
11. Pytlewski J., Antkowiak I., Czerniawska-Piątkowska E., **Kowalczyk A.** (2021). *A dependency between PRL gene polymorphism and breeding parameters in Polish black-and-white Holstein-Friesian cows.* *Animal Biotechnology*. vol. 32, nr 4, s.432-438.
12. **Kowalczyk A.**, Kowalewska-Łuczak I., Czerniawska-Piątkowska E. (2022). *Correlation of Polymorphism of AQP7 Gene with the Sperm Cells Quality Traits of the Polish Holstein Friesian Bulls.* *Pakistan Journal of Zoology*, In press
13. Kuczaj M., Mucha A., **Kowalczyk A.**, Mordak R., Czerniawska-Piątkowska E. (2020). *Relationships between selected physiological factors and milking parameters for cows using a milking robot.* *Animals*, 10(11), 2063.
14. **Kowalczyk A.**, Gałęska., Szul A., Łacka K., Bubel A., Araujo P., Ullah R. (2022). *Fertility rate and assessment of the cytoprotective capacity of various types of Holothuroidea extracts on spermatozoa.* *Veterinary Sciences*, 9, 189-202.

4. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

#### 4.1 Współpraca zagraniczna

Na przełomie 2018 i 2019 roku odbyłam staż zagraniczny w Katedrze Anatomii Zwierząt i Histologii, na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Narodowego Uniwersytetu Przyrodniczego i Nauk o Środowisku (National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine) w Ukrainie. Podczas realizacji tego stażu uczestniczyłam w pracy badawczej pracowników Katedry związanej m.in. z hormonalną regulacją cyklu rujowego, fizjologii, czy biologii rozrodu zwierząt oraz doskonaliłam umiejętności projektowania i realizacji własnych pomysłów naukowych. Efektem mojej współpracy ze wspomnianym ośrodkiem są wyniki badań prezentowane na licznych konferencjach naukowych (poz.1 tab. 2).

W lipcu (2020 roku) nawiązałam współpracę z naukowcami z Portugalii i odbyłam staż na Wydziale Escola Superior Agraria, Polytechnic Institute of Viana do Castelo, gdzie miałam okazję zapoznać się z problematyką wspomaganego rozrodu specyficzną dla tamtejszych regionów. Wspólne zainteresowania badawcze zaowocowały powstaniem kilku artykułów naukowych, doniesień konferencyjnych (poz. 2 tab. 2) oraz projektem, o którego finansowanie wspólnie zaaplikowaliśmy do Narodowego Centrum

Nauki w grudniu 2021 (SONATA 17, projekt zakwalifikowany do II etapu oceny). Nawiązane wówczas kontakty pozwoliły mi również odbyć wizytę studyjną na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu w Santiago de Compostela, a powstałe podczas spotkań pomysły również przyczyniły się do powstania kilku wspólnych prac (poz. 3 tab. 2). Od tego momentu nieprzerwanie współpracujemy analizując różne czynniki wpływające na zdrowie reprodukcyjne zwierząt oraz ich wydajność rozrodczą.

W 2022 roku rozpoczęłam także współpracę z badaczem z Arabii Saudyjskiej (Department of Pharmacognosy, College of Pharmacy Kind Saud Univeristy), którego doświadczenie w zakresie ekstrakcji surowców pochodzenia naturalnego wykorzystywanych w medycynie oraz znajomość farmakokinetyki tych ekstraktów pozwoliło mi lepiej zrozumieć mechanizm działania substancji bioaktywnych, które wykorzystuję w doskonaleniu środowiska przechowywania plemników (poz 4. tab 2.).

#### 4.2 Współpraca krajowa

W ramach aktywności naukowej i poszukiwania odpowiedzi na stawiane pytania badawcze podjęłam się współpracy z Zachodniopomorskim Uniwersytetem Technologicznym w Szczecinie, z którym intensywnie współpracuję nieprzerwanie od 2018 roku. Wspólnie z Zespołem stworzonym z pracownikami Katedry Nauk o Zwierzętach Przeżuwających, Katedry Genetyki oraz Katedry Nauk o Zwierzętach Monogastrycznych rozwiązujemy problemy badawcze z zakresu reprodukcji zwierząt, a także uwarunkowań genetycznych i środowiskowych efektywności produkcji zwierzęcej (poz. 5 tab. 2). Przy realizacji badań współpracę nawiązano także z Katedrą Genetyki Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (poz. 7 tab. 2.) oraz Szkołą Główną Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (Katedra Genetyki i Ochrony Zwierząt) (poz. 6 tab. 2.)

Tabela 2. Wykaz oraz wybrane efekty współpracy naukowej z innymi jednostkami badawczymi

	Pozycja	Współpraca zagraniczna	Wybrane efekt współpracy
Jednostka naukowa	1.	- Department of Animal Anatomy, Histology and Pathomorphology National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine	Doniesienia konferencyjne: [1, 2, 3, 4]
	2.	- Escola Superior Agraria, Polytechnic Institute of Viana do Castelo - Veterinary and Animal Research Centre, University of Trás-os-Montes and Alto Douro	Artykuły naukowe: [1, 2] Doniesienia konferencyjne: [5, 6, 7, 8, 9, 10]
	3.	- Department of Physiology, University of Santiago de Compostela	Doniesienia konferencyjne: [7, 8, 9]
	4.	- Department of Pharmacognosy, College of Pharmacy Kind Saud Univeristy	Artykuły naukowe: [6]
		<b>Współpraca krajowa</b>	
	5.	- Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie - Katedra Genetyki, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie - Katedra Nauk o Zwierzętach Monogastrycznych, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie	Artykuły naukowe: [3, 4]
	6.	- Katedra Genetyki i Ochrony Zwierząt, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie - Katedra Nauk Morfologicznych, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie	Doniesienia konferencyjne: [11]
7.	- Katedra Hodowli Zwierząt i Oceny Surowców, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu	Artykuły naukowe: [5]	

#### 4.3 Wykaz wybranych efektów:

##### 4.3.1 Artykuły naukowe

- Kowalczyk A.,** Kupczyński R., Gałęska E., Jose Pedro A., Czerniawska-Piątkowska E. (2022). *Clinical application of bio-extracts in supporting the reproductive system of animals and humans - potential and limitations*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Vol. 2022, s.1-12, Numer artykułu:4766409
- Kowalczyk A.,** Kowalewska-Łuczak I., Czerniawska-Piątkowska E. (2022). Correlation of Polymorphism of AQP7 Gene with the Sperm Cells Quality Traits of the Polish Holstein Friesian Bulls. *Pakistan Journal of Zoology*, In press

3. Kowalewska-Łuczak I., Czerniawska-Piątkowska E., **Kowalczyk A.** (2021). *Relationship between polymorphism in the CRH gene and the traits of body conformation of Salers cows.* Animal Biotechnology. 32, 1, 38-42.
4. Biel W., Czerniawska-Piątkowska E., **Kowalczyk A.** (2019). *Offal chemical composition from calves, beef and lambs maintained in organic production systems.* Animals. 9, 489, 1-10.
5. Pytlewski J., Antkowiak I., Czerniawska-Piątkowska E., **Kowalczyk A.** (2021). *A dependency between PRL gene polymorphism and breeding parameters in Polish black-and-white Holstein-Friesian cows.* Animal Biotechnology. vol. 32, nr 4, s.432-438.
6. **Kowalczyk A.**, Gałęska., Szul A., Łacka K., Bubel A., Araujo P., Ullah R. (2022). *Fertility rate and assessment of the cytoprotective capacity of various types of Holothuroidea extracts on spermatozoa.* Veterinary Sciences, 9, 189-202.

#### 4.3.2 Doniesienia konferencyjne

1. **Kowalczyk A.**, Szul A., Jędraszczyk J., Kuczaj M., Czerniawska-Piątkowska E., Kostiuk V. (2019). *Composition of bulls' seminal plasma – importance for bovine reproduction.* Mat. Konf. IV International Scientific and Practical Conference of Teachers and Students, Actual aspects of animal biology, veterinary medicine and veterinary - sanitary examination, Dnipro, 22-23.05.2019 r., 7.
2. Wrzecińska M., Czerniawska-Piątkowska E., **Kowalczyk A.**, Biel W., Kostiuk V., Szewczyk A., Malepsza M. (2019). *Specific characteristics of sheep's milk and pro-health properties.* Mat. Konf. IV International Scientific and Practical Conference of Teachers and Students, Actual aspects of animal biology, veterinary medicine and veterinary - sanitary examination, Dnipro, 22-23.05.2019 r., 101.
3. Malepsza M., Guszczenko A., Czerniawska-Piątkowska E., Kowalewska-Łuczak I., **Kowalczyk A.**, Kostiuk V. (2019). *Myostatin polymorphism.* Mat. Konf. IV International Scientific and Practical Conference of Teachers and Students, Actual aspects of animal biology, veterinary medicine and veterinary - sanitary examination, Dnipro, 22-23.05.2019 r., 115.
4. **Kowalczyk A.**, Czerniawska-Piątkowska E., Wrzecińska M., Gałęska E., Shuvar I. (2021). *The importance of interferon-tau in the diagnosis of pregnancy – the review.* Konferencja Międzynarodowa „Роль науково-технічного забезпечення розвитку агропромислового комплексу в сучасних ринкових умовах” Dnipro, 28.02.2021 r.
5. Araújo J.P., Sobreiro S., Cerqueira J.L., Pereira Pinto R., **Kowalczyk A.**, Vaz-Velho M. (2021). *Growth performance of Bisaro breed and commercial hybrid entire males on outdoor housing system.* Poster presentation on XXII Congresso de Zootecnia, 29-30.11.2021 r., Vila Real, Portugal.
6. **Kowalczyk A.**, Gałęska E., Łacka K., Szul A., Bubel A., Araújo J.P., Cerqueira J.L., Wrzecińska M. (2021). *Analysis of ProAKAP4 concentration in cryopreserved bulls' semen with the addition of sea cucumber extract.* II<sup>nd</sup> International Conference: "Assisted Reproduction Technologies - Current Threats and Chances", 3-4.12.2021 r., Toruń, Poland.
7. Ferreira J.M., Araújo J.P., Cerqueira J.L., **Kowalczyk A.**, Cantalapiedra J., Iglesias A. (2021). *Analysis of the scrotal circumference of young Galician blonde bulls using non-linear models of growth curves.* Poster presentation on XXII Congresso de Zootecnia, 29-30.11.2021 r., Vila Real, Portugal.
8. Gałęska E., **Kowalczyk A.**, Cantalapiedra J., Joaquim Cerqueira J.L., Araújo J.P., Wrzecińska M. (2021). *Energy Deficit And Estrus Disturbances In Cows, The*



- International Conference "Biomorphology Of The XXI Century", Kyiv, Ukraine, September 23-24, 2021, UDC 591.4, 453, 86-87.
9. Gałęska E., **Kowalczyk A.**, Cantalapiedra J., Joaquim Cerqueira J.L., Araújo J.P., Wrzecińska M., Kostiuik V., Melnyk O.7, Dudus T. (2021). *The Importance Of Proper Supplementation In The Rearing In Foals*, The International Conference "Biomorphology Of The XXI Century", Kyiv, Ukraine, September 23-24, 2021, UDC 591.4, 453, 87-88.
  10. **Kowalczyk A.**, Gałęska E., Szul A., Łacka K., Bubel A., Araújo J.P. (2021). *Cytoprotective Capacity Of Sea Cucumber Extracts*, The International Conference "Biomorphology Of The XXI Century", Kyiv, Ukraine, September 23-24, 2021, UDC 591.4, 453, 90-91.
  11. Świderek W., Czerniawska-Piątkowska E., Kuczaj M., **Kowalczyk A.**, Gruszczyńska J., Mikula I. (2020). *Relationship between sex hormones and bull semen quality*. XXVIII Szkoła Zimowa Hodowców Bydła, 30.

5. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

#### 5.1 Osiągnięcia dydaktyczne

Ważnym aspektem mojej pracy zawodowej jest prowadzenie zajęć dydaktycznych dla studentów kierunku zootechnika, biologia, biologia człowieka oraz bezpieczeństwo żywności, zarówno na studiach stacjonarnych jak i niestacjonarnych.

Poniżej przedstawiony został wykaz prowadzonych przeze mnie zajęć dydaktycznych na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt:

Realizowane przedmioty:

- *organizacja produkcji nasienia zwierząt*: prowadzony w formie wykładów i ćwiczeń (na kierunku zootechnika), studia stacjonarne i niestacjonarne
- *neonatologia*: prowadzony w formie ćwiczeń (na kierunkach zootechnika oraz biologia), studia stacjonarne oraz niestacjonarne
- przedmiot *profilaktyka weterynaryjna*: prowadzony w formie ćwiczeń (na kierunkach zootechnika, bezpieczeństwo żywności), studia stacjonarne i niestacjonarne
- *ochrona zdrowia zwierząt*: prowadzony w formie wykładów i ćwiczeń (kierunek zootechnika), studia stacjonarne i niestacjonarne
- *bioetyka*: prowadzony w formie wykładów (na kierunkach biologia, biologia człowieka) i ćwiczeń oraz wykładów (na kierunku zootechnika), studia stacjonarne

- *zarządzanie środowiskowe i ekologiczna produkcja żywności*: prowadzony w formie ćwiczeń (na kierunku bezpieczeństwo żywności), studia stacjonarne
- *profilaktyka i dobrostan zwierząt towarzyszących*: prowadzony w formie ćwiczeń (na kierunku biologia), studia stacjonarne
- *zdrowie zwierząt a bezpieczeństwo produktów pochodzenia zwierzęcego*: prowadzony w formie ćwiczeń (na kierunku bezpieczeństwo żywności), studia stacjonarne
- *prawo w hodowli zwierząt*: prowadzony w formie wykładów (na kierunku zootechnika), studia niestacjonarne
- *elementy analityki szczegółowej*: prowadzony w formie ćwiczeń (na kierunku biologia), studia stacjonarne
- *zwierzęta laboratoryjne hodowla i użytkowanie*: prowadzony w formie ćwiczeń (na kierunkach biologia i zootechnika), studia stacjonarne

#### 5.1.1 Opieka naukowa nad doktorantami oraz studentami

Aktualnie pełnię rolę promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim Pani mgr Marcjanny Wrzecińskiej (Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie) oraz sprawuję opiekę promotorską nad jednym magistrantem i sześcioma inżynierantami.

W ramach pracy dydaktycznej wypromowałam jednego magistranta oraz trzech inżynierantów. Wykonałam także cztery recenzje prac magisterkich oraz sześć inżynierskich.

#### 5.1.2 Praca w charakterze członka komisji egzaminacyjnych

Ponadto każdego roku pełnię rolę członka komisji egzaminacyjnej podczas egzaminów inżynierskich na kierunku zootechnika, zarówno dla studentów studiów stacjonarnych jak i niestacjonarnych.

Od 2019 roku regularnie pełnię rolę członka komisji oceniającej podczas Okręgowej Olimpiady Wiedzy i Umiejętności Rolniczych (eliminacje centralne) we Wrocławiu.

#### 5.1.3 Realizacja projektów dydaktycznych

Aktualnie kieruję projektem finansowanym ze środków przeznaczonych na działanie Wiodących Zespołów Dydaktycznych (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu) pt. Kurs unasieniania krów i loch, którego oferta skierowana jest do studentów kierunku rolnictwo. W kolejnym projekcie pt. Kurs inseminacji krów i loch jestem wykonawcą zadania

polegającego na przygotowaniu merytorycznym (przedstawieniu wykładów) studentów zootechniki w zakresie:

- zasad działalności stacji produkcji nasienia,
- regulacji prawnych dotyczących organizacji hodowli i rozrodu zwierząt oraz bioasekuracji,
- zasad bezpieczeństwa i higiena pracy podczas zabiegu inseminacji
- zasad bezpieczeństwa pracy z ciekłym azotem
- dobrostanu zwierząt podczas programu sztucznej inseminacji
- podstaw anatomii i fizjologii narządu rozrodczego buhaja i knura
- pozyskiwania i konserwacji nasienia buhaja i knura
- prawidłowego przechowywanie dawki inseminacyjnej buhaja i knura
- prawidłowego przygotowania i rozmrażania dawki inseminacyjnej buhaja i knura

W przedmiotowym projekcie realizowane są trzy cykle kursów specjalizacyjnych, kończące się egzaminem i wydaniem uprawnień inseminatora bydła oraz trzody chlewnej.

## 5.2 Osiągnięcia popularyzatorskie

W ramach aktywności popularyzatorskiej opracowałam 16 artykułów popularno-naukowych dla czasopism branżowych. Poniżej znajduje się wykaz wspomnianych prac:

1. **Mizera A.** (2017). *Zakup nasienia – na co zwrócić uwagę?* [zabookuj.eu/hodowla](http://zabookuj.eu/hodowla), 23.02.2017.
2. **Mizera A., Kuczaj M.** (2017). *Nasienie seksowane*. Hod. Bydła 11/2017.
3. **Mizera A.** (2018). *Użytkowość rozrodcza krów – problematyka vs. profilaktyka*. Hod. Bydła 12/2017, 46-49.
4. **Mizera A.** (2018). *Selekcja genomowa trzody chlewnej*. Hod. Trzody Chlewnej 1-2/2018, 30-31.
5. **Mizera A.** (2018). *"Współczesny rozród zwierząt gospodarskich" czyli relacja ze styczniowej konferencji*. Hod. Trzody Chlewnej 1-2/2018, 14-15.
6. **Mizera A., Kuczaj M.** (2018). *Co może zdyskwalifikować buhaja z użytkowania rozplodowego?* Hod. Bydła 3/2018, 56-58.
7. **Mizera A.** (2018). *Nasienie mrożone w kontekście metod sztucznego unasienniania*. Hod. Trzody Chlewnej 3-4/2018, 30-32.

8. **Mizera A.** (2018). *Utrata ciąży u krowy mlecznej – czynniki nieinfekcyjne wpływające na śmierć zarodkową i płodową*. Hod. Bydła 6/2018, 30-32.
9. **Mizera A.** (2018). *Embriotransfer – nie taki diabeł straszny*. Hod. Bydła 7-8/2018.
10. **Mizera A.** (2018). *Diagnoza ciąży u bydła – badanie per rectum vs. ultrasonografia*. Hod. Bydła 9/2018, 53-55.
11. **Kowalczyk A.** (2018). *Stres termiczny - nie tylko latem!* Hod. Bydła 11/2018, 32-34.
12. **Kowalczyk A.** (2018). *Wzbogacanie środowiska – eksploracja i zabawa*. Hod. Trzody Chlewnej 11-12/2018, 46-47.
13. **Kowalczyk A.** (2019). *Użycie preparatów hormonalnych w stadach krów – co warto wiedzieć?* Hod. Bydła 2/2019, 72-73.
14. **Kowalczyk A.** (2019). *Dlaczego prawidłowe żywienie jest tak ważne?* [Inseminatioanimalium.pl/publikacje](http://Inseminatioanimalium.pl/publikacje).
15. **Kowalczyk A.** (2019). *Mikroflora jelitowa prosiąt w okresie odsadzenia – antybiotyki a zdrowie prosiąt*. Hod. Trzody Chlewnej 3-4/2019, 22-25.
16. **Kowalczyk A.** (2022). *Embriotransfer w pigułce*. Hod. Bydła 1/2022.

### 5.3 Działalność organizacyjna

W swoim dorobku organizacyjnym wyróżnić mogę udział m.in. w pracach komisji egzaminacyjnych, współorganizatorstwo wydarzeń naukowych o zasięgu krajowym i międzynarodowym oraz członkostwo w komitetach organizacyjnych wydarzeń o charakterze naukowo-dydaktycznym. Poniżej znajduje się wykaz wspomnianego dorobku.

1. (2022). Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego: *First European Congress on Applied Animal Sciences*. 27-30.09.2022, Wrocław
2. (2022). członek Rady naukowej Związku Hodowców i Producentów Sektora Rolno-Spożywczego, Stowarzyszenie - VERUS.
3. (2021). Członek Komitetu Organizacyjnego: *The International Conference "Biomorphology Of The XXI Century"*, Kyiv, Ukraina, 23-24.09. 2021 r.
4. (2021). Członek Komisji Oceniającej (juror w bloku produkcja zwierzęca): *XLII Eliminacje Okręgowe Olimpiady Wiedzy i Umiejętności Rolniczych* 23.04.2021 r. Wrocław.

5. (2020). Członek Komisji Oceniającej w sekcji „Hodowla Zwierząt”: *XXXVII SEJMIK SKN, XXV Międzynarodowa Konferencja Studenckich Kół Naukowych*, 19-20.11.2020 r., Wrocław.
  6. (2019). Członek Komitetu Organizacyjnego (przewodniczący sesji Equal): *XIXth International Congress of ISAH*, 08.09-12.09.2019 r., Wrocław.
  7. (2019). Członek Komisji Oceniającej (juror w bloku produkcja zwierzęca): *XLII Eliminacje Centralne Olimpiady Wiedzy i Umiejętności*, 12.04.2019 r., Wrocław.
  8. (2018-2019). Członek Komitetu Organizacyjnego: *XIX International Congress of ISAH*, 8-12.09.2019 r., Wrocław.
  9. (2018). Sekretarz Komitetu Organizacyjnego: *Ist International Conference Modern reproduction of livestock*, 26.01.2018 r., Wrocław.
  10. (2018). Członek Komitetu Organizacyjnego: *Otwarte Szkolenie pt. „Bydło mleczne – narzędzia w rozrodzie i zarządzaniu stadem”*, 25.04.2018 r., Wrocław.
  11. (2018). Członek Komisji Oceniającej (juror w bloku produkcja zwierzęca): *XLII Eliminacje Okręgowe Olimpiady Wiedzy i Umiejętności Rolniczych*, 20.04.2018 r., Wrocław.
  12. (2018). Członek Komisji Oceniającej (juror w bloku produkcja zwierzęca): *XLII Eliminacje Centralne Olimpiady Wiedzy i Umiejętności Rolniczych*, 6-8.06.2018 r., Wrocław.
6. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

Podczas trzyletniej pracy zawodowej zgromadziłam prezentowany dorobek na podstawie, którego otrzymałam w 2020 roku Nagrodę Projakościową JM Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za wybitne osiągnięcia naukowe w 2019 roku, a następnie w roku 2020 Nagrodę indywidualną II stopnia za osiągnięcia naukowe JM Rektora Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Ponadto, od 2019 roku jestem członkiem Wiodącego Zespołu Badawczego, na Wydziale Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.



PODPIS ZAUFANY

ALICJA  
KOWALCZYK

18.04.2022 18:39:24 [GMT+2]

Dokument podpisany elektronicznie  
podpisem zaufanym

.....  
(podpis wnioskodawcy)