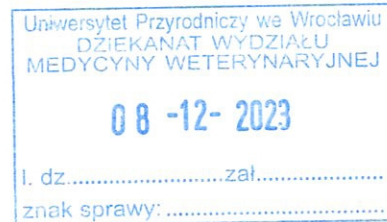


Rzeszów, 03.12.2023 r.

Prof. dr hab. Marek Koziarowski, dr h.c.  
Instytut Biotechnologii  
Dyrektor Interdyscyplinarnego Centrum  
Badań Przedklinicznych i Klinicznych  
Kolegium Nauk Przyrodniczych  
Uniwersytet Rzeszowski



## OCENA

rozprawy doktorskiej  
lek. wet. Marii Eberhardt

pt. **Badania nad właściwościami *in vitro* oraz zdolnością zapładniającą plemników żubra (*Bison Bonasus*) w aspekcie doskonalenia metod kriokonserwacji gamet męskich tego gatunku**

Recenzja została wykonana na wniosek Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria  
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 10 października 2023 r.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska wykonana została w Katedrze Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, pod opieką naukową Promotorów Prof. dr hab. Wojciecha Nizańskiego z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz Prof. dr hab. Wandy Olech-Piaseckiej ze Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, w ramach Szkoły Doktorskiej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej.

Podstawę do ubiegania się o stopień doktora stanowią dwie oryginalne prace naukowe opublikowane w latach 2022 i 2023 w czasopismach z listy JCR, których łączny współczynnik oddziaływania Impact Factor wynosi 7,2 i punktacja ministerialna łącznie 280 punktów, oraz preprintu na platformie bioRxiv, stanowiące integralną część manuskryptu, przedstawione poniżej:

1

1. Eberhardt M., Prochowska S., Partyka A., Bielas W., Van Soom A., Olech W., Nizański W. The morphology, morphometry and functionality of fresh and cryopreserved wisent (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa. *Sci Rep.* 2023. 24;13(1):13866. doi: 10.1038/s41598-023-40798-y. Punkty MEiN – 140; IF – 4,6.
2. Eberhardt M., Prochowska S., Duszewska A.M., Van Soom A., Olech W., Nizański W. The influence of Percoll® density gradient centrifugation before cryopreservation on the quality of frozen wisent (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa. *BMC Vet Res.* 2022. 18(1):305. doi: 10.1186/s12917-022-03408-z. Punkty MEiN – 140; IF – 2,6.
3. Eberhardt M., Colombo M., Prochowska S., Luvoni G.C., Olech W., Nizański W. The first report on the use of a zona pellucida binding assay to compare the effects of European bison (*Bison Bonasus*) epididymal spermatozoa cryopreservation in two different extenders. Preprint na platformie bioRxiv. bioRxiv 2023.09.11.557052; doi: <https://doi.org/10.1101/2023.09.11.557052>.

W bazie bibliometrycznej Scopus jest 3 razy indeksowana z współautorami z Katedry jako pierwszy autor, oraz 4 razy jako współautor, z 35 cytowaniami, indeks Hisha 4 (dostęp dnia 03.12.2023). Indeks Hirsha 4 oznacza, że prace Doktorantki mają oddźwięk w środowisku, a taka aktywność w ciągu ostatnich dwóch lat świadczy o dużym zaangażowaniu w badania i o zdolności publikacyjnej.

Badania zostały sfinansowane przez: Fundusz Leśny zgodnie z umową nr OR.271.3.10.2017; Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu z projektu badawczego o numerze N020/0016/20; w ramach programu “Bon doktoranta Szkoły Doktorskiej UPWr”; oraz Narodową Agencję Wymiany Akademickiej w ramach grantu nr PPI/APM/2019/1/00044/U/00001.

Przedstawiony do oceny manuskrypt liczy 87 stron wraz z piśmiennictwem i streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz 43 strony załączników, w których umieszczone są publikacje będące podsumowaniem realizacji zadań badawczych I-IV niniejszej pracy doktorskiej. Badania wraz z wynikami przedstawione zostały graficznie w postaci 16 tabel i 21 rycin. Manuskrypt zawiera następujące rozdziały: Wstęp, Przegląd piśmiennictwa, Hipotezy badawcze i cele pracy, Zadania badawcze oraz publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, Materiały i metody, Wyniki, Omówienie wyników, Wnioski, Piśmiennictwo, Streszczenie, Summary, Załącznik 1, Załącznik 2, Załącznik 3. W skład każdego rozdziału wchodzi liczne podrozdziały, które stanowią integralną część rozdziałów w prezentowanym manuskrypcie.

Żubr jest największym żyjącym ssakiem w Europie. Na terenie Polski żubr podlega ścisłej ochronie gatunkowej. Polska jest krajem przodującym w restytucji i ochronie tego gatunku i w ostatnich latach w związku z rozwojem nowych na całym świecie nauk dotyczących biologii rozrodu tworzy się banki gamet z wykorzystaniem kriokonserwacji nasienia. Mając na uwadze fakt, że pobieranie nasienia u żubrów jest praktycznie niemożliwe stosując sztuczną pochwę, w grę wchodzi pobieranie i mrożenie nasienia *post mortem*. Uboga pula genowa, będąca następstwem restytucji z udziałem kilkunastu osobników, zmusza do unikania kojarzeń krewniaczych oraz jak najszerszej wymiany osobników pomiędzy stadami. Posiadanie zamrożonych gamet zdolnych do ich rozwoju po transferze lub transfer zarodków z dalszym utrzymaniem ciąży i doprowadzeniem do porodu stanowi ciągłe wyzwanie dla szerokiego grona naukowców zajmujących się tą dziedziną. Badania na innych dzikich gatunkach wykazały, że gamety, które osiągnęły już swój rozwój i są magazynowane w ogonie najądrzy wyposażone w odpowiednio wykształcony akrosom oraz ze zdolnością ruchu są zdolne do zapłodnienia. Wyizolowanie pośmiertne tych gamet daje niezwykle duże możliwości w mrożeniu i tworzeniu banków gamet. Badania z użyciem zwierząt domowych wykazały, że u bydła jeszcze po 3 dobach od śmierci plemniki najądrzowe mogą być wykorzystane do dalszego użycia. Niezwykle mała ilość materiału badawczego stanowi w dalszym ciągu szerokie wyzwanie dla grup badawczych. O ile użycie plemników bezpośrednio po pobraniu wydaje się być niezwykle obiecujące, to dopiero proces mrożenia i przechowywania wraz z możliwością ich użycia po rozmrożeniu wydaje się być prawdziwym wyzwaniem. Na bazie dostępnego piśmiennictwa Doktorantka przytacza prace opisujące wyniki badań mrożenia plemników żubra z wykorzystaniem metod opracowanych dla bydła. Szczególnie ważna przed przystąpieniem do mrożenia plemników wydaje się być ich selekcja. Obecność w nasieniu dużej liczby nieprawidłowych oraz martwych plemników wpływa na jakość mrożenia. Uszkodzone komórki uwalniają zawartość akrosomu oraz reaktywne formy tlenu. Również negatywnie na proces mrożenia wpływa obecność elementów morfotycznych krwi – komórek nabłonkowych i fragmentów tkanki najądrzowej. Celowym wydaje się usunięcie tych zanieczyszczeń. Jedną z metod oczyszczania pozyskanego materiału jest wirowanie w gradiencie gęstości koloidalnego roztworu krzemionki pokrytej poliwinylpirolidonem. Niezwykle ważnym wydaje się dobór rozrzedzalnika, który powinien umożliwić zachowanie jakości plemników oraz w miarę prostą procedurę. Wydaje się, że jednym z lepszych rozrzedzalników jest roztwór na bazie Tris, glicerolu oraz żółtka jaja kurzego. Używając żółtka jaja kurzego lub innej tkanki zwierzęcej można obawiać się potencjalnego zakażenia mikroorganizmami. Ostatnio stosuje się nową metodę zastosowania cyklodekstryn jako

nośnika cząsteczek cholesterolu, co skutkuje zwiększeniem płynności błony chroniąc ją przed uszkodzeniami w procesie mrożenia. Próby i konieczność utworzenia banku plemników wydają się być decydujące o przyszłości zachowania żubra. Obecne wyniki kriokonserwacji nie są zadowalające i wymagają dalszych badań.

Na podstawie przedstawionych przez Doktorantkę w rozdziale Przegląd piśmiennictwa informacji i prowadzoną aktywność naukową w Katedrze, założyła Ona następujące hipotezy badawcze:

- I. Plemniki pozyskane *post mortem* z najądrzy żubrów poza sezonem rozrodczym charakteryzują się jakością kwalifikującą je do procesu kriokonserwacji;
- II. Rozrzedzalnik na bazie buforu Tris i żółtka jaja kurzego jest odpowiedni do kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra pozyskanych *post mortem*;
- III. Selekcja plemników w gradiencie gęstości Percoll® przed procesem kriokonserwacji pozwala na uzyskanie lepszej porozmrożeniowej jakości próbek;
- IV. Test wiązania z osłonką przejrzystą oocytu bydlęcego (ZBA) może być wykorzystywany do oceny jakości pozyskanych plemników.

Doktorantka jako główny cel przeprowadzonych badań założyła ustalenie efektywnego protokołu postępowania z plemnikami najądrzowymi żubra w kontekście doskonalenia procedur stosowanych w banku plemników tego gatunku. Doktorantka realizację celu badawczego wyszczególniła i realizowała w poniższych zadaniach badawczych:

- I. Ocena morfologii, morfometrii oraz cech funkcjonalno – strukturalnych plemników najądrzowych żubra za pomocą podstawowych metod oceny nasienia, pomiarów morfometrycznych oraz barwienia fluorescencyjnego i cytometrii przepływowej;
- II. Mrożenie plemników najądrzowych żubra w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu;
- III. Selekcja plemników najądrzowych żubra za pomocą wirowania w gradiencie gęstości Percoll® przed poddaniem ich procesowi kriokonserwacji;
- IV. Przeprowadzenie testu wiązania plemników najądrzowych żubra z heterologiczną osłonką przejrzystą oocytu bydlęcego.

Przedstawione w autoreferacie wyniki zadania badawczego I i II zostały opublikowane w pracy numer 1, zadanie III w pracy numer 2, a IV w preprincie.

Do wszystkich zadań badawczych Doktorantka pobierała materiał (nądrzowe plemniki) *post mortem* od 52 osobników w różnych regionach Polski (12 lokalizacji), poza

sezonem rozrodczym od września do kwietnia, w latach 2015-2023. Po przygotowaniu plemników dokonała analiz – oceny ruchliwości plemników, oceny koncentracji i całkowitej liczby plemników, a następnie szczegółowej oceny pozyskanych plemników. Koncentrację plemników określała w komorze Thoma. Do określenia odsetka plemników żywych i martwych Doktorantka użyła barwnika eozynowo-nigrozynowego. Morfologię plemników określała podczas każdego z zadań badawczych po zabarwieniu metodą Watsona. Wykonywała pomiary morfometryczne przy użyciu oprogramowania cellSens Dimension Software. Długość, szerokość oraz powierzchnię główki mierzyła ręcznie. Szczegółową analizę ruchu plemników Doktorantka wykonała za pomocą systemu Casa, który został wykorzystany do oceny ruchu plemników rozmrożonych w zadaniu III i IV. W analizie tej Doktorantka wykorzystwała parametry opracowane do analizy nasienia bydła. Istotnym badaniem wykonanym przez Doktorantkę była ocena cech strukturalno-funkcjonalnych plemników najądrzowych żubra za pomocą barwienia fluorescencyjnego i cytometrii przepływowej. Ciągłość błony komórkowej oceniła za pomocą podwójnego znakowania. Populacje plemników wykazujące ujemny wynik pod względem barwienia jodkiem propidyny, a dodatni barwieniem Sybr-14 wykazujące zieloną fluorescencję, uznawała za żywe z niezaburzoną ciągłością błony komórkowej. Czerwona fluorescencja charakteryzowała plemniki martwe. Ciągłość akrosomów Doktorantka oceniała przy użyciu lektyny oraz jodku propidyny. Plemniki ujemne wobec tych barwników klasyfikowała jako żywe. Do oceny aktywności błon mitochondrialnych analizowanych plemników Doktorantka wykorzystwała połączenie barwnika JC-1 i jodku propidyny. Plemniki emitujące pomarańczową fluorescencję klasyfikowała jako posiadające wysoki potencjał błony mitochondrialnej, a emitujące zieloną fluorescencję - niski. Peroksydację lipidów oceniała wykorzystując odpowiednio dobraną sondę fluorescencyjną. Plemniki, które pozostały niezabarwione klasyfikowała jako żywą populację bez peroksydacji lipidów. Strukturę chromatyny oceniała za pomocą barwienia oranżem akrydyny. Plemniki z prawidłowym dwuniciowym DNA wykazywały zieloną fluorescencję.

Selekcji plemników najądrzowych Doktorantka dokonała poprzez wirowanie w gradiencie gęstości Percoll®. Po wyselekcjonowaniu i rozrzedzeniu plemników do koncentracji  $200 \times 10^6$  mroziła je z wykorzystaniem rozrzedzalnika na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu. Wykorzystała też komercyjny rozrzedzalnik przeznaczony do mrożenia nasienia bydła domowego AndroMed CSS, One-step200. Po umieszczeniu plemników w słómkach francuskich zamrażała je zgodnie z procedurą. Po rozmrożeniu poddawała plemniki żubra ocenie analogicznej jak przed zamrożeniem. Do oceny testu wiązania z osłonką przejrzystą oocytu Doktorantka użyła oocytów z rozmrożonych jajników bydłecych. Kontrolę

w przeprowadzonym teście stanowiło nasienie bydłce. W celu określenia liczby związanych z oocytem plemników kompleksy poddawano barwieniu bis-benzimidem. Plemniki związane z oocytem zliczane były pod mikroskopem fluorescencyjnym.

Doktorantka użyła oprogramowania R - Studio do przeprowadzenia analiz statystycznych. Do oceny zgodności rozkładu danych z rozkładem normalnym wykorzystowała test Shapiro-Wilka. Do oceny różnic między grupami zastosowała testy parametryczne - test t-Studenta i ANOVA lub testy nieparametryczne - U Manna-Whitneya, sumy rang Wilcoxon i Kruskala-Wallis. Do oceny korelacji między miesiącem pobrania materiału, a parametrami nasienia wykorzystowała współczynnik korelacji Spearmana. Istotność współczynnika korelacji Spearmana oceniała testem t. Do oceny istotności statystycznej różnic w wynikach między replikami testu ZBA Doktorantka zastosowała asymptotyczny test równości współczynników zmienności. Różnice uznawała za istotne statystycznie przy  $p \leq 0,05$ .

Doktorantka opracowując wyniki badań podzieliła je na zadania badawcze. Prezentując wyniki zadania I wykazała dużą zmienność międzyosobniczą związaną z miesiącem pozyskania materiału. Stwierdziła istotną statystycznie ujemną korelację dla całkowitej liczby plemników, ruchliwości oraz odsetka plemników charakteryzujących się prawidłową morfologią. Kolekcjonując plemniki w kolejnych miesiącach po okresie rozrodczym, zaobserwowała niższe wartości całkowitej liczby plemników oraz ich ruchliwości. Nie stwierdziła podobnych zależności w przypadku pozostałych parametrów ocenianych plemników.

Opracowując wyniki zadania II Doktorantka wykazała, iż kriokonserwacja istotnie obniżyła odsetek żywych i ruchliwych plemników. Proces ten nie miał wpływu na morfologię gamet. Nie stwierdziła różnic w odsetku plemników charakteryzujących się wysokim potencjałem mitochondrialnym i uszkodzoną chromatyną przed i po procesie kriokonserwacji.

Wyniki zadania III wykazały, iż wirowanie w gradiencie gęstości Percoll® przyczyniło się do znacznego obniżenia całkowitej liczby plemników w próbach. W grupach badanej i kontrolnej odsetek plemników ruchliwych oraz żywych znacząco różnił się od wartości przed procesem kriokonserwacji. Doktorantka nie stwierdziła istotnych statystycznie różnic w odsetku plemników charakteryzujących się prawidłową morfologią pomiędzy grupami. Próby wirowane w gradiencie gęstości Percoll® charakteryzowały się istotnie wyższym odsetkiem plemników z nienaruszoną błoną komórkową, nienaruszonym akrosomem oraz wysokim potencjałem mitochondrialnym w porównaniu z grupą kontrolną. Doktorantka nie stwierdziła istotnych statystycznie różnic w odsetkach plemników z uszkodzoną chromatyną pomiędzy obiema grupami.

Opracowując wyniki zadania badawczego IV Doktorantka wykazała, iż próby poddane procesowi kriokonserwacji w rozrzedzalniku na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu charakteryzowały się wyższym odsetkiem ruchliwych plemników, niż mrożone w rozrzedzalniku Andromed®. Odsetek plemników charakteryzujących się prawidłową morfologią był podobny niezależnie od rozrzedzalnika. Dla obu rozrzedzalników ruchliwość uzyskanych plemników oceniana przy użyciu systemu CASA była niska. Odsetek plemników charakteryzujących się nienaruszoną błoną komórkową i akrosomem po rozmrożeniu był wyższy w rozrzedzalniku Andromed® niż w Tris. Inne parametry morfo – funkcjonalne były lepsze w próbach zamrożonych przy zastosowaniu rozrzedzalnika Tris. Niezależnie od zastosowanego rozrzedzalnika, plemniki przyłączyły się do wszystkich oocytów.

Podsumowując Doktorantka przeprowadziła badania nad parametrami i zdolnością zapładniającą plemników żubra. Miały one na celu opisanie oraz ustalenie efektywnego protokołu postępowania z plemnikami najądrzowymi żubra w ramach doskonalenia procedur stosowanych w banku plemników. Doktorantka przeprowadziła szereg analiz, które należy uznać jako obowiązujące we współczesnych badaniach nad kriokonserwacją nasienia i na podstawie uzyskanych wyników sformułowała następujące wnioski:

1. Plemniki najądrzowe żubrów pozyskane pośmiertnie cechują się właściwościami kwalifikującymi je do kriokonserwacji, mimo gorszej ruchliwości i żywotności niż gamety gatunków pokrewnych;
2. Pozyskiwanie plemników z najądrzy żubrów w terminie bliższym sezonu rozrodczego zwiększa prawdopodobieństwo zakwalifikowania ich do mrożenia;
3. Rozrzedzalnik na bazie buforu Tris z dodatkiem żółtka jaja kurzego i glicerolu jest odpowiedni do kriokonserwacji plemników najądrzowych żubra, a ruchliwość i żywotność otrzymanych po rozmrożeniu gamet pozwala na ich wykorzystanie w technikach wspomaganego rozrodu, takich jak zapłodnienie *in vitro*;
4. Wirowanie, a tym samym oczyszczenie plemników najądrzowych żubra w gradiencie gęstości Percoll® przed procesem kriokonserwacji, poprawia ich jakość po rozmrożeniu;
5. Test wiązania z osłonką przejrzystą oocytu bydłęcego jest odpowiedni dla plemników żubra i może stanowić cenne uzupełnienie rutynowo stosowanego protokołu ich ewaluacji.

Reasumując, przedstawione do recenzji opracowanie stanowi istotny wkład do nauki i poznania właściwości plemników żubra poddanych kriokonserwacji, zarówno w aspekcie poznawczym, jak i aplikacyjnym w banku nasienia.

W ocenianym opracowaniu Doktorantka wykazała się dobrym opanowaniem warsztatu badawczego, zastosowaniem nowoczesnych metod badawczych, zrozumieniem rozpatrywanych problemów i znajomością piśmiennictwa z zakresu tematyki prowadzonych badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje moim zdaniem doskonały wybór tematyki badawczej, który jest kontynuacją i poszerzeniem wiedzy poznawanej w Katedrze Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu oraz w zespole Pani Prof. dr hab. Wandy Olech-Piaseckiej.

Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można przypuszczać, że Doktorantka posiada ważne w pracy badawczej cechy, takie jak pracowitość, solidność i dociekliwość i nie boi się pracy w trudnych warunkach terenowych. Jednocześnie jako recenzentowi nasuwa się uwaga, że na bazie już uzyskanych wyników i posiadanej wiedzy należałoby opublikować artykuł przeglądowy w czasopiśmie w języku polskim. Stanowiłoby to ciekawy materiał na seminaria, w katedrach zajmujących się rozrodem zwierząt nieudomowionych, co mogłoby również być istotnym przyspieszeniem tworzenia banku genów tych zwierząt, które w niedalekiej przyszłości mogą być gatunkami zagrożonymi. Pobieranie materiału od innych gatunków jest dużo łatwiejsze technicznie i w krótkim czasie mogłoby przynieść należyte efekty. Zespół i laboratorium Prof. Niżańskiego, przy współpracy z Panią Prof. Olech-Piasecką mogą stać się jednostką wiodącą w tej dziedzinie w kraju.

## **WNIOSEK KOŃCOWY**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani lek. wet. Marii Eberhardt pt. *Badania nad właściwościami in vitro oraz zdolnością zapładniającą plemników żubra (Bison Bonasus) w aspekcie doskonalenia metod kriokonserwacji gamet męskich tego gatunku* w opinii recenzenta spełnia wszystkie wymagania – określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2021 r. poz. 478 ze zm.) – stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie do dalszych etapów postępowania doktorskiego.



Równocześnie mając na uwadze pionierskie i unikalne wyniki, co niewątpliwie jest związane z wysokim stopniem trudności pozyskania materiału badawczego, wysoki poziom naukowy zaprezentowanych badań, co uznali recenzenci kwalifikujący prace do druku w czasopiśmie o światowym zasięgu, pragnę przedłożyć Wysokiej Radzie w pełni uzasadniony moim zdaniem wniosek o wyróżnienie pracy, którego najlepszą rekomendacją niech będzie podsumowanie zaprezentowanych wyników badań łacińską maksymą „*Ad bonum animalium et naturae*”.

3.12.2023

