

Lublin, 06.09.2023 r.

Dr hab. Marek Szczubiał prof. uczelni  
Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu DZIEKANAT WYDZIAŁU MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ
<b>08-09-2023</b>
I. dz.....zał.....
znak sprawy:.....

## OCENA

### **osiągnięć naukowych dr inż. Joanny Kochan, prof. uczelni, w związku z postępowaniem w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk weterynaryjnych w dyscyplinie weterynaria**

Podstawą formalną niniejszej oceny jest pismo MDDD0000.4102.4.2023 Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 17 lipca 2023 r., informujące o powołaniu mnie na recenzenta osiągnięć naukowych dr inż. Joanny Kochan, prof. uczelni oraz na członka Komisji habilitacyjnej w postępowaniu w sprawie nadania Jej stopnia doktora habilitowanego w dziedzinie nauk weterynaryjnych w dyscyplinie weterynaria. Ocena została sporządzona zgodnie z art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce określającym warunki nadania stopnia doktora habilitowanego (Dz. U. z 2023 r. poz. 742).

#### **Informacje ogólne o Habilitantce**

Dr inż. Joanna Kochan, prof. uczelni, uzyskała dyplom magistra inżyniera zootechniki w zakresie biologii rozrodu zwierząt w 2004 r. na Wydziale Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie. Od ukończenia studiów swoją karierę zawodową związała z Katedrą Rozrodu i Anatomii Zwierząt (obecna nazwa: Katedra Rozrodu, Anatomii i Genomiki Zwierząt) Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, najpierw jako asystent (2010-2012), a następnie adiunkt naukowo-dydaktyczny (2012-2019), adiunkt naukowo-badawczy (2019-2022) oraz profesor uczelni (od września 2022 r. do chwili obecnej). Stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika uzyskała na macierzystym Wydziale w 2009 r. na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Badanie *in vitro* zdolności rozwojowych oocytów klaczy po mikroiniekcji plemnika i aktywacji partenogenetycznej.”

1

**Ocena cyklu powiązanych tematycznie publikacji naukowych wskazanych przez dr inż. Joannę Kochan jako osiągnięcie naukowe określone w art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce**

Jako osiągnięcie naukowe dr inż. Joanna Kochan przedstawiła cykl 4 współautorskich, oryginalnych, tematycznie powiązanych publikacji naukowych, pod wspólnym tytułem „Analiza czynników wpływających na efektywność hodowli *in vitro* zarodków kota domowego (*Felis catus*)”. Wszystkie prace zostały opublikowane w latach 2018-2022 w dobrych czasopismach naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR) o wskaźniku wpływu (Impact Factor – IF) od 1,278 do 3,231 i przypisanych przez Ministerstwa Edukacji i Nauki (MEiN) do dyscypliny weterynaria. Sumaryczny IF tych publikacji według listy JCR wynosi 10,663, a ich wartość punktowa wg kryteriów MEiN wynosi 355 punktów zgodnie z rokiem ich wydania (382 punkty po zastosowaniu przelicznika dla prac wydanych po 2018 r.). W skład wymienionego cyklu wchodzi następujące publikacje:

1. **Kochan J.**, Nowak A., Kij B., Fryc K., Prochowska S., Nizański W.: A comparison of *in vitro* culture systems for cat embryos. *Theriogenology* 2022, 179, 149-154 (punktacja MEiN: 140; IF: 2,923).
2. **Kochan J.**, Nowak A., Młodawska W., Prochowska S., Partyka A., Skotnicki J., Nizański W.: Comparison of the morphology and developmental potential of oocytes obtained from prepubertal and adult domestic and wild cats. *Animals* 2021, 11, 20. doi: 10.3390/ani11010020 (punktacja MEiN: 100; IF: 3,231).
3. **Kochan J.**, Nowak A., Kij B., Prochowska S., Nizański W.: Analysis of morphokinetic parameters of feline embryos using a time-lapse system. *Animals* 2021, 11, 748. doi: 10.3390/ani110307481-10 (punktacja MEiN: 100; IF: 3,231).
4. **Kochan J.**, Nowak A., Nizański W., Prochowska S., Migdał A., Młodawska W., Partyka A., Witkowski M.: Developmental competence of cat (*Felis domesticus*) oocytes and embryos after parthenogenetic stimulation using different methods. *Zygote* 2018, 26, 119-126. doi: 10.1017/S0967199418000011 (punktacja MEiN: 15/42; IF: 1,278).

Wszystkie przedstawione do oceny prace są wieloautorskie, z udziałem od 5 do 8 autorów. We wszystkich pracach Habilitantka jest pierwszym autorem, a w trzech również autorem korespondencyjnym. Z dostarczonych oświadczeń, dotyczących udziału Habilitantki w powstawaniu tych prac, wynika jednoznacznie, że Jej rola we wszystkich przedstawionych pracach była wiodąca, a Jej

wkład w powstanie tych prac wynosił od 60% do 65%. We wszystkich pracach Habilitantka opracowała koncepcję i metodykę badań, przeprowadziła część badań laboratoryjnych, dokonała analizy wyników oraz przygotowała manuskrypt.

Głównym celem badawczym cyklu prac stanowiących osiągnięcie naukowe dr inż. Joanny Kochan była kompleksowa analiza czynników wpływających na potencjał rozwojowy zarodków kota domowego (*Felis catus*) w warunkach *in vitro* oraz próba ustalenia optymalnych warunków hodowli *in vitro* zarodków kotowatych. Dla realizacji postawionego celu badawczego w pierwszej pracy cyklu porównywano kilka systemów hodowli *in vitro* zarodków kota domowego, aby wskazać najbardziej efektywny. W tych badaniach oocyty pozyskane z jajników kotek poddanych owariohysterektomii zapładniano *in vitro*, a następnie zarodki poddawano hodowli indywidualnie, grupowo (5 lub 16 zarodków) oraz w szalkach WOW-Primo Vision<sup>®</sup>, stosując różne objętości pożywki hodowlanej (20  $\mu$ l lub 50  $\mu$ l) i różne zagęszczenie zarodków. Ponadto oceniano potencjał rozwojowy zarodków kocich we wspólnych hodowlach *in vitro* w szalkach WOW-Primo Vision z niezapłodnionymi oocytami, a także z zarodkami kocimi oraz zarodkami owczymi. W badaniu wpływu niezapłodnionych oocytów na rozwój zarodków porównywano wyniki hodowli przypuszczalnych zygot od 16 godziny po zapłodnieniu oraz zarodków od 24 godziny po zapłodnieniu, gdzie uwzględniano jedynie dzielące się zarodki 2 blastomerowe. Analiza wpływu na rozwój zarodków kocich obecności w hodowli zarodków tego samego gatunku i innego gatunku obejmowała wspólną hodowlę ocenianych zarodków kocich z zaawansowanymi stadiami rozwojowymi (morula/blastocysta) zarodków kocich i zarodków owczych. Uzyskane wyniki badań wykazały pozytywny wpływ hodowli zarodków w szalkach WOW-Primo Vision na potencjał rozwojowy zarodków kocich, wyrażający się najwyższym odsetkiem blastocyst i wyklutych blastocyst. Stwierdzono również obniżenie się zdolności do wykluwania się blastocyst przy największym zagęszczeniu zarodków w najmniejszej objętości pożywki (16 zarodków/20  $\mu$ l). Ponadto przeprowadzone badania wykazały, że wspólna hodowla zarodków kocich ze starszymi zarodkami owczymi w sposób istotny zwiększała zdolności rozwojowe zarodków kocich, w porównaniu do grupy kontrolnej. Natomiast wspólna hodowla zarodków kocich z towarzyszącymi im zaawansowanymi stadiami rozwojowymi zarodków kocich wykazywała jedynie pozytywny wpływ, w porównaniu do grupy kontrolnej, na wskaźnik wykluwania się blastocyst. Nie obserwowano wpływu niezapłodnionych oocytów na potencjał rozwojowy zarodków podczas wspólnej hodowli *in vitro*. Wyniki tych badań wskazujące istotną wyższość hodowli zarodków kocich metodą szalki „well of well”, w porównaniu do innych testowanych systemów, są szczególnie wartościowe w kontekście hodowli *in vitro* cennych zarodków gatunków dzikich kotowatych zagrożonych wyginięciem, wykazujących często gorszą jakość ze względu na status zdrowotny lub wiek dawczyń oocytów. Prezentowane wyniki badań wskazują również, że roz-

wój gorszej jakości zarodków kocich oraz dzikich kotowatych zagrożonych wyginieciem można wspierać poprzez wspólną hodowlę z dobrej jakości zarodkami kota domowego lub zarodkami innych gatunków. Z kolei brak wpływu niezapłodnionych oocytów w hodowlach zarodków na potencjał rozwojowy zarodków wskazuje, że możliwe jest rozpoczęcie hodowli przypuszczalnych zygot od 16 godzin po zapłodnieniu *in vitro* lub podzielonych zarodków od 24 godzin po zapłodnieniu.

Celem badań przedstawionych w drugiej pracy cyklu było porównanie morfologii i zdolności rozwojowych oocytów uzyskanych od niedojrzałych i dojrzałych płciowo kotek oraz samic dzikich kotowatych. Do badań wykorzystano oocyty dojrzałych płciowo kotek pobrane z jajników po zabiegu owariohysterektomii, oocyty niedojrzałych płciowo kotek pobrane z jajników pośmiertnie oraz oocyty dorosłych (rysia, servala i manula) i niedojrzałych płciowo (tygrysa syberyjskiego, rysia i manula) samic dzikich kotowatych. Pobrane oocyty były następnie oceniane przy użyciu mikroskopu stereoskopowego i odpowiednio klasyfikowane w oparciu o wady morfologiczne, ilość komórek wżórka jajonośnego otaczających oocyt oraz kolor ich cytoplazmy. W następnym etapie badań dokonano porównania zdolności do dojrzewania *in vitro* (IVM) oocytów pochodzących od niedojrzałych i dojrzałych płciowo kotek oraz samic dzikich kotowatych, a także przeprowadzono ocenę potencjału rozwojowego oocytów pochodzących od niedojrzałych i dojrzałych płciowo kotek oraz jakości blastocyst powstałych w wyniku zapłodnienia *in vitro* oocytów od takich kotek. Uzyskane wyniki tych badań wskazują, że jajniki pozyskane od niedojrzałych płciowo kotek mogą być źródłem dobrej jakości oocytów, zdolnych do dojrzewania i zapłodnienia *in vitro*. Pomimo niższego potencjału rozwojowego, w stosunku do oocytów kotek dorosłych, mają zdolność rozwoju do stadium blastocysty i wyklucia się w warunkach *in vitro*. Duże podobieństwo morfologii i zdolności rozwojowych oocytów kota domowego i badanych gatunków dzikich kotowatych potwierdza przydatność kota domowego jako modelu badawczego dla dzikich kotowatych. Uzyskane wyniki są niezwykle cenne ponieważ wskazują na możliwość wykorzystania oocytów od niedojrzałych płciowo samic dzikich kotowatych zagrożonych wyginieciem w programach ochrony *ex situ* opartych na technikach wspomaganego rozrodu.

Trzecia praca cyklu dotyczyła analizy parametrów morfokinetycznych zarodków kota domowego przy użyciu najnowocześniejszej i najbardziej precyzyjnej obecnie metody monitorowania zarodków – nie stosowanej dotychczas do oceny zarodków kocich - tj. systemu time-lapse. Ta część badań pozwoliła po raz pierwszy precyzyjnie ustalić parametry morfokinetyczne oraz ich wpływ na potencjał rozwojowy zarodków kota domowego. Wykazano, że czas pierwszego i drugiego podziału, czas powstawania jamy blastocysty i anomalie morfologiczne mogą stanowić wczesne wskaźniki prognostyczne potencjału rozwojowego zarodków kota domowego. Wyniki analizy 300 zarodków kocich wskazują że najlepszy potencjał rozwojowy posiadają zarodki dzielące się 21-22 godzi-

ny po zapłodnieniu. Zarodki dzielące się bardzo wcześnie (17-18 godzin po zapłodnieniu *in vitro*) miały obniżony potencjał rozwojowy do stadium blastocysty, natomiast dzielące się później niż 27 godzin po zapłodnieniu nie były zdolne do osiągnięcia stadium blastocysty. Obserwacje procesu kawitacji w badanych zarodkach pozwoliły stwierdzić, że największy potencjał do wykluwania się blastocysty miały zarodki, w których jama blastocysty zaczynała się pojawiać pomiędzy 142 a 150 godziną po zapłodnieniu. Natomiast blastocysty powstające po 161 godzinie od zapłodnienia nie były zdolne do wyklucia się w warunkach *in vitro*. Przyjmując kota domowego jako model badawczy dla dzikich kotowatych zagrożonych wyginięciem, uzyskane wyniki badań morfokinetyki zarodków kocich stwarzają możliwość wyselekcjonowania zarodków o najwyższym potencjale rozwojowym do transferu zarodków w programach ochrony dzikich kotowatych, wykorzystujących techniki wspomaganego rozrodu. Jest to szczególnie ważne ponieważ transfer zarodków u dzikich kotowatych jest niezwykle skomplikowaną procedurą, często wykonywaną tylko jeden raz, bez możliwości powtórzenia, a wybór odpowiednich zarodków do transferu jest kluczowy dla powodzenia całej procedury.

Celem badań czwartej pracy cyklu było określenie zdolności do aktywacji oocytów kota domowego podczas różnych etapów procedur pozaustrojowej produkcji zarodków i pod wpływem różnych czynników aktywujących. W ramach badań przeanalizowano trzy typy aktywacji oocytów kocich: spontaniczną aktywację zachodzącą w obrębie jajnika oraz podczas dojrzewania *in vitro* oocytów, aktywację podczas procedury docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI) - zarówno aktywację przy udziale plemnika, jak i aktywację mechaniczną podczas nakłucia pustą pipetą oraz aktywację chemiczną przy pomocy kombinacji 2 czynników aktywujących (jonomycyna + 6-DMAP). Wykazano, że oocyty kotów mogą ulegać spontanicznej aktywacji w jajniku i podczas dojrzewania *in vitro*. Jednakże powstałe w ten sposób zarodki partenogenetyczne rozwijają się jedynie do stadium kilku blastomerów. Stwierdzono również, że kontrolowana sztuczna aktywacja czynnikami chemicznymi pozwala na szybką, tanią i łatwą produkcję dużej liczby zarodków bez użycia plemników. Ponieważ uzyskane w ten sposób zarodki rozwijają się do stadium moruli, mogą być wykorzystywane do wielu badań na zarodkach. Jest to szczególnie istotne w przypadku kotowatych cechujących się niską efektywnością procedur zapłodnienia *in vitro*. Z badań tych wynika także, że podczas ICSI może dochodzić do niekontrolowanego wzbudzenia podziału na skutek mechanicznej aktywacji oocytu podczas jego nakłucia, a co za tym idzie efekty ICSI mogą być obniżone na skutek pojawienia się zarodków partenogenetycznych.

W mojej opinii, cykl prac stanowiących osiągnięcie naukowe dr inż. Joanny Kochan należy ocenić wysoko, zarówno w aspekcie naukowym jak i aplikacyjnym. Tematyka prac składających się na osiągnięcie naukowe jest spójna i w pełni zasługuje na pozytywną ocenę. Przedstawione w ko-

lejszych publikacjach badania dotyczyły hodowli *in vitro* zarodków kota domowego jako modelu badawczego dla dzikich kotowatych i w wielu aspektach są badaniami pionierskimi. Wszystkie gatunki kotowatych, poza kotem domowym, są zagrożone wyginięciem, co sprawia, że niezwykle ważnym problemem jest rozwijanie skutecznych programów ochrony tych gatunków. Podstawą nowoczesnych programów ochrony zagrożonych gatunków są techniki wspomaganego rozrodu, takie jak inseminacja, zapłodnienie *in vitro* czy klonowanie. Postęp w rozwoju tych metod zależy od dostępności żeńskich i męskich gamet, co w przypadku dzikich gatunków kotowatych jest szczególnie utrudnione. Dlatego kot domowy, w przypadku którego nie istnieje problem dostępności gamet, stał się modelem badawczym dla dzikich kotowatych. Jednak wyniki hodowli zarodków kocich *in vitro* nie są satysfakcjonujące. Do największych problemów w hodowli zarodków u kotowatych należą słaba efektywność dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro*, ograniczona zdolność rozwoju zarodków do stadium blastocysty po zapłodnieniu *in vitro*, zróżnicowana morfologicznie pula oocytów ograniczająca efektywność zapłodnienia *in vitro* oraz zjawisko zatrzymania rozwoju zarodków w stadium moruli (tzw. blok moruli). Jedną z przyczyn niezadawalających wyników w technikach wspomaganego rozrodu u kotów jest mała liczba badań dotyczących tego zagadnienia u tego gatunku, a co za tym idzie brak odpowiedniej wiedzy, pozwalającej na optymalizację procedur wspomaganego rozrodu u kotowatych. Dlatego podjęte przez Habilitantkę badania są z całą pewnością niezwykle potrzebne i wartościowe, a uzyskane wyniki stanowią niewątpliwie cenny wkład w rozwój dyscypliny weterynarii w zakresie wspomaganego rozrodu kota domowego i dzikich gatunków kotowatych. Za szczególnie wartościowe osiągnięcia wynikające z przedstawionego cyklu prac uważam: opisanie po raz pierwszy parametrów i wzorców morfokinetycznych w rozwoju zarodków kocich i określenie ich wpływu na potencjał rozwojowy tych zarodków; wskazanie najbardziej efektywnych systemów hodowli *in vitro* zarodków kocich; udowodnienie podobieństwa morfologicznego i zdolności rozwojowych w hodowli *in vitro* oocytów kota domowego i dzikich kotowatych oraz wykazanie możliwości wykorzystania oocytów pozyskanych od niedojrzałych płciowo, padłych samic kota domowego i dzikich kotowatych w procedurach wspomaganego rozrodu. Osiągnięcia te znacząco pogłębiają dotychczasową wiedzę dotyczącą hodowli i rozwoju zarodków kota domowego oraz dzikich kotowatych w warunkach *in vitro*. Stanowią również mocną podstawę do udoskonalenia technik wspomaganego rozrodu u rasowych kotek oraz w programach ochrony dzikich kotowatych zagrożonych wyginięciem.

Reasumując, uważam, że przedstawiony do oceny cykl publikacji naukowych, wskazanych przez dr inż. Joannę Kochan jako osiągnięcie naukowe, spełnia wymogi określone w art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

**Ocena innych osiągnięć naukowych dr inż. Joanny Kochan w tym wykazywania się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury w szczególności zagranicznej**

Poza 4 pracami wskazanymi przez dr inż. Joannę Kochan jako osiągnięcie naukowe wynikające z art. 219 ust. 1 pkt 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Jej dorobek naukowy obejmuje autorstwo jednego i współautorstwo dwóch rozdziałów w monografiach naukowych, redakcję jednej monografii, współautorstwo 32 prac (29 prac oryginalnych i 3 prace przeglądowe) opublikowanych w czasopismach z listy JCR, współautorstwo 5 prac w czasopismach z poza listy JCR oraz współautorstwo 60 doniesień konferencyjnych. Dwadzieścia dwie prace zostały opublikowane w renomowanych zagranicznych i krajowych czasopismach znajdujących się w bazie JCR, których IF wynosi od 1,039 do 3,231 (Theriogenology – 8, Animals – 4, Annals of Animal Sciences - 3, Reproduction in Domestic Animals – 2, Reproductive Biology – 1, BioMed Research International – 1, Animal Reproduction – 1, Acta Veterinaria Hungarica – 1, Journal Veterinary Research – 1). Pozostałe 10 prac zostało opublikowane w czasopismach z listy JCR, których IF jest niższy od 1. Według punktacji MEiN 18 prac miało 140 lub 100 punktów, a 14 prac poniżej 100 punktów. Dwadzieścia dziewięć prac zostało opublikowanych w czasopismach z listy JCR, które zostały przypisane przez MEiN do dyscypliny weterynaria. Sumaryczny IF całego dorobku publikacyjnego Habilitantki wynosi 70,255, a łączna liczba punktów MEiN to 3059. Całkowita liczba cytowań opublikowanych prac Habilitantki wg bazy Web of Science Core Collection – wynosi 178 natomiast wg bazy Scopus – 174. Wartość indeksu Hirscha w obu bazach wynosi 7.

Analizując dorobek naukowy Habilitantki zwraca uwagę fakt, że jest on wynikiem realizacji badań prowadzonych przez większe zespoły badawcze, których członkiem była Habilitantka. Poza cyklem publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, Habilitantka była pierwszym autorem jedynie w 3 pracach opublikowanych w czasopismach z listy JCR (1 oryginalna i 2 przeglądowe) i jednej pracy przeglądowej opublikowanej w czasopiśmie spoza listy JCR. Taka charakterystyka dorobku Habilitantki dobrze świadczy o Jej umiejętności do nawiązywania współpracy naukowej, ale budzi pewne wątpliwości odnośnie Jej rzeczywistego wkładu w powstanie prac, w których była tylko którymś ze współautorów.

Pozytywnie oceniam fakt, że wyniki badań, w których uczestniczy Habilitantka są z dużą intensywnością konfrontowane, często przez nią osobiście, z szerokimi gremiami naukowców, podczas kongresów i konferencji w kraju i zagranicą. Dr inż. Joanna Kochan była dotychczas pierwszym autorem 11 i współautorem 49 doniesień na krajowe i zagraniczne konferencje i kongresy naukowe.

Habilitantka jest również rozpoznawalnym w środowisku naukowym naukowcem, o uznanych kompetencjach w dziedzinie technik wspomaganego rozrodu u zwierząt, czego dowodem jest powierzenie Jej przeprowadzenia 6 wykładów plenarnych/wykładów na zaproszenie podczas krajowych i zagranicznych kongresów naukowych.

Pozytywnie należy również ocenić duży progres w aktywności naukowej Habilitantki po doktoracie, co świadczy w moim przekonaniu, o nabyciu przez Nią odpowiednich kompetencji naukowych i dobrze rokuje co do Jej dalszego rozwoju naukowego.

Analizując aktywność naukową dr inż. Joanny Kochan w całym okresie Jej dotychczasowej kariery naukowej należy stwierdzić, że Jej zainteresowania naukowe są mocno sprecyzowane i koncentrują się wokół szeroko pojętej embriologii eksperymentalnej zwierząt gospodarskich i towarzyszących, a w szczególności koni i kotów. W dorobku naukowym Habilitantki można wyróżnić 3 wiodące obszary badawcze:

- techniki wspomaganego rozrodu koni;
- techniki wspomaganego rozrodu kota domowego i dzikich kotowatych;
- techniki wspomaganego rozrodu u innych gatunków zwierząt.

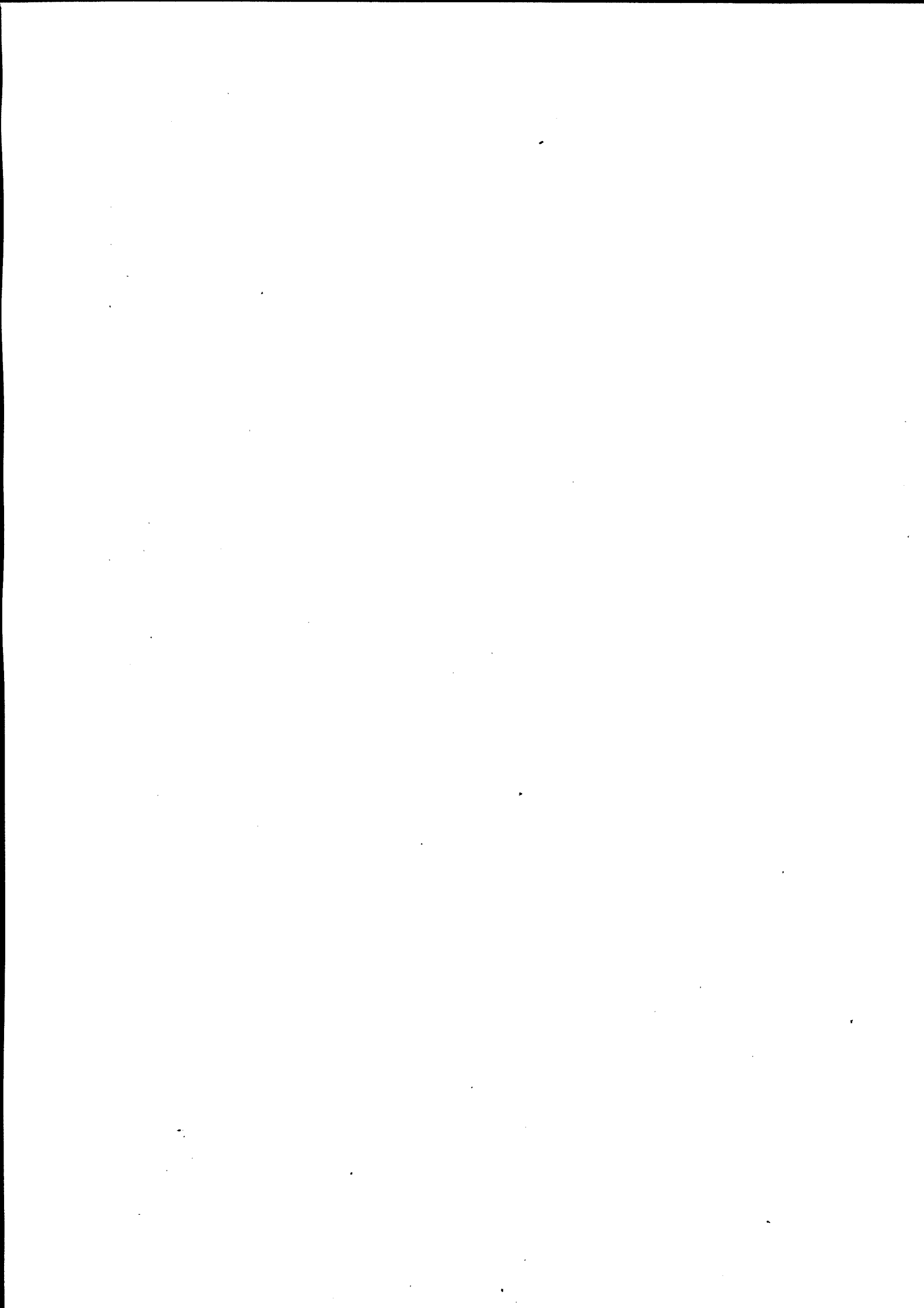
Pierwsze zainteresowania naukowe dr inż. Joanny Kochan w obszarze technik wspomaganego rozrodu koni dotyczyły uzyskiwania zarodków końskich w warunkach *in vitro*. Badania dotyczące tego zagadnienia Habilitantka realizowała, między innymi, jako wykonawca grantu promotorskiego finansowanego przez KBN pt. „Badania *in vitro* zdolności rozwojowych oocytów klaczy po mikroiniekcji plemnika i aktywacji partenogenetycznej”, i które zaowocowały obronieniem przez Nią wyróżnionej pracy doktorskiej. Za najbardziej cenne efekty badań z tego zakresu należy uznać uzyskanie po raz pierwszy w Polsce zarodków końskich metodą mikroiniekcji plemnika do komórki jajowej (ICSI), opracowanie optymalnej metody sztucznej aktywacji oocytów klaczy z zastosowaniem kombinacji jonomycyny i 6DMAP w celu uzyskiwania zarodków partenogenetycznych wykorzystywanych do badań oraz wykazanie, że oocyty pozyskane od niedojrzałych płciowo źrebiąt mają zdolność do dojrzewania w warunkach *in vitro* i mogą być wykorzystywane w procedurach pozaustrojowej produkcji zarodków. Oprócz pracy doktorskiej wyniki badań z tego zakresu zostały przedstawione w 1 publikacji naukowej (Medycyna Weterynaryjna 2012, 68, 54-57) i 3 doniesieniach konferencyjnych. Tematyki uzyskiwania zarodków końskich w warunkach *in vitro* dotyczył również projekt KBN pt. „Środowisko hormonalne pęcherzyków jajnikowych źrebiąt a zdolność oocytów do dojrzewania i zapłodnienia”, w którym Habilitantka była wykonawcą. Wyniki badań przedstawione w jednej pracy, w której Habilitantka jest współautorem, wykazały, że w jaj-



nikach niedojrzałych płciowo klaczy dochodzi do produkcji hormonów steroidowych (estrogeny, progesteron, testosteron) oraz występuje ekspresja receptorów androgenowych. Wskazuje to na udział androgenów w procesie folikulogenezy i rozwoju jajników u klaczy przed osiągnięciem dojrzałości płciowej (Theriogenology 2018, 121, 13-20).

Kolejny temat badawczy w obszarze technik wspomaganego rozrodu koni, w którym uczestniczyła Habilitantka, to optymalizacja technik kriokonserwacji oocytów i zarodków koni. Podczas realizacji badań z tego zakresu Habilitantka nawiązała współpracę naukową z Instytutem Zootechniki w Balicach oraz Instytutem Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Akademii Nauk w Jastrzębcu, gdzie przeszła szkolenie w zakresie stosowania technik mikroobjętościowych do witrifikacji oocytów, a następnie uczestniczyła w badaniach nad skutecznością witrifikacji oocytów końskich metodą Rapid I. Rezultatem tej współpracy były 2 publikacje naukowe w renomowanych czasopismach z listy JCR (Theriogenology 2021, 162, 42-48; Journal of Equine Veterinary Science 2014, 34, 675-679), 3 doniesienia zjazdowe oraz obroniona praca doktorska, w której Habilitantka była promotorem pomocniczym. Za najważniejsze osiągnięcie naukowe wynikające z tych badań należy uznać wykazanie, że najbardziej skuteczną metodą kriokonserwacji oocytów klaczy jest zaadaptowana z medycyny ludzkiej metoda witrifikacji w systemie Rapid-I, z zastosowaniem komercyjnego medium do kriokonserwacji zarodków końskich EquiPro VitKit. Dzięki zastosowaniu tej metody autorom udało się uzyskać, jako nielicznym na świecie, zarodki po zapłodnieniu *in vitro* (metodą mikroiniekcji plemnika do komórki jajowej -ICSI) witrifikowanych oocytów klaczy. Habilitantka brała również udział w interesujących badaniach dotyczących analizy fragmentacji DNA w zarodkach końskich wyplukiwanych *in vivo* i poddanych następnie krótko- lub długotrwałej konserwacji oraz stosując różne systemy witrifikacji. W oparciu o wyniki fragmentacji DNA wykazano wyższość ultra szybkiej metody witrifikacji Rapid-I nad witrifikacją w słómkach oraz potwierdzono, że analiza fragmentacji DNA może być dobrym narzędziem badawczym w ocenie skuteczności różnych technik konserwacji zarodków końskich. Wyniki badań dotyczących tego zagadnienia zostały opublikowane w postaci 1 pracy naukowej (Medycyna Weterynaryjna 2022, 78, 521-525.) oraz zaprezentowane jako 2 doniesienia zjazdowe.

Bardzo ciekawym obszarem aktywności naukowej Habilitantki, związanym z technikami wspomaganego rozrodu koni, są badania nad oceną wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na dojrzewanie *in vitro* oocytów klaczy. Są to pionierskie badania stanowiące podstawę aktualnie realizowanego przewodu doktorskiego, w którym Habilitantka jest promotorem pomocniczym. Badania są wykonywane w ramach grantu promotorskiego NCN pt.: „Analiza wpływu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z płynu pęcherzykowego jajnika konia domowego na modulację transkryptomu i ekspansję komórek ziarnistych podczas dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro*”, we



współpracy z Zakładem Biologii Komórki Uniwersytetu Jagiellońskiego. Dotychczas uzyskane wyniki wskazują, że dodatek pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pozyskanych z płynu pęcherzykowego jajnika poprawia efektywność dojrzewania jądrowego oocytów oraz stopień rozproszenia wzgórka jajonośnego. Te unikatowe wyniki zostały przedstawione w jednej publikacji naukowej (Theriogenology 2022, 188, 116-124.) oraz jako 3 doniesienia na konferencje naukowe.

Z obszaru technik wspomaganego rozrodu koni są również badania dotyczące zastosowania techniki mikroprzepływów do selekcji plemników ogiera, w których Habilitantka uczestniczy jako członek Zespołu realizującego projekt pt. „Opracowanie i zastosowanie innowacyjnego prototypu mobilnego laboratorium andrologicznego w celu utworzenia banku nasienia ogierów rasy huculskiej i małopolskiej” w ramach Programu Rozwoju Obszarów Wiejskich (finansowanego z Europejskiego Funduszu Rolnego). Wyniki wstępnych badań wykazały, że technika mikroprzepływów zastosowana do nasienia ogierów jest skuteczną metodą selekcji plemników o ruchu postępowym oraz plemników o niskiej fragmentacji DNA. Badania te są niezwykle cenne z aplikacyjnego punktu widzenia, ponieważ otwierają nowe możliwości tworzenia wartościowych dawek inseminacyjnych od ogierów z obniżonymi parametrami nasienia lub takich, u których proces kriokonserwacji znacząco obniża żywotność plemników. Wyniki tych badań zostały zaprezentowane podczas dwóch konferencji naukowych.

W trakcie badań dotyczących rozrodu koni Habilitantka nawiązała współpracę naukową z Weterynaryjną Kliniką Położnictwa i Ginekologii Uniwersytetu w Pizie, a efektem badań we współpracy z tą jednostką była jedna publikacja naukowa (Journal of Equine Veterinary Science 2017, 58, 47-50.) i jedno doniesienie zjazdowe oraz podpisanie porozumienia o współpracy między Uniwersytetem Rolniczym w Krakowie i Uniwersytetem w Pizie.

Drugim obszarem zainteresowań naukowych dr inż. Joanny Kochan są techniki wspomaganego rozrodu u kota domowego i dzikich kotowatych w kontekście ochrony zagrożonych gatunków dzikich kotowatych. W 2014 r. odbyła miesięczny staż naukowy w Katedrze Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Podczas pobytu w tej jednostce nabyła odpowiednie kompetencje w zakresie technik wspomaganego rozrodu u kotów oraz uczestniczyła w opracowaniu koncepcji wspólnego (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Ogród Zoologiczny w Krakowie) projektu badawczego pt. „Zwiększenie innowacyjności i efektywności programów ochrony zasobów genetycznych dzikich kotowatych poprzez utworzenie banku komórek i wdrożenie do praktyki metod pozaustrojowej produkcji zarodków”, który uzyskał finansowanie z NCBiR, a Habilitantka została jego koordynatorem ze strony Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. W ramach

tego projektu, we współpracy z Katedrą Rozrodu, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, a także wieloma Ogradami Zoologicznymi (w Krakowie, Opolu, Borysewi, Chorzowie, Wrocławiu, Gdańsku) uczestniczyła w utworzeniu banku komórek (fibroblastów, plemników i oocytów), w którym zgromadzono komórki od 18 gatunków dzikich kotowatych oraz 10 ras kota domowego, co stanowi unikatowy zbiór mający ogromne znaczenie w ochronie bioróżnorodności tych zwierząt. Ważnym efektem tych badań była również optymalizacja hodowli *in vitro* fibroblastów kotów, co jest niezwykle cenne w kontekście tworzenia i utrzymania rezerw genetycznych dzikich kotowatych oraz wykorzystania fibroblastów do procedury klonowania somatycznego. Podczas realizacji projektu Habilitantka została zaproszona do współpracy przez Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Stanowego Parana w Brazylii oraz Park Dzikich Zwierząt ITAIPU w Paragwaju, gdzie przez miesiąc brała udział w badaniach dotyczących kriokonserwacji nasienia dzikich kotowatych i tworzeniu banku nasienia dzikich kotowatych z rezerwatu ITAIPU. Wyniki omawianych powyżej badań zostały przedstawiono w 5 oryginalnych pracach naukowych (Annals of Animal Science 2022, 22, 1245-1255; Animals 2022, 12, 871-881; Theriogenology 2019, 131, 140-145; Annals of Animal Sciences 2019, 19, 359-372; Reproduction in Domestic Animals 2019, 54, 719-726) i 10 doniesieniach zjazdowych.

Kolejna aktywność naukowa Habilitantki dotycząca technik wspomaganego rozrodu u kota domowego i dzikich kotowatych obejmuje badania dotyczące optymalizacji technik kriokonserwacji oocytów kota domowego i dzikich kotowatych. Za szczególnie wartościowe wyniki tych badań należy uznać wykazanie, że stosowanie komercyjnych protokołów skutecznej witrifikacji oocytów kocich, takich jak zestaw Vitrolife, daje również możliwość szybkiego zabezpieczenia cennych komórek od gatunków zagrożonych wyginięciem. Stosując tę metodę udało się zabezpieczyć oocyty samic serwala i rysia po ich nagłej śmierci. Badania te zaowocowały 3 publikacjami (Animals 2023, 13, 36-46; Reproduction in Domestic Animals 2020, 55, 992-997; Cryoletters 2019, 40, 226-230) i doniesieniem na międzynarodową konferencję.

Habilitantka brała również udział w badaniach dotyczących identyfikacji zaburzeń chromosomowych w gametach i zarodkach kota domowego. Badania te były realizowane we współpracy z Weterynaryjnym Instytutem Badawczym w Czechach (Veterinary Research Institute) i były podstawą obronionej pracy doktorskiej, w której Habilitantka pełniła funkcję promotora pomocniczego. W badaniach zastosowano do oceny zarodków system time-lapse oraz fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* i wykazano związek pomiędzy morfologią i ploidalnością zarodków kota domowego. Wyniki tych badań stanowią podstawę do opracowania kryteriów selekcji najbardziej rokujących zarodków do transferu zarodków nie tylko u kota domowego, ale również dzikich kotowatych. Wyniki tej części badań zostały przedstawione w 4 pracach opublikowanych w renomowanych czaso-

pismach naukowych (Theriogenology 2022, 186, 114-121; Animals 2021, 11, 2106-2116; Theriogenology 2020, 157, 372-377; Animals 2020, 10, 3-13.)

Trzecim obszarem zainteresowań naukowych dr inż. Joanny Kochan są techniki wspomaganego rozrodu u innych gatunków zwierząt. W 2006 r. odbyła miesięczny staż naukowy na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Teramo we Włoszech, gdzie zajmowała się aktywacją partenogenetyczną zarodków owczych. Brała również udział w badaniach dotyczących monitorowania rozwoju zarodków owczych w warunkach *in vitro* oraz ich kriokonserwacji. Analiza parametrów morfokinetycznych zarodków owczych pozwoliła na uzyskanie ciekawych wyników. Stwierdzono mianowicie, że na potencjał rozwojowy zarodków ma wpływ czas pierwszego podziału po zapłodnieniu. Te zarodki, które zaczynały się dzielić średnio w 23 godzinie po zapłodnieniu posiadały największy potencjał do rozwoju do stadium blastocysty oraz jej wykluwania. Natomiast zarodki, których pierwszy podział był opóźniony średnio o 7 godzin nie rozwijały się do stadium blastocysty. Z kolei badania dotyczące kriokonserwacji zarodków owczych wykazały, że proces witryfikacji nie wpływa na tempo ekspansji blastocyst, natomiast znacząco wpływa na redukcję liczby komórek w blastocystach. Habilitantka brała również udział w badaniach dotyczących doskonalenia metod transplantacji zarodków i praktycznego ich zastosowania w produkcji owczarskiej na Ukrainie. Badania te prowadziła we współpracy z Instytutem Biologii Zwierząt Narodowej Akademii Nauk Rolniczych we Lwowie. Ponadto brała udział w badaniach dotyczących kriokonserwacji oocytów i zarodków bydła i królików. Wyniki badań z tego obszaru zostały opublikowane w postaci 7 prac naukowych (Reproductive Biology 2023, 23, 100750; Theriogenology 2022, 187, 58-63; Animal Reproduction 2022, 19, 1-9; Theriogenology 2021, 159, 147-152; Cryoletters 2019, 40, 123-128; Roczniki Naukowe Zootechniki 2018, 45, 195-202; Roczniki Naukowe Zootechniki 2018, 45, 203-208).

Obecnie Habilitantka jest wykonawcą w projekcie pt.: „Poszukiwanie genetycznych biomarkerów niepłodności idiopatycznej u mężczyzn”, realizowanym we współpracy z Katedrą Genetyki Wydziału Lekarskiego i Nauk o Zdrowiu, Krakowskiej Akademii im. Andrzeja Frycza Modrzewskiego oraz Małopolskiego Instytutu Leczenia i Diagnostyki Niepłodności KrakOVI.

Oceniając całokształt osiągnięć naukowych dr inż. Joanny Kochan uważam, że wykazuje się Ona istotną aktywnością naukową, której rezultaty w sposób znaczący wpływają na postęp w dyscyplinie weterynarii w zakresie rozrodu zwierząt. W dużym zakresie aktywność naukowa Habilitantki realizowana jest we współpracy z wieloma jednostkami naukowymi, zarówno krajowymi jak zagranicznymi. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że wiele wartościowych badań było realizowanych z udziałem Habilitantki podczas Jej pobytu w różnych instytucjach naukowych (In-

stytut Zootechniki w Balicach, Instytut Genetyki i Biotechnologii Zwierząt Akademii Nauk w Jastrzębcu, Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Stanowego Parana w Brazylii oraz Park Dzikich Zwierząt ITAIPU w Paragwaju, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu w Teramo we Włoszech). Reasumując, uważam, że omawiany obszar aktywności naukowej dr inż. Joanny Kochan spełnia kryteria określone w aktualnie obowiązujących przepisach, odnośnie warunków nadania stopnia doktora habilitowanego.

### **Aktywność dydaktyczna, organizacyjna oraz popularyzująca naukę dr inż. Joanny Kochan**

Poza aktywnością naukową dr inż. Joanna Kochan jest mocno zaangażowana w działalność dydaktyczną. Jest koordynatorem 5 przedmiotów prowadzonych na kierunkach zootechnika, bioinżynieria zwierząt, biologia stosowana i weterynaria (Biotechniki rozrodu zwierząt, Embriologia, Biomedyczne kierunki embriologii, Metody oceny gamet i zarodków, Rozród zwierząt) oraz koordynuje i prowadzi przedmiot w języku angielskim „Biotechniques in animal reproduction” dla studentów programu ERASMUS. Ponadto prowadzi zajęcia dydaktyczne dla studentów V roku medycyny w Małopolskim Instytucie Diagnostyki i Leczenia Niepłodności „KraKOvi” z przedmiotu „Seksuologia i zaburzenia płodności”. Dr inż. Joanna Kochan była opiekunem 78 prac dyplomowych, w tym 32 prac inżynierskich i 46 prac magisterskich. Była promotorem pomocniczym w dwóch zakończonych przewodach doktorskich i jest również promotorem pomocniczym w jednym aktualnie realizowanym przewodzie doktorskim.

Dr inż. Joanna Kochan bierze również aktywny udział w organizacji życia naukowego uczelni. Była członkiem komitetów organizacyjnych trzech konferencji naukowych (Kraków 2011, 2013, 2015), a także członkiem Rady Kierunku Bioinżynieria Zwierząt, Rady Dyscypliny Weterynaria oraz Rady Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt. Ponadto była organizatorem kursu inseminacji koni oraz brała udział w Nocach Naukowców, Festiwalach Nauki, pokazowych lekcjach i wykładach dla licealistów w ramach promocji Wydziału Hodowli i Biologii Zwierząt. Za swoją aktywność organizacyjną została trzykrotnie nagrodzona nagrodą Rektora UR.

Dr inż. Joanna Kochan jest członkiem European Society of Human Reproduction and Embryology, Polskiego Towarzystwa Medycyny Rozrodu i Embriologii oraz Towarzystwa Biologii Rozrodu.

Podsumowując, po analizie całokształtu osiągnięć naukowych dr inż. Joanny Kochan, stwierdzam, że w mojej opinii, osiągnięcia te spełniają kryteria określone w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742) i stanowią podstawę do nadania stopnia naukowego doktora habilitowanego w dziedzinie nauk weterynaryjnych w dyscyplinie weterynaria.

Marek Szczubica