



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kollątaja w Krakowie

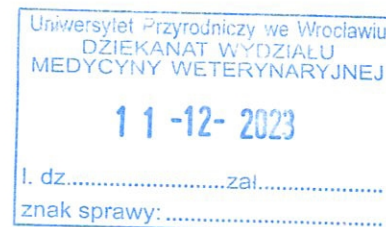


UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

Kraków, 26.11.2023 r.

Prof. dr hab. Małgorzata Kotula-Balak
Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie



RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. wet. Marii Eberhardt w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora w dyscyplinie weterynaria przed Radą Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, pt. Badania nad właściwościami *in vitro* oraz zdolnością zapładniającą plemników żubra (*Bison Bonasus*) w aspekcie doskonalenia metod kriokonserwacji gamet męskich tego gatunku

W dniu 10 grudnia 2020 r. Międzynarodowa Unia Ochrony Przyrody (ang. *International Union for Conservation of Nature*; IUCN) zaktualizowała Czerwoną Listę Gatunków Zagrożonych. Żubr (*Bison bonasus L.*), największy ssak lądowy w Europie, dzięki ciągłym wysiłkom ochronnym zmienił status z gatunku zagrożonego na bliski zagrożenia. Dr Bruno Oberle, dyrektor generalny IUCN podkreślił, że ogromne wysiłki prowadzące do ochrony tego gatunku przyniosły skutek jednak rosnąca lista gatunków wymarłych wyraźnie przypomina, że należy nadal pilnie zwiększać prace na rzecz ochrony przyrody. W dzisiejszych czasach konieczne jest niwelowanie globalnych zagrożeń poprzez dążenie do zrównoważonego działania człowieka we wszystkich sektorach gospodarki wyznaczając i realizując ambitne cele w zakresie strategii ochrony różnorodności biologicznej. Obecnie żubr pozostaje zależny od bieżących środków ochronnych, takich jak translokacja do bardziej optymalnych siedlisk otwartych (z wystarczającą ilością pożywienia) i ograniczanie konfliktów człowiek-żubr powstałych w wyniku przebywania żubra na terenach rolniczych oraz dokarmiania. Dlatego koniecznym jest utworzenie obszarów chronionych obejmujących otwarte łąki gdzie żubry będą mogły żyć i rozmnażać jak w czasach świetności tego gatunku. Z drugiej strony bardzo intensywnie rozwijające się technologie wspomaganie rozrodu mogą pomagać w ochronie gatunków dzikich przezwyciężyć przed wyginięciem lub pomagać zwiększyć liczbę zwierząt hodowlanych. Większość wysiłków w zakresie biobankowania skupia się na opracowaniu skutecznych protokołów konserwacji plemników, oocytów i zarodków. Kriokonserwacja plemników pozostaje najmniej inwazyjną i najtańszą metodą przechowywania plazmy



Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

zarodkowej. W ciągu ostatnich kilku lat opracowano kilka biotechnologii wspomagających rozród wykraczających poza konwencjonalne zamrażanie plemników. Należą do nich techniki ultraszybkiego zamrażania. Jednak rezultaty dla wielu gatunków poddanych sztucznej inseminacji przy użyciu zamrożonych i rozmrożonych plemników wciąż potrzebują dalszego doskonalenia.

1. Wartość naukowa rozprawy

Oryginalność badań

Rozprawa doktorska Pani lek. wet. Marii Eberhardt, dotyczy powyżej wspomnianego **niezwykle ważkiego tematu** utrzymania ciągłości gatunkowej żubra. **Badania prowadzone w niniejszej dysertacji wpisują się w nieocenioną, wybitną działalność Pani Prof. dr hab. Wandy Olech-Piaseckiej** z Katedry Genetyki i Ochrony Zwierząt Instytutu Nauk o Zwierzętach Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, która jest Prezesem Towarzystwa Miłośników Żubrów. Natomiast w Katedrze Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu **od wielu lat intensywnie prowadzone są badania rozrodu i andrologii zwierząt udomowionych i dzikich ze szczególnym uwzględnieniem oceny i konserwacji nasienia w niskich temperaturach oraz leczenia niepłodności samic i samców z użyciem technik wspomaganego rozrodu. Pan Prof. dr hab. Wojciech Niżański jest uznanym w kraju i na świecie wysokiej klasy specjalistą w tym zakresie. Po raz pierwszy w niniejszej dysertacji zostają podjęte szczegółowe analizy na poziomie komórkowym plemników najądrzowych żubra wraz z zastosowaniem techniki kriokonserwacji, selekcji za pomocą wirowania w gradiencie gęstości Percollu® oraz testu wiązania z osłonką przejrzystą.**

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska została przygotowana w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów, składającego się z **dwóch oryginalnych opublikowanych prac oryginalnych oraz przesłanej do repozytorium przed wydawniczej pracy oryginalnej (wrzesień 2023), w których Kandydatka jest pierwszym autorem.**

Wartość naukowa

Rozprawa doktorska składa się z następujących głównych części: słownik terminów, wstęp, przegląd piśmiennictwa, hipotezy badawcze i cele pracy, zadania badawcze oraz publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, materiał i metody, wyniki, omówienie wyników,



Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

wnioski, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim, załączniki: publikacja (nr 1) Eberhardt i wsp. *Scientific Reports* 2023, publikacja (nr 2) Eberhardt i wsp. *BioMed Central Veterinary Research* 2022, publikacja (nr 3) Eberhardt i wsp. przesłana do repozytorium przed wydawniczego bioRxiv, oraz oświadczenia współautorów.

Oryginalne opublikowane prace naukowe stanowiące rozprawę doktorską lek. wet. Marii Eberhardt to przygotowane we współpracy międzynarodowej prace wymienione wg. kolejności prowadzonych analiz:

1. Eberhardt M, Prochowska S, Partyka A, Bielas W, Van Soom A, Olech W, Niżański 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. (IF: 4.996; MEN 140 pkt).

2. Eberhardt M, Prochowska S, Duszewska AM, Van Soom A, Olech W, Niżański W. *The influence of Percoll® density gradient centrifugation before cryopreservation on the quality of frozen wisent (Bison bonasus) epididymal spermatozoa*. *BMC Vet Res.* 2022, 10;18(1):305. doi: 10.1186/s12917-022-03408-z. (IF: 2.792; MEN 140 pkt).

oraz praca przesłana do repozytorium przed wydawniczego:

3. Eberhardt M, Colobo M, Prochowska S, Luvoni GC, Olech W, Niżański 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*. *bioRxiv* 2023.09.11.557052.

W pierwszej pracy oryginalnej (nr 1) Eberhardt i wsp. Sci Rep 2023: *The morphology, morphometry and functionality of fresh and cryopreserved wisent (Bison bonasus) epididymal spermatozoa* plemniki najądrzowe pobrano pośmiertnie od żubrów poza sezonem lęgowym (wrzesień-kwiecień) ze stad hodowlanych lub zagród pokazowych z 13 miejscowościach w Polsce w latach 2015 – 2023 (n = 27; wiek 3 - 20 lat). Komórki poddano kompleksowej charakterystyce morfologicznej, morfometrycznej i funkcjonalnej oraz oceniono efektywność ich kriokonserwacji w rozcieńczalniku na bazie buforu (Tris(hydroksymetylo)-aminometanowego i żółtka jaja kurzego. Oceniono całkowitą liczbę plemników uzyskanych od jednego osobnika (średnia 1985.0×10^6). Gamety te charakteryzowały się ruchliwością na poziomie (śred.) 40.0%, żywotnością (śred.) 69.8% i prawidłową morfologią (śred.) 54.3%. Oceniono średnią wielkość główki plemnika, długość i pole powierzchni. Żywotną populację uzyskanych gamet charakteryzowały (śred. wartości) dla: 53.02% komórek - nienaruszona błona, 50.8% - nienaruszony akrosom, 0.4% - pofragmentowana chromatyna, 5.9% - wysoki



Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

potencjał mitochondrialny i 42.1% brak peroksydacji lipidów. Żywą populację zamrożonych/rozrożonych gamet charakteryzowały (śred. wartości): 18.4% komórek posiadało nienaruszoną błonę, 35.1% nienaruszony akrosom, 0.07% nienaruszoną chromatynę, 12.8% komórek wykazywało wysoki potencjał mitochondrialny i 16.3% komórek nie wykazywało peroksydacji lipidów. Badania prowadzone przez Doktorantkę pozwoliły na wstępne określenie niektórych standardów gatunkowych oceny plemników najądrza żubra m.in. plemniki pobrane w okresie bliskim sezonu rujowego miały najlepsze parametry funkcjonalne. Wyniki uzyskane z analiz kriokonserwanych plemników żubra wskazały, że rozcieńczalnik na bazie buforu Tris z dodatkiem żółtka jaja kurzego może być użyteczny w dalszych analizach w tym kierunku.

W drugiej pracy oryginalnej (nr 2) Eberhardt i wsp. BMC Vet Res 2022: *The influence of Percoll® density gradient centrifugation before cryopreservation on the quality of frozen wisent (Bison bonasus) epididymal spermatozoa* podjęto próbę oczyszczenia nasienia żurów (materiał badawczy jak w pracy nr 1) przeznaczonego do kriokonserwacji aby zwiększyć jakość pozyskiwanych w ten sposób gamet. Do analiz użyto Percoll® w gradiencie gęstości a próbki oceniano następnie za pomocą komputerowego systemu analizy nasienia i cytometrii przepływowej. Stwierdzono, że wirowanie w gradiencie gęstości Percollu® spowodowało zwiększenie odsetka plemników ruchliwych, plemników o prawidłowej morfologii i prawidłowej funkcjonalności, ale także znacznie zmniejszyło całkowitą liczbę plemników. Niemniej jednak stężenie zamrożonych plemników było w dalszym ciągu wystarczające do uzyskania z każdego najądrza kilku pełnych dawek inseminacyjnych (jak te określone dla bydła). Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka stwierdziła, że wysokiej jakości dawka inseminacyjna do celów zapłodnienia *in vitro* powinna być pozbawiona detrytusów podczas gdy ogólna liczba plemników jest sprawą drugorzędą jednak równie ważną. Wirowanie w gradiencie gęstości Percollu® jest istotnym elementem przygotowania próbek nasienia żubra do kriokonserwacji.

W trzeciej pracy oryginalnej (nieopublikowanej) (nr. 3) Eberhardt i wsp. (wysłana do bioRxiv): *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* Doktorantka po raz pierwszy zastosowała test wiązania osłonki przejrzystej do oceny jakości kriokonserwowanych plemników żubra (materiał badawczy jak pracach nr 1 i 2). Ze względu na bliskie pokrewieństwo między gatunkami zastosowano protokół testu



Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

wiązania osłonki przejrzystej oocytu bydlęcego. Aby wykluczyć wpływ składu rozrzedzalnika użytego do kriokonserwacji, plemniki poddano kriokonserwacji w rozcieńczalniku na bazie buforu Tris, żółtku jaja i gliceryny oraz w komercyjnym rozcieńczalniku Andromed®. Dla rozrzedzalników na bazie buforu Tris i Andromedu® wykazano następujące różnice: ruchliwość plemników rozmrożonych odpowiednio 25% i 15%, żywotność średn. odpowiednio 30.75% i 51.25% oraz prawidłowa morfologia średn. odpowiednio 81.5% i 80.75%. Dla obu rozrzedzalników ruchliwość w zakresie parametrów szczegółowych w analizie CASA była niska. Niezależnie od użytego rozcieńczalnika, do 100% oocytów związały się plemniki (średn. 66.26 plemniki mrożone w rozcieńczalniku na bazie Tris i średn. 27.37 plemniki kriokonserwowane w rozcieńczalniku Andromed®). Lepsze rezultaty wiązania do osłonki przejrzystej dla plemników kriokonserwowanych w rozcieńczalniku na bazie Tris pokrywają się z wynikami oceny nasienia żubra opisanej w pracach 1 i 2. Doktorantka wykazała, że protokół wiązania osłonki przejrzystej opracowany dla bydła może być używany do oceny plemników najądrzowych żubra po kriokonserwacji a przed przystąpieniem do użycia technik wspomaganego rozrodu.

Podjmując badania opisane w dysertacji pani lek. wet. Maria Eberhardt była świadoma ogromnej ich trudności jednak zmierzyła się z poszczególnymi problemami, które na każdym etapie mogły przyczynić się do niepowodzenia podjętej pracy. Należy w tym miejscu pochwalić **ogromną determinację Doktorantki** w dążeniu do uzyskania wyników z poszczególnych analiz prowadzonych po raz pierwszy na podstawie niewielkiej ilości danych literaturowych z badań w większości uzyskanych ze zwierząt hodowlanych m.in.: (i) pozyskanie plemników poprzez pośmiertne nacinanie najądrzy, oczyszczanie w gradiencie Percollu®, wybór najlepszego rozrzedzalnika do kriokonserwacji czy test wiązania z osłonką przejrzystą oocytu bydlęcego.

Powyższe wyniki badań przedstawione w pracach 1-3 są **pionierskie, obiecujące i pozwalają na podjęcie dalszych prac prowadzących do zachowania cennego materiału genetycznego i jego dalszego wykorzystania w technikach sztucznego zapłodnienia u żubra.**



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kollątaja w Krakowie



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

2. Wartość merytoryczna rozprawy

W mojej opinii **rozprawa jest w pełni poprawna** pod względem merytorycznym. Doktorantka bardzo dobrze wprowadziła czytelnika w tematykę badawczą. Użyte rutynowe ale liczne techniki: izolacja plemników z najądry, ocena mikroskopowa (ruch, koncentracja, całkowita liczba plemników), barwienie eozyna-nigrozyna, barwienie Giemzy (wg. Watsona), CASA, czy fluorescencyjna cytometria przepływowa (ocena ciągłości błony komórkowej, potencjału mitochondrialnego, peroksydacji lipidów, statusu chromatyny), wirowanie w gradiencie gęstości Percollu® i kriokonserwacja oraz test wiązania z osłonką przejrzystą oocytu wraz z przygotowaniem rzeźnianych oocytów bydłęcych, barwienie bis-bezimid, mikroskopia fluorescencyjna są poprawnie opisane. Na tej podstawie można stwierdzić, że Kandydatka bardzo dobrze opanowała powyższy warsztat badawczy, a także umiejętnie posługuje się narzędziami statystycznymi do analizy uzyskanych danych. Sposób przedstawienia wiedzy oraz wyników wraz z ich krytyczną analizą podlegały już ocenie przez recenzentów czasopism w których zostały opublikowane artykuły nr.1 i 2. Artykuł nr. 3 jest obecnie dostępny on-line i podlega publicznie dostępnej ewaluacji. Tym niemniej, na podstawie Dyskusji dysertacji można stwierdzić, że Doktorantka potrafi właściwie analizować wyniki i dyskutować je na tle piśmiennictwa oraz umiejętnie formułować wnioski.

3. Poprawność redakcyjna rozprawy

Dysertacja została poprawnie skonstruowana w oparciu o zalecenia Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu i uwzględnia wszystkie wymagane elementy rozprawy doktorskiej przygotowanej w formie zbioru artykułów. Praca napisana jest bardzo starannie z uwzględnieniem poprawnych zasad gramatyki i pisowni. Chciałabym podkreślić, że Doktorantka doskonale posługuje się terminologią z zakresu biologii, biologii molekularnej, hodowli zwierząt czy medycyny weterynaryjnej. Wskazuje to na skrupulatne przygotowanie merytoryczne do przeprowadzenia i napisania rozprawy doktorskiej a także na bieżące uzupełnianie swojej wiedzy. W pracy znalazłam niewielkie uchybienia - pojedyncze niekonsekwencje w stosowaniu pełnych nazw, skrótów lub terminologii anglojęzycznej np. reaktywne formy tlenu. Warto byłoby podać także pełną nazwę chemiczną wskazującą na skład „buforu Tris” przed stosowaniem opisu „bufor Tris”.



Uniwersyteckie Centrum Medycyny Weterynaryjnej UJ-UR

4. Uwagi krytyczne

Nie mam żadnych uwag krytycznych do niniejszej dysertacji. Natomiast czytając rozprawę i powyżej przedstawione cechy naukowe Doktorantki nasunęły mi się następujące przemyślenia-pytania:

1. Czy ograniczenia badań (jakie) napotkane przez panią mogą być w przyszłości zniwelowane?
2. Czy technologie uwzględniające podział zarodków, transfer jądra komórek somatycznych czy indukowanie pluripotentnych komórek macierzystych w tym embrionalnych mogły by także być użyte w pracach nakierowanych na ochronę żubra? Jak powinny zostać one poprowadzone?
3. W leczeniu niepłodności człowieka wciąż brak jest odpowiednich testów do zbadania komórki rozrodczej męskiej przed jej użyciem w technikach wspomaganego rozrodu. Czy i jakie analizy plemnika zaproponowałaby pani gdyby w przyszłości sztuczne zapłodnienie było wykonane u żubra?

5. Ocena końcowa

Oceniana rozprawa doktorska zawiera bardzo interesujące wyniki naukowe, które **noszą cechy odkryć naukowych**. Rozprawa wskazuje na bardzo dużą wiedzę Doktorantki w zakresie opisywanego tematu, umiejętność prowadzenia i modyfikacji protokołów analitycznych, interpretacji wyników i niewątpliwie wnosi nowe, ważne elementy do nauki.

Ja, niżej podpisana stwierdzam, że recenzowana **rozprawa doktorska lek. wet. Marii Eberhardt spełnia warunki** określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2023, poz. 742 z późn. zm.) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. wet. Marii Eberhardt do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie ze względu na podjęty poważny i trudny temat, przeprowadzone z sukcesem badania i uzyskane istotne wyniki o znamionach aplikacyjności a także wiedzę i zaangażowanie Doktorantki wnioskuję o wyróżnienie pracy.

M. Kuku - Balala