

Prof. zw. dr hab. Leszek Krakowski
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt



Recenzja

**dysertacji doktorskiej lekarz weterynarii Marii Eberhardt
pt. „Badania nad właściwościami *in vitro* oraz zdolnością zapładniającą
plemników Żubra (*Bison Bonasus*) w aspekcie doskonalenia metod
kriokonserwacji gamet męskich tego gatunku.”**

Podstawą formalną recenzji jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 10 października 2023 r. Promotorami przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej są: **Prof. dr hab. Wojciech Niżański** Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu oraz **Prof. dr hab. Wanda Olech-Piasecka**, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Rozprawę doktorską Pani lek. wet Marii Eberhardt, stanowią według załączonej dokumentacji, trzy wskazane przez Doktorantkę, monotematyczne, oryginalne prace, które zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych indeksowanych przez *Journal Citation Report* o *Impact Factor* od 2,6 do 4,6. Łączna suma punktów MNiSzW przedstawionych prac wynosi: 280 pkt. Jedna z prac opublikowana została w *BMC Vet Res* (2022), druga w *Sci Rep* (2023), natomiast trzecia praca w formie preprintu na platformie *bioRxiv* (2023). We wszystkich trzech pracach Doktorantka jest pierwszym autorem.

Podjęta przez Doktorantkę problematyka badawcza oparta została na czterech hipotezach badawczych, a mianowicie: możliwości kriokonserwacji nasienia Żubrów

pozyskanego post mortem z najądrzy poza sezonem rozrodczym. Wykorzystanie odpowiedniego rozrzedzalnika na bazie buforu Tris i żółtka jaja kurzego. Selekcję plemników w odpowiednim gradiencie (Percoll®) na uzyskanie lepszej przeżywalności plemników po rozmrożeniu. A także wykonanie testu wiązania plemników z osłonką przejrzystą oocytu w kontekście oceny jakości plemników. Na podstawie opisanych hipotez badawczych Doktorantka dokładnie określiła cel badań, a mianowicie ustalenie efektywnego protokołu postępowania z plemnikami najądrzowymi żubra w kontekście doskonalenia procedur stosowanych w banku materiału genetycznego tego gatunku.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska Pani lek. wet Marii Eberhardt przygotowana została bardzo starannie i podzielona na dwie części. Pierwsza część pracy liczy łącznie 88 ponumerowanych stron wydruku komputerowego i składa się z wykazu skrótów, wstępu, celu pracy, opisu materiału i metod, wyników, wniosków, piśmiennictwa (127 pozycji) oraz streszczenia w języku angielskim. Druga część pracy zawiera kopie trzech tematycznie oryginalnych prac, które stanowią logiczną całość w aspekcie wybranej w dysertacji tematyki badawczej.

Problem naukowy, jego sformułowanie i aktualność podjętego zagadnienia naukowego

Praca doktorska Pani lek. wet Marii Eberhardt dotyczy oceny i zdolności do kriokonserwacji nasienia żubrów pozyskiwanego pośmiertnie. Należy w tym miejscu przypomnieć, że żubry w Polsce podlegają ścisłej ochronie. Co więcej, są one również nieodzownym elementem polskiego krajobrazu i historii tego gatunków w naszym kraju. Polska jest przodującym państwem w restytucji i ochronie tego gatunku nie mniej jednak wiele aspektów dotyczących jego rozrodu nie zostało dotychczas w pełni poznanych. Powstające na całym świecie banki materiału genetycznego zagrożonych gatunków w tym żubrów skupiają się obecnie nad wykorzystaniem najnowszych technik wspomaganego rozrodu (ART.) w kriokonserwacji plemników pobranych od padłych bądź poddanych eliminacji osobników. Uważa się, że stworzenie dobrej jakości rezerwy genetycznej chronionych gatunków pozwoli na utrzymanie zagrożonych wyginięciem populacji zwierząt chronionych. Aby jednak wdrożyć odpowiednio skuteczne metody wspomaganego rozrodu w tworzeniu banku materiału genetycznego w postaci plemników niezbędne jest dokładne przebadanie możliwości pobrania

materiału, jego oceny oraz wypracowanie odpowiedniej metodyki w celu jego konserwacji i przechowywania.

Doktorantka w mojej ocenie zrealizowała w pełni wszystkie postawione w dysertacji zadania badawcze a na szczególną uwagę zasługuje przygotowanie i opracowanie odpowiedniego protokołu postępowania z plemnikami najądrzowymi żubra przeznaczonych do kriokonserwacji w ramach doskonalenia procedur stosowanych w banku plemników tego gatunku. Dodatkowo należy podkreślić iż Doktorantka w swoich badaniach wykorzystwała najnowsze techniki badawcze co świadczy o Jej profesjonalizmie i dobrym merytorycznym przygotowaniu. Na uwagę zasługuje fakt iż badania zostały wykonane na dość licznej grupie żubrów i tak: liczba osobników w I zadaniu badawczym to 27 szt., w II 20 szt., III 4 szt. i w IV 1 szt. co w mojej ocenie w zupełności zapewnia wiarygodność otrzymanych wyników a przeprowadzone analizy statystyczne uzyskanych wyników są adekwatne do zamierzonego celu badań.

Wyniki badań Doktorantka opublikowała w formie trzech oryginalnych artykułów naukowych. W pierwszej publikacji pt. **The morphology, morphometry and functionality of fresh and cryopreserved wisent (*Bison bonasus*) epididymial spermatozoa** Doktorantka opisuje parametry nasienia pozyskanego z najądrzy żubrów w postaci ogólnej liczby plemników, żywotności, ruchliwości, budowy morfologicznej oraz integralności błony komórkowej i porównuje je do takich samych parametrów u bydła i bizonów. Badania pokazały, że koncentracja, ruchliwość i żywotność plemników była niższa niż u bydła. W ocenie recenzenta ważnym elementem badań była ocena cech funkcjonalno-strukturalnych plemników najądrzowych żubra gdzie Doktorantka używając wysublimowanych technik badawczych wykazała, że plemniki z najądrzy żubrów charakteryzowały się niższym odsetkiem plemników z nienaruszoną błoną komórkową oraz prawidłowym akrosomem w porównaniu z próbkami pozyskanymi od bydła. W dalszej części pracy Doktorantka skupiła się na przygotowaniu nasienia do kriokonserwacji a następnie do jego oceny po rozmrożeniu. Do przygotowania nasienia do mrożenia wykorzystany został rozrzedzalnik na bazie buforu Tris i żółtka jaja kurzego. Po rozmrożeniu nasienia badania wykazały obniżony odsetek plemników z

nienaruszoną błoną komórkową oraz z obniżoną ruchliwością. Należy tutaj podkreślić, że użyty do kriokonserwacji rozrzedzalnik okazał się dobrym wyborem.

W drugiej publikacji pt. **The influence of Percoll® density gradient centrifugation before cryopreservation on the quality of frozen wisent (*Bison bonasus*) epididymal spermatozoa** Doktorantka skupiła się na wykorzystaniu gradientu gęstości Percoll® w celu poprawy jakości nasienia poprzez usunięcie uszkodzonych i martwych plemników jak i niepotrzebnych komórek. Ta popularna metoda wykorzystywana była nie tak dawno jeszcze w procedurach in vitro u człowieka, lecz została wycofana ze względu na podejrzenie toksyczności w stosunku do gamet męskich. Natomiast znalazła ona zastosowanie w medycynie weterynaryjnej odnośnie procedur stosowanych w technikach wspomaganego rozrodu u bydła. W badaniach swych Doktorantka wykazała, że metoda wirowania nasienia najadrzowego żubrów w gradiencie Percoll® pozwoliło na uzyskanie lepszej jakości plemników w postaci wyższego odsetka ruchliwości zarówno przed jak i po rozmrożeniu oraz niższego odsetka plemników z wadami morfologicznymi. Można zatem z całą pewnością stwierdzić, że metoda ta jest jak najbardziej wskazana do przygotowywania nasienia żubrów do mrożenia i powinna się znaleźć w protokole metodycznym u tego gatunku zwierząt.

Ostatnia publikacja wchodząca w zakres dysertacji doktorskiej pt. **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** dotyczy zdolności przechowywanych po kriokonserwacji plemników najadrzowych żubra do zapłodnienia komórki jajowej. Wprowadzony przez Doktorantkę test wiązania plemnika z osłonką przejrzystą oocytu (ZBA) miał za zadanie określić czy plemniki poddane kriokonserwacji mogą być wykorzystane do sztucznej inseminacji czy tylko w procedurach in vitro. Wiązanie plemnika z komórką jajową odbywa się poprzez połączenie receptorów na błonie komórkowej plemnika z glikoproteinami osłonki przejrzystej. Dlatego też metoda ta pozwala na ocenę plemników pod kątem zaburzeń struktury błony komórkowej, niewykrywalnych w rutynowych procedurach analizy jakości nasienia. Zastosowany przez Doktorantkę protokół ZBA, z wykorzystaniem oocytów bydlęcych okazał się odpowiedni do oceny plemników żubra pozyskanych pośmiertnie z najądrzy. Na szczególną uwagę zasługuje

fakt, że zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupach badanych pomimo że jakość plemników po rozmrożeniu była niska to doszło do połączenia się plemników ze wszystkim badanymi oocytami. Przy okazji Doktorantka wykazała, że użyty do kriokonserwacji rozrzedzalnik na bazie buforu Tris, żółtka jaja kurzego i glicerolu okazał się lepszy w teście ZBA w porównaniu do komercyjnego rozrzedzalnika o nazwie Andromed®. Dodatkowo wprowadzenie testu ZBA do protokołu oceny plemników najądrzowych żubra umożliwia zweryfikowanie zdolności zapłodnieniowej badanych gamet i podjęcie decyzji o ich dalszym przeznaczeniu w technikach wspomaganego rozrodu. Ponadto zastosowanie takiego testu, poprzez pominięcie etapu z wykorzystaniem prób biologicznych, umożliwia ocenę gamet bez wykorzystania cennego dla ochrony gatunku materiału.

Podsumowanie

W niniejszej pracy przedstawione zostały wyniki badań nad właściwościami in vitro oraz zdolnością zapładniającą plemników żubra. Podjęta tematyka miała na celu scharakteryzowanie oraz ustalenie efektywnego protokołu postępowania z plemnikami pozyskanymi z najądrzy żubra w ramach doskonalenia procedur stosowanych w banku plemników tego gatunku. W mojej opinii jako recenzenta wyniki przedstawione w dysertacji doktorskiej Pani lek. wet. Marii Eberhardt są bardzo interesujące, mają charakter poznawczy zarówno pod względem naukowym jak i praktycznym. Badania wnoszą znaczący wkład w dziedzinie andrologia i rozród zwierząt, a w szczególności zwierząt dzikich zagrożonych wyginięciem. Praca kończy się postawieniem pięciu zasadniczych wniosków, które wynikają z przeprowadzonych badań i które wzbogacają dotychczasową wiedzę z zakresu wykorzystania technik wspomaganego rozrodu u żubrów. Jestem przekonany, że z tej wiedzy z pewnością skorzystają nie tylko lekarze weterynarii ale także pracownicy naukowcy którzy na co dzień zajmują się problemami związanymi z rozrodem zwierząt dziko żyjących.

Oceniając pracę doktorską lek. wet. Marii Eberhardt nie mam znaczących krytycznych uwag z wyjątkiem drobnych błędów stylistycznych i literowych.

Wniosek końcowy

Podsumowując ocenianą przeze mnie rozprawę doktorską pt. „**Badania nad właściwościami in vitro oraz zdolnością zapładniającą plemników Żubra (Bison Bonasus) w aspekcie doskonalenia metod kriokonserwacji gamet męskich tego gatunku.**” autorstwa Pani lek. wet Marii Eberhardt oceniam wysoce pozytywnie. Przedłożona praca jest bardzo wartościowa ze względu na aktualność tematu badawczego oraz praktyczny aspekt podjętego przez Doktorantkę zagadnienia. Jasno przedstawione cele pracy zostały w pełni zrealizowane.

Przedstawiona przez Panią lek. wet. Marie Eberhardt rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.) i wnioskuje do Wysockiej Rady Dyscypliny Weterynaria UP we Wrocławiu o dopuszczenie Kandydatki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 2023-12-04

Prof. dr hab. Leszek Krakowski

KIEROWNIK
Zakładu Andrologii i Biotechnologii Rozrodu

prof. dr hab. Leszek Krakowski

Na Rady Dyscypliny