

Szczecin, 18 stycznia 2019 r.

dr hab. Barbara Błaszczyk
Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Zachodniopomorskie Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Ocena rozprawy doktorskiej

mgr inż. Katarzyny Poniedziałek-Kempny

pt.: „Wpływ zmodyfikowanych warunków dojrzewania *in vitro* oocytów oraz jakości i sposobu przygotowania nasienia knura na pozaustrojowe zapłodnienie u świń”

wykonanej

w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki

Państwowego Instytutu Badawczego w Krakowie

pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Gajdy

i promotora pomocniczego dr Moniki Trzcńskiej

Ocena wyboru i znaczenia podjętej tematyki badawczej

Tematyka podjęta w przedstawionej do oceny pracy doktorskiej jest w pełni uzasadniona zarówno od strony naukowej, jak i aplikacyjnej. Uzyskanie prawidłowych zarodków świni w warunkach pozaustrojowych pozwala nie tylko na większe wykorzystanie potencjału rozrodczego świń, ale przede wszystkim ma ogromne znaczenie w biomedycynie. Uzyskanie w wyniku dojrzewania pozaustrojowego dojrzałych i kompetentnych oocytów jest kluczowym, ale nie jedynym elementem w procedurze pozaustrojowej hodowli zarodków. Istotne znaczenie ma także właściwa jakość i przygotowanie nasienia. W przypadku świń, dużym problemem jest wysoka częstotliwość zapłodnień polispermicznych i niski odsetek zarodków osiagających stadium blastocysty o zadowalającej jakości. Przyczyną tego zjawiska może być zbyt niski postęp w opracowaniu właściwej metody przygotowania i kapacytacji plemników knura, jak również zaburzony przebieg dojrzewania oocytów w warunkach pozaustrojowych. Dlatego też szereg badaczy stawia sobie za cel opracowanie optymalnego medium do dojrzewania oocytów świni i najwłaściwszego sposobu przygotowania plemników. Badania powyższych problemów prowadzone są w wielu ośrodkach naukowych, w tym również w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki

w Balicach. W tym nurcie badawczym mieści się także praca doktorska mgr Katarzyny Poniedziałek-Kempny.

Ocena merytoryczna pracy

WSTĘP

We „Wstępie”, stanowiącym wprowadzenie do problematyki badawczej, Autorka w pierwszej kolejności przedstawiła aktualny stan wiedzy z zakresu dojrzewania *in vitro* oocytów ze szczególnym uwzględnieniem oocytów świńskich. W sposób syntetyczny opisała procesy, jakie zachodzą w czasie dojrzewania oocytów w warunkach fizjologicznych, a następnie wskazała na istotne czynniki mające znaczenie w dojrzewaniu oocytów w warunkach pozaustrojowych. Doktorantka opisała między innymi wpływ kwasu hialuronowego i wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na rozwój oocytów i zarodków (czynników, które wykorzystała w pracy do modyfikacji warunków dojrzewania oocytów *in vitro*). Autorka w dojrzewaniu pozaustrojowym oocytów świńskich rozważa również udział tymozyny. Podała przykłady korzystnego działania tego hormonu w wielu procesach życiowych, wskazując, że zostało ono stwierdzone tylko w komórkach somatycznych. Nie do końca można się z tym zgodzić, gdyż istnieją prace wskazujące na udział tymozyny w mejotycznym dojrzewaniu oocytów bydłowych (np. praca Salhab i wsp. 2010:Thymosins β -4 and β -10 are expressed in bovine ovarian follicles and upregulated in cumulus cells during meiotic maturation). Ponadto tytuł podrozdziału (1.1.3.2.), który brzmi „Tymozyna jako suplement pożywki do dojrzewania oocytów świni” nie jest adekwatny do zawartej w nim treści.

Kolejne rozdziały „Wstępu” są opisem procesów zachodzących podczas dojrzewania plemników, zwłaszcza podczas kapacytacji, które warunkują prawidłowy przebieg reakcji akrosomalnej i zapłodnienia w warunkach fizjologicznych i pozaustrojowych. Doktorantka poruszyła też bardzo istotny problem, jakim jest zapłodnienie polispermiczne, a także szczegółowo scharakteryzowała czynniki wpływające na efektywność zapłodnienia *in vitro* u świni.

W dalszej części opracowania Autorka podała informacje dotyczące jakości nasienia knura, możliwości jego przechowywania i oceny.

„Wstęp” kończy przegląd aktualnej wiedzy na temat warunków hodowli *in vitro* zarodków świńskich. Autorka wskazała na osiągnięcia, ale też poruszyła ważne problemy w zakresie pozaustrojowej hodowli zarodków świńskich.

Oceniając tę część pracy stwierdzam, że dokonany przegląd piśmiennictwa mimo pewnych niedociągnięć wprowadza czytelnika w obszar stanowiący zakres pracy i uzasadnia celowość prowadzenia badań.

CEL PRACY

Głównym celem pracy była modyfikacja warunków hodowli *in vitro* niedojrzałych oocytów świni oraz ustalenie parametrów jakości nasienia knura po kapacytacji mogących mieć wpływ na prawidłowe zapłodnienie *in vitro* u świni.

Dla realizacji tego celu Autorka zaplanowała realizację 7 celów szczegółowych.

Cel pracy jest bardzo ambitny, a jego realizacja wymagała ogromnej pracy i nie była łatwa.

W mojej ocenie, pierwsza część celu głównego dotyczącego modyfikacji warunków dojrzewania oocytów *in vitro* jest jak najbardziej prawidłowa, natomiast sformułowanie drugiej części celu, dotyczącego jakości nasienia knura, może być dyskusyjne. Aczkolwiek zamierzenia wyznaczone w celach szczegółowych są jasno ukierunkowane i właściwie sformułowane.

MATERIAŁ I METODY

Rozdział „Materiał i metody” zawiera opis stosowanych metod badawczych, a także opis każdego z zaplanowanych doświadczeń.

Ze względu na bardzo szeroki zakres prowadzonych prac Doktorantka musiała wykazać się opanowaniem wielu technik badawczych związanych z pozyskiwaniem oocytów, ich selekcją, zakładaniem hodowli oocytów i zarodków, przeprowadzeniem kapacytacji i oceną nasienia. Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie w badaniach metod na poziomie molekularnym pozwalających na ocenę zmian apoptycznych w plemnikach i zarodkach. Analiza statystyczna została wykonana prawidłowo z zastosowaniem właściwych testów.

Metodyka badań nie budzi zastrzeżeń, chociaż w przedstawionym opracowaniu metodycznym brakuje dość ważnych informacji.

- Przede wszystkim każda opisana metoda badawcza powinna być poparta odpowiednią pozycją piśmiennictwa, chyba że jest to opracowanie własne (powinno to być zaznaczone). Dotyczy to między innymi oceny morfologicznej oocytów i poddawania oocytów działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego.
- Nie jasnym jest także, który etap procedury związanej z kapacytacją plemników jest zmodyfikowany przez Autorkę (Autorka w rozdziale „Wyniki” wnioskuje, że „...opracowana metoda kapacytacji *in vitro* nasienia...”str. 63).
- Brakuje informacji dotyczących stężeń poszczególnych składników pożywki, np. NCSU-23 (str. 34).

- Nie wiadomo też, jakie stężenie tymozyny lub kwasu hialuronowego zastosowano w modyfikacji własnej pożywek. Autorka podaje tylko, że oocyty hodowano w pożywce z dodatkiem 0,5 mg tymozyny lub kwasu hialuronowego oraz z dodatkiem 1 mg tymozyny lub kwasu hialuronowego. Brak również informacji uzasadniających dobór zastosowanych w pracy stężeń powyższych składników w suplementacji pożywek. Szkoda, że w tej części opracowania Autorka nie podała konkretnej nazwy handlowej i numeru katalogowego zastosowanych suplementów. Jest to ważna informacja wskazująca, jaki typ tymozyny użyto do doświadczeń, czy był to hormon specyficzny gatunkowo.
- Zamieszczony schemat doświadczeń (str. 37) nie za bardzo jest czytelny. Według tego schematu można się spodziewać, że oocyty z każdej grupy badawczej były poddawane zapłodnieniu pozaustrojowemu plemnikami każdej grupy doświadczalnej.
- Niedociągnięciem jest także brak potwierdzenia, że badania związane z transferem zarodków prowadzono w oparciu o zgodę Lokalnej Komisji Etycznej (jestem przekonana, że Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki takie pozwolenie posiada).
- Brak jest wzmianki o tym, jakiego aparatu użyto do diagnostyki ultrasonograficznej.

WYNIKI

Uzyskane wyniki zostały umieszczone w tabelach lub na wykresach i w sposób przejrzysty i zwięzły zostały przez Autorkę opisane. Rozdział ten został podzielony na kilka części, z której każda przedstawia rezultaty kolejnego doświadczenia. Jednocześnie przedstawione wyniki stanowią wzajemnie uzupełniającą się dokumentację. W dokumentacji tej znajdują się także wartościowe fotografie obrazów mikroskopowych badanych oocytów i zarodków.

W tej części opracowania, Autorka nie uniknęła jednak pewnych niedociągnięć.

- Nie ma potrzeby powtarzania wyników umieszczonych w tabelach (konkretnych wartości) w ich opisie.
- Niezbyt precyzyjne są określenia, np: cyt.: „oocyty dojrzałe w pożywce....”, „...w blastocystach, uzyskanych z niedojrzałych oocytów poddanych...”. Lepiej byłoby zastosować sformułowanie – oocyty, które dojrzewały w pożywce, albo oocyty hodowane w pożywce, czy oocyty, które przed dojrzewaniem *in vitro* poddawano działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. Z pewnością są to pewnego rodzaju skróty myślowe, które jednak mogą wprowadzić w błąd czytelnika i mogą sugerować, że zapładniano niedojrzałe oocyty.

- W tabeli 8, litery oznaczające różnice statystyczne powinny być umieszczone po odchyleniu standardowym.
- Nasuwa się również pytanie, czy na uzyskane wyniki mogły mieć wpływ różnice międzyrasowe, czy wiek knurów.

DYSKUSJA

Dyskusja została przeprowadzona wieloetapowo zgodnie z zaplanowanymi założeniami i uzyskanymi wynikami. Ten rozdział, Autorka przygotowała bardzo kompetentnie i w sposób merytoryczny przeprowadziła dyskusję z wynikami innych autorów.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Zwieńczeniem pracy jest rozdział „Posumowanie i wnioski”. W sposób wyczerpujący weryfikują one przyjęte cele pracy i mają pełne uzasadnienie w przeprowadzonych doświadczeniach. Za najbardziej wartościowe osiągnięcie w pracy uważam zastosowanie dodatku tymozyny do modyfikacji pożywki do dojrzewania oocytów świni *in vitro*. Modyfikacja ta pozwoliła uzyskać imponujący odsetek blastocyst, z których część kontynuowała dalszy rozwój embrionalny i płodowy w warunkach fizjologicznych.

Ocena formalna pracy

Strona formalna pracy nie budzi zastrzeżeń. Recenzowana praca liczy ogółem 81 stron w układzie typowym dla tego typu prac. Część doświadczalną poprzedza streszczenie (w języku polskim i angielskim) i dwudziestostronicowe wprowadzenie. Wykorzystane w pracy piśmiennictwo obejmuje 206 pozycji; w większości są to aktualne pozycje obcojęzyczne. Na podkreślenie zasługuje staranny wykaz pozycji piśmiennictwa.

Praca napisana jest starannym językiem, właściwym dla prac naukowych. Co prawda występuje w niej kilka uchybień stylistycznych, drobnych nieścisłości i dwuznaczności stwierdzeń.

Z obowiązku recenzenta muszę wymienić zauważone błędy czy niezręczności edytorskie:

- Podrozdziały od 1.1.3.1 do 1.1.3.3 nie są ujęte w spisie treści.
- Skrót niektórych hormonów, czynników itd. nie są wyjaśnione w tekście (takie wyjaśnienie powinno się znajdować w miejscu, w którym po raz pierwszy się je wymienia) (np. str. 14).
- Zamiast określenia „komórki T” powinno być limfocyty T.
- Skrót eCG (str. 31) nie oznacza gonadotropiny żrebnych klaczy, ale końską gonadotropinę kosmówkową.

- Niekiedy Autorka (w części doświadczalnej pracy) używa określeń: „nasze wyniki, zrobiliśmy, uzyskaliśmy, w uzyskanych przez nas wynikach, wyższy od naszych”. W moim odczuciu powinno być: uzyskane wyniki, wykonano, zrobiono, wyższy niż w niniejszej pracy itd.

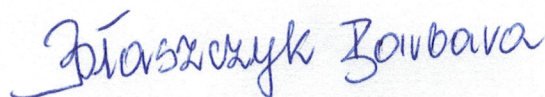
Reasumując, zwracam się z prośbą do Autorki rozprawy doktorskiej o ustosunkowanie się do wszystkich moich uwag i wątpliwości zawartych w całej recenzji.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawione uwagi nie obniżają merytorycznej wartości pracy, na którą składa się dobrze opracowany przegląd piśmiennictwa, przemyślany, dobrze zaplanowany i zrealizowany cykl doświadczeń, a przede wszystkim prawidłowo zweryfikowane wnioski o priorytetowym znaczeniu dla badań nad pozaustrojową hodowlą zarodków świńskich.

W związku z powyższym stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr inż. Katarzyny Poniedziałek-Kempny pt.: „Wpływ zmodyfikowanych warunków dojrzewania *in vitro* oocytów oraz jakości i sposobu przygotowania nasienia knura na pozaustrojowe zapłodnienie u świń” odpowiada warunkom określonym w artykule 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku: o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 z 2003 r., poz. 595, z póź. Zm).

W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie Pani mgr Katarzyny Poniedziałek-Kempny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



dr hab. Barbara Błaszczyk