

Wojciech Nizański

Wrocław 15.02.2019

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

UP Wrocław

Sz. Pan dr hab. Jacek Walczak

Zastępca Dyrektora ds. Nauki

Instytutu Zootechniki

Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach

Niniejszym przedkładam recenzję pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Poniedziałek-Kempny zrealizowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Gajdy, promotor pomocniczy dr Monika Trzcńska. Moja ocena pracy jest wysoce pozytywna.

Z poważaniem

Wojciech Nizański

Prof. dr hab. Wojciech Nizański
Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
UP we Wrocławiu

Wrocław, 11.02.2019 r.

Ocena

pracy 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 świni”
wykonanej w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki

BIP

pod kierunkiem: prof. dr hab. Barbary Gajdy

promotor pomocniczy dr Monika Trzcńska

Pozauustrojowa produkcja zarodków u świń jest przedmiotem zainteresowania środowiska naukowego zajmującego się naukami biologicznymi i biomedycznymi. Pomimo prowadzenia badań w zakresie technik wspomaganego rozrodu u świń, jak dotychczas nie opracowano optymalnych warunków hodowli oocytów i zarodków w warunkach *in vitro* u tego gatunku zwierząt. Osiągane wyniki w zakresie dojrzewania gamet i zapłodnienia w warunkach pozaustrojowych są wciąż niezadowalające. Największymi problemami obniżającymi wydajność stosowanych biotechnik są u tego gatunku: jakość oocytów po dojrzewaniu w warunkach *in vitro*, jakość nasienia po kapacytacji, sam proces zapłodnienia pozaustrojowego, zjawisko polispermii oraz relatywnie niska jakość uzyskanych *in vitro* zarodków.

Biorąc powyższe pod uwagę, podjęcie badań nad optymalizacją procedur dojrzewania i zapłodnienia *in vitro* w ramach prowadzonej pracy doktorskiej jest jak najbardziej uzasadnione, trafia w zapotrzebowanie środowiska naukowego oraz stanowi interesujące wyzwanie. Ze względu na fakt, iż podjęta tematyka znajduje się w polu zainteresowania ośrodków reprezentujących nauki biomedyczne, potencjał publikacyjny i aplikacyjny pracy jest duży.

Praca Doktorantki znajduje się w głównym nurcie realizowanych przez wiele lat kierunków badawczych w wiodącym w skali międzynarodowej ośrodku zajmującym się biotechnikami rozrodu – w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki BIP, w ramach uznanego zespołu naukowego prof. dr hab. Barbary Gajdy.

Podstawą formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej mgr inż. Katarzyny Poniedziałek-Kempny jest uchwała Rady Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego podjęta na 210 posiedzeniu w dniu 22 listopada 2018 r.

Przedstawiona rozprawa doktorska jest monografią i liczy 82 strony. Została zrealizowana w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji Instytutu Zootechniki BIP pod kierunkiem prof. dr hab. Barbary Gajdy. Promotorem pomocniczym jest dr Monika Trzcńska.

Praca składa się ze spisu treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, celu i zakresu badań, materiału i metod, opisu schematu i układu doświadczeń, omówienia uzyskanych wyników, dyskusji, podsumowania i wniosków, spisu tabel, rycin, fotografii i wykazu piśmiennictwa. Na ostatniej stronie zamieszczona jest informacja, że praca została wykonana w ramach działalności polegającej na prowadzeniu działań naukowych lub prac rozwojowych oraz zadań z nim związanych, służących rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich pt. "Uwarunkowania indywidualnej zdolności do prawidłowego zapłodnienia *in vitro* nasienia knura" oraz Funduszu Badań Własnych IZ PIB pt. "Określenie potencjału rozwojowego *in vitro* i *in vivo* zarodków świni uzyskanych z oocytów dojrzałych w obecności tymozyny".

Doktorantka w streszczeniu zredagowanym w języku polskim i angielskim opisała zwięźle i jasno przeprowadzone eksperymenty oraz scharakteryzowała uzyskane wyniki. Streszczenia napisane są w obu przypadkach poprawnym językiem naukowym.

We wstępie pracy Doktorantka przedstawia stan wiedzy dotyczący technik wspomagania rozrodu u gatunku będącego przedmiotem opracowania. Opisuje uwarunkowania dojrzewania oocytów w warunkach *in vitro* oraz zagadnienia związane z kryteriami selekcji oocytów do hodowli. Następnie Doktorantka przedstawia niezwykle ciekawe opracowanie czynników wpływających na dojrzewanie *in vitro* oocytów świni, w tym modyfikacji mediów poprzez dodatek surowicy bydlęcej, płynu pęcherzykowego, kwasu hialuronowego, hormonów i tymozyny. Przytacza także dane na temat możliwości optymalizacji warunków tej hodowli poprzez zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego. W dalszej kolejności Doktorantka opisuje warunki kapacytacji *in vitro* plemników knura, zagadnienia związane z reakcją akrosomalną i standardowym zapłodnieniem pozaustrojowym. Opisuje też zjawisko zapłodnienia polispermicznego, do którego u omawianego gatunku dochodzi relatywnie często.

W następnych podrozdziałach Autorka opisuje czynniki dotyczące samca, wpływające na efektywność zapłodnienia *in vitro* oocytów świni, w tym wiek i rasę knura oraz porę roku. Wstęp zawiera także opis metod oceny jakości nasienia, technik rozrzedzania i jego konserwacji, fizjologicznej roli osocza nasienia oraz jego wpływu na

właściwości plemników i narząd płciowy samicy. Niezwykle ciekawą częścią omawianego rozdziału jest część wstępu dotycząca metod optymalizowania warunków *in vitro* hodowli zarodków świni np. w zakresie zmniejszania stężenia tlenu, zastępowania białek zwierzęcych białkami roślinnymi - PP czy SSS - Synthetic Serum Substitute, dodatku antyoksydantów - witaminy E, regulatorów metabolizmu - fenazy lub innych substancji typu glicyna, laminaryna czy sorbitol.

Na zakończenie przeglądu piśmiennictwa Autorka przytacza dane świadczące o tym, że w pracach dotyczących omawianej tematyki odsetek blasycyst w hodowli pozaustrojowej nie przekracza zwykle 50% a jakość zarodków uzyskiwanych w warunkach *in vitro* jest zdecydowanie gorsza od uzyskanych w warunkach *in vivo*.

Wstęp jest bardzo dobrym opracowaniem przedstawiającym najważniejsze dane dotyczące zaawansowanych technik wspomaganie rozrodu u świń. Jest też doskonałym opisem zjawisk fizjologicznych dotyczących czynności reprodukcyjnych świń oraz przeglądem literatury dotyczącej procedur *in vitro* prowadzonych u tego gatunku do etapu uzyskania blasycysty.

Przegląd piśmiennictwa zredagowany jest dobrym, przejrzystym językiem naukowym. Napisany jest jasno, co świadczy o dużej znajomości tematu przez Autorkę. Tekst czyta się łatwo. Jest on bardzo dobrym wprowadzeniem do opisu doświadczenia. Wstęp pracy jest na tyle interesującym i całościowym opracowaniem stanu wiedzy na temat technik wspomaganie rozrodu u świń, że należałoby się zastanowić nad jego publikacją w formie pracy przeglądowej w renomowanym czasopiśmie naukowym. Godne podkreślenia jest, że Autorka porusza się swobodnie w opisywanych zagadnieniach, co potwierdza doskonałą znajomość piśmiennictwa.

Nadrzędnym 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. Cel ten był osiągnięty poprzez realizację 7 celów szczegółowych, w tym: 1) Określenie wpływu tymozyny na dojrzewanie *in vitro* oocytów oraz na zapłodnienie *in vitro*; 2) Określenie wpływu kwasu hialuronowego na dojrzewanie *in vitro* oocytów oraz na zapłodnienie *in vitro*; 3) Ocenę wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na dojrzewanie *in vitro* oocytów oraz na zapłodnienie *in vitro*; 4) Ocenę jakości oraz podatności na kapacytację nasienia ejakulowanego, najądrzowego i pozbawionego osocza; 5) Ocenę efektywności zapłodnienia poprzez określenie odsetka dzielących się zarodków oraz uzyskanych morul i

blastocyst; 6) Ocena jakości blastocyst uzyskanych po zapłodnieniu *in vitro*; 7) Ocena rozwoju *in vivo* zarodków świni uzyskanych po zapłodnieniu *in vitro*.

Badania prowadzono na oocytach pochodzących od loszek po uboju dwoma metodami: aspiracyjną oraz poprzez nacinanie powierzchni jajnika. Oocyty poddawano ocenie morfologicznej, klasyfikowano do jednej z czterech grup jakościowych a do badań przeznaczano te zaklasyfikowane do grupy 1 i 2 tzn. oocyty o prawidłowej morfologii. Dojrzewanie oocytów następowało przez 42-44 godziny w zmodyfikowanym medium opartym na TCM-199 (Tissue Culture Medium) uzupełnionym FCS, płynem pęcherzykowym oraz cysteiną. Część niedojrzałych oocytów poddawano przed hodowlą działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego 200 bar przez okres 60 min w specjalnej komorze. Dojrzałe oocyty po ocenie morfologicznej i usunięciu chemicznym i mechanicznym komórek wzgórka jajonośnego poddawano zapłodnieniu *in vitro*. Nasienie wykorzystane w badaniach pochodziło od knurów 2 ras (pbz, wbp) i mieszańców (duroc x pietrain, Maxter, Hypor) w wieku 9 miesięcy do 3,5 lat. Nasienie po pobraniu poddawano rozrzedzeniu rozrzedzalnikiem Biosolwens, transportowano do laboratorium oraz poddawano ocenie CASA przy zastosowaniu systemu SCA z uwzględnieniem najważniejszych właściwości ruchowych plemników. W części badań dotyczących nasienia pozbawionego plazmy, przeprowadzono delikatne wirowanie ejakulatu i odrzucanie osocza nasienia. W badaniu wykorzystano także nasienie najądrzowe, pozyskiwane po uboju knurów różnych ras, w różnym wieku. Nasienie aspirowano z ogonów najądrzy przy pomocy pipety automatycznej i rozrzedzano rozrzedzalnikiem Biosolwens.

Zmiany apoptotyczne plemników oceniano za pomocą barwienia fluorescencyjnego YO-PRO-1/PI w mikroskopie fluorescencyjnym. Kapacytację plemników indukowano w zmodyfikowanym medium mM199, przy inkubacji plemników 1 godzinę w temperaturze 39°C.

Zapłodnienie *in vitro* prowadzono metodą standardową w kroplach w pożywce opartej na mM-199 przy koinkubacji z plemnikami o koncentracji 1 mln/ml. Hodowlę zarodków do stadium blastocysty prowadzono w pożywce NCSU-23 przygotowywanej w laboratorium. Potencjalne zygoty poddawano ocenie morfologicznej co 24 godziny w mikroskopie stereoskopowym. Oceniano liczbę dzielących się morul i blastocyst. Apoptozę w blastocystach poddawano ocenie na podstawie analizy liczby jąder apoptotycznych - z zauważalną fragmentacją DNA identyfikowaną przy zastosowaniu barwienia TUNEL. Ocenie poddawano również całkowitą liczbę komórek w blastocystach po zabarwieniu ich

za pomocą DAPI.

Badania zostały uzupełnione transferem zarodków przeprowadzonym u 6-cio miesięcznych loszek o masie ciała 90 kg. Po synchronizacji cyklu jajnikowego zarodki otrzymane po hodowli oocytów z dodatkiem tymozyny i zarodki grupy kontrolnej były wprowadzane metodą chirurgiczną do narządu płciowego 2 dni po rui samic.

Do analizy statystycznej zastosowano test χ^2 , a przy analizie danych parametrycznych test t-Studenta oraz analizę wariancji. Zastosowano również test LSM najmniejszych średnich kwadratów.

Dobór zastosowanych metod badawczych oraz metod oceny materiału należy uznać za trafny. Badania są niezwykle komplementarne i wzajemnie się uzupełniają. Autorka zajmuje się bowiem postępowaniem z nasieniem i poddaje je ocenie za pomocą bardzo zaawansowanych metod. Przeprowadza również procedury dojrzewania oocytów i poddaje wszechstronnej ocenie ich rozwój. Wreszcie przeprowadza procedurę zapłodnienia pozaustrojowego oraz hodowli zarodków, poddając je kolejny raz zaawansowanym metodom oceny. Wreszcie, aby w sposób konsekwentny i całościowy zamknąć projekt, przeprowadza próby biologiczne polegające na transferze uzyskanych zarodków. Było to zadanie ambitne, ale niezwykle podwyższyło wartość pracy, bowiem udany embriotransfer dowodzi jednoznacznie trafności dobranych metod hodowli w warunkach pozaustrojowych.

Reasumując, metodyka jest adekwatna do prowadzonych badań i należy ją uznać za atut pracy. Godne podkreślenia jest opanowanie bogatego warsztatu metodycznego przez Autorkę. Praca wymagała doskonałych umiejętności embriologa i androloga i nie byłaby możliwa do przeprowadzenia bez konsekwencji i pracowitości Doktorantki. Należy dodać, że w dobrze dobranej metodyce widać też rękę promotorów prowadzących Doktorantkę, która jest dobrą kontynuatorką uznanej i renomowanej szkoły biotechnik rozrodu w Balicach.

Rodział "Materiał i metody" uzupełniono o czytelny schemat prowadzonych doświadczeń i szczegółowy opis siedmiu doświadczeń zawartych w pracy a dotyczących oceny wpływu tymozyny, kwasu hialuronowego oraz wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na dojrzewanie i zapłodnienie *in vitro*, oceny jakości nasienia, podatności na kapacytację i przydatności do zapłodnienia *in vitro* nasienia najądrzowego, ejakulowanego i pozbawionego osocza, oceny jakości blastocyst uzyskanych w wyniku zapłodnienia pozaustrojowego trzema wspomnianymi rodzajami nasienia oraz oceny

wyników próby biologicznej polegającej na przeprowadzeniu embriotransferu.

Omówienie wyników zostało przeprowadzone przez Autorkę bardzo czytelnie i jest zilustrowane dodatkowo fotografiami, wykresami i tabelami. Rozdział ten w sumie zawiera 5 fotografii, 11 tabel i 3 ryciny. Autorka szczegółowo opisuje wyniki uzyskane w każdym z kolejnych doświadczeń wskazując, jakie warunki hodowli w warunkach pozaustrojowych wpływają na właściwości oocytów, plemników i na potencjał rozwojowy zarodków. Doktorantka opisała również pozytywne wyniki embriotransferu wykonanego u samic, u których rozwinęła się ciąża zakończona urodzeniem kolejno 6 i 10 prosiąt. Rozdział ten napisany jest bardzo poprawnym naukowo a jednocześnie łatwym w odbiorze językiem. Tekst jest starannie podzielony na podrozdziały i logicznie posegregowany, a kolejność prezentowanych wyników jest przejrzysta i zrozumiała. Wykresy są poprawnie skonstruowane.

Rozdział „Dyskusja” został podzielony przez Autorkę na podrozdziały przyporządkowane kolejnym celom pracy. W tym rozdziale Doktorantka stara się pogłębić opis wyników oraz komentuje je, tłumaczy i konfrontuje z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów. Oceniam ten rozdział pozytywnie. Jest logicznie i mądrze napisany. Autorka porusza się niewytkle swobodnie w cytowanej literaturze. Stara się wyłumaczyć w sposób logiczny odkryte zależności, w tym dlaczego tymozyna wpłynęła pozytywnie na uzyskane wyniki i dlaczego nie zanotowano wpływu podwyższonego ciśnienia hydrostatycznego oraz hialuronidazy na uzyskane rezultaty. Ciekawa jest również część traktująca o zależności pomiędzy czynnością plemników a obecnością osocza nasienia.

W podsumowaniu i wnioskach Autorka syntetycznie przedstawia uzyskane wyniki badań. Zastosowana modyfikacja warunków dojrzewania oocytów świni polegająca na suplementacji pożywki do hodowli hormonem grasicy- tymozyną umożliwiła uzyskanie wysokiego odestka oocytów dojrzałych, wyższego w stosunku do kontroli. Blastocysty świni uzyskane w wyniku zapłodnienia *in vitro* oocytów hodowanych z dodatkiem tymozyny cechowały się wyższą jakością w stosunku do blastocyst hodowanych bez tego dodatku. Oocyty świni dojrzewające z dodatkiem kwasu hialuronowego i bez tego dodatku rozwijały się na podobnym poziomie. Działanie wysokim ciśnieniem hydrostatycznym nie wpłynęło pozytywnie zarówno na dojrzewające oocyty jak i na rozwijające się zarodki świni. Nasienie knura, niezależnie od rodzaju (ejakulowane i najądrzowe), charakteryzowało się podobną podatnością na kapacytację *in vitro*. Usuwanie osocza z nasienia knura nie wpłynęło korzystnie na jego zdolność do kapacytacji, jak również do zapłodnienia *in vitro*. Przeprowadzone badania potwierdziły konieczność ostrej selekcji knurów, których nasienie

jest przeznaczone do zapłodnienia pozaustrojowego. Blastocysty świni uzyskane w wyniku zapłodnienia *in vitro* nasieniem ejakulowanym cechowały się najwyższą jakością. Opracowana metoda dojrzewania *in vitro* oocytów świni z dodatkiem tymozyny pozwoliła na uzyskanie kompetentnych oocytów, zdolnych do zapłodnienia i rozwoju zarodkowego, a także doprowadziła do uzyskania potomstwa.

Opis prac stanowiących rozprawę doktorską uzupełniony jest o spis tabel, rycin, fotografii i 206 pozycji piśmiennictwa.

Do szczególnych walorów przedłożonej pracy zaliczam:

1. Interesującą tematykę badań mieszczącą się w polu szczególnego zainteresowania ośrodków zajmujących się naukami biomedycznymi.
2. Dobrze zaprojektowane doświadczenie i ciekawy, przejrzysty oraz komplementarny schemat wzajemnie uzupełniających się badań. Zaawansowana i nowoczesna metodyka prac.
3. Rzetelny warsztat naukowy Doktorantki, zaawansowane metody hodowli *in vitro* oraz oceny gamet i zarodków
4. Uzupełnienie badań o próby biologiczne.
5. Niezwykła drobiazgowość badań. Doktorantka zrealizowała ogrom pracy, który powinien teraz zaowocować publikacjami.
6. Bardzo dobrze zredagowany tekst pracy, co sprawia, że opracowanie czyta się z łatwością. Bardzo dobrze napisany i interesujący rozdział „Wstęp” i „Dyskusja”. Zdolność do syntetycznego i zrozumiałego opisu trudnych zależności i umiejętność prowadzenia dyskusji naukowej.

Na rozważenie natomiast zasługują następujące zagadnienia:

1. Autorka w kilku miejscach pisze o wartościach mniejszych i większych z komentarzem, że nie wykazano różnic istotnych statystycznie. Unikałbym tego rodzaju sformułowań. Sugeruję użycie określeń typu „tendencje, trend” itp.
2. Nie doszukałem się kryteriów doboru wartości ciśnienia hydrostatycznego lub dlaczego zastosowano określone stężenie kwasu hialuronowego. Nie ma też w tym zakresie wskazania pozycji piśmiennictwa, na które powoływałaby się Autorka.
3. Nie znalazłem analizy statystycznej wpływu knura na uzyskane właściwości plemników. Taka analiza mogłaby nieco wzbogacić wyniki i dodać elementy przydatne w dyskusji. Pozwoliłaby przeanalizować, czy na uzyskane wyniki wpływały

wyłącznie zastosowane procedury, czy może również różnice osobnicze i czy nie maskowało to do pewnego stopnia uzyskanych zależności.

4. W dyskusji sugerowałbym dodać, że wirowanie nasienia w celu odrzucenia osocza mogło w pewien sposób wpłynąć na uzyskane wyniki, poprzez potencjalny wpływ negatywny na właściwości plemników. Innych rodzajów nasienia bowiem nie wirowano.
5. Nie znalazłem dokładnego opisu metodyki aspiracji nasienia z najądrzy. Czy pipetą nakłuwano najądrze, czy przecinano je uprzednio skalpelem, czy preparowano tkankę łączną i naczynia krwionośne.
6. Zrezygnowałbym z wniosku mówiącego o tym, że badania potwierdziły konieczność ostrej selekcji knurów, jako iż wniosek ten jest bardzo ogólny i nie wynika bezpośrednio z prowadzonych badań.

Powyższe uwagi są jedynie formą konstruktywnych sugestii wyrażonych z obowiązku recenzenta. Całość pracy odbieram bowiem niezwykle pozytywnie i uważam, że jest to przykład doktoratu pełnego i dopracowanego, gdzie na próżno szukać słabych punktów. Z drugiej strony wyrażone wcześniej drobne uwagi i sugestie nie wpływają w żadnym razie na wartość merytoryczną pracy, mają charakter porządkowy i są formą konstruktywnych uwag i komentarzy zainspirowanych pracą doktorską w sytuacji dostrzegania jej wartości.

Podsumowując, pracę doktorską mgr inż. Katarzyny Poniedziałek-Kempny oceniam bardzo pozytywnie. Praca została solidnie zaplanowana, zrealizowana i wnosi nowe dane w specjalność „rozmród zwierząt”. Praca posiada wartość poznawczą i duży potencjał aplikacyjny. Doktorantka udowodniła, że posiada duże umiejętności w posługiwaniu się warsztatem naukowym.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Katarzyny Poniedziałek-Kempny odpowiada w pełni wymogom stawianym dysertacjom na stopień naukowy doktora, określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm.).

W oparciu o przedłożoną ocenę przedkładam wniosek Radzie Naukowej Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr inż. Katarzyny Poniedziałek-Kempny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę warsztat metodyczny Doktorantki oraz wkład przedstawionych wyników badań w rozwój reprezentowanej dyscypliny składam wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Wojciech Nizański

