

Prof. dr hab. Jan Udała
Katedra Biotechnologii Rozrodu Zwierząt
i Higieny Środowiska
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Alicji Mizery pt. „Optymalizacja środowiska przechowywania nasienia buhajów” wykonanej w Zakładzie Hodowli Bydła i Produkcji Mleka Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Mariana Kuczaja i dr Jarosława Jędraszczyka, jako promotora pomocniczego

Osiągnięty postęp genetyczny w hodowli bydła w okresie ostatniego półwiecza to efekt pracy hodowców i wdrożonych programów hodowlanych, opartych między innymi na wykorzystaniu inseminacji krów nasieniem najlepszych buhajów. Szerokie zastosowanie tej biotechniki było możliwe dzięki przypadkowemu użyciu glicerolu do konserwacji nasienia przez Polge'a i Rowsona, opracowaniu następnie przez nich w 1951 roku techniki konserwacji nasienia w temperaturze zestalonego CO₂, a później w temperaturze ciekłego azotu. Sprzyjał temu zapewne fakt dużej podatności nasienia buhajów, w porównaniu z samcami innych gatunków zwierząt, na proces konserwacji w niskich temperaturach. Stąd też wynika szerokie zastosowanie inseminacji w hodowli bydła. Obecnie na świecie inseminowanych jest około 75% krów. W naszym kraju natomiast ponad 85% .

Wprowadzenie nowych technik opartych na komputerowo sterowanym procesie schładzania i zamrażania nasienia znacznie poprawiło efektywność jego konserwacji, pozwalając na przyjęcie obowiązującego kryterium minimum 50% plemników o ruchu postępowym po rozmrożeniu próby. Nadal jednak duża część plemników nie przeżywa tego procesu, stąd też potrzeba doskonalenia metod konserwacji nasienia. Podstawowe znaczenie w tym względzie wydaje się mieć stworzenie odpowiedniego środowiska dla plemników na etapie przygotowania ich do procesu mrożenia. W tym też kierunku zmiernają badania Autorki niniejszej pracy, która postanowiła do komercyjnie stosowanych rozcieńczalników dodać wybrane składniki przed mrożeniem nasienia, a następnie określić jego jakość po rozmrożeniu, za pomocą nowych metod z zakresu diagnostyki andrologicznej.

Dostęp do materiału badawczego w ramach współpracy z Małopolskim Centrum Biotechniki Sp. z o.o. w Krasnem umożliwił Autorce niniejszej pracy przeprowadzenie interesujących badań o znaczeniu poznawczym i praktycznym, których efekty zamieściła w przedłożonej rozprawie. Dysertacja ta została opracowana na podstawie trzech oryginalnych prac twórczych spójnych tematycznie przyjętych do opublikowania w czasopismach naukowych znajdujących się w bazie Journal Citation Report: *Medycyna Weterynaryjna* (2018 IF = 0,197), *Animal Biotechnology* (2018, IF = 0,928) i *Italian Journal of Animal Science* (2018, IF = 0,990). Czasopisma te w wykazie czasopism naukowy MNiSW posiadają odpowiednio 15, 20 i 25 pkt. We wszystkich trzech publikacjach Doktorantka jest pierwszym autorem. Swój udział w ujęciu wskaźnikowym we wszystkich pracach szacuje na 70%, co potwierdzili w stosownych oświadczeniach pozostali współautorzy. Wskazuje to na Jej duże zaangażowanie w cały proces powstania i wydania publikacji. Udział ten polegał na opracowaniu koncepcji doświadczenia, jego przeprowadzeniu, zbieraniu i analizowaniu danych, analizie statystycznej wyników oraz przygotowaniu manuskryptu i opracowaniu redakcyjnym pracy. Pełnienie głównej roli w procesie powstawania prac świadczy o posiadanych zdolnościach organizacyjnych przez Doktorantkę i umiejętnościach współpracy z innymi Członkami Zespołu, co jest bardzo pozytywną cechą, zważywszy znaczenie wspólnie podejmowanych działań w twórczej działalności naukowej.

Przyjęta forma przygotowania dysertacji na podstawie opublikowanych już prac naukowych w uznanych czasopismach, ułatwia w znacznym stopniu wykonanie zadania postawionego przed recenzentem w zakresie merytorycznej oceny pracy. Prace te bowiem uzyskały pozytywne opinie niezależnych ekspertów związanych z daną problematyką co świadczy o ich rzetelności i dużej wartości naukowej. Rola oceniającego powinna więc skupiać się bardziej na ocenie komplementarności i spójności prac, ich znaczenia dla rozwoju wiedzy w danym kierunku oraz polemice z Autorką na temat uzyskanych wyników.

Powyższe wyniki zamieszczone w trzech publikacjach Autorka zaprezentowała w pracy przygotowanej według obowiązujących wymogów dla tego typu opracowań naukowych. W pracy tej poza załączonymi publikacjami i oświadczeniami zawarła następujące rozdziały: streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cel pracy, hipotezy badawcze, dyskusja, konkluzja, literatura. Na początku pracy zamieszczono wykaz stosowanych skrótów.

We wstępie, będącym zarazem przeglądem literatury, Autorka po krótkim przedstawieniu zalet inseminacji omawia metody przechowywania plemników buhaja.

W pierwszej kolejności, nawiązuje do problemów związanych z przechowywaniem plemników w stanie płynnym. Wymienia i omawia główne składniki stosowane do konserwacji nasienia oraz opracowane na ich podstawie wybrane rozcieńczalniki. Podobnie czyni w odniesieniu do przechowywania plemników w stanie mrożonym, podkreślając znaczenie dodania do nasienia glicerolu przez Polge'a i Rowsona. Opierając się na pionierskich pracach tych oraz innych autorów z połowy lat ubiegłego wieku Doktorantka zwraca uwagę na główne trudności związane z kriokonserwacją nasienia, wskazując na poczynania mające na celu zwiększenie efektywności przeżywania plemników w procesie ich mrożenia/rozmrażania. Mając na względzie własne badania jeden podrozdział poświęca modyfikacją składu rozcieńczalników, wyróżniając 4 grupy stosowanych do nich dodatków, tzn. suplementy o działaniu antyoksydacyjnym, poprawiające żywotność plemników, wpływające pozytywnie na ruchliwość plemników oraz takie, które charakteryzują się potencjalną ochroną DNA plemników przed uszkodzeniem. Dodatki te można charakteryzować w różny sposób, przyjmując różne kryteria. Przyjęty podział na grupy jest poprawny, niemniej jednak dobrze byłoby wyjaśnić, dlaczego Autorka przedstawiła taki podział dodatków do rozcieńczalników? Co było myślą przewodnią do jego przyjęcia?

W wyróżnionych czterech podrozdziałach Doktorantka przedstawiła wybrane dodatki stosowane przez badaczy w celu poprawy efektów konserwacji nasienia buhajów i samców innych gatunków zwierząt. Charakteryzując związki o działaniu antyoksydacyjnym, w krótkiej i przystępnej formie wyjaśniła oddziaływanie reaktywnych form tlenu na plemniki i niektóre możliwości ograniczenia ich wpływu negatywnego. Opierając się na wykonanych badaniach w ostatnich latach, wskazała także na możliwość uzupełnienia rozcieńczalników i poprawę jakości konserwowanego nasienia poprzez zastosowanie dodatków pochodzenia naturalnego i syntetycznego. Ważnym było podkreślenie w ostatnim podrozdziale, znaczenia oceny integralności DNA plemników, nie tylko w kontekście jej wpływu na jakość nasienia ale także możliwymi jej powiązaniem z wyznacznikami przebiegu ciąży oraz cechami funkcjonalnymi potomstwa. Tym samym wskazuje na potrzebę wdrażania do praktyki andrologicznej nowych metod badawczych pozwalających lepiej poznać strukturę i funkcje plemnika.

Przedstawiony rozdział, w krótkiej ale treściwej i przystępnej formie jest dobrze dokonany przegląd literatury, zwłaszcza w odniesieniu do możliwości doskonalenia metod konserwacji nasienia. Autorka wykorzystala zarówno starsze jak i aktualne materiały źródłowe, odpowiednio je zinterpretowała, wskazała na złożoność problemu i potrzebę kontynuacji prac w podjętym temacie. Świadczy to o znajomości przez Nią problematyki

badawczej i posiadanych umiejętnościach analizy, interpretacji wyników badań i wyciągania na ich podstawie wniosków.

Mając na uwadze poruszone zagadnienia we wstępie, Autorka stawia sobie za cel optymalizację środowiska przechowywania nasienia w stanie płynnym lub mrożonym. Czyni to poprzez dodatek do komercyjnie stosowanego rozcieńczalnika kobalaminy (wit. B₁₂), octanu busereliny (analog GnRH) ekstraktu ze Spiruliny (wyciąg z alg).

W przyjętych hipotezach badawczych zakłada pozytywny wpływ powyższych dodatków na określone wskaźniki charakteryzujące jakość nasienia konserwowanego w stanie płynnym bądź też mrożonym.

Z zastosowanymi metodami badawczymi i osiągniętymi wynikami czytelnik może się zapoznać analizując trzy prace wymienione na początku niniejszej opinii. Do wyników tych Doktorantka odnosi się także w zamieszczonym rozdziale dyskusja.

Jak zaznaczyłem wcześniej, od strony merytorycznej, w tym doboru materiału i metod badawczych, praca była poddana już ocenie. Należy jednak podkreślić trafność doboru tych metod i wskazać na posiadane możliwości wykonania specjalistycznych badań z zakresu diagnostyki andrologicznej. Należy także podkreślić, że badania te wykonano przy współpracy z Małopolskim Centrum Biotechniki Sp z o.o. w Krasnem w warunkach produkcyjnych i stosowanego w tym Zakładzie procesu technologicznego. Ewentualne więc zweryfikowanie czy też wdrożenie uzyskanych wyników nie powinno stwarzać problemów. Należy także podkreślić, że bez tej współpracy wykonanie powyższej pracy byłoby raczej niemożliwe. Jest to wzorcowy przykład współpracy między nauką i praktyką. Na bazie dociekań naukowych Zespół realizujący badania uzyskał wyniki, które mogą być wykorzystane w praktyce hodowlanej.

Wyniki te potwierdzają osiągnięcie w pełni celów badawczych i potwierdzają hipotezy, jakie w pracy założono, gdyż:

1. Wskazano na pozytywny wpływ witaminy B₁₂ na jakość kriokonserwowanego nasienia buhaja oraz ustalono optymalną dawkę tej witaminy jaką należy dodać do rozcieńczalnika.
2. Wykazano korzystne oddziaływanie octanu busereliny na kształtowanie się ocenianych wskaźników ruchu i żywotności plemników przechowywanych w stanie płynnym oraz określono dawkę tego analogu GnRH jaką należy dodać do rozcieńczalnika.

3. Stwierdzono pozytywny wpływ ekstraktu ze *Spiruliny maxima* na ruchliwość, żywotność, stopień defragmentacji DNA oraz ochronę antyoksydacyjną kriokonserwowanych plemników buhaja.

Otrzymane wyniki Autorka omawia w następnym rozdziale dyskusja, porównuje je z pracami innych badaczy, przedstawia własne spostrzeżenia i poglądy w niektórych kwestiach. Wyniki omawia dla poszczególnej pracy oddzielnie, podsumowując je za każdym razem. Podsumowania te są w formie wniosków i szkoda, że nie wyróżniono takiego rozdziału w pracy. Można było umieścić go po rozdziale dyskusja.

Ogólnie, opracowanie omawianego rozdziału dyskusja świadczy o dobrej znajomości tematu przez Doktorantkę. W rozdziale tym poprawnie zinterpretowała uzyskane wyniki na tle osiągnięć innych badaczy, wskazując zarazem na potrzebę kontynuacji badań nad doskonaleniem metod konserwacji nasienia. Trafny dobór pozycji piśmiennictwa, swobodny sposób interpretacji wyników i wybór najważniejszych wątków do dyskusji, świadczy o rozeznaniu Autorki w aktualnych trendach badawczych, dostrzeganiu znaczenia realizowanych prac dla praktyki oraz chęci rozwijania swoich zainteresowań naukowych.

Analizując jednak wyniki przedstawione w tabeli 1 i rycinie 1 (praca w *Animal Biotechnology*) oraz podane wyniki w dyskusji (str. 24) można zauważyć niezgodność prezentowanych danych. Zamieszczone wyniki w tabeli 1 są najprawdopodobniej błędnie podane, gdyż wartości średnie dla ruchu postępowego w grupie kontrolnej są niemal dwukrotnie mniejsze niż w pozostałych grupach.

W pracy tej w rozdziale materiał i metody podano, że do badań przeznaczano ejakulatory o ruchliwości i żywotności plemników powyżej 60%. W pierwszej pracy (*Medycyna Weterynaryjna*) przyjęte kryteria dla tych wskaźników wynosiły odpowiednio 80% dla ruchliwości i 60% dla żywotności, a w trzeciej pracy (*Italian Journal of Animal Science*) odpowiednio 70% i 60%. Z czego wynikało to zróżnicowanie? Przyjętym bowiem powszechnie kryterium w zakładach unasienniania zwierząt kwalifikującym ejakulatory do dalszego użycia jest minimum 70% plemników o ruchu postępowym.

Praca, stanowiąca podsumowanie wyników zamieszczonych w trzech oryginalnych pracach twórczych, napisana jest generalnie poprawnym językiem pod względem stylistycznym i gramatycznym. Autorka w przystępnej i zrozumiałej formie we wstępie wprowadziła czytelnika w istotę problemu, jasno sformułowała cel i hipotezy badawcze, a uzyskane wyniki poddała rzeczowej dyskusji. Wnioski, które w zasadzie są sformułowane w rozdziale dyskusja, zawarto również w rozdziale konkluzja, będącym podsumowaniem

pracy. Na jej końcu zamieszczono literaturę, w której zamieszczono 165 pozycji piśmiennictwa, niemal wyłącznie w języku angielskim.

Mając na uwadze zawarte w rozdziale konkluzja zdanie o możliwości zastosowania kombinacji użytych w badaniach dodatków do rozcieńczalników, chciałbym poznać opinię Autorki, czy zamierza w przyszłości dokonać tego i jakie ewentualnie mogą wynikać z tego implikacje.

Nasuwa mi się też pytanie, dlaczego w przypadku octanu busereliny ograniczono się do nasienia przechowywanego w stanie płynnym? Czy nie warto byłoby sprawdzić również wpływ dodatku tego analogu GnRH do rozcieńczalnika na jakość kriokonserwowanego nasienia, podobnie jak w przypadku dwóch pozostałych dodatków?

Po przeczytaniu pracy mam kilka uwag i sugestii odnośnie użytych sformułowań i zwrotów:

- Autorka używa zwrotu sztuczna inseminacja. Zwrot taki jest podawany w niektórych słownikach czy też encyklopediach, niemniej w fachowych podręcznikach i powszechnym użyciu stosuje się raczej sztuczne unasiennianie lub inseminacja;
- w pracy używany jest zwrot rozrzedzalnik mleczny. Sugeruję używanie rozcieńczalnik mlekowy;
- na str. 10 (6g) jest rozcieńczeniach – powinno być rozcieńczalnikach;
- na str. 5 i in. jest simmentalskiej – powinno być simentalskiej;
- na str. 12 (6d) i in. jest nasienia bydłęcego – powinno używać się raczej nasienia buhaja;
- str. 23 (ostatnie zdanie) – zdanie niezrozumiałe;

Powyższe uwagi nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, a Autorka może wziąć je pod uwagę przy pisaniu kolejnych prac naukowych.

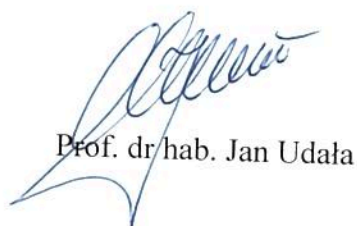
Wniosek końcowy

Przygotowana rozprawa doktorska ma zarówno znaczenie poznawcze jak i aplikacyjne. Na podkreślenie zasługuje wykonanie badań w warunkach produkcyjnych oraz zastosowanie nowych metod oceny nasienia. Wykorzystane metody badawcze, które pozwoliły Doktorantce uzyskać interesujące wyniki, a na ich podstawie przygotować trzy oryginalne prace twórcze, zebrała i w przystępny sposób objaśniła w maszynopisie. Wyniki te przedstawiła na tle osiągnięć innych badaczy, sugerując potrzebę realizacji dalszych badań w obranym kierunku. Świadczy to o dobrym rozeznaniu w aktualnych trendach badawczych, posiadanej wiedzy i kompetencjach naukowych. Autorka w pełni wykonała postawione zadania, osiągnęła postawione cele i potwierdziła przyjęte hipotezy. Praca

niewątpliwie wnosi nowe wartości i przyczynia się do rozwoju badań w uprawianej dyscyplinie

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Alicji Mizery pt. „Optymalizacja środowiska przechowywania nasienia buhajów odpowiada wymaganiom określonym w Ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. z 2017r., poz. 1789). Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Biologii i Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie mgr inż. Alicji Mizery do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Szczecin, 4 października 2018 roku



Prof. dr hab. Jan Udała