

O c e n a
rozprawy doktorskiej mgr Ewy Kwity
pt. „Ocena funkcjonalnych i strukturalnych zmian plemników knura podczas
przechowywania nasienia w stanie płynnym z uwzględnieniem polimorfizmu
genów CD9, DAZL, ESR2 i PIWIL4 oraz grupy genetycznej”

Inseminacja należy do najstarszych biotechnik stosowanych w rozrodzie zwierząt. Jej znaczenie wynika z licznych korzyści o charakterze hodowlanym i produkcyjnym. Pierwsze próby usługowego unasienniania świń podjęto w Polsce w latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia. Inseminacja świń w Polsce ma więc już blisko sześćdziesięcioletnią historię, a jej skala jest obecnie duża. Udział inseminacji w masowym rozrodzie tego gatunku przekracza 50%, co przesądza o jej dużym znaczeniu praktycznym. Ejakulatory pobierane od knurów inseminacyjnych wykazują dużą zmienność w zakresie parametrów fizycznych i cech jakościowych, co utrudnia efektywne wykorzystanie nasienia. Zmienność ejakulatu determinowana jest czynnikami genetycznymi takimi jak: rasa, wariant krzyżowania czy linia genetyczna oraz czynnikami poza genetycznymi. Niedocenianym źródłem zmienności są też indywidualne predyspozycje knurów. Istnieją knury szczególnie predysponowane do użytkowania inseminacyjnego, których ejakulatory są podatne na działanie środków konserwujących, wykazują małą wrażliwość na negatywne czynniki działające w trakcie obróbki i obrotu nasienia, a ich plemniki przez długi czas po rozcieńczeniu zachowują zdolność do zapłodnienia. Zdarzają się też rozplodniki, wytwarzające nasienie o dużej wrażliwości na działanie czynników związanych z rozcieńczaniem i konserwacją, co w praktyce wyklucza je z użytkowania inseminacyjnego. Celem przedstawionej do oceny pracy było

określenie zmian strukturalno-funkcjonalnych plemników przechowywanych w stanie płynnym z uwzględnieniem polimorfizmu wybranych genów oraz rasy lub grupy genetycznej. Praca ta wpisuje się w nurt badań zmierzających do poszukiwania skutecznych metod zwiększania wydajności i poprawy efektywności inseminacyjnego wykorzystania nasienia knurów. Tematykę pracy uznaję za aktualną i ważną, a uzyskanie w niej wyniki mogą mieć duże znaczenie zarówno poznawcze jak również utylitarne.

Zaprezentowana do oceny praca to obszerne dzieło, zredagowane na 116 stronach, które zawiera 32 tabele i jeden rysunek, przedstawiający elektroforegramy poszczególnych genotypów analizowanych SNP. Elementami pracy są rozdziały: wprowadzenie, przegląd piśmiennictwa, cel pracy i hipoteza badawcza, materiał i metody, analiza statystyczna, wyniki i dyskusja, spostrzeżenia i wnioski oraz piśmiennictwo, który zawiera alfabetyczny wykaz źródeł wykorzystanych w pracy. Do rozprawy dołączono streszczenie oraz słowa kluczowe w językach polskim i angielskim, wykaz skrótów używanych w pracy oraz spis tabel i rycin. Układ i struktura rozdziałów, ich kolejność i formy nie budzą zastrzeżeń. Są one typowe dla rozpraw naukowych i adekwatne do tematyki oraz charakteru ocenianej rozprawy. Można by się wprawdzie zastanawiać dlaczego autorka opis metod analizy statystycznej umieściła w odrębnym rozdziale (Analiza statystyczna), poza rozdziałem „Materiał i metody”. Nie ma to jednak merytorycznego znaczenia.

W części początkowej autorka zamieściła dość duże, 3-stronicowe wprowadzenie, które wprowadza czytelnika w tematykę pracy. Wprowadzenie dobrze uzasadnia celowość podejmowanych badań.

Obszerny, zredagowany na 19 stronach przegląd piśmiennictwa, podzielono na 3 podrozdziały: ocena nasienia knurów, konserwacja nasienia knurów i genetyczne uwarunkowania jakości nasienia. W części pierwszej, obejmującej zagadnienia oceny nasienia knurów, autorka omówiła tradycyjne metody oceny nasienia i inne metody oceny nasienia knurów. W części tej szczególnie dużo miejsca poświęciła ona komputerowo wspomaganą analizę nasienia (CASA), co wcale nie dziwi zważywszy, że określanie parametrów ruchu plemników

z wykorzystaniem komputerowo wspomaganej analizy obrazu było jednym z ważniejszych narzędzi wykorzystanych w badaniach. Opisała też ona nowoczesne metody oceny integralności błony komórkowej i potencjału mitochondrialnego plemników oraz stopnia uszkodzeń akrosomu i aktywności enzymów. Zwróciła uwagę na oddziaływanie czynników pozagenetycznych na cechy nasienia knurów, takich jak: wiek, żywienie i system utrzymania samca czy pora roku, w której pobierane jest nasienie.

W części związanej z konserwacją nasienia knurów autorka wskazała na ograniczone znaczenie kriokonserwacji jako metody konserwacji nasienia knurów i skupiła się na dominującej w praktyce metodzie, opartej na konfekcjonowaniu nasienia w stanie płynnym. Słusznie zauważyła, że przy tej metodzie konserwacji podstawowym problemem jest zachowanie na odpowiednim poziomie ruchliwości oraz integralności błony komórkowej plemników, co utrudnia utrzymanie zdolności zapładniającej plemników w przechowywanych porcjach inseminacyjnych. Wątek ten łączy się bezpośrednio z badaniami doktorantki, która określała procent plemników o ruchu postępowym na stoliku Błoma, ruchliwość plemników (system CASA), integralność błony komórkowej i aktywność mitochondriów, oraz integralność akrosomów plemników w 1., 3., 5. i 7. dniu przechowywania nasienia. Doktorantka dokonała też przeglądu genów kandydujących związanych z ważniejszymi cechami nasienia i opisała metody badania polimorfizmu tych genów, w kontekście diagnostyki przydatności nasienia do inseminacji.

W rozprawie wykorzystano łącznie 200 pozycji piśmiennictwa, z których znakomitą większość (około 75%) stanowią oryginalne prace naukowe, opublikowane w języku angielskim, w czasopismach o zasięgu światowym, a pozostałą część głównie także oryginalne pozycje napisane w języku polskim. Wszystkie pozycje piśmiennictwa, wykorzystane w rozprawie, zostały bardzo starannie i prawidłowo zestawione, z podaniem pełnych danych bibliograficznych, w rozdziale „Piśmiennictwo”, umieszczonym na końcu rozprawy. Piśmiennictwo zostało dobrze dobrane i prawidłowo wykorzystane w rozprawie w części wstępnej i w przeglądzie piśmiennictwa jak również w dyskusji wyników prowadzonej

w rozdziale „Wyniki i dyskusja”. Autorka umiejętnie posługuje się informacjami zaczerpniętymi z piśmiennictwa, opisując stan badań, przytaczając poglądy i podając ważniejsze wyniki. Mgr Ewa Kwita wykazuje tym samym wiedzę z obszaru zagadnień ściśle związanych z przedmiotem rozprawy i dokumentuje, że spełnia jeden z podstawowych warunków stawianych kandydatom do uzyskania stopnia doktora, który mówi że rozprawa doktorska powinna „wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata (doktoranta) w danej dyscyplinie naukowej” (art. 13.1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym...).

Jako główny cel pracy doktorantka przyjęła: określenie zmian strukturalno-funkcjonalnych plemników przechowywanych w stanie płynnym z uwzględnieniem polimorfizmu genów *CD9*, *DAZL*, *ESR2*, i *PIWIL4* oraz grupy genetycznej knurów.

Autorka sformułowała także 3 cele szczegółowe:

1. Określenie związków między polimorfizmem genów *CD9*, *DAZL*, *ESR2* i *PIWIL4* a wybranymi wskaźnikami jakości konserwowanego nasienia z uwzględnieniem grupy genetycznej badanych zwierząt.
2. Określenie zmian w poszczególnych parametrach ruchu plemników konserwowanych w stanie płynnym w kolejnych dniach przechowywania nasienia przy pomocy komputerowo wspomaganego analizy (CASA) oraz tradycyjnej metody oceny ruchliwości nasienia.
3. Określenie zmian w integralności błony komórkowej i akrosomu oraz mitochondrialnego potencjału transbłonowego w czasie przechowywania nasienia przy pomocy testów fluorescencyjnych.

Sformułowała też hipotezę badawczą, z której wynika, że w obrębie występujących form polimorficznych badanych genów i grup genetycznych zwierząt występują różnice w jakości nasienia ocenianego na podstawie analizowanych cech strukturalno-funkcjonalnych plemników w kolejnych dniach przechowywania nasienia.

Podstawą wnioskowania w rozprawie są wyniki badań, przeprowadzonych na 195 ejakulatach pobranych od 195 knurów, w tym: 50 knurów rasy duroc, 28 knurów mieszańców duroc × pietrain, 52 knurów rasy pbz, 34 knurów PIC oraz

31 knurów rasy wbp, w wieku od 18 do 36 miesięcy, użytkowanych w dwóch stacjach inseminacyjnych. Badania wykonywano na materiale pobieranym z porcji inseminacyjnych rozcieńczanych i konfekcjonowanych zgodnie z procedurą stosowaną w stacjach inseminacyjnych. Porcje inseminacyjne przechowywano w termoboksie, w temperaturze 16°C. Badania wykonywano w próbkach pobieranych w 1., 3., 5. i 7. dniu przechowywania nasienia.

Przeprowadzono ocenę integralności błony komórkowej oraz akrosomu plemników, stosując dwie metody oceny:

- ocena na podstawie barwienia różnicowego (barwienie eozyna – nigrozyna)
- ocena na podstawie barwienia fluorescencyjnego

Przy ocenie metodą barwienia eozyna – nigrozyna wykonano także analizę frekwencji plemników o prawidłowej morfologii i plemników zmienionych morfologicznie, wyszczególniając wady główne i podrzędne według klasyfikacji Bloma. W ocenie z wykorzystaniem barwienia fluorescencyjnego zastosowano barwienie łączone, stosując trzy fluorochromy SYBR-14 i PI oraz PNA skoniugowaną z barwnikiem Alexa Fluor 594. W obu metodach każdorazowo oceniano 200 plemników z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego (w ocenie na podstawie barwienia fluorescencyjnego także mikroskopu fluorescencyjnego).

Przeprowadzono także ocenę integralności błony komórkowej oraz aktywności mitochondriów plemników z wykorzystaniem barwienia fluorescencyjnego. Zastosowano barwienie łączone, stosując trzy fluorochromy SYBR-14 i PI oraz JC-1. W tym badaniu także każdorazowo oceniano 200 plemników z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego.

Ruchliwość plemników doktorantka oceniała przy użyciu systemu komputerowo wspomaganą analizy nasienia (CASA), wykorzystując system SCA (Sperm Class Analyzer®, Microptic S.L., Hiszpania), skonfigurowany z kamerą cyfrową i mikroskopem Nikon Eclipse E-200z, wyposażonym w podgrzewany stolik. Analizę obrazu przeprowadzono w kontraście fazowym ujemnym. Dla każdej próby nasienia oceniano wskaźniki ruchu dla co najmniej 500 plemników w 5 różnych polach widzenia.

Doktorantka przeprowadziła także identyfikację genotypów knurów, na podstawie polimorfizm genów CD9, DAZL, ESR2 oraz PIWIL4, który identyfikowano metodą PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Stosowane metody badawcze zostały szczegółowo opisane w rozdziale „Materiał i metody”. Z opisu wynika duże zaawansowanie doktorantki w stosowaniu nowoczesnych technik badawczych i zaawansowanej aparatury naukowej. Wybór narzędzi badawczych uważam za trafny oraz adekwatny do celów pracy.

Do statystycznej interpretacji wyników autorka wykorzystwała obliczenia wykonane przy zastosowaniu programu Statistica v.13.3 (StatSoft, Polska). Ocena wpływu czasu przechowywania na analizowane zmienne określała na podstawie analizy wariancji powtarzanych pomiarów dla rang Friedmana oraz testu U Manna-Whitneya dla oceny istotności różnic międzygrupowych w obrębie wariantów polimorficznych i testu Kruskala-Wallisa dla oceny istotności różnic międzygrupowych w obrębie wariantów polimorficznych oraz pomiędzy grupami genetycznymi. Występowanie wzajemnych zależności między wybranymi zmiennymi sprawdzono (dla nasienia przechowywanego przez 7 dni), określając współczynniki korelacji rang Spearmana. Analizę statystyczną doktorantka poprzedziła sprawdzeniem zgodności rozkładu zmiennych ciągłych z rozkładem normalnym, stosując test Shapiro-Wilka. Narzędzia analizy statystycznej, które doktorantka szczegółowo opisała w rozdziale „Analiza statystyczna” uznaję za prawidłowe i adekwatne do charakteru pozyskanych danych.

Zasadniczą część rozprawy stanowi rozdział „Wyniki i dyskusja”, który opisany jest na 16 stronach opracowania. W rozdziale tym, podzielonym na 4 podrozdziały (analiza miejsc polimorficznych, tradycyjna ocena mikroskopowa, wpływ czasu przechowywania na integralność błony komórkowej, stopień uszkodzenia akrosomu oraz aktywność mitochondriów plemników, wpływ czasu przechowywania na parametry ruchu plemników), autorka szczegółowo opisuje

wyniki badań, dokumentując je danymi empirycznymi zestawionymi w tabelach i na rysunku.

Jak należało się spodziewać autorce udało się udowodnić, że czas przechowywania konserwowanego nasienia knurów ma wpływ na jego jakość. Wykazała, że kolejnych dniach 7-dniowego okresu przechowywania porcji inseminacyjnych następuje istotne obniżenie: ruchliwości, integralności błony komórkowej, integralności akrosomu oraz aktywności mitochondriów plemników. Wykazała też, że jakość nasienia konfekcjonowanego, w czasie jego przechowywania zależy od rasy lub grupy genetycznej. Udowodniła, że największe wartości analizowanych wskaźników (z wyjątkiem aktywności mitochondriów), ma nasienie knurów PIC, a najmniejsze nasienie knurów rasy wbp.

Istotne znaczenie dla praktyki inseminacyjnej ma wykazanie zależności między procentowym udziałem plemników o ruchu postępowym ocenianym szacunkowo pod mikroskopem, a wskaźnikami ruchliwości plemników ocenianymi metodą obiektywną z wykorzystaniem systemu CASA oraz wskaźnikami charakteryzującymi integralność błony komórkowej i aktywność mitochondriów plemników. Potwierdza to wiarygodność i przydatność metod powszechnie wykorzystywanych w praktyce laboratoriów stacji inseminacyjnych.

Wykazała też powiązania wskaźników szacunkowej oceny mikroskopowej nasienia z polimorfizm genów DAZL i ESR2. Zasugerowała możliwość wykorzystania polimorfizmu tych genów w prognozowaniu przydatności nasienia do konserwacji w stanie płynnym.

Całość kończy rozdział „Spostrzeżenia i wnioski”. Wnioski wynikające z badań autorka sformułowała w 6 punktach. Formułując uogólnienia autorka rozprawy trzyma się faktów, a przedstawione uogólnienia mają uzasadnienie w materiale empirycznym. Są one sformułowane zwięźle, a niektóre z nich zawierają zalecenia dla praktyki inseminacyjnej.

Podsumowując część wynikową uważam, że Autorka zrealizowała założenia wynikające z tytułu rozprawy i jej celów zdefiniowanych na początku rozprawy. Wykazała się przy tym umiejętnością stosowania zaawansowanych technik

badawczych, w tym: wykorzystanie systemu CASA w analizie ruchliwości plemników, zaawansowanych technik barwienia fluorescencyjnego w analizie ciągłości błon komórkowych oraz akrosomu i potencjału błon mitochondrialnych, a także zaawansowanych technik identyfikacji genotypów, na podstawie oceny polimorfizmu genów metodą PCR–RFLP.

Z obowiązku recenzenta nadmieniam także, że niektóre sformułowania i określenia używane w pracy mogą budzić wątpliwości. Za niefortunne należy uznać na przykład określenia: „w doskonaleniu postępu genetycznego” (str 9) – to nie postęp hodowlany jest doskonalony ale populacja zwierząt oraz określenie „wartość genetyczna” – chyba chodzi o wartość hodowlaną. Za niezbyt niefortunne uważam też określenie: „selekcja hodowlana”.

Uważam też, że doprecyzowania wymagają objaśnienia do tabel 8 i 9, w których są dwie kolumny zestawiające dane dotyczące ruchu postępowego plemników. Prawdopodobnie pierwsza z tych kolumn zawiera wyniki mikroskopowej oceny nasienia świeżego przed rozcieńczeniem (?), co rutynowo wykonywane jest w stajach inseminacyjnych i stanowi kryterium zakwalifikowania ejakulatu do inseminacji (lub nie) oraz wpływa na ilość dodawanego rozcieńczalnika i liczbę wykonywanych dawek inseminacyjnych. W drugiej kolumnie są wyniki oceny nasienia „w pierwszym dniu badań”. Nasuwają się pytania: po ilu godzinach od pobrania? (w pierwszym dniu każda godzina się liczy), czy już po dodaniu rozrzedzalnika? (chyba tak - to wiele zmienia), czy także metodą mikroskopową (opis w metodyce wskazuje, że chyba raczej z wykorzystaniem systemu SCA).

Ostatnie uwagi formułuję wskazując na możliwości doprecyzowania niektórych kwestii. Nie obniżają jednak wartości merytorycznej ocenianej rozprawy.

Stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie konkretnego problemu naukowego, a jej autorka wykazała duże umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Rozprawa spełnia więc warunki stawiane kandydatom do uzyskania stopnia doktora, wynikające z art. 13.1 Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym..., który mówi że rozprawa

doktorska powinna „*stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.....*”, a kandydat do stopnia naukowego doktora nauk powinien wykazywać „*umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej...*”. **Przedstawiona do oceny rozprawa merytorycznie mieści się w obszarze dziedziny nauk: nauki rolnicze, w dyscyplinie zootechnika i rybactwo i w tym zakresie dokumentuje ona kompetencje naukowe kandydatki. Uwzględniając wartości poznawcze i użyteczne przedstawionej do oceny rozprawy oraz wynikające z niej udokumentowanie wiedzy i opanowania warsztatu naukowego przez doktorantkę stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca pt. „Ocena funkcjonalnych i strukturalnych zmian plemników knura podczas przechowywania nasienia w stanie płynnym z uwzględnieniem polimorfizmu genów CD9, DAZL, ESR2 i PIWIL4 oraz grupy genetycznej” odpowiada warunkom określonym dla rozpraw doktorskich w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki dnia z 14 marca 2003 roku, a jej autorka mgr Ewa Kwita wykazała wymagane Ustawą umiejętności. W związku z tym przedstawiam Radzie Naukowej Dyscypliny zootechnika i rybactwo Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wnioski o dopuszczenie rozprawy Pani mgr Ewa Kwita do publicznej obrony.**

Jednocześnie z uwagi na naukowe znaczenie wyników pracy, zastosowanie zaawansowanych technik badawczych, wymagających dużych umiejętności i solidnego warsztatu naukowego oraz wykazane w pracy umiejętności przejrzystego przedstawiania trudnych kwestii, stawiam wnioski o wyróżnienie ocenianej rozprawy.

Stanisław Kardaś