

Streszczenie

Celem pracy było dokonanie analizy porównawczej w składzie płynu pęcherzyków jajnikowych pomiędzy dużymi pęcherzykami przedowulacyjnymi, dominującymi oraz atretycznymi. W analizie uwzględniono hormony steroidowe (P4, E2), białko morfogenetyczne kości-15 (BMP-15), hormon folikulotropowy (FSH), glukozę, białko, mocznik, kreatyninę, kwas moczowy, składniki lipidowe i jonowe. Postanowiono też zbadać wpływ wieku krów na skład płynu pęcherzykowego oraz określić zależności pomiędzy stężeniem badanych czynników w płynie pęcherzykowym a ich stężeniem w surowicy krów.

W pracy postawiono następującą hipotezę badawczą: stężenia hormonów steroidowych, hormonu folikulotropowego, białka morfogenetycznego kości i składników biochemicznych w płynie pęcherzyków jajnikowych różni się w zależności od statusu pęcherzyka i wieku krów.

Doświadczenie wykonano na 72 krowach rasy holsztyńsko-fryzyjskiej, odmianie czarno-białej (wiek 2-18 lat). Od każdej krowy do badań pobrano poubojowo po jednym jajniku, na którym znajdował się duży pęcherzyk o średnicy od 12 do 20 mm. W uzyskanych próbkach płynu pęcherzykowego i surowicy oznaczono stężenie białka morfogenetycznego kości-15 (BMP-15), hormonu folikulotropowego (FSH), progesteronu (P4) i 17- β -estradiolu (E2). Oznaczano również kolorymetrycznie stężenie glukozy (GLU), białka całkowitego (TP), kwasu moczowego (URIC), kreatyn (CREA), mocznika (UREA), bilirubiny całkowitej (TBIL), całkowitego cholesterolu (CHOL), HDL-cholesterolu (HDL), LDL-cholesterolu (LDL), trójglicerydów (TAG), fosforu (P), wapnia (Ca), magnezu (Mg) i żelaza (Fe). Metodą potencjometryczną oznaczano stężenie sodu (Na).

W niniejszej pracy zanotowano wyższe stężenie progesteronu i niższe 17- β -estradiolu w pęcherzykach atretycznych w porównaniu do pęcherzyków przedowulacyjnych i dominujących ($P < 0.01$). Stwierdzono też różnice zależne od wieku. Dotyczyły one zarówno stężeń hormonów steroidowych w pęcherzykach, jak i surowicy. Istotne różnice wykazano także w stężeniu BMP-15 i FSH. W pęcherzykach krów najstarszych stężenie BMP-15 było istotnie wyższe niż u krów młodszych ($P < 0.01$). Ponadto w pęcherzykach atretycznych u krów najstarszych stężenie BMP-15 było istotnie wyższe niż w pęcherzykach przedowulacyjnych i dominujących ($P < 0.01$). Między stężeniem pęcherzykowego BMP-15 a wiekiem krów wykazano dodatnią korelację ($r=0,45$; $P < 0.01$). Podobną zależność stwierdzono również w stężeniu tego czynnika w surowicy. Stężenie FSH w pęcherzykach krów starszych było

istotnie wyższe niż w pęcherzykach krów młodszych, a korelacja między wiekiem a stężeniem tego hormonu była dodatnia ($r=0,62$; $P < 0.01$).

W pracy wykazano również istotne różnice w składzie biochemicznym. Różnice zależne od statusu pęcherzyka dotyczyły przede wszystkim glukozy, cholesterolu HDL oraz fosforu. Najwyższe stężenie glukozy oraz fosforu zanotowano w pęcherzykach dominujących ($P < 0.05$). Natomiast stężenie cholesterolu HDL było najwyższe w pęcherzykach atretycznych ($P < 0.05$). Ponadto wykazano zależności między stężeniem badanych składników w pęcherzykach jajnikowych a ich stężeniem surowicy oraz wiekiem krów.

Na podstawie przeprowadzonych badań, wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają hipotezę badawczą, że stężenie hormonów steroidowych, hormonu folikulotropowego, białka morfogenetycznego kości i składników biochemicznych w płynie pęcherzyków jajnikowych różni się w zależności od statusu pęcherzyka i wieku krów.

Kościuch 15.12.2020

Abstract

The study objective was a comparative analysis on the composition of ovarian follicles between large pre-ovulation, dominant and atretic follicles. The analysis included steroid hormones (P_4 , E_2), bone morphogenetic protein-15 (BMP-15), follicle-stimulating hormone (FSH), glucose, protein, urea, creatinine, uric acid, lipid and ion components. What is more, the impact of cow age on the composition of follicular fluid and the relationship between the concentration of the tested factors in follicular fluid and their concentration in cow serum were tested.

The following research hypothesis was established in the study: concentration of steroid hormone, follicle-stimulating hormone, bone morphogenetic protein and biochemical composition of follicular fluid depend on the follicle status and cow age.

The experiment was carried out on 72 Black-and-White Holstein-Friesian cows (aged 2-18). One ovary was collected from each cow after slaughter, containing a large follicle measuring 12 to 20 mm. Concentrations of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15), follicle-stimulating hormone (FSH), progesterone (P_4) and 17- β -estradiol (E_2) were determined in the obtained follicular fluid. What is more, concentrations of glucose (GLU), total protein (TP), uric acid (URIC), creatines (CREA), urea (UREA), total bilirubin (TBIL), total cholesterol (CHOL), HDL-cholesterol (HDL), LDL-cholesterol (LDL), triglycerides (TAG), phosphorus (P), calcium (Ca), magnesium (Mg) and iron (Fe) were determined via colorimetry. Sodium (Na) concentration was determined via potentiometric method.

The present study demonstrated that the higher concentration of progesterone and lower of 17- β -estradiol was demonstrated in atretic follicles compared to pre-ovulatory and dominant follicles ($P < 0.01$). Differences depending on age were also found. They concerned both follicle and serum concentrations of steroid hormones. Significant differences were also shown in the concentration of BMP-15 and FSH. In the follicles of the oldest cows, the BMP-15 concentration was significantly higher than in the younger cows ($P < 0.01$). Moreover, in atretic follicles in the oldest cows, the BMP-15 concentration was significantly higher than in pre-ovulatory and dominant follicles ($P < 0.01$). There was a positive correlation between the follicular BMP-15 concentration and the age of the cows ($r = 0.45$; $P < 0.01$). A similar relationship was also found in the concentration of this factor in the serum. The concentration of FSH in the follicles of older cows was significantly higher than in the follicles of younger

cows, and the correlation between age and concentration of this hormone was positive ($r = 0.62$; $P < 0.01$).

The study also showed significant differences in the biochemical composition. The differences depending on the status of the follicle concerned mainly glucose, HDL cholesterol and phosphorus. The highest concentration of glucose and phosphorus was recorded in the dominant follicles ($P < 0.05$). In contrast, HDL cholesterol was highest in atretic follicles ($P < 0.05$). Moreover, the relationship between the concentration of the tested components in the follicles and their serum concentration and the age of the cows was demonstrated.

On the basis of the conducted research, the results obtained in this study confirm the research hypothesis that the concentration of steroid hormones, follicle-stimulating hormone, bone morphogenetic protein and biochemical components in the ovarian follicle fluid differs depending on the status of the follicle and the age of the cows.

Mojciak 15.12.2020

prof. dr hab. Anna Korzekwa
Zakład Ochrony Bioróżnorodności
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności
Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie

Popielno, 31 marca 2021 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej magistra inżyniera Wojciecha Mościckiego
pt. „Określenie i porównanie stężeń wybranych hormonów, czynników wzrostu
i składników biochemicznych w dominujących i atretycznych pęcherzykach jajnikowych
w odniesieniu do surowicy u krów mlecznych w różnym wieku”**

wykonanej w Katedrze Biotechnologii Rozrodu Zwierząt i Higieny Środowiska na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie pod kierunkiem dr hab. inż. Barbary Błaszczuk, prof. ZUT.

Formalna ocena pracy

Wysoka wydajność reprodukcyjna jest jednym z najważniejszych aspektów produkcji zwierzęcej. W hodowli krów ras mlecznych ważny jest balans pomiędzy długością użytkowania związaną z zachowaniem satysfakcjonującej wydajności mlecznej a gotowością do zapłodnienia, a następnie utrzymania ciąży i urodzenia zdrowego potomstwa. Obecnie z pomocą przychodzą techniki wspomaganego rozrodu. Efektywna produkcja zarodków oraz embryotransfer są aktualnie głównymi celami przemysłu produkcji zwierzęcej i jednocześnie wiodącymi metodami biotechnologicznymi wpływającymi na poprawę wydajności rozrodczej bydła. Duże zróżnicowanie jakości komórek jajowych stanowi niezmiennie wyzwanie dla wydajności produkcji zarodków *in vitro* wpływając na ograniczenie ich współczynników rozwojowych. Selekcja pęcherzyków jajnikowych z których rozwiną się komórki jajowe najwyższej jakości jest kluczowa w produkcji zarodków o wysokich współczynnikach rozwojowych. Dlatego poszukiwanie właściwych markerów jakości komórek jajowych jest przedmiotem zainteresowania wielu grup badawczych. Środowisko, czyli płyn pęcherzykowy, w jakim rozwija się oocyt ma ogromne znaczenie dla jego jakości. Podjęta w niniejszej pracy doktorskiej próba porównania stężeń wybranych czynników w płynie pęcherzykowym z jajników w zależności od dojrzałości pęcherzyka i wieku krowy, jest zatem w pełni uzasadniona i wychodzi naprzeciw istniejącym potrzebom.

Rozprawa doktorska Pana mgr inż. Wojciecha Mościckiego została napisana zgodnie z ogólnie przyjętymi zasadami dla rozpraw naukowych. Dysertacja liczy 83 strony maszynopisu i zawiera rozdziały: Wykaz skrótów użytych w pracy, Wstęp, Przegląd piśmiennictwa, Cel

pracy i Hipoteza badawcza, Materiały i Metody, Wyniki, Omówienie wyników, Wnioski, Piśmiennictwo, Streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim.

Wstęp zawiera 2 strony. Doktorant przedstawił w nim informacje o długości życia i użytkowania krów w Polsce w korelacji do wydajności mlecznej i aktywności jajników. Wskazał profil rezerwy jajnikowej u krowy, a następnie podkreślił istotność znajomości składu płynu pęcherzykowego jako środowiska rozwoju oocytów.

Szesnastostronicowy rozdział Przegląd piśmiennictwa został podzielony na podrozdziały: Folikulogeneza i steroidogeneza pęcherzyka u krów, Rozwój i funkcja ciała żółtego oraz Cykl rujowy u krów. Doktorant omówił proces powstawania pęcherzyka jajnikowego i scharakteryzował typy pęcherzyków wraz z zaznaczeniem roli hormonów przysadkowych. Następnie zwrócił uwagę na syntezę steroidów podczas steroidogenezy i przeszedł do omówienia składu płynu pęcherzykowego jako produktu sekrecji komórek warstwy ziarnistej i przesączu osocza. Zauważył, że stężenia biochemicznych metabolitów w płynie pęcherzykowym mogą ulegać fluktuacjom w różnych fazach cyklu rujowego oraz etapach rozwoju poszczególnych typów pęcherzyków. Wymienił ponadto witaminy i składniki mineralne zidentyfikowane dotąd w płynie pęcherzykowym lochy i krowy. Wskazał, że atrezja pęcherzykowa odbywa się głównie przez apoptozę. W dalszej części wymienił białko morfogenetyczne kości (BMP-15), czynnik wzrostu śródbłónka naczyń (VEGF) oraz czynniki wzrostu (TGF, FGF, IGF) jako wpływające na folikulogenezę. W podrozdziale Rozwój i funkcja ciała żółtego znajdziemy informacje o luteinizacji, strukturze komórkowej, rozwoju i luteolizie ciała żółtego. Przegląd piśmiennictwa kończy się omówieniem podziału cyklu rujowego ze względu na zmiany morfologii jajnika i w behawiorze samicy oraz szczegółowego przedstawienia działania hormonów podczas rui i owulacji.

Celem pracy było określenie zależności między wybranymi składnikami w płynie pęcherzyków jajnikowych a ich stężeniem w surowicy krów z uwzględnieniem wieku zwierząt. Postawiona hipoteza badawcza zakładała, że „stężenia hormonów steroidowych, hormonu folikulotropowego, BMP-15 i składników biochemicznych w płynie pęcherzyków jajnikowych różni się w zależności od statusu pęcherzyka i wieku krów”.

Rozdział Materiały i Metody przedstawiony jest na 12 stronach. Doświadczenia przeprowadzono na 72 krowach z podziałem na trzy grupy wiekowe, a w każdej grupie wiekowej zastosowano podział na 4 podgrupy określające fazę cyklu rujowego wg powszechnie przyjętego podziału podanego przez Irelanda i wsp. (1980). Materiał badawczy stanowiła krew oraz płyn pęcherzykowy. Przedstawiono opis 19 badanych parametrów

metodami ELISA, kolorymetryczną lub potencjometryczną. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

Wyniki przedstawiono na 18 stronach jako 14 tabeli z opisem. Omówienie wyników zajęło 8 stron. Na podstawie wyników osiągniętych w pracy doktorskiej sformułowano cztery wnioski. Kolejnym rozdziałem dysertacji jest Piśmiennictwo składające się z 223 pozycji literaturowych. Dołączono ponadto Streszczenia w języku polskim i angielskim.

Ocena rozprawy doktorskiej

Całość przedstawionych wyników ujętych jako porównanie stężeń wybranych czynników w płynie pęcherzykowym i w surowicy w zależności od wieku krowy uważam za oryginalne osiągnięcie badawcze, które spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim.

Do szczególnych osiągnięć ocenianej pracy doktorskiej zaliczam wykazanie:

- Różnic w stężeniu hormonów steroidowych, FSH, BMP-15 i żelaza w płynie pęcherzykowym u krów w różnym wieku, co wskazuje, że wiek ma wpływ na skład płynu pęcherzykowego.
- Wyższego stężenia BMP-15 w pęcherzykach atretycznych niż w pęcherzykach przedowulacyjnych i dominujących, co sugeruje znaczenie tego czynnika w atrezji pęcherzykowej.
- Korelacji pomiędzy oznaczanymi parametrami w płynie pęcherzyków jajnikowych i surowicy, co potwierdza, że skład płynu pęcherzykowego zależy od składu biochemicznego krwi, a także od przemian zachodzących w pęcherzyku jajnikowym.

Uwagi, pytania oraz prośby o komentarz

1. Tytuł pracy doktorskiej powinien zostać doprecyzowany. Badane parametry były porównane nie w pęcherzykach jajnikowych, a w płynie pęcherzykowym i surowicy. Ponadto porównanie wymaga wcześniejszego określenia stężenia, zatem słowo „określenie” jest zbędne.
2. Chociaż Doktorant zamieścił Wykaz skrótów, w dalszej części pracy niestety rzadko użył zaproponowanych w wykazie skrótów.
3. Informacje we Wstępie dotyczące wieku użytkowania krów mlecznych w Polsce oraz korelacji wieku względem aktywności jajników są jak najbardziej prawidłowym wprowadzeniem w tematykę pracy doktorskiej. Zabrakło natomiast jakiegokolwiek wzmianki na temat receptywności macicy na działanie steroidów, zmian morfologii macicy wraz z wiekiem użytkowania krowy i postępujących zaburzeń funkcjonalnych, które pomimo

prawidłowej aktywności jajników mogą modyfikować przebieg funkcji rozrodczych, a nawet prowadzić do niepłodności u krów. Dopiero powiązanie prawidłowych funkcji jajników i macicy gwarantuje sukces w postaci zapłodnienia i rozwoju ciąży, porodu oraz powrotu do cykliczności.

4. Przegląd piśmiennictwa jest obszerny. Doktorant bardzo szczegółowo opisał przemiany zachodzące w jajnikach krów, uwzględnił regulacje hormonalne i zmiany zachodzące w ich strukturze podczas cyklu rujowego, co zasługuje na pochwałę i świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu teoretycznym. Niemniej jednak oczekiwałam, że w tym rozdziale znajdzie się również wyjaśnienie wyboru czynników doświadczalnych, czyli parametrów, jakie Doktorant zdecydował się określić. Wybrane parametry biochemiczne, takie jak kreatynina, mocznik, cholesterol są aktywne w innych organach i procesach biologicznych, a ich względny pomiar, np. klirens świadczy o prawidłowym lub zaburzonym działaniu jednak nie związanym bezpośrednio z aktywnością jajników. Chociaż wg najnowszych danych, zaburzenia płodności kobiet mogą być spowodowane działaniem kilku spośród badanych w niniejszej pracy doktorskiej czynników. Jednak selekcja czynników badawczych w pracy doktorskiej mgr inż. Wojciecha Mościckiego nie została przedstawiona, dlatego uprzejmie proszę o jej przybliżenie podczas obrony pracy doktorskiej.
5. Hipoteza badawcza wymaga uzupełnienia o założenie, że istnieje korelacja pomiędzy stężeniem badanych parametrów w płynie pęcherzykowym i w surowicy.
6. Nie znalazłam informacji na temat źródła finansowania badań wykonanych w ramach pracy doktorskiej.
7. W rozdziale Materiały i Metody nie podano czy pobierana krew była tętnicza czy żylna, a ma to znaczenie w diagnostyce niektórych parametrów. Podczas pierwszego trymestru ciąży ciałko żółte jest źródłem syntezy progesteronu niezbędnego do rozwoju ciąży. Proszę o wyjaśnienie czy podczas doboru samic do doświadczenia Doktorant zwracał uwagę na morfologię macicy, aby uniknąć błędnego zakwalifikowania osobników ciężarnych do badań i w jaki sposób rozpoznawał oraz eliminował osobniki w stadium wczesnej ciąży.
8. Proszę o wyjaśnienie czy do analizy wyników zastosowano jednoczynnikową czy wieloczynnikową analizę wariancji Anova.
9. Omówienie wyników nie zostało podzielone na podrozdziały, a wg mnie taki podział ułatwiłby prowadzenie dyskusji osiągniętych wyników z dostępną literaturą. Znaczną część rozdziału poświęcono omówieniu wyników dotyczących analizy BMP15, co uważam za słuszne ponieważ w ostatnim czasie zwraca się uwagę na zaangażowanie tego czynnika w

dojrzewaniu oocytów. Zatem BMP-15 może stać się indykátorem statusu dojrzałości oocytów u krów wybieranych do zapłodnienia *in vitro*.

10. Wnioski sformułowane zostały zbyt ogólnie ponieważ nie można po ich przeczytaniu dowiedzieć się w przypadku jakich parametrów odnotowano wzrost stężenia w płynie pęcherzykowym wraz z procesem dojrzewania pęcherzyka jajnikowego i wraz z wiekiem krowy. Nie sprecyzowano również czy uzyskane korelacje stężeń w płynie i w surowicy są pozytywne czy negatywne. Uprzejmie proszę o bardziej precyzyjne sformułowanie wniosków, co będzie pomocne przy przygotowaniu wyników do publikacji.
11. W pracy doktorskiej wykorzystano płyn pęcherzykowy. Czy zabezpieczono do przyszłych analiz odwirowane pęcherzyki? W mojej opinii mogłyby one stanowić cenny materiał badawczy do kontynuacji badań.

Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi i komentarze stanowią element naukowego dyskursu i nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji. Praca napisana jest w czytelny sposób i wyróżnia się logicznym tokiem drażenia problemu badawczego. Uzyskane rezultaty mogą stać się podstawą opracowania wartościowych publikacji również w kierunku ich praktycznego wykorzystania w biotechnikach rozrodu u krów. Wartościowe jest kompleksowe ujęcie wyznaczenia profilu 19 parametrów w płynie pęcherzykowym i w surowicy w zależności od stopnia rozwoju pęcherzyka jajnikowego i wieku krowy.

W mojej opinii, rozprawa doktorska mgr inż. Wojciecha Mościckiego stanowi przemyślane oraz interesujące, rozwiązanie problemu naukowego w odniesieniu do celów badawczych, metodyki, opracowania wyników i sformułowania wniosków. W związku z tym stwierdzić należy, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska pt. *„Określenie i porównanie stężeń wybranych hormonów, czynników wzrostu i składników biochemicznych w dominujących i atretycznych pęcherzykach jajnikowych w odniesieniu do surowicy u krów mlecznych w różnym wieku”* odpowiada warunkom określonym w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65, poz. 595 ze zm. Dz.U. z 2005 r., Nr 164, poz. 1365) stawiane pracom doktorskim.

W związku z powyższym przedkładam wniosek o dopuszczenie Pana mgr inż. Wojciecha Mościckiego do dalszych etapów przewidzianych postępowaniem o ubieganie się o stopień doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika.

Anna Kowalska

Prof. dr hab. Jędrzej M. Jaśkowski
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika
w Toruniu

Toruń, 16.03.21

R e c e n z j a

Pracy doktorskiej mgr inż. Wojciecha Mościckiego pt.: „**Określenie i porównanie stężeń wybranych hormonów, czynników wzrostu i składników biochemicznych w dominujących i artretycznych pęcherzykach jajnikowych w odniesieniu do surowicy u krów mlecznych w różnym wieku**” Recenzję wykonano na prośbę Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Praca przygotowana została w klasycznej postaci rozprawy naukowej. Liczy 83 strony i obejmuje klasyczne rozdziały, krótki wstęp, 15 stronicowy, rozbudowany na kilka podrozdziałów - przegląd piśmiennictwa, jednostronicowy cel i hipotezę badawczą, 8 stronicowy rozdział Materiał i metody. Uzyskane wyniki przedstawiono w 15 tabelach umieszczonych w tekście rozdziału, który obejmuje 19 stron. Omówienie wyników – to kolejne 7 stron. Zasadniczą część opracowania kończą 4 wnioski. Piśmiennictwo składa się z 223 niemal wyłącznie anglojęzycznych prac. Ostatnimi elementami pracy są streszczenia w języku polskim i angielskim. Cennym uzupełnieniem jest umieszczony na początku opracowania wykaz skrótów.

Opis pracy, wykorzystanego materiału oraz uzyskanych wyników

W interesującym przeglądzie piśmiennictwa przedstawiono bogate dane na temat procesu wzrostu i dojrzewania pęcherzyków jajnikowych, z uwzględnieniem mechanizmów powstawania, budowy histologicznej i mechanizmu różnicowania. Opisano fale pęcherzykowe oraz selekcję pęcherzyka dominującego. Omawiając steroidogenezę pęcherzykową przedstawiono hormonalny skład płynu pęcherzykowego, rolę i znaczenie w nim cholesterolu i jego frakcji, nadrzędne znaczenie 17- β estradiolu. (E2). W kolejnych częściach tekstu przedstawiono rolę płynu pęcherzykowego i jego skład – z uwzględnieniem wpływu hormonów płciowych - na rozwój i dojrzewanie pęcherzyka jajnikowego, oraz związek pomiędzy jego składem a jakością oocytów. Wskazano także na znaczenie obecności

innych hormonów i substancji biologicznie czynnych a także metabolitów, antyoksydantów, witamin, składników mineralnych. Szerzej omówiono także procesy związane z końcowym dojrzewaniem pęcherzyków, ich owulacją luteinizacją i atrezią pęcherzykową, uwzględniając wpływ hormonów płciowych, hormonu wzrostu, hormonów pozagonadowych oraz steroidowych i niesteroidowych związków obecnych lub syntetyzowanych w jajniku w tym TGF- β czynników wzrostu - cytokin – w tym śródbłonkowego czynnika wzrostu – VEGF, TGF α a FGF (fibroblastowego czynnika wzrostu) czy insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-I i IGF-2) a także białka BMP-15. Sporo uwagi poświęcono roli BMP-15 w tym także jako wskaźnika zapłodnienia komórek jajowych i dojrzałości oocytów. Omówiono także czynniki wpływające na folikulogenezę z uwzględnieniem roli czynników wzrostu, w tym białek morfogenetycznych kości (BMP-15). Scharakteryzowano także zjawisko atrezji pęcherzyków i rolę atrezji w ograniczaniu liczby i rozwoju pęcherzyków jajnikowych, prewencji ciąży mnogiej, a także znaczenie w tym obszarze procesu apoptozy, sekwencji zdarzeń podczas atrezji i zmian w koncentracji hormonów w płynie pęcherzyków. Omówiono częstotliwość atrezji w zależności od fazy cyklu rujowego, stadium rozwoju pęcherzyków jajnikowych, wpływu na ten proces hormonów płciowych oraz insulinopodobnych czynników wzrostu. Sporo uwagi poświęcono także rozwojowi, ewolucji oraz zanikowi ciała żółtego, rządzącym tymi procesami mechanizmami oraz odpowiadającym za nie czynnikom hormonalnym. Przegląd piśmiennictwa kończy – być może mniej pasujący do całości i dobrze znany podrozdział na temat podziału oraz regulacji cyklu rujowego u bydła. Całość jest zrozumiała, tematycznie spójna i merytorycznie bez zarzutu. Przedstawiona w pracy hipoteza oraz cele są poprawne i odzwierciedlają rozwijane później tezy. W rozdziale Materiał i metody dokładnie opisano sposób pobierania, jego kwalifikację, przedstawiono podział na grupy doświadczalne oraz szczegółowo przedstawiono sporą paletę dokonywanych badań analitycznych w próbkach krwi oraz płynu pęcherzyków jajnikowych. W opisie wykorzystano podział ciałek żółtych konkretne klasy oraz podział pęcherzyków jajnikowych w oparciu o wzajemną relację progesteronu i estrogenów. Wykorzystany do badań, starannie wyselekcjonowany materiał pochodzący od 72 krów jest wystarczający. Dodatkowo zastosowana randomizacja grup oraz jedno źródło ich pochodzenia, uwiarygodnia uzyskane w trakcie badań wyniki. W eksperymencie wykazano istotne różnice w stężeniach estradiolu oraz progesteronu, przy czym w pęcherzykach przedowulacyjnych i dominujących były one niższe niż w artretycznych. Podobne różnice dotyczyły krów w różnym wieku. Były one na ogół zbieżne z podobnymi różnicami wykazywanymi w surowicy krwi. Interesujące zmiany następowały także w białku morfotycznym kości (BMP-15). których poziom, podobnie jak

progesteronu i estrogenów był wyższy w pęcherzykach artretycznych niż innych ich kategoriach. Dodatkowo stężenie BMP-15 nie tylko w płynie pęcherzyków jajnikowych, ale też surowicy korelowało dodatnio z wiekiem krów. Nawiasem mówiąc ten parametr należy pośród palety ocenianych - do niewątpliwie oryginalnych. Podobne zmiany notowano w odniesieniu do koncentracji FSH, która była istotnie wyższa w pęcherzykach krów starszych niż młodszych i korelowała dodatnio z wiekiem krów. Pewne, dynamiczne różnice dotyczyły wszystkich analizowanych metabolitów oraz pierwiastków, korelując z ich poziomami w krwi. Zasadniczy wniosek, płynący z wykonanych badań to wykazanie zasadniczych różnic i dynamicznych zmian w koncentracjach badanych parametrów. Są one skorelowane nie tylko z fazą rozwoju pęcherzyka jajnikowego ale też wiekiem krów. Ustalenie tych różnic pociąga za sobą konkretne implikacje praktyczne, mogące znaleźć zastosowanie w biotechnologii, w tym produkcji zarodków *in vitro*, ale też w różnych obszarach biologii rozrodu. Z pewnością wyniki te mogą być inspiracją do dalszych badań i poszukiwań.

Pozytywy pracy to dobre uzasadnienie badań, czytelnie zarysowany problem oraz jasno zaznaczone cele, co wzbogacone o dobre merytoryczne przygotowanie Autora pracy w oparciu o bogate piśmiennictwo, czyni z opracowania co najmniej poprawną, miejscami oryginalną konstrukcję. Wyniki poddano rzetelnej dyskusji, podobnie wnioski odpowiadają na pytania zamieszczone w hipotezie. Całość napisana jest dobrym językiem naukowym, który nie męczy potencjalnego czytelnika niepotrzebnymi zawiłościami stylistycznymi, skupiając się na istotnych kwestiach.

Niedostatki merytoryczne i drobne usterki

Autor nie ustrzegł się – na ogół drobnych – niedociągnięć. Oto one: w rozdziale „**Przegląd piśmiennictwa**” nie wspomniano nic na temat ewentualnych zmian w składzie płynu pęcherzyków jajnikowych w zależności od wieku krów. Analizując zebraną przez Autora literaturę, trudno w brak takich badań uwierzyć. Wprawdzie ten element przewija się we wstępie do pracy, jednak wskazanym byłoby jego zamieszczenie takich informacji i ich szersze naświetlenie w przeglądzie piśmiennictwa, zwłaszcza, że badania na ten temat stanowią jeden z podstawowych celów pracy. Z drobnych błędów zauważonych w tej części pracy zwraca uwagę kilka z nich. Przykładowo - zamiast „fluktuacja stężeń”, trafniej byłoby użyć określenia „zmiany stężeń” (str. 5 1 w. od dołu), „atrezję pęcherzykową” lepiej zastąpić pojęciem „atrezja pęcherzyków jajnikowych” (str. 6 1 wiersz od góry), podobnie – mimo, że takie pojęcia używane są nawet w oficjalnych dokumentach Ministerstwa Rolnictwa i

Rozwoju Wsi - zamiast „bydlęcych pęcherzyków jajnikowych” lepiej użyć określenia „pęcherzyków jajnikowych bydła” (ściślej krów) – patrz - str. 6 wiersz 2 od dołu. Str. 8 wiersz 6 od góry – liczba pęcherzyków raczej „nie spada” co „obniża się”, względnie „ulega obniżeniu (zmniejszeniu)”; podobnie str. 14 2 wiersz od góry, stężenia biochemicznych metabolitów nie „ulegają znacznym „wahaniom” co raczej „ulegają znacznym zmianom”. Raczej też bardziej poprawnie brzmi określenie „liczba oocytów” niż „ilość oocytów”. Liczba (tu ogromna) pozostawia możliwość policzenia tych konkretnych struktur. „Ilość” dokładne policzenie wyklucza (str., 15 pierwszy wiersz od dołu). W języku potocznym oba określenia są używane zamiennie, tu jednak – z wielu powodów - wymagana byłoby większa precyzja i unikanie określeń dopuszczalnych w codziennym życiu. Raczej też nie „pęcherzyki jajnikowe ulegają zapłodnieniu” co raczej „komórka jajowa” (str. 15, pierwszy wiersz od góry). W rozdziale „**Cel pracy i hipoteza badawcza**” niezbyt precyzyjnie zapisano (przeprowadzenie analizy... pomiędzy?) pierwszy punkt). W moim przekonaniu znacznie lepiej ujęto cele tego punktu w tytule pracy doktorskiej. Nie ma też powodu wymienianie w tym miejscu analizowanych składników w płynie pęcherzykowym i krwi (przyjdzie na to czas w rozdziale Materiał i metody). Trzymając się ogólnie przyjętego kanonu hipoteza badawcza powinna poprzedzać cel badań (a nie odwrotnie). Pewnie niedociągnięcia posiada rozdział „**Materiał i metody**”. Autor wspomina w nim o ubijanych (a nie ubitych) krowach, co sugeruje pewien przedział czasowy, w którym materiał gromadzono. Biorąc pod uwagę, że w badaniach wykorzystano jajniki 72 krów (ubitych krów było z pewnością więcej, jako że z grupy zwierząt doświadczalnych eliminowano samice z wyraźnymi zmianami patologicznymi), to pozyskany materiał już choćby z tego powodu nie był homologiczny (trudno uwierzyć, by jednego dnia ubijano 72 krowy pochodzące z jednego gospodarstwa (korzystny element randomizacji). Pytaniem pozostaje w jakim przedziale czasowym (dni, miesiące) dokonywano uboju i jaki był potencjalny wpływ tego rozciągnięcia czasowego na skład płynu pęcherzyków jajnikowych? W wymienionym rozdziale - przy okazji opisu przeprowadzania analizy wybranych parametrów płynu pęcherzyków jajnikowych - wymieniono dokładne parametry odczytu długości fali w odniesieniu do 10 parametrów. W przypadku pięciu kolejnych fakt ten pominięto. Trochę razi także określenie „grupa wiekowa”, sugerując istnienie grupy „niewiekowej”. Z pewnością na czytelności zyskałyby tabele zamieszczone w dalszym rozdziale – Wyniki - gdyby podział na grupy krów a także podział pęcherzyków jajnikowych opisać w tekście rozdziału „Materiał i metody”. Wreszcie Autor z jakichś powodów nie podaje, na którym z jajników znajdował się duży pęcherzyk; czy był on położony na jajniku przyległym do ciała żółtego, czy też przeciwnym. Być może – tu

pominięty czynnik - miał jakiś bliżej nieokreślony wpływ na skład płynu konkretnego pęcherzyka. Także różnice w składzie płynu pęcherzykowego można zakładać, dokonując powierzchownego przeglądu zacytowanych publikacji. Nie bez przyczyny - może też z takich właśnie powodów - powstają istotne różnice w odsetku ciąży implantujących się u bydła w lewym lub prawym rogu macicy. Fakt ten - niezależnie od oczekiwań (bądź ich braku) - należało w metodyce zapisać. I wreszcie drobny komentarz do liczby oznaczeń wybranych składników płynu pęcherzykowego. Jest ona co najmniej jest znaczna. Piętnaście z nich wykonano na analizatorze biochemicznym (przy przeważnie jednej długości fali), cztery pozostałe cztery na fluorymetrze. Zastosowane procedury są proste i mało pracochłonne. Nie wymagają złożonych, skomplikowanych procedur. Są jednak bardziej efektem możliwości urządzenia badawczego niż szczególnego zaangażowania Autora pracy. Na marginesie, w rozdziale „Materiał i metody” warto było - przy okazji opisu poszczególnych analiz - napisać jakiej ilości krwi, jej surowicy oraz płynu pęcherzykowego użyto do przeprowadzenia konkretnej analizy. Z kolei moje uwagi odnośnie do rozdziału „Wyniki” dotyczą jedynie czytelności a właściwie jej braku z powodu nagromadzenia ogromnej liczby danych. Może warto przemyśleć inną formę prezentacji wyników a same tabele maksymalnie uprościć?

Pewne nieścisłości pojawiają się także w rozdziale „Wnioski”. Jak wykazano skład niektórych parametrów biochemicznych i hormonalnych płynu pęcherzykowego zmieniał się na poszczególnych etapach dojrzewania pęcherzyka jajnikowego. Podkreślam „pęcherzyka jajnikowego” Autor sugeruje, że uzyskane wyniki mogą być przydatne w pracach nad modyfikacją mediów hodowlanych dla oocytów krów w warunkach *in vitro*. Dla wyjaśnienia; do zapłodnienia *in vitro* wykorzystuje się liczne, niedojrzałe oocyty pobierane ze stosunkowo małych pęcherzyków jajnikowych. Rzadko są nimi oocyty uzyskane z wyłącznie dużych (tu dużego) pęcherzyków. Pewien wyjątek stanowić mogą oocyty pobierane od dawczyń poddawanych stymulacji hormonalnej. Taka procedura jest jednak stosowana rzadko. Podobnie znaczne liczby oocytów do hodowli *in vitro* pozyskiwane są z pęcherzyków krów po uboju. Także i tu nie są to pojedyncze, duże pęcherzyki jajnikowe. Skład chemiczny takich pęcherzyków jest odmienny niż pęcherzyka dużego. Co więcej - oocyty do hodowli zarodków *in vitro* - pobierane są przyżyciowo w tygodniowych, nierzadko krótszych odstępach czasu, co wyklucza ich duże rozmiary. Wydaje się więc, że wykorzystanie uzyskanych wyników do prac nad modyfikacją mediów hodowlanych w hodowlach *in vitro* może być uogólnieniem zbyt optymistycznym. I wreszcie rozdział „Piśmiennictwo” którego zasadniczym mankamentem jest nadmiar pozycji. Wątpię by można było nad ta obfitością

bezkarnie zapanować. Zdumiewa niewielka liczba najnowszych pozycji literatury. Przykładowo spośród 253 pozycji zaledwie 16 (6,9%) stanowią opracowania z lat 2016-2021. Pozostałe cytowane prace są sprzed kilkunastu lat, zwykle przełomu wieków, wskazując że poruszony temat stracił już nieco na aktualności. Wydaje się, że uzasadniona byłaby ostrzejsza selekcja zebranych publikacji i wyważona rezygnacja z dzieł o charakterze historycznym.

Reasumując praca stanowi interesujące, w kilku miejscach - oryginalne studium dynamiki zmian składu płynu pęcherzykowego krów w zależności od stadium rozwoju pęcherzyka jajnikowego oraz wieku krów. Jej wartość zwiększa szeroka, wieloczynnikowa analiza endokrynologiczna i biochemiczna składu badanych płynów ustrojowych oraz dobrze pomyślany układ doświadczenia. Duża swoboda w operowaniu przez Autora opracowania, danymi literaturowymi i ich swobodna konfrontacja z uzyskanymi wynikami dodatkowo wartość te podnoszą. Pewne niedociągnięcia i usterki, których często trudno uniknąć, nie dyskwalifikują pracy i nie mają istotnego znaczenia dla mojej w całości pozytywnej oceny.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Wojciecha Mościckiego pt.: „Określenie i porównanie stężeń wybranych hormonów, czynników wzrostu i składników biochemicznych w dominujących i artretycznych pęcherzykach jajnikowych w odniesieniu do surowicy u krów mlecznych w różnym wieku” spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789). Wnoszę zatem do Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie o dopuszczenie Pana mgr inż. Wojciecha Mościckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

UCHWAŁA NR 91
Senatu Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie
z dnia 31 maja 2021 r.

w sprawie nadania mgr. inż. Wojciechowi Mościckiemu
stopnia doktora

Na podstawie art. 179 ust. 1 i 3 pkt 2b ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669, z późn. zm.) w związku z art. 14 ust. 2 pkt 5 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789, z późn. zm.) uchwala się, co następuje:

§ 1.

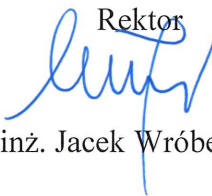
Senat Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie nadaje mgr. inż. Wojciechowi Mościckiemu stopień doktora w dziedzinie nauk rolniczych, w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

§ 2.

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

Przewodniczący Senatu

Rektor



dr hab. inż. Jacek Wróbel, prof. ZUT