

Dr hab. Anna Domosławska -Wyderska

Olsztyn 20.10.2024.

Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

UW-M w Olsztynie

Ul. Oczapowskiego 14

10-719 Olsztyn

OCENA

pracy doktorskiej lek. wet. Kingi Domrazek

pt. „Wpływ różnych gatunków *Mycoplasma* spp., Herpesvirus canis typu 1 i *Chlamydia* spp. na jakość nasienia psa domowego (*Canis familiaris*)”.

Rozprawa doktorska lek. wet. Kingi Domrazek oparta jest na trzech publikacjach oryginalnych i jednej przeglądowej, zamieszczonych w czasopismach z listy JCR o wysokim współczynniku wpływu (IF).

1. Domrazek K, Kaszak I, Kanafa S, Sacharczuk M, Jurka P. The influence of *Mycoplasma* species on human and canine semen quality: a review. *Asian J Androl.* 2023;25(1):29-37 (Punkty MNiSZW=70, IF=2,9)

2. Domrazek K, Jurka P. Prevalence of *Chlamydia* spp. and Canid herpesvirus-1 in Polish dogs. *Veterinary World.* 2024;17(1):226-232 (Punkty MNiSZW=70; IF=1,6).

3. Domrazek K, Konieczny P, Majka M, Czopowicz M, Cywińska A, Jurka P. The lack of the influence of various species of *Mycoplasma* spp on canine semen quality. *Theriogenology*, 2024;219:86-93 (Punkty MNiSZW=140; IF=2,8).

4. Domrazek K, Konieczny P, Majka M, Czopowicz M, Jurka P. The impact of microorganisms on canine semen quality. *Animals* 2024, 14,1267 (Punkty MNiSZW=100, IF=3,0).

Sumaryczny IF wynosi 10,3.

Aplikantka przeprowadziła badania nad wpływem takich patogenów jak *Mycoplasma* spp., Herpesvirus canis (CHV-1) oraz *Chlamydia* spp. na jakość nasienia i płodność psów. Słusznie podkreśliła, iż dane dotyczące wpływu *Mycoplasma* spp. na płodność psów (zarówno samic jak i samców) są sprzeczne i nadal niejednoznaczne. Wpływ tego patogenu może być przyczyną obniżenia płodności i strat w hodowlach. Z kolei wpływ CHV-1 na układ rozrodczy

samic został dobrze poznany i opisany, natomiast jego wpływ na jakość nasienia nie jest u psów samców dokładnie poznany, tak jak u innych gatunków zwierząt. Badania Doktorantki nad chlamydiaż potwierdziły jej sporadyczne występowanie w populacjach polskich psów i jej znikomy lub nadal niepoznany wpływ na jakość nasienia.

Aplikantka posiadała niezbędne umiejętności pracy laboratoryjnej, wyniki swoich badań zaprezentowała profesjonalnie w przedstawionym cyklu publikacji oraz ogólnym podsumowaniu dysertacji.

Oceniana praca doktorska obejmuje 55 stron maszynopisu z wyłączeniem kopii publikacji, 2 tabele oraz 6 rycin. Tekst pracy został podzielony na rozdziały główne i podrozdziały w typowy sposób dla prac naukowych. Układ redakcyjny rozprawy jest bez zarzutu. W pracy, po stronie tytułowej, stosownych oświadczeniach, zamieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim. Kolejne strony zawierają spis treści, wykaz skrótów, który ułatwia rozumienie tekstu, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Nieliczne poprawki i uwagi dotyczące rozprawy zostały zamieszczone w treści recenzji.

Streszczenie w języku polskim oraz angielskim jest zwarte i poprawnie skonstruowane.

W zdaniu w 7 wersji głównego tekstu proponowałabym rozwinięcie skrótu „CHV-1” na Herpesvirus canis, ponieważ jest użyty pierwszy raz w tym tekście.

W wykazie publikacji zamieszczonym na stronie 14. należy poprawić:

- Chlamydoghila spp. na *Chlamydoghila* spp. - pisane kursywą zgodnie z tytułem opublikowanej pracy (pozycja 2.)
- Mycoplasma spp. na *Mycoplasma* spp. - pisane kursywą zgodnie z tytułem opublikowanej pracy (pozycja 3.)
- poprawienie tytułu w pozycji 4. – brak „canine” przed „semen quality” zgodnie z tytułem opublikowanej pracy

Brak jest w wersji papierowej publikacji z pozycji drugiej: Domrazek K, Jurka P. Prevalence of *Chlamydoghila* spp. and Canid herpesvirus-1 in Polish dogs. Veterinary World. 2024;17(1):226-232.

Jest ona jednak dostępna w wersji elektronicznej.

Wstęp rozprawy doktorskiej Aplikantka podzieliła na 3 podrozdziały obejmujące omówienie każdego patogenu w zwarte i klarowny sposób. Podkreśliła globalny problem niepłodności występujący zarówno w populacji ludzkiej, jak i u psów. Jest to problem powszechny i narastający, a ponad połowa przypadków zaburzeń płodności dotyczy osobników męskich. Poszerzanie wiedzy na temat zaburzeń rozrodu jest cały czas przedmiotem badań i dyskusji. Niepłodność samców jest jednym z kluczowych elementów w niezwykle istotnym

problemie utrzymania różnorodności genetycznej i podtrzymania populacji psów hodowlanych. Wraz z rozwojem technik wspomaganego rozrodu, zostały opracowane i zoptymalizowane metody oznaczania nasienia jak komputerowo wspomagana analiza nasienia (CASA), spektrofotometria czy cytometria przepływowa. Jak podkreśliła Doktorantka ocena nasienia przy użyciu systemu CASA jest podstawowym narzędziem diagnostycznym zarówno w medycynie ludzkiej jak i weterynaryjnej, i między innymi na nim opierała swoje badania jakości nasienia badanych psów. Niezwykle istotnym parametrem oznaczanym przez ten system jest ruch postępowy plemników, który jest jednym z kluczowych elementów stanowiących o płodności. Aplikantka słusznie podkreśliła, iż znalezienie przyczyny niepłodności lub obniżonej jakości nasienia, mimo dostępu do zaawansowanych technik diagnostycznych, może stanowić duże wyzwanie. Coraz częściej zwraca się uwagę na rolę czynników mikrobiologicznych – bakteryjnych, wirusowych, grzybiczych. Patogeny takie jak *Mycoplasma* spp., Herpesvirus canis czy *Chlamydia* spp. są słabo poznane w kontekście niepłodności samców, jednakże prowadząc do stanów zapalnych i odpowiedzi immunologicznej organizmu mogą pośrednio wpływać na upośledzenie płodności. Jak słusznie Doktorantka podkreśliła mimo wykonanych badań i uzyskanych wyników ich interpretacja może stanowić duży problem i wyzwanie dla lekarzy weterynarii.

Autorka w pierwszym podrozdziale wstępu przystępnie i zwięźle opisała rodzaje i występowanie *Mycoplasma* spp., sposób działania i replikacji patogenu. Opierając się na dostępnej literaturze podaje właściwe statystyki, szacujące występowanie M.spp. w układzie rozrodczym psów na 85-88%. Jak podkreśliła dane literaturowe są sprzeczne co do wpływu tego patogenu na jakość nasienia i płodność. Do wykrywania i oznaczania poszczególnych gatunków M.spp. Doktorantka wybrała najbardziej użyteczną metodę- reakcję łańcuchową polimerazy (PCR), stosowana w laboratoriach komercyjnych. Co ważne, wyjaśniła otrzymywanie fałszywie dodatnich wyników obecności tego patogenu – badanie PCR wykrywa zarówno żywe jak i martwe komórki M.Spp, co jest głównym ograniczeniem tej metody badania. Dotychczasowe badania skupiały się głównie na wykrywaniu obecności mykoplazm bez ich identyfikacji gatunkowej. Nie jest znana częstość występowania poszczególnych gatunków mykoplazm w korelacji z niepłodnością samców psów. Również, jak podkreśliła Doktorantka, pobieranie przez lekarzy weterynarii tylko wymazu z napletka stanowi ograniczenie diagnostyczne i nie koniecznie musi korelować z występowaniem bakterii w innych częściach układu rozrodczego samców.

Drugi podrozdział Wstępu Autorka poświęciła przybliżeniu Herpewirozy u psów i jej wpływu na zdrowie i rozrodczość. Wpływ na układ rozrodczy jest dobrze znany i opisany, zwłaszcza w

odniesieniu do suk i noworodków. Natomiast wpływ na jakość nasienia psów nie został jeszcze wyjaśniony, tak jak u innych gatunków. Doktorantka opisała wybór najlepszej metody diagnostycznej dla tego patogenu – PCR, jako metody eliminującej fałszywie dodatnie lub fałszywie ujemne wyniki badań serologicznych.

W trzecim podrozdziale Autorka zawarła zwięzłe informacje na temat rodzajów, cyklu rozwojowego, występowania i dróg zakażenia oraz przenoszenia się chlamydii u psów. Podkreśliła, iż doniesienia o chlamydiozie psów są rzadkie, prawdopodobnie ze względu na to, iż psy wydają się nietypowymi żywicielami chlamydii. Dotychczas powiązanie tego patogenu z układem rozrodczym nie zostało określone.

Uwagi redakcyjne dotyczące wstępu:

- strona 15, wers 21 dobrze by było przed skrótem CASA umieścić polskie nazewnictwo – komputerowo wspomaganą analizę nasienia – CASA (skrót angielski).

Celem pracy było:

1. Oszacowanie częstości występowania różnych gatunków *Mycoplasma* spp., CHV-1 i *Chlamydia (Chlamydomphila)* spp. w napletku i nasieniu psa domowego.
2. Ocena wpływu tych drobnoustrojów na jakość nasienia psa domowego.

Realizację w/w celów Doktorantka podjęła się poprzez wykonanie następujących zadań badawczych:

1. Diagnostykę PCR *Mycoplasma* spp. i jej różnych gatunków, *Chlamydia (Chlamydomphila)* spp. i Herpesvirus canis występujących w napletku i w nasieniu psów.
2. Ocenę i porównanie jakości nasienia psów-nosicieli *Mycoplasma* spp (różnych gatunków), Herpesvirus canis i *Chlamydia* spp. oraz psów, u których nie stwierdzono obecności tych drobnoustrojów w napletku lub nasieniu.

Rozdział **materiały i metody** rozpoczyna się od omówienia kwalifikacji i liczby osobników biorących udział w badaniach, pobierania materiału biologicznego, jaki stanowił wymaz z napletka oraz frakcja nasienna ejakulatu. Do diagnostyki PRC przeznaczono 78 próbek wymazu z napletka dla każdego oznaczanego patogenu oraz 63 próbki nasienia dla *M.spp*, 52 próbki odpowiednio dla CHV-1 i *Chlamydia* spp. Wspomaganą komputerowo analizę nasienia przeprowadzono za pomocą Sperm Class Analyzer w połączeniu z mikroskopem Nikon Eclipse E 200 i kamerą. Oznaczenia w tym systemie obejmowały najważniejsze parametry koncentracji i ruchliwości komórek plemnikowych, a także subpopulacje ich ruchu. Ocena mikroskopowa nasienia polegała na analizie żywotności plemników z wykorzystaniem barwienia eozynowo-nigrozynowego oraz oznaczeniu ich

morfologii przy użyciu komercyjnego zestawu Sperm Stain (Microptic, Hiszpania). W publikacjach stanowiących cykl tematyczny Doktorantka szczegółowo opisała metodologię dotyczącą diagnostyki PRC i Real-Time PCR w próbkach wymazu z napletka i nasienia. W przypadku uzyskania dodatniego wyniku w kierunku *Mycoplasma* spp. przeprowadzano identyfikację gatunkową.

W akapicie opisującym metody statystyczne Autorka użyła kilku metod statystycznych w zależności od otrzymanych danych, co zostało zawarte w poszczególnych publikacjach jednotematycznego cyklu.

Uwagi redakcyjne dotyczące rozdziału materiały i metody:

- strona 31 oraz 35: psy od których pobierano wymazy z napletka opisane zostały jako grupa 1, a psy od których oznaczano wymazy z nasienia – jako grupa 2. Brak wpisania tych grup w tabeli 1 na stronie 31
- strona 32: pierwsze zdanie lepiej brzmiałoby: „wspomagana komputerowo analiza nasienia...”

Doktorantka omówiła uzyskane wyniki i najważniejsze obserwacje oraz przedstawiła najważniejsze wnioski. Oceeniła wpływ różnych gatunków *Mycoplasma* spp. występujących w napletku psów na jakość nasienia. Po przeprowadzonej identyfikacji gatunkowej bakterii wykazała jedenaście różnych gatunków, przy czym *M.cynos* i *M. HRC 689* występowały najczęściej. Co ważne, w dostępnej do chwili obecnej literaturze, brak jest wyników przedstawiających taką różnorodność gatunkową tej bakterii w obrębie psiego układu rozrodczego. Doktorantka na podstawie otrzymanych wyników, nie stwierdziła istotnego statystycznie związku między obecnością *Mycoplasma* spp., a azoospermią. Również nie zaobserwowała korelacji między parametrami jakości nasienia, a liczbą wykrytych gatunków tej bakterii zasiedlającej napletek. Badania PCR nasienia psów wykazały obecność *Mycoplasma* spp. u 60,3% psów, gdy w wymazach z napletka było to 72,3%. Może to sugerować występowanie bakterii z malejącą częstością w poszczególnych częściach układu rozrodczego podobnie jak ma to miejsce w układzie oddechowym. W celu identyfikacji poszczególnych gatunków i szczepów *M.spp.* niezbędne są dalsze badania, zwłaszcza oparte o metody ilościowe. Mogłoby to pozwolić, co słusznie podnosi Autorka, na opisanie negatywnego wpływu tych mikroorganizmów na płodność psów.

Doktorantka wykazała sporadyczne występowanie patogenów jakimi są CHV-1 i *Chlamydia* (*Chlamydophila*) spp. w populacji polskich psów badając wymazy z napletka i nasienia. Pozytywny wynik w kierunku *Chlamydia* (*Chlamydophila*) spp. uzyskała tylko w jednej próbce pochodzącej z napletka. W tym jednym przypadku jedynym odstępstwem od norm

fizjologicznych nasienia był jego ruch postępowy. Na podstawie tego przypadku klinicznego nie można stwierdzić jednoznacznego wpływu *Chlamydia (Chlamydophila) spp.* na jakość nasienia psa.

Omówione wyniki i przedstawione wnioski są sformułowane czytelnie i odnoszą się logicznie do postawionych celów badań.

Spis piśmiennictwa zawiera 90 cytowanych pozycji przedstawionych w sposób ujednolicony. Przywołane prace są aktualne, zawarte zarówno w poszczególnych artykułach jednotematycznego cyklu prac, jak i zebrane w całość na stronach od 46 do 52.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że uwagi i spostrzeżenia mają jedynie charakter redakcyjny. Z uwagi na rosnący problem niepłodności psów, praca ta jest jak najbardziej aktualna. Doktorantka wykazała się odpowiednim przygotowaniem zarówno warsztatu badawczego jak i podjęła trud niełatwych badań klinicznych – andrologicznych, w tym pobierania nasienia od dużej liczby badanych psów. Wyrażam nadzieję, że będzie Ona kontynuowała badania nad tymi patogenami, poszerzając także badanie ejakulatu – zarówno frakcji nasiennej jak i gruczołu krokowego o takie parametry jak status oksydacyjny czy apoptyczny plemników. Na tym polu jest jeszcze wiele do zbadania.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmująca cykl jednotematycznych artykułów, wnosi istotne elementy do nauki, spełniając wszystkie warunki określone w Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz. U. z 2023 r., poz. 742 ze zm.).

W związku z powyższym przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie Pani lek.wet. Kingi Domrazek do dalszych etapów postępowania mającego na celu nadanie stopnia naukowego doktora.

Janina Antko - Wroblewska

OPLATA POBRANA
TAXE PERÇUE - POLOGNE
Umowa z Poczta Polska S.A.
ID 518459/W

UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI
w Olsztynie
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ
Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką
10-719 Olsztyn, ul. Oczipowskiego 14
tel. 89 523 34 97



Inst. Med. wet.

KANCELARIA GŁÓWNA SGGW
2024 -11- 19
WPŁYNEŁO DNIA -8-



23783 15.11.2024 02 POLECONA

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w
Warszawie Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Nowoursynowska 159C
02-776 Warszawa

(00)659007734918605257



(00)659007734918605257

(00)659007734918605257



Poczta Polska
Opłata pobrana _____ zł _____ gr

R

23482

2024