

Prof. dr hab. Jacek Malejczyk
Katedra i Zakład Histologii i Embriologii
Centrum Biostruktury
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa
tel.: 22 629 52 82; 601 342 781
jacek.malejczyk@wum.edu.pl

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR ANNY NIWIŃSKIEJ PT. „OCENA WPŁYWU OSOCZA BOGATOPŁYTKOWEGO NA AUTOLOGICZNY PRZESZCZEP JAJNIKA W PROCEDURZE ZACHOWANIA PŁODNOŚCI NA MODELU SZCZURZYM”

Rozprawa na stopień doktora nauk weterynaryjnych mgr Anny Niwińskiej została przygotowana w postaci monografii w języku polskim. Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Chorób Dużych Zwierząt Instytutu Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie pod kierunkiem dr hab. Sławomira Gizińskiego i promotorki pomocniczej dr n. wet. Ewy Kautz. Praca dotyczy bardzo aktualnych i interesujących zagadnień związanych z zachowaniem płodności w kontekście terapii przeciwnowotworowej. Ogromny postęp diagnostyki i terapii onkologicznej stworzył możliwości powrotu pacjentów do normalnego życia w tym również możliwości posiadania dzieci. Zachowanie płodności jest więc obecnie jednym z istotnych priorytetów, który skupia wysiłki lekarzy onkologów, specjalistów medycyny rozrodu oraz badaczy innych gałęzi wiedzy medycznej. Wiedza w tym zakresie oraz metody zachowania płodności są ciągle mało poznane i napotykają na szereg problemów technicznych co powoduje konieczność prowadzenia dalszych, szeroko zakrojonych badań. Dlatego uważam, że wybór tematyki pracy mgr Anny Niwińskiej jest niezwykle interesujący zarówno z teoretycznego jak i klinicznego punktu widzenia. Tym samym podjęcie przez Doktorantkę badań tym kierunku uważam za w pełni uzasadnione.

Monografia będąca rozprawą doktorską mgr Anny Niwińskiej liczy 150 stron i ma układ typowy dla tego typu opracowań. Zawiera ona stosowne oświadczenia, streszczenie w języku polskim i angielskim, spis treści, wykaz podstawowych skrótów, wstęp z przeglądem literatury naukowej, hipotezę i cel pracy, materiały i metody, wyniki, omówienie wyników i dyskusję, wnioski, spis fotografii, rycin i tabel oraz bibliografię z odniesieniami zawierającą 283 pozycje literaturowe.

Streszczenie w języku polskim i angielskim zawiera zwięzły opis problematyki i założeń pracy i przedstawia uzyskane wyniki oraz wynikające z nich wnioski.

Wstęp rozpoczyna się podaniem podstawowych danych statystycznych dotyczących częstości występowania nowotworów u kobiet ze szczególnym uwzględnieniem dziewcząt i kobiet w okresie płodności. Doktorantka wskazuje na gonadotoksyczność terapii

przeciwnowotworowych opartych na radioterapii i chemioterapii i wynikającą z tego konieczność zachowania funkcji gruczołowych i rozrodczych układu rozrodczego. W dalszej części zostały omówione główne strategie zachowania płodności. Szczególny nacisk został położony na kriokonserwację i autologiczny przeszczep fragmentów jajnika z uwzględnieniem rozmaitych czynników mających potencjalny wpływ na powodzenie takiego zabiegu. Podstawowe założenia tego rodzaju terapii zostały dobrze podsumowane na rycinie przedstawiającej schemat ortotopowego przeszczepu konserwowanej tkanki jajnika.

Kolejne podrozdziały Doktorantka poświęciła na opis i podsumowanie modeli zwierzęcych przydatnych do badań eksperymentalnych nad zachowaniem płodności oraz potencjalnym znaczeniem terapii osoczem wielopłytkowym jako czynnikiem ułatwiającym wżajanie się przeszczepu. Ta część również została ładnie zilustrowana schematem budowy i aktywacji trombocytu oraz tabelą, gdzie wymieniono znane składniki osocza bogatopłytkowego, które mogą mieć wpływ na komórki i struktury histologiczne jajnika.

Jako całość wstęp jest dobrym i logicznym wprowadzeniem w tematykę rozprawy i uzasadnia założenia i cele pracy. Doktorantka sformułowała hipotezę, że osocze bogatopłytkowe jest czynnikiem mającym znaczący wpływ na poprawę efektywności przeszczepu i funkcjonalności witryfikowanych tkanek jajnika po przeszczepie na modelu szczurzym. Przesłanki do sformułowania powyższej hipotezy znajdują potwierdzenie w aktualnym stanie wiedzy.

Aby zweryfikować powyższą hipotezę, mgr Niwińska określiła 4 szczegółowe cele (zadania) badawcze na które złożyło się:

1. Opracowanie i wykonanie wzbogaconej osoczem bogatopłytkowe procedury autologicznego przeszczepu tkanek jajnika u szczurów jako modelu translacyjnego dla człowieka.
2. Ocena przebiegu i nasilenia angiogenezy i apoptozy oraz rekrutacji i hamowania wzrostu pęcherzyków w kriokonserwowanych tkankach jajnika po autologicznej transplantacji.
3. Ocena wpływu osocza bogatopłytkowe na efektywność procedury przeszczepu tkanek jajnika poprzez wzbogacenie procedury na etapach inkubacji oraz iniekcji w miejscu przeszczepu.
4. Ocena krótko-, średnio- i długoterminowego wpływu osocza bogatopłytkowego na strukturę i funkcje kriokonserwowanych i przeszczepionych tkanek jajnika.

Cele pracy zostały sformułowane w sposób bardzo precyzyjny i nie budzą zastrzeżeń.

Kolejna część pracy „Materiały i metody” zawiera opis zwierząt użytych do doświadczeń, szczegółowy protokół procedury przeszczepiania jajnika, opis przygotowania osocza bogatopłytkowego, kriokonserwacji i ogrzewania jajnika oraz metodykę wykonania preparatów histologicznych oraz ich oceny pod kątem kategoryzacji i liczby pęcherzyków jajnikowych, oceny

włóknienia, barwień immunohistochemicznych w kierunku identyfikacji naczyń krwionośnych oraz apoptozy. Ponadto, Doktorantka przedstawiła również metodologię izolacji RNA z tkanek oraz analizy ekspresji wybranych genów na podstawie ilościowej reakcji PCR. Na koniec tej części pracy Doktorantka podała szczegółowy opis zastosowanych w pracy metod statystycznych.

Generalnie opis materiałów i metodyki badań jest poprawny i nie budzi zastrzeżeń. Nie mam również zastrzeżeń co do założeń i metodologii badań. Wybór metod statystycznych też nie budzi wątpliwości. Należy również nadmienić, że na prowadzenie swoich badań Doktorantka uzyskała zgodę właściwej komisji etycznej. Doktorantka bardzo rzetelnie i jasno przedstawiła stosowane metody, które zostały bardzo dobrze podsumowane na przejrzystym schemacie. Jedynym drobnym uchybieniem jest brak informacji jakim oprogramowaniem (metodą) posługiwała się Doktorantka w obliczeniach wartości Ct w ocenie względnej ekspresji genów.

Wyniki badań przeprowadzonych przez mgr Niwińską zostały szczegółowo opisane w rozdziale „Wyniki i analiza statystyczna”. Uzyskane wyniki zostały wyczerpująco opisane i bogato zilustrowane na kolorowych mikrofotografiach z preparatów histologicznych barwionych klasycznymi metodami histologicznymi i preparatów barwionych metodami immunohistochemicznymi lub opartymi na fluorescencji. Wyniki liczbowe przedstawiono na wykresach. Całość sprawia bardzo dobre wrażenie, wyniki pomimo złożoności przedstawianych porównań przedstawione są jasno i zrozumiale.

Jedyna uwaga dotyczy opisu pod rycinami. Na niektórych wykresach wyniki przedstawione są jako mediana z kwartylami, na innych jako średnia z odchyleniem standardowym. W podpisach zabrakło mi wyjaśnienia jaka jest forma przedstawienia wyników oraz jaki test statystyczny zastosowano w ocenie różnic pomiędzy porównywanymi grupami. Na wykresach przedstawiających wyniki analizy regresji tam, gdzie korelacja była statystycznie istotna zabrakło mi również przedstawienia linii trendu.

Muszę też dodać, że osobiście bardzo nie lubię, kiedy ryciny i ich opisy znajdują się na różnych stronach co ogromnie utrudnia analizę przedstawionych wyników. Uwaga ta dotyczy w szczególności Fot. 1 i Fot. 2. gdzie zdjęcia i ich opisy zupełnie się „rozjechały”. Ta krytyczna uwaga nie zmienia faktu, że poziom edytorski monografii mgr Niwińskiej oceniam bardzo wysoko.

Mam też drobną uwagę natury terminologicznej. Już od dawna zgodnie z zaleceniami stosownej komisji od klasyfikacji cytokin nie używamy nazwy TNF α tylko po prostu TNF. Gdyby była taka potrzeba, zawiałości nomenklaturowe związane z nazewnictwem TNF mogą wyjaśnić przy innej okazji.

Uzyskane wyniki Doktorantka przedyskutowała bardzo obszernie w kontekście dotychczasowej wiedzy, w szczególności odnosząc się do różnych aspektów oceny morfologicznej i funkcjonalnej przeszczepów. Dyskusję oceniam bardzo dobrze, chociaż wydaje mi się, że Autorka mogła ustrzec się powtarzaniu opisu wyników zawartych we wcześniejszej części pracy. Doktorantka wykazała się umiejętnością analizy własnych wyników w kontekście doniesień innych badaczy oraz umiejętnością korzystania z piśmiennictwa naukowego. Dodam też, że piśmiennictwo zostało starannie dobrane i jest właściwie cytowane.

Dysertacja kończy się czterema wnioskami, które w rzeczywistości są podsumowaniem uzyskanych wyników. Mgr Niwińska stwierdza co następuje:

1. Prezentowany model wzbogaconej osoczem bogatopłytkowym procedury autologicznego przeszczepu witryfikowanych tkanek jajnika z użyciem sznurów opracowany i wykorzystany w jej pracy umożliwia trafną i rzetelną ocenę wpływu bogatopłytkowego osocza na przeżywalność i funkcjonalność przeszczepionych tkanek.
2. Wzbogacenie badanej procedury poprzez dodatek bogatopłytkowego osocza przyspiesza neowaskularyzację, zwiększa obszar neowaskularyzacji oraz zachowuje fizjologiczny poziom procesów rekrutacji i hamowania wzrostu pęcherzyków w witryfikowanych tkankach jajnika, a także zmniejsza odsetek apoptotycznych komórek w przeszczepionych tkankach, a co za tym idzie poprawia perfuzję, skraca okres wstrząsu niedokrwiennego oraz umożliwia zachowanie funkcji hormonalnych i rozrodczych przeszczepianych tkanek jajnika.
3. Wzbogacenie procedury przeszczepu tkanek jajnika przez dodatek bogatopłytkowego osocza na etapie inkubacji po ogrzaniu oraz w formie iniekcji lokalnej w okolicy przeszczepu zwiększa efektywność autologicznego przeszczepu witryfikowanych tkanek jajnika.
4. Wzbogacenie procedury przeszczepu tkanek jajnika przez dodatek bogatopłytkowego osocza wywiera pozytywny krótko- i średnio trwały wpływ na strukturę i funkcje witryfikowanych i przeszczepionych tkanek jajnika, a także znacznie ogranicza efekt obniżenia rezerwy jajnikowej.

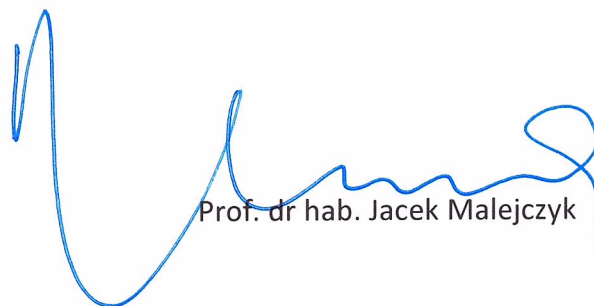
Przedstawione punkty zgodne są z wcześniejszymi celami, co świadczy, że Doktorantka w pełni zrealizowała założenia pracy. Wprawdzie tak sformułowane brzmienie może być optymistycznie, ale przedstawione wyniki rzeczywiście potwierdzają, że wzbogacenie procedury przeszczepu tkanek jajnika przez dodatek bogatopłytkowego osocza wywiera pozytywny, choć niestety nie długoterminowy, efekt na wgajanie się przeszczepów fragmentów jajnika.

Na podstawie przedstawionej mi dysertacji mogę stwierdzić, że Doktorantka dysponuje bardzo dobrym i zaawansowanym warsztatem badawczym, posiada szeroką wiedzę i bardzo dobrze orientuje się w tematyce badań nad zachowaniem płodności, zna światowe piśmiennictwo w tej dziedzinie oraz potrafi krytycznie analizować wyniki badań naukowych.

Tym samym mogę bez wątpliwości wyrazić przekonanie, że osiągnęła ona stopień dojrzałości i samodzielności naukowej uprawniającej ją do ubiegania się o stopień doktora. Wprawdzie Doktorantka nie ustrzegła się od drobnych niedociągnięć natury edytorskiej, ale nie ma to jednak wpływu na moją ogólną bardzo wysoką ocenę pracy.

Podsumowując, stwierdzam, że monografia mgr Anny Niwińskiej jest jej samodzielnym, oryginalnym i interesującym osiągnięciem oraz spełnia wszystkie ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktorski określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zmianami). W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o dopuszczenie mgr Anny Niwińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze bardzo interesującą tematykę pracy, bardzo dobre zaplanowanie i wykonanie badań oraz doskonałe umiejętności i wiedzę Doktorantki chciałbym również zwrócić się do Wysokiej Rady o rozważenie możliwości wyróżnienia jej pracy doktorskiej.

Warszawa, 04/05/2023



Prof. dr hab. Jacek Malejczyk