

prof. dr hab. Wojciech Nizański  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław 29.03.2023 r.

## **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr Anny Niwińskiej  
pt. Ocena wpływu osocza bogatopłytkowego na autologiczny przeszczep jajnika  
w procedurze zachowania płodności na modelu szczurzym**

*Assessment of the effect of platelet-rich plasma on autologous ovarian transplant in a fertility preservation procedure in a rat model*

wykonanej  
w Katedrze Chorób Dużych Zwierząt i Klinice  
Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW

Promotor dr hab. Sławomir Giziński  
Promotor pomocniczy dr n. wet. Ewa Kautz

### **Podstawa formalna opracowania recenzji**

Recenzję przedłożonej rozprawy doktorskiej wykonano w odpowiedzi na pismo Dyrektora Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW prof. dr hab. Marcina Bańbury na podstawie Uchwały Rady Dyscypliny Weterynaria SGGW z dnia 18 stycznia 2022 r.

### **Ocena formalna przedłożonej rozprawy doktorskiej**

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze Chorób Dużych Zwierząt i Klinice Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW pod kierunkiem Promotora dr hab. Sławomira Gizińskiego i Promotora pomocniczej dr n. wet. Ewa Kautz.

Przedstawiona rozprawa doktorska jest monografią i liczy 150 stron. Praca składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu i przeglądu literatury naukowej, hipotezy badawczej, celu badań, materiałów i metod, opisu wyników, omówienia i dyskusji, wniosków, spisu fotografii, rycin i tabel oraz 283 pozycji piśmiennictwa. Monografię uzupełniono o wykaz skrótów. Opracowanie zawiera 5 fotografii, 19 rycin oraz jedną tabelę. Badania stanowiące podstawę pracy doktorskiej finansowano częściowo ze środków pochodzących z grantu Konsorcjum Naukowego KNOW przyznanego na drodze konkursu ESR (Early Stage Research) pod tytułem „Wpływ osocza bogatopłytkowego na angiogenezę i przyjęcie przeszczepu autologicznego tkanki jajnika po kriokonserwacji u szczura” pod kierunkiem dr n. wet. Ewy Kautz.

Rozprawa opracowana została wedle obowiązujących standardów przygotowania monografii naukowej. Taką formę rozprawy dopuszcza art.187 ust. 3 ustawy o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018 r. oraz wytyczne Rady Doskonałości Naukowej (Komunikat 19/2020 z dnia 9 listopada 2020 r.).

### **Tematyka rozprawy**

Metoda autologicznego przeszczepu tkanki jajnikowej poddanej uprzedniej kriokonserwacji stosowana jest w medycynie umożliwiając zachowanie płodności w przypadku konieczności prowadzenia terapii przeciwnowotworowej pacjentek. Daje też szansę na przywrócenie fizjologicznej równowagi hormonalnej i zapobieganie przedwczesnej menopauzie. Przeszczep w miejsce pierwotnej lokalizacji jajnika (ortotopicznie) umożliwia naturalne zajście w ciążę, natomiast transplantacja w inne miejsce (heterotopicznie-przedramię lub okolica brzucha) niesie za sobą konieczność przeprowadzenia zapłodnienia pozaustrojowego. W weterynarii istnieją próby wykorzystania omawianej metody w programach zachowania płodności osobników o najwyższej wartości hodowlanej a przeszczep międzygatunkowy poddawany jest eksperymentom w ramach aplikacji programów ratowania gatunków zwierząt zagrożonych wyginięciem. Metoda jest stosunkowo nowa, perspektywiczna, a z jej wykorzystaniem w praktyce wiązane są duże nadzieje w odniesieniu do medycyny i weterynarii. Niestety efektywność systemów zamrażania tkanki jajnikowej oraz jej przeszczepu po rozmrożeniu nie są zadowalająco wysokie. Samo zamrażanie gonad jest trudne, bowiem duże objętości tkanki utrudniają skuteczną penetrację krioprotektorów. Ponadto chirurgiczna transplantacja nie zawsze jest w pełni udana ze względu na kriouszkodzenia tkanki i zróżnicowanie stopnia jej neowaskularyzacji *in vivo*. Zanim ona nastąpi, dochodzi do niedokrwienia i niedotlenienia gonady oraz stresu oksydacyjnego a to w długiej perspektywie czasowej powodować może zwyrodnieniowe, zanik i zwłóknienie. Ponadto początkowe niedokrwienie stanowić może swoisty czynnik stymulujący, powodując zjawisko „wypalania” puli oocytów (burnout), wskutek rozpoczęcia kaskadowego dojrzewania wielu z nich tuż po transplantacji. W efekcie zjawisko to powoduje gwałtowne kurczenie się rezerwy pęcherzyków. W chwili obecnej prowadzone są poszukiwania metod zwiększania efektywności procedury autotransplantacji w kontekście podtrzymywania/przywracania płodności. Równocześnie istnieją doniesienia naukowe i opinie klinicystów świadczące o pozytywnym wpływie nastrzykania okolicy gonad za pomocą osocza bogatopłytkowego (PRP), zwiększającym powodzenie technik wspomaganego rozrodu w medycynie.

W pracy doktorskiej zaproponowano, aby na modelu szczura poddać badaniom efektywność autotransplantacji mrożonej-rozmrożonej tkanki jajnika do więzadła szerokiego macicy i sprawdzić czy inkubacja *in vitro* i nastrzykanie miejsca transplantacji tkanki jajnikowej za pomocą PRP zwiększa sukces zabiegu.

Pomysł zastosowania osocza bogatopłytkowego jako próby przyspieszenia neowaskularyzacji tkanki gonad jest kreatywny i ciekawy. Z doniesień, niektórych autorów i doświadczeń lekarzy praktyków zajmujących się płodnością człowieka wynika, że PRP może stymulować funkcję jajników i zwiększać efektywność pozyskiwania oocytów. Pomysł zastosowania tej właściwości w stymulacji waskularyzacji transplantowanej tkanki gonad jest twórczy i perspektywiczny. W tym aspekcie wartość pracy dostrzegam głównie w obszarze aplikacyjnym. Należy mieć jednak również na względzie widoczne tło poznawcze przeprowadzonych badań, bowiem obejmują one opis profilu waskularyzacji, organizacji tkankowej oraz czynności endokrynej przeszczepianych gonad na poziomie molekularnym.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że pomysł jest nowy oraz oryginalny i nie ma doniesień na temat stosowania PRP w odniesieniu do autotransplantacji jajników na zastosowanym modelu zwierzęcym. Tematyka pracy jest zatem aktualna i ciekawa zarówno w kontekście poznawczym jak i aplikacyjnym.

### **Ocena merytoryczna**

Praca poprzedzona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim. Streszczenia są napisane poprawnym językiem naukowym i są dobrze przemyślanym skrótowym opisem najważniejszych zagadnień będących przedmiotem rozprawy.



Wstęp i przegląd literatury naukowej podzielony jest na podrozdziały. Autorka w tej części dysertacji zbudowała ciekawy i niezwykle szczegółowy opis stanu wiedzy w obszarze badań będącym przedmiotem opracowania. W pierwszej kolejności opisuje wagę zagadnień związanych z tzw. oncofertility - obszarem zastosowania technik wspomaganie rozrodu u pacjentek onkologicznych w celu podtrzymania ich płodności. Dalej opisuje znaczenie chorób nowotworowych w medycynie człowieka oraz wyjaśnia metody zachowania płodności, gdy stosowana jest terapia gonadotoksyczna, poprzez zastosowanie transplantacji gonad, mrożenia oocytów i zarodków, wykorzystanie analogów gonadoliberyny oraz kriokonserwację i przeszczep jajnika. Opisuje celowość wykorzystania w doświadczeniu PRP, jego skład, właściwości i rodzaje zastosowań w medycynie. Tę część Doktorantka uzupełnia o obszerną tabelę przedstawiającą wybrane składniki PRP o udowodnionym wpływie na jajnik. Wstęp opatrzone jest estetycznymi i przejrzystymi dla czytelnika schematami.

Powyższe opracowanie zawierające przegląd piśmiennictwa jest niezmiernie skrupulatne, wnikliwe i szczegółowe. Autorka bardzo trafnie podzieliła tekst na tematyczne podrozdziały i krok po kroku wprowadza czytelnika w poruszane zagadnienia. Robi to interesująco i w sposób przemyślany. Wiedza Autorki w zakresie opisywanych zagadnień jest głęboka. Widoczna w opracowaniu jest umiejętność posługiwania się językiem naukowym. Jedyna moja uwaga dotyczy dość pobieżnego potraktowania istotnych dla tego rodzaju badań zagadnień dotyczących kriobiologii oraz uwarunkowań stopnia przeżywalności materiału biologicznego poddanego kriokonserwacji. Niezmiernie ciekawym dopełnieniem wstępu byłoby też podanie danych na temat wyników kriokonserwacji fragmentów jajnika w zestawieniu z wynikami kriokonserwacji całej tkanki. Poświęcono temu tylko jeden akapit. W mojej opinii korzystne dla pracy byłoby zaakcentowanie już we wstępie opinii na temat korzyści i strat płynących z kriokonserwacji i przeszczepiania fragmentów tkanki jajnika wobec kriokonserwacji i przeszczepu całej gonady. W tym kontekście wybór kriokonserwacji całej gonady byłby uzasadniony już na początku pracy. Jak wiadomo lepsza penetracja krioprotektorów i wyższa przeżywalność fragmentów tkanki w ocenie *in vitro* po rozmrożeniu niekoniecznie oznacza lepszą efektywność w odniesieniu do rezerwy oocytów po dokonaniu przeszczepu.

Niezależnie od powyższych uwag, uważam wstęp pracy za opracowanie interesujące i fachowe. Tekst ten stanowić może podstawę do przygotowania kilku prac przeglądowych w czasopiśmie o wysokiej reputacji naukowej.

Autorka stawia tezę badawczą stanowiącą, że osocze bogatopłytkowe jest czynnikiem mającym znaczący wpływ na poprawę efektywności przeszczepu i funkcjonalności witryfikowanych tkanek jajnika po przeszczepie na modelu szczurzym.

Doktorantka formułuje jasne cele pracy. Nadrzędnym celem była analiza wpływu osocza bogatopłytkowego na efektywność procedury autologicznego przeszczepu jajnika

Szczegółowe zadania badawcze obejmowały:

1. Opracowanie i wykonanie wzbogaconej osoczem bogatopłytkowym 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 bogatopłytkowego na efektywność procedury przeszczepu tkanek jajnika, poprzez wzbogacenie procedury na etapach inkubacji oraz iniekcji w miejscu wszczepu.



4. Ocena krótko-, średnio- i długotrwałego wpływu osocza bogatopłytkowego na strukturę i funkcje kriokonserwowanych i przeszczepionych tkanek jajnika.

Cele pracy sformułowane są poprawnie a ich realizacja posiada potencjalne znaczenie w kontekście nie tylko poznawczym, ale też aplikacyjnym.

Badania przeprowadzono za zgodą Komisji Biotecznej i zgodnie ze standardami europejskimi i krajowymi. Eksperymentami objęto dojrzałych płciowo 18 szczurów w wieku 12 tygodni szczepu WAG/Rij/W. Od zwierząt pozyskano gonady, które następnie poddawane były witryfikacji według skutecznej metody opracowanej przez innych autorów. Po rozmrożeniu, po okresie wynoszącym ponad 30 dni dokonywano przeszczepu autologicznego jajników w lokalizacji para-ortotopicznej do więzadła szerokiego macicy. Prawy jajnik przed przeszczepem każdorazowo był poddawany inkubacji w PRP. Dodatkowo miejsce przeszczepu prawego jajnika było nastrzyknięte osoczem bogatopłytkowym. Lewy jajnik stanowił kontrolę. Jajniki poddane autotransplantacji i oddziaływaniu PRP były poddawane ocenie po 2, 7 i 30 dniach od dokonaniu transplantacji. Ponadto właściwości tych jajników porównywane były z właściwościami tkanki gonad poddanych jedynie witryfikacji bez przeszczepu. Pozwoliło to na dokonanie obiektywnej oceny dynamiki zmian tkanki poddanej przeszczepowi w odniesieniu do kontroli bazowej. W pracy przeprowadzono bardzo szeroką i zaawansowaną ocenę tkanki jajnikowej za pomocą markerów charakteryzujących status strukturalny i czynnościowy materiału. Przeprowadzono analizę histologiczną liczby pęcherzyków pierwotnych, pierwszo- i drugorzędowych, antralnych oraz opisano stopień zwłóknienia tkanki. Za pomocą metod immunohistochemicznych (CD-31 marker nowo powstałych naczyń krwionośnych) ocenie poddano stopień waskularyzacji tkanki. Do oceny nasilenia apoptozy zastosowano metodę TUNEL przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Ocenie poddano również ekspresję mRNA hormonu AMH i jego receptora, receptora progesteronowego i receptorów estrogenowych alfa i beta oraz czynnika martwicy nowotworów. Analizę statystyczną wyników przeprowadzono za pomocą adekwatnej metodyki m.in. z wykorzystaniem analizy wariancji ANOVA oraz testów porównań wielokrotnych Tukeya i Sidaka.

W moim odczuciu trudno znaleźć w metodyce słabe punkty. Czytając tekst zwróciłem uwagę, iż nieco brakuje podkreślenia w rozdziale faktu, że Autorka pracuje nie na fragmentach tkanek, a na całych gonadach. To ważna informacja, co do której musiałem się upewnić czytając powtórnie inne rozdziały pracy. Według mnie wykorzystanie w dysertacji oznaczenia markerów inicjalnych etapów apoptozy a nade wszystko przeprowadzenie oceny nasilenia stresu oksydacyjnego w przeszczepianej tkance wzbogaciłoby eksperyment, dostarczyłoby cennych informacji i stanowiłaby dopełnienie przeprowadzonych badań. Z racji osobistych zainteresowań nieco brakuje mi w schemacie doświadczenia bazowego punktu odniesienia, jakim byłaby tkanka jajnika nie poddana kriokonserwacji. Niełatwo bowiem znaleźć w tekście informacje na temat tego, w jakim stopniu badane gonady uległy uszkodzeniom kriogenicznym, jaka część oocytów przed przeszczepem znajduje się w stanie destrukcji i czy czasem zjawiska obserwowane po przeszczepie tkanki nie wynikają w dużym stopniu ze stopnia uszkodzenia tkanki w wyniku mrożenia-rozmrażania. To ważne dane, które dałyby szersze i bardziej wyczerpujące spojrzenie na omawiane zagadnienia. Dodanie tego rodzaju kontroli wzbogaciłoby pracę i być może stanowiłoby przyczynek do poszukiwań optymalizacji warunków konserwacji tkanki jajnika.

Niezależnie od powyższych uwag, które są wyrazem dążenia do konstruktywnej dyskusji uważam metodykę za rzetelnie opracowaną. Wykorzystany materiał i zastosowane metody badawcze są trafne. Metodyka badań jest bogata i wymagała niezwykle szerokich umiejętności. Konieczne było przygotowanie materiału do badań, ocena histologiczna i histochemiczna, analiza ekspresji mRNA, ocena apoptozy a też prowadzenie zabiegów na zwierzętach laboratoryjnych. Tak szeroki wachlarz metodyczny zasługuje na uznanie.



Wykonanie pracy laboratoryjnej wymagało ogromnej wiedzy, umiejętności i konsekwencji. Pragnę dodać, iż schemat doświadczenia został zaprojektowany bardzo klarownie. Ten ambitny projekt został rzetelnie zrealizowany, a zaawansowana metodyka jest adekwatna do charakteru prowadzonych badań.

Omówienie wyników zostało opracowane przez Autorkę przejrzysto i zobrazowane jest czytelnymi rycinami. Doktorantka opisuje kolejno oceniane parametry i ilustruje opis wykresami z zaznaczeniem istotności statystycznej. Wyniki obserwacji tkanki jajnikowej dokonane po 2 i 7 dniach po przeszczepie świadczą o tym, że model autoprzeszczepu powiódł się w krótko- i średnioterminowym przedziale czasu obserwacji i że osocze bogatopłytkowe wpływa pozytywnie na opisywane właściwości tkanki jajnikowej. Zmiany degeneracyjne i fibroza nie pozwoliły na miarodajną analizę wyników w 30 dniu po zabiegu transplantacji. Wykazano, że PRP zwiększa efektywność procedury o czym świadczy większe nasilenie neowaskularyzacji, mniejszy stopień apoptozy, większa pula pęcherzyków pierwotnych i pierwszorzędowych, co świadczy o ograniczeniu zjawiska „wypalania” pęcherzyków. Analiza na poziomie ekspresji mRNA receptorów steroidozależnych oraz AMH wskazały również na korzystny wpływ w osocza bogatopłytkowego. Tekst tego rozdziału został starannie zredagowany, a kolejność prezentowanych wyników i podział na podrozdziały jest przejrzysty i zrozumiały.

W rozdziale Omówienie wyników i dyskusja Doktorantka daje wyraz niezwykle szerokiego oglądu w zakresie opracowywanych zagadnień. Rozdział ten podzielony jest ponownie na podrozdziały logicznie powiązane z odpowiednimi podrozdziałami Materiałów i Metod oraz Wyników, co ułatwia przyswajanie informacji. Autorka ze znajomością tematu dogłębnie komentuje i wyjaśnia uzyskane rezultaty oraz tłumaczy zależności i korelacje. Dowodzi to z jednej strony dużej wiedzy, jak i świadczy o swobodnym posługiwaniu się językiem naukowym.

W pracy sformułowano 4 syntetyczne wnioski:

1. Prezentowany model wzbogaconej osoczem bogatopłytkowym procedury autologicznego przeszczepu witrifikowanych tkanek jajnika z użyciem szczurów, opracowany i wykorzystany w niniejszej pracy badawczej umożliwia trafną i rzetelną ocenę wpływu osocza bogatopłytkowego na przeżywalność i funkcjonalność przeszczepionych tkanek.
2. Wzbogacenie badanej procedury poprzez dodatek osocza bogatopłytkowego przyspiesza neowaskularyzację, zwiększa obszar neowaskularyzacji oraz zachowuje fizjologiczny poziom procesów rekrutacji i hamowania wzrostu pęcherzyków w witrifikowanych tkankach jajnika, a także zmniejsza odsetek apoptozy 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 osocza bogatopłytkowego na etapie inkubacji po ogrzaniu oraz w formie iniekcji lokalnej w okolicy przeszczepu zwiększa efektywność autologicznego przeszczepu witrifikowanych tkanek jajnika.
4. Wzbogacenie procedury przeszczepu tkanek jajnika poprzez dodatek osocza bogatopłytkowego wywiera pozytywny krótko- i średnio- trwały wpływ na strukturę i funkcje witrifikowanych i przeszczepionych tkanek jajnika, a także znacznie ogranicza efekt wypalenia rezerwy pęcherzykowej.

Wnioski sformułowano jasno. Są one przyporządkowane logicznie celom pracy i zadaniom badawczym. Jednak w moim odczuciu wniosek drugi i trzeci oznaczają niemal to samo i sugeruję, aby połączyć je w jeden i zacząć go „Wzbogacenie procedury przeszczepu tkanek jajnika przez dodatek osocza bogatopłytkowego zwiększa efektywność autologicznego



przeszczepu witryfikowanych tkanek jajnika:...” i uzupełnić tekstem wniosku drugiego.

Spis piśmiennictwa przedłożonej pracy zawiera bardzo bogaty zasób danych źródłowych zawierający aż 283 pozycje, głównie artykułów opublikowanych w ostatnich latach w liczących się czasopismach z listy JCR.

### **Podsumowanie oceny pracy:**

Do szczególnych zalet przedłożonej pracy zaliczam:

- kreatywny pomysł na przeprowadzenie doświadczenia wpisującego się w aktualne kierunki nowoczesnych badań aplikacyjnych
- rzetelnie przygotowany manuskrypt pracy o rozsądnie zaprojektowanym podziale na rozdziały i napisany dojrzałym językiem naukowym
- zaawansowany warsztat metodyczny Autorki, wymagający posiadania szerokiej wiedzy, umiejętności, pracowitości i cierpliwości
- umiejętność prowadzenia głębokiej dyskusji naukowej
- rezultaty o potencjale aplikacyjnym, które mogą być pomocne w praktyce klinicznej.

Z drugiej strony moje uwagi na temat pracy, które przytoczyłem powyżej to:

- bardzo oszczędne potraktowanie zależności pomiędzy uszkodzeniami kriogenicznymi a efektywnością autotransplantacji
- brak uwzględnienia w badaniach grupy kontrolnej w postaci tkanki jajnikowej bez uszkodzeń kriogenicznych
- podobieństwo brzmienia wniosku 2 i 3, co skłania mnie do zasugerowania przeredagowania polegającego na połączeniu ich w jeden wniosek

### **Uwagi końcowe:**

Recenzowana praca doktorska mgr Anny Niwińskiej prezentuje wysoki poziom naukowy. Temat pracy jest nowatorski i istotny dla rozwoju Dyscypliny Weterynaria, posiadając duży potencjał aplikacyjny. W dysertacji wykorzystano zaawansowaną metodykę. Doktorantka wykorzystywała w pracy szeroki wachlarz technik badawczych, świadczący o Jej wysokich kompetencjach naukowych.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Anny Niwińskiej jest prawidłowo opracowanym edytorsko, metodycznie i formalnie oraz oryginalnym osiągnięciem naukowym wnoszącym istotny wkład w rozwój reprezentowanej Dyscypliny i spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm). Na tej podstawie wnoszę do Rady Dyscypliny Weterynaria SGGW o dopuszczenie Autorki rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto z uwagi na kreatywnie i nowocześnie zaprojektowane doświadczenie, wyjątkowo bogatą metodykę pracy, wymagającą ogromnej wiedzy i umiejętności oraz z uwagi na osiągnięte nowatorskie wyniki cechujące się walorami aplikacyjnymi, uważam pracę za wybitną i świadczącą o wysokich kompetencjach Doktorantki. Wnoszę zatem o wyróżnienie pracy stosowną Nagrodą w SGGW.

Wojciech Nizański

