

Prof. dr hab. S. Zduńczyk

7.02.2023.

Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

UW-M w Olsztynie

## Ocena

pracy doktorskiej mgr Anny Niwińskiej „Ocena wpływu osocza bogatopłytkowego na autologiczny przeszczep jajnika w procedurze zachowania płodności na modelu szczurzym”

Kriokonserwacja i autologiczny przeszczep tkanki jajnikowej uznawana jest od niedawna za metodę zachowania płodności u kobiet poddawanych terapii przeciwnowotworowej. Skuteczność tej metody wynosi ok. 25%. Jednym z problemów dotyczących przeszczepiania tkanki jajnikowej jest przejściowy stres ischemiczny, zanim nastąpi rewaskularyzacja przeszczepionej tkanki. Może on prowadzić do nagłej aktywacji wzrostu pęcherzyków jajnikowych wkrótce po przeszczepieniu tkanki jajnikowej i utraty rezerwy jajnikowej. Zjawisko to określa się to jako syndrom wypalenia się (burnout syndrome) pęcherzyków. Prowadzone są badania nad opracowaniem metod ograniczających negatywny wpływ przejściowego niedokrwienia i niedotlenienia przeszczepionych tkanek jajnika. Osocze bogatopłytkowe zawiera wiele czynników wpływających na funkcje tkanki jajnikowej, w tym wpływające na angiogenezę, jak transformujący czynnik wzrostu beta 1 (TGF- $\beta$ 1), trombospondyna 1 (TSP-1) i czynniki wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGFs). Badania dotyczące wpływu osocza bogatopłytkowego na funkcję jajników są bardzo nieliczne i dotyczą jego dojazdowej iniekcji. Wpływ osocza bogatopłytkowego na przeszczepioną tkankę jajnikową nie był jeszcze badany. Badania Doktorantki nad wpływem osocza

bogatopłytkowego na autologiczny przeszczep jajnika dotyczą więc ważnej, aktualnej problematyki i mają pionierski charakter.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 150 stron maszynopisu, 19 rycin, 5 fotografii i 1 tabelę umieszczonych w tekście pracy. Składa się ona ze streszczenia w j. polskim i angielskim, spisu treści, wykazu skrótów, wstępu i przeglądu literatury, założeń i celu pracy, opisu materiałów i metod, omówienia wyników i dyskusji, wniosków, spisu fotografii, rycin i tabel oraz bibliografii.

We wstępie i przeglądzie literatury Doktorantka opisuje występowanie chorób nowotworowych u kobiet, gonadotoksyczność terapii przeciwnowotworowych, procedury zachowania płodności, czynniki wpływające na efektywność przeszczepu tkanki jajnika, kierunki badań związanych z kriokonserwacją tkanki jajnika na modelach zwierzęcych oraz omawia osocze bogatopłytkowe jako czynnik wspomagający neowaskularyzację przeszczepionej, kriokonserwowanej tkanki jajnika i jego zastosowanie w medycynie rozrodu. Wstęp jest napisany przystępnie, w oparciu o odpowiednio dobrane, aktualne piśmiennictwo.

Doktorantka postawiła hipotezę, że osocze bogatopłytkowe jest czynnikiem mającym znaczący wpływ na poprawę efektywności przeszczepu i funkcjonalności witryfikowanych tkanek jajnika po przeszczepie. Głównym celem badań przeprowadzonych przez Doktorantkę była analiza wpływu osocza bogatopłytkowego na efektywność procedury autologicznego przeszczepu jajnik na modelu szczurzym. Szczegółowe zadania badawcze obejmowały:

1. Opracowanie i wykonanie wzbogaconej osoczem bogatopłytkowym procedury autologicznego przeszczepu tkanek jajnika u szczurów jako modelu translacyjnego dla człowieka.
2. Ocenę przebiegu i nasilenia angiogenezy i apoptozy oraz rekrutacji i hamowania wzrostu pęcherzyków w kriokonserwowanych tkankach jajnika po autologicznej transplantacji.

3. Ocenę wpływu osocza bogatopłytkowego na efektywność procedury przeszczepu tkanek jajnika, poprzez wzbogacenie procedury na etapach inkubacji oraz iniekcji w miejscu wszczepu.

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

Badania przeprowadzono na 18 samicach szczurów szczepu WAG. Samice zostały poddane ovariectomii, a jajniki poddano witrifikacji. Po 30 dniach rekonwalescencji szczury poddano zabiegowi autologicznej transplantacji. Po rozmrożeniu prawe jajniki inkubowano przez 15 minut w roztworze soli fizjologicznej typu Dulbecco (DPBS) z dodatkiem osocza bogatopłytkowego (PRP), a lewe jajniki inkubowano w DPBS jako próbę kontrolną. Jajniki przeszczepiono na najbardziej unaczyniony brzeg więzadła szerokiego macicy w modelu jajnik prawy +PRP, jajnik lewy- kontrolny. Po prawej stronie przeszczepu również wstrzyknięto ok. 100-200  $\mu$ l PRP. Zwierzęta uśmiercono po 2 (D2), 7 (D7) i 30 (D30) dniach i pobrano tkanki. Liczbę pęcherzyków i analizę histopatologiczną wykonano za pomocą barwienia trójbarwnego typu Massona. Wykonano ocenę apoptozy (immunofluorescencyjne barwienie TUNEL) i unaczynienia tkanki (immunohistochemiczne barwienie PECAM-1). Analizę względnej ekspresji mRNA przeprowadzono dla: receptorów estrogenowych  $\alpha$  (ESR $\alpha$ ) i  $\beta$  (ESR $\beta$ ), hormonu anty-Müllerowskiego (AMH) i jego receptora (AMHR2), receptora progesteronowego (PGR) i czynnika martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) za pomocą sond TaqMan techniką rt PCR.

Stwierdzono większą liczbę pęcherzyków pierwotnych, pierwszorzędowych, drugorzędowych i antralnych w D2 i D7 w grupie badanej względem grupy kontrolnej. Wykazano niższą wartość wskaźników apoptozy w grupie badanej niż w grupie kontrolnej w D2 i D7. Stwierdzono większą liczbę i gęstość naczyń w grupie z PRP niż w grupie kontrolnej po 7 dniach od przeszczepu (D7), a także wykazano istotne statystycznie korelacje pomiędzy liczbą pęcherzyków a gęstością naczyń. Wykazano różnicę ekspresji mRNA PGR, ESR $\beta$  i ESR $\alpha$  w tkankach jajnika pomiędzy grupami badaną i kontrolną w D7. Stwierdzono wyższą ekspresję



AMH w grupie z PRP w D2 i D7. Uzyskane wyniki wskazują, że osocze bogatopłytkowe podawane bezpośrednio przed oraz w czasie samej procedury autologicznego przeszczepu jajnika wywiera krótko- i średnioterminowo pozytywny wpływ na zachowanie prawidłowej struktury i funkcji przeszczepionej tkanki jajnikowej. W grupie D30 cykl rujowy wystąpił u 2 szczurów, u pozostałych 3 szczurów badania histologiczne tkanki jajnika wykazały cechy zwłóknienia, przerastania tkanką tłuszczową i zaawansowanej apoptozy. Nie stwierdzono również statystycznie istotnych różnic w ekspresji mRNA badanych czynników w porównaniu z grupą kontrolną.

Dyskusja jest napisana interesująco. Doktorantka dokonuje w niej wyważonej interpretacji wyników badań własnych i konfrontuje je z danymi z piśmiennictwa.

Z przeprowadzonych badań wyciągnięto 4 wnioski, wynikające z uzyskanych rezultatów.

Badania przeprowadzone przez Doktorantkę mają duże znaczenie naukowe. Dostarczyły one nowych danych o wpływie osocza bogatopłytkowego na efektywność przeszczepu i funkcjonalność witryfikowanych tkanek jajnika na modelu szczurzym.

Recenzowana praca posiada również pewne niedociągnięcia. Nie podano miejsca wykonywania zabiegów operacyjnych (Centrum Medycyny Translacyjnej SGGW?). We wnioskach nie odniesiono się do długoterminowego (D30) wpływu osocza bogatopłytkowego na przeszczep jajnika. W wykazie skrótów receptor estrogenowy określany jest jako ER, w tekście pracy jako ESR. Doktorantka używa określenia „hormon antymullerowski”, prawidłowo powinno być „hormon antymüllerowski” lub „anty-Müllerowski”. Autorzy cytowanych prac podawani są w bibliografii w różny sposób (pierwszy autor et al., kilku autorów et al., wszyscy autorzy)

Przedstawione uwagi mają charakter redakcyjny i nie obniżają wysokiej oceny recenzowanej pracy, wynikającej z aktualności problematyki, pionierskiego charakteru badań, nowoczesności metod badawczych oraz naukowego znaczenia uzyskanych wyników.

Recenzowana praca doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2022 r., poz. 574 z późn. zm.).

Biorąc powyższe pod uwagę wnoszę o dopuszczenie mgr Marty Niwińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie jej pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. S. Zduńczyk

