

Olsztyn, 14.02.2025 r.

dr hab. Anna Rapacz-Leonard, prof. UWM
Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
UWM w Olsztynie
ul. Oczapowskiego 14
10-719 Olsztyn

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Łukasza Przemysława Zdrojkowskiego

pt. „Ekspresja mRNA czynników wzrostu
i transformacji fibroblastów w błonie śluzowej macicy klaczy względem nasilenia
endometrozy i zmian histopatologicznych”

Rozprawa doktorska lek. wet. Łukasza Przemysława Zdrojkowskiego oparta jest na monografii.

Endometroza u klaczy to przewlekła choroba polegająca na powstaniu zwłóknień w obrębie endometrium i jego zwyrodnieniu, co powoduje niepłodność. Najczęściej występuje u zwierząt starszych, zwłaszcza wieloródek. Na częstotliwość i zaawansowanie występowania endometrozy najprawdopodobniej wpływają nawracające stany zapalne endometrium (endometritis). W rozprawie doktorskiej przedstawiono wnikliwą analizę tego schorzenia, podkreślając znaczący wpływ chorób macicy na wskaźniki płodności u koni. W pracy autor metodycznie bada związek między ekspresją różnych genów — THY1, IGF1, PDGFRA i MKI67 i innych — a stopniem zaawansowania endometrozy, na podstawie wykonanych badań histopatologicznych oraz systemu klasyfikacji Kenneya i Doiga.

Oceniana praca doktorska obejmuje 143 strony maszynopisu, w tym 36 tabel i 16 rycin. Tekst pracy został podzielony w typowy dla prac naukowych sposób na rozdziały główne i podrozdziały, co ułatwia lekturę. Układ redakcyjny rozprawy jest prawidłowy. W pracy, po stronie tytułowej i oświadczeniach, zamieszczono przejrzysty spis treści oraz wykaz skrótów co ułatwia czytanie i zrozumienie tekstu. Praca zawiera również streszczenie w języku angielskim oraz wykaz licznej bibliografii (181 pozycji).

Wstęp i przegląd piśmiennictwa

We wstępie Autor zwięźle nakreślił problem niskiej płodności u koni ukierunkowując czytelnika na problem endometrozy i dlatego jest ona jedną z przyczyn niepłodności. W kolejnym rozdziale pt. „Przegląd literatury” Autor opisuje budowę anatomiczną ściany macicy, jej mechanizmy odporności i czynniki, które mogą wpływać na obniżenie płodności klaczy. Następnie Autor w sposób obszerny i bardzo szczegółowy opisuje problem samej endometrozy u koni, jej patogenezę, diagnostykę i kończy ten rozdział na czynnikach THY1, IGF1, PDGFRA i MKI67, których to ekspresję i korelacje później przedstawia w wynikach swojej pracy doktorskiej. Rozdział ten jest bardzo rzetelnie opisany, cytując szeroką listę literatury i odnosząc się możliwie do wszystkich czynników, jakie do tej pory zostały opisane w potencjalnej patogenezie tej choroby.

O ile cały rozdział, jak wspomniałam wcześniej, jest rzetelnie napisany, tak wkrađło się tutaj kilka niejasności. W rozdziale tym na stronie 25 Autor wspomina o endometrozie niszczącej, ale dopiero na stronie 28 podaje na czym ta podjednostka endometrozy polega. Takie wyjaśnienie powinno się znaleźć już przy pierwszej wzmiance takiego podziału. Na stronie 33 Autor wspomina o badaniach nad sivelestat i noskapiną i o ich potencjalnej roli w terapii endometrozy, natomiast nie podał tutaj, że cytowane przez niego badania były jedynie badaniami in-vitro, a jest to ważne z punktu widzenia klinicysty. W tym rozdziale zabrakło rozważań na temat definicji płodności i jak interpretuje ją sam Autor. Definicja ta jest różnie rozumiana przez wielu autorów. Jedni zakładają, że płodność to możliwość samego poczęcia potomka (do zdiagnozowania ciąży), podczas gdy drudzy, że to zdolność do urodzenia potomka. U koni aspekt ten również różnie jest interpretowany (zwłaszcza jeżeli chodzi o wyniki skali Kenneya i Doiga, której Autor używa w badaniach). Kenney w swojej pracy z 1978 odnosi się do odsetka klaczy ożrebionych, podczas gdy większość późniejszych autorów pisze o odsetku zdiagnozowanych ciąży.

Cele pracy i hipoteza badawcza

Autor postawił sobie pięć celów badawczych. Cele te zostały określone jasno i precyzyjnie, co jest niewątpliwym plusem tej dysertacji. Ocena wpływu ekspresji THY1, IGF1, PDGFRA i MKI67 na występowanie zmian histopatologicznych w endometrium objętym endometrozą i na nasilenie występowania samej endometrozy jest jak najbardziej uzasadniona biorąc pod uwagę informacje przedstawione w przeglądzie literatury. Ponadto podjęcie się zbadania interakcji pomiędzy ekspresją poszczególnych genów (wspomnianych powyżej) a zmianami histopatologicznymi w endometrium klaczy z endometrozą jest bardzo ciekawe. W

hipotezie badawczej wdarł się błąd, Autor nie badał białka tylko ekspresję genów, więc hipoteza badawcza powinna brzmieć „Geny Thy1, IGF1 i PDGFR α biorą udział...”.

Materiały i metodyka badań

Rozdział ten, podobnie jak wcześniejszy, jest omówiony jasno, tak że czytający pracę nie ma problemów ze zrozumieniem tego rozdziału. Materiał badawczy stanowiły 72 macice pobrane poubojowo od klaczy, ale zabrakło tutaj informacji z którego miejsca w macicy zostały pobrane wycinki. Na podstawie badania histologicznego do dalszych badań zakwalifikowano 47 wycinków (obejmujących całą grubość ściany macicy). Tutaj próbki zostały podzielone na pięć kategorii: I (10 próbek), I+ (7 próbek), IIA (11 próbek), IIB (9 próbek) i III (10 próbek). Tutaj też zabrakło opisu, jak Autor obliczył wymaganą liczbę próbek, czyli wielkość próby do zapewnienia mocy testu (mocy statystycznej) wykonywanych później analiz.

Następnie próbki zostały poddane bardzo szczegółowemu badaniu histologicznemu, uwzględniając wszystkie możliwe aspekty rozwijającej się endometrozy, co jest niewątpliwym plusem przedstawionej rozprawy. Drugim etapem badania były badania molekularne. Z próbek po rozmrożeniu zostało wyizolowane RNA i wykonano analizy qPCR. Przy opisie izolacji RNA zabrakło opisu jak została sprawdzona jakość RNA i jakie parametry uzyskano. Przy opisie metody qPCR Autor użył dwóch genów referencyjnych SDHA i GAPDH, co jest obecnie standardem i dużym plusem pracy. Autor niestety nie wyjaśnił na jakiej podstawie zdecydował się na właśnie te geny referencyjne w swoich badaniach a nie inne. Również wdarł się tutaj błąd literowy, ponieważ skrót dla dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego to GAPDH a nie GADPH. Użycie sond TaqMan jest bardzo dużym atutem przedstawionej pracy, niejasne jest natomiast co oznaczają numery przy poszczególnych badanych genach np. Ec03470487. Nie jest to numer katalogowy sondy ani numer genu w GenBank. W każdej reakcji qPCR Autor wykonał 3 powtórzenia techniczne, co jest bardzo wielką zaletą i mocną stroną metodyki. Sekcja ta jest niestety dość pokrótce opisana i nie wymienia wielu parametrów, które powinny być opisane przy analizach qPCR:

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19246619.

Bustin SA, Wittwer CT. MIQE: A Step Toward More Robust and Reproducible Quantitative PCR. Clin Chem. 2017 Sep;63(9):1537-1538. doi: 10.1373/clinchem.2016.268953. Epub 2017 Jun 12. PMID: 28606913.

Analizy statystyczne wykonano przy użyciu oprogramowania IBM SPSS, co świadczy o szerokiej wiedzy Autora i dobrej znajomości statystyki, ponieważ program SPSS powszechnie uznawany jest za trudny w obsłudze i wymagający zaawansowanej wiedzy. W rozdziale tym zabrakło jednak informacji jak Autor skorygował problem wielokrotnych porównań i korelacji.

Przedstawienie i omówienie wyników

Wyniki otrzymane przez Autora zostały przedstawione szczegółowo i starannie. Struktura wyników jest przejrzysta. Wyniki dotyczące ekspresji THY1 dostarczają intrygujących spostrzeżeń na temat jego roli w interakcjach komórkowych z macierzą pozakomórkową (ECM) i sugerują jego potencjalną funkcję we wczesnym stadium endometrozy. Z drugiej strony, negatywna korelacja między ekspresją IGF1 a ciężkością zmian histopatologicznych podnosi krytyczne pytania, dotyczące jego roli w zdrowiu endometrium i procesach regeneracyjnych. Ta dychotomia podkreśla złożoność patologii macicy u klaczy i konieczność dalszych badań nad mechanizmami, które są w to zaangażowane. Rozprawa doktorska wnosi cenny wkład w zrozumienie endometrozy u klaczy, łącząc ocenę histologiczną z analizą ekspresji genów, aby zapewnić nowe spojrzenie na postęp choroby. Przyszłe badania, które będą się opierały na przedstawionych wynikach, mogą dalej wyjaśniać patogenezę endometrozy na poziomie białek.

Największym minusem tej sekcji jest brak wizualnego przedstawienia wyników ilościowych. Wszystkie wyniki zostały zamieszczone w tabelach i czytelnikowi trudno jest się w nich poruszać. Wszystkie ryciny podpisane są „Obraz mikroskopowy błonie śluzowej...”, a powinno być „Obraz mikroskopowy błony śluzowej...”. Przy opisywaniu istotnych lub nie różnic w wynikach, Autor pominął słowo „statystycznie”. W tabelach 17 do 25 przedostatni rząd zatytułowany jest „Łącznie”, ale nie jest jasne, do czego to się odnosi. Na stronie 96 Autor wymienia wyniki z tabeli 36, ale zabrakło omówienia tych wyników.

Dyskusja i wnioski

Dyskusja uzyskanych wyników jest wnikliwa i dowodzi wiedzy Doktoranta. Napisana jest spójnie. Widoczna jest umiejętność samodzielnej oceny danych z piśmiennictwa. Na uwagę zasługuje bardzo ciekawy rozdział nr 6.14. „Rekomendacje dla modyfikacji oceny zmian histopatologicznych w endometrium w przebiegu endometrozy”. Wnioski są rzeczowe i prawidłowe. W weryfikacji hipotezy badawczej wdarł się błąd, Autor nie badał białka tylko

ekspresję genów, więc to zdanie powinno brzmieć „Geny Thy1, IGF1 i PDGFR α biorą udział...”.

Na stronie 100 wdarł się kolejny błąd do zdania „...stąd również w prezentowanych badaniach Thy1 może w zwiększać interakcje pomiędzy..”, powinno być „...Thy1 może zwiększać...”. Na stronie 113 przy opisywaniu wybieranego miejsca do pobrania wycinków/biopsji zabrakło komentarza Autora, że ogranicza nas długość biopsatora i to właśnie jego rozmiary wyznaczają jak głęboko możemy pobrać biopsję in-vivo.

Literatura

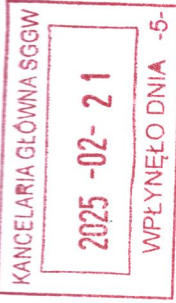
Spis literatury to 181 pozycje przedstawione w sposób ujednolicony. Przywołane prace są odpowiednio wybrane, dawne i aktualne związane z tematem pracy.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że uwagi i spostrzeżenia nie umniejszają wartości merytorycznej pracy. Pracę oceniam pozytywnie. Doktorant przeprowadził badanie naukowe i wykazał dojrzałość w definiowaniu zadań badawczych i doborze materiałów i metod. Autor wykazał się umiejętnością formułowania logicznych wniosków i korzystania z danych literaturowych. Przedstawione przez lek. wet. Łukasza Zdrojkowskiego badania przyczynią się do rozwoju wiedzy o endometrozie u kłacz. Wyrażam nadzieję, że badania Doktoranta w tym zakresie będą nadal przez Niego kontynuowane.

Recenzowana rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 poz. 1571). W związku z powyższym przedstawiam Radzie Dyscypliny Weterynaria, Instytutu Medycyny Weterynaryjnej, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie Pana lek. wet. Łukasza Przemysława Zdrojkowskiego do dalszych etapów postępowania mającego na celu nadanie stopnia naukowego doktora.

J. Rapała - Leonard

LI WARSZAWSKO-WIAZURON
w Olsztynie
DYCYN WETERYNARYJNEJ
rozrodu Zwierząt z Klinika
w. ul. Oczapowskiego 14
p. 83 523 34 97



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

Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

ul. Nowoursynowska 159

02-776 Warszawa

59007734273091733



659007734273091733



Polska

pobrana — zł — gr

2024



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

