

Prof. dr hab. n. wet. Roland Kozdrowski
Katedra Chorób Wewnętrznych i Diagnostyki
UP w Poznaniu, Ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań

Poznań 29.01.2025 r.

Recenzja

pracy 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*

wykonanej w Katedrze Chorób Dużych Zwierząt i Klinice, Instytutu Medycyny

Weterynaryjnej, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

pod kierunkiem dr. hab. Bartosza Pawlińskiego, prof. SGGW

i promotora pomocniczego pani dr Małgorzaty Wierzbickiej

Praca doktorska lek. wet. Łukasza Przemysława Zdrojkowskiego ma tradycyjną formę wydruku komputerowego, liczącą 143 strony w ramach których zostały zawarte następujące rozdziały: streszczenie w języku angielskim, wykaz skrótów, wstęp oraz przegląd piśmiennictwa, cel pracy i hipoteza badawcza, materiał i metodyka badań, przedstawienie i omówienie wyników, dyskusja, wnioski oraz literatura. Układ pracy jest poprawny, zgodny z ogólnie przyjętymi normami, choć rozdział *Przedstawienie i omówienie wyników* powinien być zatytułowany krótko tj. Wyniki, bowiem jest to prezentacja uzyskanych wyników, a ich omówienie jest zawarte w rozdziale *Dyskusja*.

We *Wstępie* pracy doktorskiej Autor położył duży nacisk na przedstawienie zależności pomiędzy wiekiem, występowaniem chorób narządu płciowego, a potencjałem rozrodczym klaczy. Jest to bardzo dobre wprowadzenie czytelnika w problemy analizowane w pracy doktorskiej, ponieważ zmiany degeneracyjne zachodzące w macicy w dużym stopniu nasilają się wraz z upływem wieku klaczy. Ten tok myślenia oraz opis procesów zachodzących w macicy wraz z postępującym wiekiem klaczy jest kontynuowany i szczegółowo omawiany w rozdziale *Przegląd piśmiennictwa*.

Doktorant wylicza w tym rozdziale czynniki ryzyka związane ze zmniejszaniem się potencjału rozrodczego klaczy, opisując jednocześnie szczegółowo budowę błony śluzowej macicy, zwracając uwagę na rolę macierzy zewnątrzkomórkowej w prawidłowym funkcjonowaniu endometrium oraz analizując dogłębnie cały szereg mechanizmów zaangażowanych w prawidłową funkcję i mechanizmy obronne endometrium, równolegle szczegółowo przedstawiając aktualną wiedzę z zakresu patogenezy i diagnostyki endometrozy.

W mojej opinii przegląd piśmiennictwa jest nieco zbyt obszerny, momentami za bardzo wchodzący w zagadnienia nie będące bezpośrednio powiązane z badanymi przez Doktoranta problemami. Również, czasem, przegląd piśmiennictwa zupełnie niepotrzebnie przyjmuje charakter dyskusji nad wynikami uzyskanymi przez innych autorów lub polemiki nad hipotezami wysuwanymi w innych opracowaniach. Taka polemika powinna być zarezerwowana i musi być nieodzowną częścią omówienia wyników badań własnych. W tych częściach pracy doktorskiej napotkałem pewne nieścisłości lub niepoprawne sformułowania np.: Str. 16, cytuję: „...występują receptory oksytocynowe, których ekspresja w cyklu jajnikowym jest stała, a zmniejsza się w trakcie ciąży”. Wydaje się nieprawdopodobne aby w fazie pęcherzykowej i dominacji ciała żółtego ekspresja receptorów oksytocynowych była taka sama. Str. 18, cytuję: „gęstość gruczołów macicznych w endometrium”. Czy gruczoły maciczne występują poza endometrium? Str. 20, cytuję: „...stwierdza się w biopsjach”. Powinno być stwierdza się w biopsjach lub najlepiej powiedzieć w wycinkach.

Niemniej, szczegółowa analiza piśmiennictwa przeprowadzona przez doktoranta wskazuje na jego bardzo dobre przygotowanie do prowadzenia badań i do analizy uzyskanych w ramach pracy doktorskiej wyników tematycznie związanych z etiopatogenezą endometrozy.

Materiał do badań został pobrany poubojowo. Niejasno sprecyzowana jest klasyfikacja cyklu płciowego klaczy w oparciu o analizę makroskopową struktur znajdujących się na jajnikach. Tzn. u klaczy ciało żółte może przyjąć formę ciała żółtego litego (częściej) lub krwotocznego, kiedy owulacji towarzyszy znaczne krwawienie do jamy pęcherzyka. Te dwie formy ciała żółtego nie różnią się praktycznie pod względem funkcjonalnym, a jedynie morfologicznym. Nie jestem pewien, czy przyjęte kryterium bazujące na podstawie braku ciała żółtego i obecności pęcherzyków powyżej 20 mm jest wystarczające do zakwalifikowania cyklu jako fazy pęcherzykowej. Klinicznie w większości przypadków objawy rujowe pojawiają się przy obecności pęcherzyka

dominującego o średnicy powyżej 30 mm. Brak ciała żółtego i obecność licznych pęcherzyków powyżej 20 mm jest np. typowy dla wiosennego okresu przejściowego. Tymczasem nie ma podanych informacji odnośnie pory roku w jakiej pobierano próbki. Pobieranie materiału poubojowo ma również inne wady, bowiem z pobranych 72 wycinków zakwalifikowano jedynie 47, ponieważ pozostałe 25 wycinków cechowało się intensywnym naciekiem zapalnym z minimalnym nasileniem zmian zwyrodnieniowych, co wskazuje na ostry proces zapalny i pośrednio na młody wiek klaczy. Ta sytuacja pokazuje, że materiał rzeźniany ma ograniczoną przydatność, bowiem nie ma w przypadku tak pobranego materiału dostępnych, istotnych z klinicznego punktu widzenia informacji dotyczących wieku klaczy i historii rozrodu (tj. ilości porodów, ronień, historii wczesnej zamieralności zarodków, ewentualnych objawów klinicznych związanych z chorobami macicy, czy też informacji o podjętych próbach leczenia). Jednakże tak pozyskany materiał do badań bez wątplenia jest przydatny do realizacji założonych celów w pracy doktorskiej.

Pobrane wycinki oceniano wg klasyfikacji wg Kenney'a i Doiga, gdzie dodatkowo wyodrębniono kategorię I+, cechującą się obecnością nielicznych zmian świadczących o zapoczątkowaniu procesów degeneracyjnych, jednak nie branych pod uwagę w standardowej ocenie lub cechujących się niezmiernie małą intensywnością. Wg mnie jest to dobry krok i słuszne rozumowanie, przy czym proszę o wskazanie jakie zmiany i w jakim nasileniu były brane pod uwagę. W sumie stworzono pięć grup porównawczych tj. kategoria I (n=10) jako grupa kontrolna, kategoria I+ (n=7), kategoria IIA (n=11), kategoria IIB (n=9) oraz kategoria III (n=10). Jest to prawidłowe z metodycznego punktu widzenia tworzenie grup porównawczych w oparciu o analizę histopatologiczną wycinków endometrium. Izolacji RNA dokonano po homogenizacji pozyskanych wycinków. Przy wykorzystaniu metody reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym zbadano ekspresję genów dla THY1 (antygen komórek grasicy I), IGF1 (insulinopodobny czynnik wzrostu 1), PDGFRA (receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu alfa), MKI67 (marker komórkowej proliferacji), TGFB1 (transformujący czynnik wzrostu β 1), ACTA2 (aktyna mięśni gładkich), ESR1 (receptor estrogenowy) i PGR (receptor progesteronowy). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

Spośród mnogości uzyskanych wyników wg mojej oceny za najważniejsze należy uznać wykazanie, że ekspresja THY1 oraz ekspresja TGFB1 wzrastają w przypadkach uszkodzenia błony podstawnej w obrębie gruczołów endometrium. Z kolei ekspresja dla IGF1 jest ujemnie skorelowana z nasileniem zmian degeneracyjnych i intensywnością procesu zapalnego endometrium. Uzyskane wyniki wskazują również, że THY1 oraz

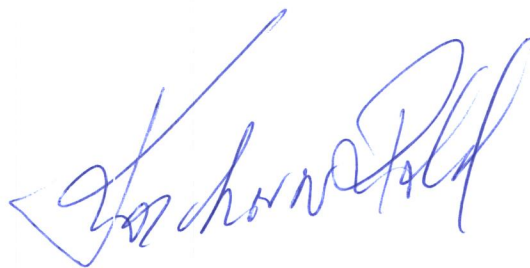
TGFβ1 mogą odgrywać pewną rolę w zapoczątkowaniu procesu włóknienia, a w miarę progresji zmian ich znaczenie spada. Z kolei wyniki dotyczące ESR1 i PGR, a szczególnie ich interpretacja, przy wątpliwej klasyfikacji próbek w zależności od fazy cyklu płciowego i braku analiz hormonalnych, musi być bardziej krytyczna.

Doktorant analizując uzyskane wyniki pokusił się o refleksję nad przydatnością histopatologicznego badania endometrium do oszacowania potencjału rozrodczego klaczy, wskazując przy tym na pewne niedostatki tej metody diagnostycznej i jednocześnie proponując włączenie do oceny innych parametrów takich jak, cytuję: „*morfologia i ewentualne ubytki nabłonka powierzchniowego, morfologia gruczołów macicznych, angiopatie, a także intensywność charakter nacieku zapalnego*” Trudno się z tym nie zgodzić, choć jednak większość histopatologów uwzględnia np. intensywność nacieku zapalnego w rutynowej histologicznej ocenie endometrium. Moim zdaniem podstawowym problemem interpretacyjnym jest pomijanie wyników innych badań w oszacowywaniu potencjału rozrodczego klaczy. Np. inaczej należy podejść do interpretacji powiedzmy kategorii IIB w przypadku gromadzenia się płynu w macicy po kryciu/sztucznej inseminacji, a inaczej jeżeli płyn się nie gromadzi. Nie bez znaczenia są też wyniki badania mikrobiologicznego endometrium w oszacowywaniu potencjału rozrodczego klaczy. Wszystko to prowadzi do wniosku, że istnieje potrzeba doprecyzowania metod diagnostycznych niepłodności klaczy. Przedstawiona do recenzji praca doktorska porusza ten temat, a Autor dobrze rozumie znaczenie problemu. Jednakże bez wiedzy na temat pełnej historii rozrodczej klaczy uzyskane wyniki mają ograniczone znaczenie praktyczne, natomiast aspekty poznawcze tej pracy oceniam wysoko.

Pracę kończą cztery poprawnie wyciągnięte wnioski, oparte uzyskanymi wynikami. Cele postawione w pracy doktorskiej zostały zrealizowane. Natomiast hipoteza badawcza została źle sformułowana, bowiem w recenzowanej pracy nie badano produktu analizowanych genów, a więc odpowiednich białek. Dlatego weryfikacja hipotezy badawczej w brzmieniu: „*Białka THY1, IGF1 i PDGFRa biorą udział w patogenezie endometrozy, a ich specyficzna rola oraz interakcja z endometrium wymaga dalszych badań*” jest niepoprawna, bowiem podkreślę to jeszcze raz w pracy nie badano stężeń białek, a analizowano ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję tych białek. W literaturze jest dostępnych wiele przykładów wskazujących na rozbieżność wyników uzyskiwanych w oparciu o analizę ekspresji genów i pomiaru stężeń odpowiednich białek, dlatego też interpretacja uzyskanych wyników w recenzowanej pracy doktorskiej powinna ograniczyć się do poziomu ekspresji genów. Niemniej uważam, że zawarte w pracy

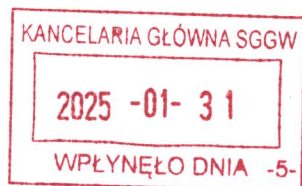
doktorskiej wyniki są ciekawe i wypełniają lukę literaturową w tym zakresie, wskazując na zaangażowanie pewnych analizowanych genów w rozwój zmian degeneracyjnych endometrium u klaczy. Kompleksowa i bardzo wyczerpująca interpretacja uzyskanych wyników bardzo podnosi walory pracy.

Dlatego też uważam, że praca doktorska lek. wet. Łukasza Przemysława Zdrojkowskiego pt.: *Ekspresja mRNA czynników wzrostu i transformacji fibroblastów w błonie śluzowej macicy klaczy względem nasilenia endometrozy i zmian histopatologicznych*, odpowiada wymogom określonym w art. 187 ust.1 - 4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571) i stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora. Dlatego też przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Weterynarii SGGW w Warszawie o dopuszczenie lek. wet. Łukasza Przemysława Zdrojkowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to the author of the letter, is positioned on the right side of the page. The signature is stylized and cursive.

Prof. dr hab. n. wet. Roland Kozdrowski
Katedra Chorób Wewnętrznych i Diagnostyki
UP w Poznaniu, Ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań

Poznań 29.01.2025 r.



RPW/2449/2025 N
Data: 2025-01-31

SZ. Pan

Prof. dr hab. Marcin Bańbura

**Dyrektor Instytutu Medycyny Weterynaryjnej
SGGW w Warszawie**

W załączeniu przesyłam dwa egzemplarze recenzji pracy doktorskiej lek. wet. Łukasza Przemysława Zdrojkowskiego pt.: *Ekspresja mRNA czynników wzrostu i transformacji fibroblastów w błonie śluzowej macicy kłaczy względem nasilenia endometrozy i zmian histopatologicznych* i przepraszam za błąd.

z poważaniem