



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 28
60-637 Poznań
tel. +48 61 848 7196
e-mail: wmwz.kfibz@up.poznan.pl



Wydział Medycyny Weterynaryjnej
i Nauk o Zwierzętach

Katedra Fizjologii, Biochemii
i Biostruktury Zwierząt



Poznań, dnia 18 grudnia 2024 roku

dr hab. Paweł Antoni Kołodziejski
Katedra Fizjologii, Biochemii i Biostruktury Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Ocena rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Anny Wójtowicz pt. *„The effect of Th1 and Th2 cell subsets and their mediators on the processes associated with the development of fibrosis in the progression of endometriosis in the mare”*, wykonanej w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności, Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, w Zespole Immunologii i Patologii Rozrodu pod opieką dr hab. Anny Szóstek-Mioduchowskiej.

Sylwetka doktorantki

Pani mgr inż. Anny Wójtowicz jest absolwentką kierunku Biotechnologia na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, gdzie w roku 2020 uzyskała stopień magistra inżyniera. Od tego roku jest też doktorantką w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie. W swojej działalności naukowej wykonuje badania dotyczące patogenezy endometrosis u kłacz, które prowadzone są m.in. w ramach projektu Sonata zatytułowanego „Oddziaływanie limfocytów pomocniczych z fibroblastami endometrium w procesach związanych z rozwojem endometrosis u kłacz”, którego kierowniczką jest Pani dr hab. Anna Szóstek-Mioduchowska, będąca jednocześnie opiekunem naukowym pracy. O zaangażowaniu w pracę naukową Pani magister świadczy autorstwo/współautorstwo w 5 oryginalnych pracach twórczych oraz w 2 artykułach przeglądowych, które opublikowane zostały w czasopismach z listy filadelfijskiej o współczynniku oddziaływania – *Impact Factor* od 0.4 do 3,8. Ponadto, za swoją działalność związaną z prowadzonymi badaniami była nagradzana m.in. na I Konferencji naukowej pn. „Naukowe i praktyczne aspekty rozrodu koni”, która odbywała się w dniach 23-25 lutego 2023 roku w Walewicach. Niewątpliwym osiągnięciem doktorantki było również otrzymanie w tym samym roku finansowania projektu badawczego pt: *„Building blocks and energy carriers in the course of mare endometrial fibrosis - identification of metabolic changes and the effect of inflammatory mediators”* w ramach konkursu PRELUDIUM 22 organizowanym przez Narodowe Centrum Nauki.



Wstęp

Mimo, że zaburzenia rozrodu kłaczy w tym endometrosis są przedmiotem intensywnych badań, to jednak w dalszym ciągu pozostaje wiele problemów do rozwiązania. Endometrosis u kłaczy to przewlekła zwyrodnieniowa choroba endometrium, charakteryzująca się degenerującym zapaleniem błony śluzowej macicy, co w konsekwencji prowadzi do nagromadzenia się składników macierzy pozakomórkowej (ang. *the extracellular matrix* – ECM), które ma miejsce głównie w zrębie łącznotkankowym błony śluzowej macicy. W przebiegu endometrosis dochodzi do zaburzeń zarówno różnicowania jak i namnażania komórek nabłonka gruczołowego, co może prowadzić do torbieli gruczołowych, ubytków w nabłonku czy nacieków komórek układu odpornościowego (neutrofile, limfocyty B i T). Zmiany te w konsekwencji prowadzą do niepłodności u kłaczy.

Stąd też endometrosis kłaczy stanowi istotne wyzwanie zarówno naukowe jak i w praktyce weterynaryjnej i hodowlanej. Dodatkowo, kluczowym problemem pozostaje brak skutecznych terapii oraz nieinwazyjnych metod diagnostyki, co wymaga dalszych badań nad patomechanizmami choroby i opracowania nowych strategii leczenia. Biorąc powyższe pod uwagę zaproponowany temat rozprawy doktorskiej wydaje się być niezwykle aktualny, a rezultaty badań potrzebne w kontekście leczenia endometrosis u kłaczy. Na podkreślenie zasługuje również fakt zaangażowania doktorantki w prace prowadzone w jednostce, czego efektem jest dorobek naukowy przedstawiony powyżej, jak również niezwykle rozbudowana część metodyczna pracy, w tym zastosowanie metod *in vitro*, technik biologii molekularnej czy bioinformatyki. Umiejętności te, oprócz dużej wiedzy Pani mgr inż. Anny Wójtowicz, miały istotne znaczenie w otrzymaniu interesujących i wartościowych wyników przedstawionych w niniejszej pracy

1. Formalna ocena pracy.

Przedstawiona do oceny praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, które przyjęło formę monografii napisanej w języku angielskim obejmującego wraz ze wszystkimi załącznikami 305 stron maszynopisu. Zasadnicza część rozprawy obejmująca 173 strony, podzielona została (wyluczając streszczenie) poprawnie na 10 rozdziałów zatytułowanych: Wstęp (*Introduction*); Hipotezy badawcze (*Research hypotheses*); Cele badań (*Research objectives*); Materiał i Metody (*Material and Methods*); Wyniki (*Results*); Dyskusja (*Discussion*); Podsumowanie wyników (*Summary of results*); Wnioski (*Conclusions*); Bibliografię (*Bibliography*) oraz dane uzupełniające (*Supplementary data*).

Wstęp pracy (17 stron) stanowi wartościowe wprowadzenie do tematyki badawczej i zawiera bogate odniesienia literaturowe. W części tej doktorantka zawarła najważniejsze informacje dotyczące samej choroby – endometrosis jak również informacje dotyczące mechanizmów komórkowych i molekularnych leżących u podstaw rozwoju włóknienia, roli metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej w chorobach zwłóknieniowych, dotychczasowej wiedzy o patogenezie endometriozy u kłaczy, funkcji komórek pomocniczych T (*Th cells*), roli komórek Th1 (podrozdział 1.3.1), Th2 (podrozdział 1.3.2), interferonu γ (IFN- γ) (podrozdział 1.3.1), interleukiny 4 (IL-4) oraz interleukiny 13



(IL-13).

Kolejną częścią monografii są sformułowane przez Doktorantkę hipotezy badawcze obejmujące hipotezę główną i pięć hipotez szczegółowych oraz cele badawcze zbieżne ilościowo z zaproponowanymi hipotezami i obejmujące jeden cel główny i 5 celów szczegółowych. W rozdziale Materiał i metody (strony 32-61) Doktorantka opisała w sposób szczegółowy zarówno: zbieranie materiału, izolację i prowadzenie hodowli, projekt eksperymentów jak i metody którymi się posługiwała podczas realizacji badań. Zastosowane metody badawcze objęły metody kolorymetryczne, metody biologii molekularnej a także analizę statystyczną wyników.

Następnie Doktorantka zaprezentowała wyniki eksperymentów (strony 62-120). Rozdział Wyniki zawiera 45 rycin przedstawiających uzyskane rezultaty wraz z analizą statystyczną. Kolejny rozdział - „Dyskusja” (strony 121-150) zestawia najważniejsze wyniki własne z pracami innych autorów i dostarcza interpretacji uzyskanych danych. Rozprawę zamykają rozdziały: Podsumowanie wyników (strony 151-152), Wnioski (strona 153) oraz Bibliografia (strony 154 -172) licząca 254 pozycje literaturowe. Jak wspomniano powyżej rozprawa napisana jest w języku angielskim, którym Doktorantka posługuje się bardzo dobrze. Nie budzi zastrzeżeń poprawność językowa pracy, jak również jasność i precyzyjność zastosowanych sformułowań. Podsumowując, rozprawa doktorska mgr inż. Anny Wójtowicz jest przygotowana starannie pod względem edytorskim oraz formalnym i pod tym względem odpowiada wszelkim standardom stawianym tego typu opracowaniom.

2. Merytoryczna ocena pracy.

Rozdział „Wstęp”

W rozdziale „Wstęp” Doktorantka przedstawia informacje literaturowe dotyczące endometrosis u klaczy. Ponadto odnosząc się do najnowszej literatury uzasadnia celowość podjętych badań dotyczących wpływu cytokin wydzielanych przez komórki Th1 i Th2, do których zaliczamy IFN- γ (wydzielany przez komórki Th1) oraz IL-4 i IL-13 (wydzielane przez komórki Th2) na metabolizm „aktywność” fibroblastów w tym produkcję i przebudowę ECM. Doktorantka sugeruje, że w świetle ostatnich wyników badań ukierunkowanie interakcji pomiędzy komórkami układu odpornościowego a fibroblastami może stanowić potencjalną strategię terapeutyczną w chorobach zwłóknieniowych. Opis problemu przedstawiony we wstępie, którym zajęła się Doktorantka jest syntetyczny, jasno uzasadniający przesłanki podjęcia badań. Autorka posiada znakomite rozeznanie w zakresie dotychczasowej wiedzy z obszaru badań, w którym działa. Ponadto rozdział ten pokazuje, że Doktorantka umie analizować obszerny zakres piśmiennictwa, czerpiąc najistotniejsze informacje, które pozwalają jej uzasadnić celowość prowadzonych doświadczeń. Jednakże, z roli recenzenta zobowiązany jestem do prośby o wyjaśnienie/doprecyzowanie kilku kwestii przez Panią Magister:

1. Czy Doktorantka może doprecyzować, jakie procesy miała na myśli używając określeń „aktywność fibroblastów” czy „aktywność miofibroblastów” i czy nie bardziej zasadnym by było użycie określenia metabolizm fibroblastów.



2. Rozwinięcia skrótu „COLs”, który nie został wyjaśniony w tekście, jednakże z kontekstu wynika, że dotyczy on różnych typów kolagenu.

Rozdział „Hipotezy badawcze”

Rozdział ten obejmuje hipotezę główną, która zakłada „że komórki Th1 i IFN- γ wywierają działanie przeciwwłóknieniowe, podczas gdy komórki Th2 oraz IL-4 i IL-13 wywierają profibrotyczne działanie na procesy komórkowe i molekularne związane z rozwojem włóknienia endometrium u koni w progresji endometrosis u klaczy” oraz hipotezy szczegółowe, których jest pięć i mają na celu nie tylko wspierać hipotezę główną ale również same w sobie zawierają ważne założenia będące istotnymi badawczymi wyzwaniem. Zabieg Doktorantki, by skonstruować ten rozdział w ten sposób jest jak najbardziej prawidłowy i pozwala czytelnikowi na wrażenie zagłębiania się w tematykę pracy.

Rozdział „Cele badawcze”

Analogicznie do rozdziału poprzedzającego Autorka podzieliła ten rozdział na cel główny, jakim było „określenie wpływu dwóch odrębnych podgrup komórek Th: komórek Th1 i Th2 oraz ich mediatorów: IFN- γ , IL-4 i IL-13 na procesy komórkowe i molekularne związane z rozwojem włóknienia w postępie endometrosis u klaczy” oraz cele szczegółowe, które skonstruowane zostały w ten sposób, by zweryfikować postawione hipotezy.

Rozdział „Materiał i metody”

Badania *in vitro* stanowiące podstawę do niniejszej dysertacji wykonane zostały na materiale rzeźnianym pochodzącym od 67 zwierząt o masie ciała ok 500 $\pm$ 100 kg. Natomiast badania *in vivo* przeprowadzono na 5 klaczach w wieku od 2 do 8 lat. Na doświadczenie *in vivo* otrzymano zgodę właściwej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach.

W dalszej części rozdziału Doktorantka opisuje bardzo szczegółowo metodę izolacji i hodowli fibroblastów endometrium jak również metodę weryfikacji homogenności hodowli poprzez barwienia immunofluorescencje na marker – vimentynę. Przykładowe zdjęcia z takiego barwienia przedstawiono na Rycinie 6. Następnie opisane zostały metody izolacji komórek T z endometrium i krwi obwodowej jak również proces ich różnicowania przy użyciu specyficznych stymulatorów (anti-CD28, anti-IL-4, anti-IFN- γ , IL-12, IL-2, IL-4) zarówno dla frakcji komórek Th1 jak i Th2. Precyzyjne informacje na temat proporcji i ilości dodatków zawarto w tabeli 2. Wydajność procesu różnicowania sprawdzano przy pomocy cytometru przepływowego. Autorka przedstawiła również przykładowe barwienia immunofluorescencyjne uzyskanych komórek.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym projekt eksperymentu (*Experimental design*) autorka przedstawiła podział swoich badań na 3 zadania, które obejmowały: analizę proporcji komórek Th1 do Th2 i ekspresji ich cytokin w endometrium klaczy z endometrosis, wpływ sekretom komórek Th1 i Th2 na procesy związane z rozwojem włóknienia w fibroblastach endometrium klaczy w progresji endometrosis oraz wpływ IFN- γ , IL-4 i IL-13 na fibroblasty endometrium: analiza transkryptomowa, ekspresja markerów związana z ECM i charakterystyka funkcjonalna. Zabieg ten pozwala



recenzentowi/czytelnikowi pracy w bardzo przystępny sposób poznać tok rozumowania Autorki, a także ciąg przyczynowo – skutkowy badań podjętych w ramach realizacji pracy. Następnie Autorka opisuje poszczególne eksperymenty, w ramach których realizowała wcześniej przedstawione zadania badawcze. W podrozdziale 4.4 Doktorantka przedstawia spis metod, które wykorzystywała podczas realizacji badań m.in. test BrdU, test MTT, test migracji komórek, metody biologii molekularnej, które wykorzystywała do badań zmian ekspresji genów zarówno na poziomie mRNA jak i białka, oraz metody statystyczne.

Metody analiz wykorzystane w pracy opisano ze szczegółami, w sposób przyjęty w pracach eksperymentalnych, co pozwala na ocenę prawidłowości uzyskanych wyników. Opis procedur wskazuje jednoznacznie na opanowanie ogromnego warsztatu metodycznego z zakresu biologii molekularnej. Ponadto, na szczególne podkreślenie zasługują kompetencje mgr inż. Anny Wójtowicz w zakresie doboru i twórczego wykorzystywania bioinformatycznych baz danych, w analizie „ogromu” danych uzyskanych z pomocą sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Pomimo bardzo precyzyjnego opisu metodyki badawczej w mojej opinii zabrakło kilku szczegółów, do których należy się odnieść szczególnie w kontekście przyszłej publikacji wyników:

1. Doktorantka zarówno w metodzie Western blot (WB) jak również przy barwieniach immunofluorescencyjnych wykorzystywała przeciwciała skierowane przeciwko badanym antygenom. Jednakże w tekście nie znajduję informacji dotyczących specyficzności gatunkowej przeciwciał oraz sposobu walidacji prawidłowości uzyskanych wyników/specyficzności uzyskiwanych sygnałów.
2. Ponadto w tekście brakuje informacji czy badając poszczególne białka Doktorantka wykorzystywała tę samą membranę, która była „strippowana”, czy poszczególne białka były badane na osobnych membranach.

Rozdział „Wyniki”

Wyniki badań uzyskane podczas realizacji pracy Doktorantka przedstawiła w logiczny sposób na 45 rycinach. Na podkreślenie zasługuje przejrzystość i precyzja w prezentowaniu większości wyników przez Panią mgr Annę Wójtowicz, co sprawia, że czytelnik nie musi doszukiwać się szczegółowych informacji dotyczących układu eksperymentalnego, który pozwolił na uzyskanie danego wyniku, co znacząco ułatwia odbiór pracy.

Jednakże z roli jaka została mi powierzona zmuszony jestem zwrócić uwagę na kilka niedociągnięć w prezentacji wyników i ich opisie z prośbą o wyjaśnienie:

1. Na niektórych rycinach (np. *Figure 14, 15* etc.) Doktorantka nie określa liczby powtórzeń (n), na podstawie których eksperymenty zostały wykonane. Proszę o doprecyzowanie tej kwestii.
2. W mojej opinii niewielkim przeoczeniem jest również brak określenia wielkości produktu prezentowanego na rycinach zawierających wyniki z techniki WB.



3. Zwracam się również z prośbą do Doktorantki o wyjaśnienie, dlaczego wyniki z NGS w przypadku drugiego zadania badawczego zostały przedstawione po badaniach funkcjonalnych, podczas gdy w prezentacji wyników z zadania 3 przed.
4. W numeracji rycin „wkradł się” błąd, po rycinie 53 jest rycina 37 a następnie 55.

Rozdział „Dyskusja”

Ten bardzo obszerny rozdział jest udaną próbą skonfrontowania uzyskanych przez Doktorantkę wyników z danymi literaturowymi. Bardzo przemyślanym zabiegiem z uwagi na konieczność przedyskutowania tak dużej liczby uzyskanych wyników jest podział tego rozdziału na podrozdziały. Dyskusja prowadzona jest w sposób prawidłowy. Doktorantka nie tylko konfrontuje wyniki własne z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy, ale również stara się tłumaczyć i wyjaśniać zarówno zbieżności jak i rozbieżności pomiędzy nimi. Ponadto w części tej Doktorantka wskazuje słabe strony badań, które prowadziła, co w mojej opinii świadczy o dojrzałości naukowej, a także świadomości niedoskonałości większości układów doświadczalnych. Niezwykle cenną częścią dyskusji jest podrozdział „*Future implications*”, w którym Doktorantka przedstawia możliwości wykorzystania wyników badań, ale także wskazuje przyszłe kierunki, które pozwolą na jeszcze lepsze poznanie patomechanizmów leżących u podstaw rozwoju endometrosis u klaczy.

Rozdział „Podsumowanie wyników”

W rozdziale tym Doktorantka podsumowała najważniejsze wyniki wykazując m.in., że:

- liczba komórek Th2, stosunek komórek Th2 do Th1 oraz ekspresja IFN- γ , IL-4 i IL-13 oraz ich receptorów (IFN- γ R1, IL-4RA i IL-13RA) nie ulegają zmianom w endometrium klaczy w przebiegu endometrosis.
- Sekretom komórek Th1 i Th2 zwiększył proliferację fibroblastów hodowanych w warunkach *in vitro* oraz wpłynął na ekspresję markerów związanych z ECM (FN1, ACTA2, MMP2, TIMP1 i TIMP2) oraz identyfikację 2140 (dla wpływu sekretom komórek Th1) oraz 1033 (dla wpływu sekretom komórek Th2) genów ulegających zróżnicowanej ekspresji (DEGs), które związane są odpowiednio z organizacją ECM, przebudową tkanek, adhezją komórek (dla Th1) oraz przebudową tkanek i odpowiedzią komórkową na TNF, aktywnością receptora PR i metaloproteinaz (dla Th2).
- Inkubacja z IFN- γ nie powoduje zmian w tempie proliferacji fibroblastów pozyskanych z endometrium kategorii I i IIB oraz zmian w poziomie ekspresji genów markerowych dla ECM w warunkach *in vitro*, podczas gdy IL4 oraz IL-13 zwiększała tempo proliferacji fibroblastów i modulowała ekspresję genów związanych z ECM.

Badania pozwoliły również na identyfikację genów ulegających zróżnicowanej ekspresji, które związane są efektem działania IL4 i IL-13 na fibroblasty, a także wskazanie różnic we wpływie na DEGs w zależności od kategorii endometrium.



Rozdział „Wnioski”

W końcowej części opracowania zamieszczono pięć wniosków. Skonstruowano je w dużej analogii do podsumowania wyników w odniesieniu do poszczególnych aspektów badanych w pracy i są one raczej stwierdzeniami niż wnioskami odnoszącymi się do hipotez założonych w pracy. W mojej opinii brakuje jednego wniosku ogólnego, który wnika z pracy jako całości. Stąd też podczas obrony pracy proszę Doktorantkę o jego przedstawienie.

Rozdział „Bibliografia”

W opisie rozprawy Doktorantka wykorzystała 254 artykuły naukowe. O aktualności prowadzonych badań jak również znajomości literatury związanej z tematem pracy świadczy fakt, że Doktorantka odnosi się przede wszystkim do artykułów najnowszych, opublikowanych w roku 2024. Warto także zauważyć, że na liście jest 8 publikacji, w których pierwszym autorem jest promotor niniejszej rozprawy, co sugeruje, że rozprawa jest kontynuacją badań nad zagadnieniem związanym z rozwojem endometrosis u klaczy, które prowadzone są przez Zespół Immunologii i Patologii Rozrodu oraz Promotor pracy od wielu lat, a jednostka naukowa jest pozycjonowana wśród najlepszych na świecie laboratoriów zajmujących się tą tematyką.

Wnioski końcowe recenzenta

Najważniejsze osiągnięcia rozprawy doktorskiej.

Za najważniejsze osiągnięcia przedstawione w rozprawie doktorskiej uważam:

1. Wykazanie wpływu sekretomu komórek Th1 i Th2 na metabolizm fibroblastów pozyskanych z endometrium klaczy.
2. Identyfikacja/wykazanie genów ulegających zróżnicowanej ekspresji (DEGs) w fibroblastach pod wpływem sekretomu komórek Th1 i Th2.
3. Wykazanie wpływu IL-4 oraz IL-13 na proliferację fibroblastów w warunkach *in vitro* oraz wykazanie różnic w aktywacji ekspresji genów przez te interleukiny w zależności od kategorii zmian w endometrium, z których zostały pozyskane.

Podsumowanie

W mojej opinii przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Wójtowicz, biorąc pod uwagę poziom uzyskanych danych doświadczalnych i ich znaczenie dla wiedzy o patologii rozrodu, zasługuje na bardzo wysoką ocenę. Doktorantka opanowała szeroki zakres podstaw teoretycznych i praktycznych realizowanego tematu, wykazała się umiejętnościami doboru nowoczesnych technik i perfekcyjnie je zastosowała. Ponadto posiada znakomitą znajomość literatury przedmiotu, zdolność wytyczania celów badań, stawiania hipotez i ich weryfikacji.

Pragnę również podkreślić, że drobne uwagi zamieszczone w powyższej opinii w żadnej mierze nie umniejszają wartości merytorycznej pracy, a jedynie są wyrazem zainteresowania recenzenta i chęcią włączenia się w dyskusję nad interesującymi wynikami badań.



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
ul. Wojska Polskiego 28
60-637 Poznań
tel. +48 61 848 70 01
e-mail: rektorat@up.poznan.pl



Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wszelkie warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023r poz. 742 ze zm.) i jednoznacznie pozytywnie rekomenduję dopuszczenie Pani mgr inż. Annę Wójtowicz do kolejnych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.

Jednocześnie biorąc pod uwagę zakres wykonywanych doświadczeń, wysokie walory poznawcze i aplikacyjne otrzymanych wyników, ogrom pracy laboratoryjnej włożonej przez Doktorantkę w uzyskanie przedstawionych wyników zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie o rozważenie wyróżnienia rozprawy doktorskiej Pani mgr. inż. Anny Wójtowicz.

Paweł Antoni Kołodziejski