



Warszawa, 28.12.2024 r.

dr hab. Małgorzata Domino, prof. uczelni
Katedra Chorób Dużych Zwierząt i Klinika
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

RECENZJA

pracy 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
endometrosis in the mare

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem naukowym promotora Pani dr hab. Anny Szóstek-Mioduchowskiej w Instytucie Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie. Praca została realizowana w ramach projektu 2019/35/D/NZ9/02989 pt.: *Oddziaływanie limfocytów pomocniczych z fibroblastami endometrium w procesach związanych z rozwojem endometrosis u kłaczy* finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki, którego kierownikiem jest Pani dr hab. Anna Szóstek-Mioduchowska. Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi uchwała Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie z dnia 17 października 2024 r.

Szkoła Główna
Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Instytut Medycyny
Weterynaryjnej

Katedra Chorób Dużych
Zwierząt i Klinika

ul. Nowoursynowska 100
02-797 Warszawa
+48 22 593 61 91

Ogólna charakterystyka pracy doktorskiej

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Wójtowicz stanowi pracę pisemną przygotowaną w formie monografii naukowej w języku angielskim która liczy łącznie 305 stron druku. Praca doktorska została przygotowana bardzo starannie zarówno w części głównej liczącej 172 strony jak i części uzupełniającej liczącej 132 strony.

Część główna pracy została przygotowana według klasycznego układu uwzględniającego streszczenia, wykaz skrótów, wstęp, jasne hipotezy badawcze, dobrze uzasadnione cele pracy, obszerny opis materiałów i metod, równie obszerną prezentację wyników, dyskusję, podsumowanie wyników, wnioski i wykaz cytowanej literatury. Na uwagę zasługuje bardzo dobrze zaplanowany projekt doświadczenia, który został konsekwentnie opisany w rozdziałach materiały i metody oraz wyniki w odniesieniu do trzech zadań badawczych (ocenę proporcji limfocytów pomocniczych (Th1 i Th2) i ekspresję wybranych cytokin w endometrium objętym endometrozą, ocenę wpływu sekretom limfocytów pomocniczych na fibroblasty uzyskane z endometrium klaczy oraz ocenę wpływu wybranych cytokin na funkcje i profil transkrypcyjny fibroblastów uzyskanych z endometrium klaczy) zawierających odpowiednio dwa lub trzy dobrze zaplanowane eksperymenty.

Część uzupełniająca została przygotowana w formie dziewięciu obszernych tabel charakteryzujących szczegółowo zbiory danych, ekspresję genów oraz geny ulegające zróżnicowanej ekspresji w wybranych eksperymentach drugiego i trzeciego zadania badawczego.

Ogólna wiedza teoretyczna w dyscyplinie zootechnika i rybactwo

Zrozumienie przyczyn endometrozy umożliwiające wprowadzenie bezpiecznego i skutecznego leczenia może wydatnie przyczynić się do wzrostu tempa postępu hodowlanego poprzez umożliwienie efektywnego rozmnażania starszych klaczy. Z tego względu temat podjętych badań jest interesujący z poznawczego punktu widzenia, a jego kontynuacja może mieć istotne znaczenie aplikacyjne. Zagadnienia poruszone w pracy doktorskiej dobrze opisują problemy związane z poznaniem patogenez endometrozy, a szerzej opisana rola komórek zapalnych w regulacji włóknienia endometrium wydaje się kluczowa dla planowania dalszych badań nad potencjalnymi metodami leczenia.

We wstępie Autorka opisuje zmiany w endometrium związane z endometrozą, uwzględniając złożoność mechanizmów związanych z rozwojem procesu włóknienia. Wstęp zawiera również przegląd aktualnej wiedzy na temat udziału komórek zapalnych, przede wszystkim limfocytów pomocniczych, w patogenezie endometrozy. Autorka podkreśla rolę przekazywania cytokinowego, zwłaszcza związanego z interferonem γ (IFN- γ) oraz interleukinami 4 i 13 (IL-4 i IL-13), w regulacji funkcji komórek endometrium i włóknienia macierze zewnątrzkomórkowej. Przedstawione we wstępie zagadnienia pozwalają na zrozumienie problematyki badań, uwidaczniając luki w aktualnym stanie wiedzy na temat roli limfocytów pomocniczych w patogenezie

endometrozy, które następnie Autorka stara się wypełnić realizując zaplanowane zadania badawcze.

W pracy doktorskiej Autorka cytuje 254 pozycje literaturowe, z których ponad połowa (136 pozycje) zostały opublikowane w ciągu ostatnich 10 lat w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Dobór piśmiennictwa, cytowanego zarówno w rozdziałach wstęp i dyskusja, jak również w rozdziale materiały i metody, wskazuje na bardzo dobrą wiedzę teoretyczną Autorki oraz systematyczne przygotowanie do realizacji zadań badawczych.

Uważam, że praca doktorska bardzo dobrze prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Pani mgr inż. Anny Wójtowicz w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej

W pracy doktorskiej Autorka zaproponowała złożony projekt doświadczenia wykorzystujący zróżnicowaną metodologię w tym: cytometrię przepływową, hodowlę komórkową, Western Blot, ELISA, PCR, NGS, zymografię i barwienie immunofluorescencyjne. Wachlarz zastosowanych metod świadczy o bardzo dobrej znajomości technik laboratoryjnych oraz świadomości zalet i ograniczeń wynikających z zastosowania różnych metod oznaczania aktywności biologicznej. Właściwy dobór materiałów i metod do proponowanych celów pracy wskazuje na umiejętność zastosowania wiedzy teoretycznej w praktyce oraz bardzo dobre przygotowanie warsztatu doświadczalnego. Szerokie zastosowanie technik hodowli komórkowej i biologii molekularnej wskazuje na nowoczesny warsztat metodyczny Autorki i zespołu badawczego, umożliwiający weryfikację stawianych hipotez.

Warto jednak zwrócić uwagę na pewne uproszczenia zastosowane w części projektu doświadczenia w celu zmniejszenia liczby analizowanych próbek. Autorka pobierała fibroblasty do hodowli komórkowej w fazie pęcherzykowej, chociaż w wielu badaniach związane z włóknieniem zmiany w metabolizmie komórek endometrium stwierdzano również w fazie lutealnej. Dodatkowo, podczas hodowli komórkowej Autorka nie zastosowano dodatku hormonów jajnikowych, przez co zatrzymana została stymulacja estrogenowa fibroblastów, co mogło zmienić efekt działania cytokin produkowanych przez limfocyty pomocnicze. Analogicznie w hodowli komórkowej Autorka wykorzystała fibroblasty pochodzące z endometrium sklasyfikowanego do kategorii I i IIB według Kenney'a and Doiga uzasadniając swój wybór wynikami wcześniejszych badań, w których zmiany transkryptomiczne w endometrium były najsilniej wyrażone w kategorii IIB. Ze względu na złożoną regulację włóknienia endometrium, która niewątpliwie zmienia się wraz z progresją endometrozy –

w zależności od funkcji komórek endometrium, gęstości tkanki i składu macierzy zewnątrzkomórkowej - warto byłoby uwzględnić wpływ limfocytów pomocniczych i produkowanych przez nie przekaźników na endometrium w różnym stadium nasilenia endometrozy. Jednak sposób prowadzenia dyskusji przekonuje, że właśnie taki kierunek badań obierze Autorka w swojej dalszej samodzielnej pracy naukowej.

Zakończenie rozdziału dyskusja związłym wskazaniem dalszych kierunków badań nad rolą limfocytów pomocniczych Th1 i IFN- γ w progresji włóknienia endometrium oraz przeciwciał anty IL-4 i IL-13 w celowanej terapii doświadczalnej dodatkowo podkreśla dojrzałość naukową Autorki i odpowiedni poziom przygotowania do kontynuowania badań naukowych. Uważam, że praca doktorska jednoznacznie wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Panią mgr inż. Annę Wójtowicz, a zaprezentowany warsztat badawczy należy ocenić bardzo pozytywnie.

Problem naukowy, jego sformułowanie i oryginalne rozwiązanie

W recenzowanej pracy doktorskiej na podkreślenie i docenienie zasługuje ścisły związek między prezentowanym aktualnym stanem wiedzy, wynikającymi z niego hipotezami badawczymi oraz przejrzystym celem pracy. Autorka prezentuje oryginalne rozwiązanie sformułowanego problemu naukowego poparte wynikami badań własnych zaprezentowanymi w przejrzysty sposób na 46 rycinach. Bogate wyniki, obejmujące ocenę behawioru biologicznego komórek, transkrypcji genów, jak i produkcji białek, pozwalają na dobre zrozumienie zakresu oddziaływania limfocytów pomocniczych i produkowanych przez nie cytokin na fibroblasty znajdujące się w endometrium. W pracy doktorskiej należy docenić kompleksową i wyczerpującą interpretację wyników uzyskanych w bardzo złożonym i zaawansowanym układzie doświadczalnym.

W rozdziale dyskusja, Autorka bardzo dobrze polemizuje z innymi autorami zajmującymi się patogenezą endometrozy, a w szczególności rolą komórek zapalnych w transformacji fibroblastów i progresji zmian zachodzących w macierzy zewnątrzkomórkowej. Polemika oraz uwagi własne Autorki przedstawione w tej części pracy doktorskiej nadają dodatkowego waloru naukowego i tak wysoko ocenionej pracy. Jednak mało wyczerpujące omówienie wpływu limfocytów pomocniczych na interakcje komórek endometrium z elementami macierzy zewnątrzkomórkowej pozostawia pewien niedosyt. Uzyskane bardzo bogate wyniki uprawniają Autorkę również do szerszego omówienia interakcji pomiędzy komórkami endometrium - limfocytami pomocniczymi i fibroblastami - co mam nadzieję z przyjemnością przeczytać w kolejnych publikacjach Autorki.

Wnioski zostały sformułowane prawidłowo, chociaż Autorka mogłaby rozważyć podkreślenie, braku zmian liczby limfocytów Th2, proporcji między limfocytami Th2

i Th1, a także ekspresji IFN- γ , IL-4, i IL-13 i ich receptorów IFN- γ R1, IL-4RA i IL-13RA w endometrium klaczy wraz z nasileniem endometrozy. Wniosek taki byłby bardziej spójny z pierwszym celem pracy. Trzeci wniosek pracy doktorskiej, zgodnie z którym w fibroblastach pochodzących z endometrium kategorii I i IIB IL-4 zwiększa proliferację komórek i wpływa na przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowej poprzez zwiększenie ilości fibronektyny i kolagenu typu 3 oraz zmniejszenie ekspresji i aktywności MMP i TIMP, wyznacza dalszy kierunek badań, który nie został omówiony w dyskusji. Warto byłoby rozważyć szerzej, które MMP i TIMP są regulowane i jakie składniki macierzy zewnątrzkomórkowej są dla nich docelowe - na które MMP działają poszczególne zmienione TIMP i jakie składniki macierzy zewnątrzkomórkowej są następnie rozkładane przez zmienione MMP. Takie badania pozwolą lepiej ocenić wpływ limfocytów pomocniczych na strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej, a następnie wpływ macierzy na strukturę, funkcję i wzajemne interakcje między komórkami endometrium. Piąty wniosek pracy doktorskiej, zgodnie z którym różne reakcje fibroblastów pochodzących z endometrium kategorii I i IIB na badane cytokiny mogą wynikać z różnic w przekaznictwie wewnątrzkomórkowym lub mikrośrodowisku komórkowym, a także adaptacji fibroblastów do zmian powodowanych nadmierną produkcją macierzy zewnątrzkomórkowej, wymaga szerszego omówienia. W dalszych badaniach warto uwzględnić takie zmienne jak gęstość i uwodnienie macierzy zewnątrzkomórkowej, które nie są brane pod uwagę w hodowlach komórkowych. Standardowe hodowle komórkowe, ani nawet zastosowane w pracy doktorskiej hodowle na krążkach kolagenowych, nie odwzorowują idealnie warunków *in vivo*, które mogą wpływać na funkcje komórek endometrium - w tym adaptację do zwiększonego działania sił mechanicznych, zaburzenia migracji komórek i tempo dyfuzji substancji odżywczych i cząsteczek sygnałowych, a co za tym idzie stopień wymiany informacji pomiędzy poszczególnymi komórkami endometrium. Pojedyncze drobne błędy, takie jak niewłaściwe cytowanie (Fig. 10C, str. 62) i podpisanie (Fig. 54, str. 119) rycin czy brak rozwinięcia skrótu w tekście (TIMP, str. 20), w żaden sposób nie umniejszają wartości pracy.

Niezależnie od powyższych uwag, za najważniejsze osiągnięcie pracy doktorskiej uznaję wykazanie wpływu IFN- γ , IL-4, i IL-13 na fibroblasty z endometrium klaczy w kontekście procesu włóknienia i endometrozy. Osiągnięcie to zostało poparte analizą transkryptomiczną, proteomiczną i funkcjonalną, zapewniając rzetelność obserwacji oraz kierując dalsze badania nad rolą komórek zapalnych i produkowanych przez nie cytokin w patogenezie endometrozy. Uważam, że praca doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, które należy ocenić wysoce pozytywnie.

Wniosek końcowy

Uważam, że praca doktorska 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* spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 ze zm.). Dlatego też pozytywnie opiniuję pracę doktorską i przedkładam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Wójtowicz do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia naukowego doktora.

Niewątpliwie praca doktorska Pani mgr inż. Anny Wójtowicz wyróżnia się oryginalnością, złożonością, a zarazem komplementarnością metodyki badań oraz wysokim stopniem jej opanowania przez kandydata. Recenzowana praca doktorska z całą pewnością przyczynia się do lepszego zrozumienia procesów zachodzących w endometrium w przebiegu endometrozy, zwłaszcza w kontekście roli komórek zapalnych. Zastosowana metodyka i szerokie możliwości oceny wpływu biologicznego badanych komórek i cytokin każą z nadzieją patrzeć w przyszłość na nadchodzące badania nad patogenezą endometrozy oraz bezpiecznym i skutecznością jej potencjalnego leczenia. Dlatego też przedkładam do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

dr hab. Małgorzata Domino, prof. uczelni

