

prof. dr hab. Katarzyna Ropka-Molik
Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt
Instytut Zootechniki PIB
Sarego 2, 31-047 Kraków

Kraków, 29.07.2025

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdy Słyszewskiej

w formie monografii pod tytułem:

„Dynamics of endometrial macrophage subpopulations and their relevance in processes associated with the development of mare endometrial fibrosis in the course of endometrosis”

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie podjęty 12 czerwca 2025.

Ogólna charakterystyka rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr. inż. Magdy Słyszewskiej przygotowana została w języku angielskim w formie monografii. Struktura pracy jest typowa dla rozpraw doktorskich, składa się z 14 głównych rozdziałów obejmujących wprowadzenie teoretyczne, cele i hipotezy, szczegółowo opisane materiały i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz materiały uzupełniające. Warto podkreślić, że rozprawa powstała w ramach projektu finansowanego ze źródeł zewnętrznych (grant Narodowego Centrum Nauki; OPUS 2020/37/B/NZ9/03355), co dodatkowo podkreśla istotność i aktualność podjętej tematyki. Ryciny i schematy zamieszczone w pracy, w tym ilustrujące cele, hipotezy oraz przebieg eksperymentów wzbogacają odbiór merytoryczny dysertacji oraz pozwalają na precyzyjne śledzenie kolejnych etapów realizacji badań.

Z formalnego punktu widzenia przedstawiona do oceny dysertacja nie budzi zastrzeżeń i spełnia wymagania stawiane tego typu opracowaniom. Została ona przygotowana starannie, z

zachowaniem właściwych proporcji, a poszczególne rozdziały opisano w sposób przejrzysty i spójny.

Jako uwagę ogólną należy wskazać, że praca została napisana w języku angielskim, w związku z czym w zapisie liczbowym należy stosować kropkę, zamiast przecinka, jako separator dziesiętny, zgodnie z międzynarodowymi standardami obowiązującymi w piśmiennictwie naukowym. Dodatkowo, we fragmentach rozprawy autorka stosuje błędną nomenklaturę dla badanych genów i białek – w nazwach genów pojawia się nieprawidłowo myślnik (np. „MMP-1”), który zgodnie z zasadami nomenklatury oznacza symbol białka. Obecny zapis nazw genów nie jest niezgodny z przyjętymi zasadami nomenklatury genetycznej i może prowadzić do nieporozumień interpretacyjnych (str. 49, 50, 55, itd.).

Ocena merytoryczna rozprawy

Oryginalność tematyki i cel badań

Zaburzenia płodności u klaczy stanowią poważny problem hodowlany i weterynaryjny, wpływając istotnie na obniżenie płodności - spadek ilości zazębień oraz zdrowo urodzonego potomstwa. Zmiany degeneracyjne endometrium, wśród których szczególne znaczenie ma endometrioza, odgrywają kluczową rolę w zaburzeniach płodności. Endometrioza u koni, definiowana jako włóknienie błony śluzowej macicy (*equine endometrial fibrosis*), stanowi przewlekłe i postępujące schorzenie endometrium prowadzące do zastępowania prawidłowej tkanki gruczołowej przez tkankę łączną włóknistą. Proces ten jest jedną z głównych przyczyn niepłodności u klaczy wykorzystywanych w hodowli, ponieważ upośledza funkcje sekrecyjne i immunologiczne endometrium niezbędne do implantacji zarodka i utrzymania ciąży. Skutkiem tych zmian może być zwiększona liczba cykli bezowulacyjnych, poronień oraz obniżona skuteczność inseminacji, co znacząco zmniejsza efektywność rozrodu. Pociąga to za sobą konsekwencje ekonomiczne związane ze wzrostem kosztów inseminacji i leczenia, spadkiem liczby odchowanych źrebiąt oraz koniecznością przedwczesnego wykluczenia cennych genetycznie klaczy z programów hodowlanych. Wszystko to generuje istotne straty finansowe dla hodowców i negatywnie wpływa na opłacalność hodowli.

Endometrioza jest jednostką chorobową o złożonej, nie do końca poznanej etiologii, obejmującą przebudowę tkankową i włóknienie. W tym kontekście rosnące zainteresowanie naukowe budzi rola makrofagów – komórek odgrywających istotną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej oraz przebiegu procesów zapalnych i regeneracyjnych. Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdy Słyszewskiej doskonale wpisuje się w ten obszar badań, koncentrując się na roli subpopulacji makrofagów w rozwoju włóknienia błony śluzowej macicy klaczy. Mimo

rosnącej liczby doniesień naukowych dotyczących roli układu odpornościowego w przebudowie tkanek, zagadnienie to – w kontekście fizjologii i patologii układu rozrodczego koni – wciąż pozostaje praktycznie niezbadane. Doktorantka podjęła się ambitnego zadania określenia roli subpopulacji makrofagów w rozwoju włóknienia błony śluzowej macicy kłaczy w przebiegu endometrosis. Zasadność prowadzonych badań i podjętej tematyki autorka wyczerpująco umotywowwała w przeglądzie literatury, podkreślając jednocześnie brak skutecznych metod leczenia oraz złożony charakter schorzenia. Autorka na podstawie najnowszych pozycji literatury nakreśliła molekularny kontekst rozwoju endometriozy poprzez przebudowę macierzy zewnątrzkomórkowa (ECM) oraz potencjału makrofagów jako czynnika regulującego proces włóknienia (ang. fibrosis).

Na podstawie wcześniejszych wyników badań własnych oraz dostępnych danych literaturowych doktorantka precyzyjnie sformułowała główną hipotezę badawczą odwołującą się bezpośrednio do związku między profilem subpopulacji makrofagów a procesem włóknieniem oraz cztery hipotezy szczegółowe. Do weryfikacji postawionych hipotez autorka zdefiniowała korespondujący cel główny oraz pięć celów szczegółowych. Cele i hipotezy są sformułowane jasno i poprawnie oddając równocześnie tematykę prowadzonych badań.

Z uwagi na powiązanie merytoryczne hipotez i celów szczegółowych, w pracy brakuje odniesienia do Celu 5, którego treść mogłaby zostać uzupełniona przez Hipotezę V: „Podanie wewnątrzmaciczne autologicznych komponentów modulujących funkcję $M\Phi$ wpływa na redukcję markerów włóknienia w endometrium.” Element praktyczny dotyczący wykorzystania uzyskanych wyników do modelowania potencjalnych strategii terapeutycznych jest bardzo interesującym i warty podkreślenia, także w hipotezach.

Do tej pory nie w pełni zdefiniowano procesy prowadzone do rozwoju endometriozy, jak również nie opracowano skutecznego jej leczenia. Temat ten jest szczególnie słabo poznany u koni, gdzie mechanizmy patogenezы oraz skuteczne strategie terapeutyczne pozostają w dużej mierze nieokreślone, co utrudnia diagnostykę i leczenie tej choroby. Dlatego też podjętą tematykę badań oceniam jako bardzo aktualną i nowatorską. Badania mają zarówno duży aspekt poznawczy wnoszący istotny wkład w rozwój dyscypliny zootechniki i rybactwo jak i potencjał aplikacyjny dając podstawę do opracowania terapii celowanych i nowych strategii terapeutycznych.

Metodyka badań

Do osiągnięcia założonych celów i weryfikacji hipotezy badawczej autorka zastosowała kompleksowy model badawczy, łączący zaawansowane techniki biologii molekularnej,

hodowle in vitro oraz analizy in vivo, co pozwoliło na wielowymiarowe poznanie roli makrofagów podczas patogenezы włóknienia błony śluzowej macicy.

Doktorantka rozdzieliła i szczegółowo opisała wykorzystany materiał badawczy oraz zastosowane metody. Metodyka zastosowana w pracy jest bardzo rozbudowana, wieloetapowa i starannie zaplanowana. Autorka wykorzystwała zaawansowane techniki biologii molekularnej, takie jak cytometria przepływowa, chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas; RNA-seq, qPCR, Western blot, immunofluorescencja, analiza funkcjonalna fibroblastów (prolifracja, migracja), a także analizy bioinformatyczne (IPA). Szczególnym atutem jest integracja badań in vitro (hodowla fibroblastów i makrofagów) z badaniami in vivo (domaciczne podanie makrofagów). Badania zostały przeprowadzone na wysokim poziomie eksperymentalnym, a dobór metod potwierdza wysoki poziom metodologiczny pracy.

Istotnym aspektem badań jest zastosowanie subpopulacji makrofagów wyprowadzonych z monocytów (eqMD-MΦIFN γ /LPS i eqMD-MΦIL-4/IL-13), które zostały zaprojektowane jako funkcjonalne analogi fenotypów MΦ1 i MΦ2a. Takie podejście umożliwiło nie tylko identyfikację zmian ilościowych i przestrzennych tych komórek w endometrium, ale również ocenę ich wpływu na fibroblasty macicy i skład macierzy pozakomórkowej zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i w modelu doświadczalnym in vivo. To unikalne i autorskie podejście do modelowania procesów immunologiczno-włóknieniowych w kontekście rozrodu koni zasługuje na szczególne uznanie.

Metodyka jest bardzo rozbudowana i w większości elementów zaprojektowana prawidłowo. Z perspektywy recenzenta warto jednak zwrócić uwagę na kilka kwestii wymagających doprecyzowania lub dalszego uzasadnienia:

- proszę o wyjaśnienie kryteriów wyboru białka CRP (białko C-reaktywne) jako indykatora procesu zapalnego; u koni częściej stosowanym białkiem reaktywnym jest SAA (białko amyloidowe A); zgodnie z doniesieniami literaturowymi białko CRP charakteryzuje się mniejszą reaktywnością, czułością oraz dynamiką zmian w porównaniu do SAA; często jest ono nieprzydatne do analiz wczesnych zmian zapalnych ze względu na niższą czułość na bodźce zapalne i opóźnioną odpowiedź czasową;

- autorka używa określenia „poziom standardowy” w kontekście analizowanych poziomów stężenia CRP – bardziej zasadne byłoby stosowanie terminu „wartości referencyjne”, odnoszącego się do zakresów ustalonych na podstawie danych literaturowych lub populacji referencyjnej, co umożliwiło obiektywne porównanie wyników;

- metody wysokoprzepustowe, takie jak RNA-seq, cechują się relatywnie większym poziomem błędu i zmienności technicznej niż klasyczne metody jak qPCR, dlatego ich wyniki

powinny być weryfikowane za pomocą metod o wyższej czułości i precyzji. W związku z tym, proszę o doprecyzowanie, czy w niniejszej rozprawie przeprowadzono walidację wyników sekwencjonowania transkryptomu metodą RNA-seq;

- podczas barwienia immunofluorescencyjnego zastosowano mysie przeciwciało pierwszorzędowe anti-CD68, natomiast detekcja sygnału została przeprowadzona z użyciem koziego przeciwciała drugorzędowego skierowanego przeciwko immunoglobulinom szczura (anti-rat). Należy jednak zauważyć, że użycie przeciwciała „anti-rat”, może sugerować niezgodność gatunkową pomiędzy zastosowanym przeciwciałem a analizowanym układem („anti-mouse” – „anti-rat”), co z kolei może wpływać na specyficzność i wiarygodność uzyskanego sygnału; wymaga to doprecyzowania i ewentualnego uściślenia zastosowanego protokołu;

- ponadto, producent wykorzystanego przeciwciała CD68 podaje, że przeciwciało to jest niezalecane do stosowania w immunohistochemii tkanek utrwalonych formaliną/zatopionych w parafinie. W pracy do utrwalania próbek użyto paraformaldehydu (a w przypadku tkanek potem przenoszono je do parafiny). Proszę o doprecyzowanie czy procedura ta została zwalidowana, czy wykonano analizy w obecności kontroli pozytywnych i negatywnych;

- w przypadku przeciwciała wykorzystanego w pracy jako referencyjne do analizy Western Blot – *GAPDH* - producent nie rekomenduje tego przeciwciała do badań na próbkach pochodzących od pewnych gatunków, w tym właśnie od koni („We do not recommend this combination. It is not covered by our product promise”). Proszę o doprecyzowanie kryteriów wyboru tego przeciwciała oraz informację czy procedura ta została zwalidowana, czy wykonano analizy w obecności kontroli pozytywnych i negatywnych;

- wątpliwości budzi przeciwciało wykorzystane dla kolagenu typu I (20121; Novotec), które nie zostało przez producenta zwalidowane do zastosowania w metodzie Western Blot. Istnieje niepewność co do specyficzności rozpoznawanego pasma białkowego o masie 140 kDa. Nie wiadomo, czy odpowiada ono łańcuchowi COL1A1 (~140 kDa), COL1A2 (~135 kDa), czy też jest wynikiem niespecyficznego wiązania i zlewania się obu łańcuchów w jedno pasmo. Producent nie dostarcza informacji na temat dokładnej specyficzności epitopu. Jest to istotne, ponieważ poziom mRNA mierzony był tylko dla *COL1A1*, co może prowadzić do błędnych interpretacji wyników. Dodatkowo, w fibroblastach kolagen typu I występuje głównie w postaci prokolagenu, który jest cięższy o około 30 kDa.

Obliczenia statystyczne:

- przy obliczeniach dla Research Task 2 bardziej trafne wydaje się zastosowanie metod statystycznych uwzględniających wielokrotne porównania, takich jak ANOVA z korektą post hoc (np. Bonferroniego lub Tukey'a), zamiast t-testu lub testu U Manna–Whitneya. W przypadku trzech grup (dwa autologi/makrofagi i wspólna kontrola) brak korekty prowadzi do wzrostu ryzyka uzyskania wyników fałszywie pozytywnych;
- w opisie zastosowanej analizy statystycznej brakuje istotnej informacji, czy w modelach dwuczynnikowej ANOVA – zarówno klasycznej, jak i z pomiarami powtarzanymi – uwzględniono interakcję między czynnikami głównymi. Jest to kluczowy element konstrukcji modelu, ponieważ obecność lub brak interakcji może znacząco wpływać na interpretację uzyskanych wyników. W przypadku danych przedstawionych na rysunku 41 (migracja komórek), konieczne jest doprecyzowanie zakresu wykonanych porównań. Należy wskazać, czy porównania między grupą kontrolną a grupą doświadczalną wykonano wyłącznie w poszczególnych punktach czasowych (co dawałoby pięć porównań i uzasadniało zastosowanie korekty Tukeya), czy też wykonano pełne porównania krzyżowe dla wszystkich punktów ($2 \text{ grupy} \times 5 \text{ czasów} = 45 \text{ porównań}$), co obniżałoby moc wykonanej analizy.

Analogiczna uwaga dotyczy danych z rysunku 42 (zmiany poziomu CRP). Tutaj również należy jasno wskazać, jak skonstruowano porównania między grupami. Co więcej, przy bardzo małej liczebności próby ($n = 3$ na grupę), spełnienie założeń klasycznej analizy ANOVA – takich jak normalność rozkładu reszt czy sferyczność (weryfikowana np. testem Mauchly'ego) – jest wątpliwe. Nawet zastosowanie korekty Greenhouse-Geissera może nie być wystarczające. W związku z tym, w analizach opartych na tak małych grupach lepszym podejściem wydaje się zastosowanie testu nieparametrycznego Friedmana, który jest bardziej odpowiedni dla tego typu danych.

Wyniki badań, Dyskusja oraz Wnioski

Przedstawione badania stanowią kompleksową analizę roli subpopulacji makrofagów ($M\Phi$) w patogenezie endometrosis u kłaczy, łącząc modele in vivo i in vitro z podejściem omicznym. Z punktu widzenia nauk podstawowych kluczowym wynikiem jest potwierdzenie zwiększonego udziału $M\Phi$ typu M1 ($CD68^+iNOS^+ARG1^-$) względem M2 ($CD68^+iNOS^-ARG1^+$) w zaawansowanych stadiach włóknienia, niezależnie od fazy cyklu. Sugeruje to przewagę reakcji prozapalnej w postępującej chorobie. Zwiększona ekspresja CD68 w fazie pęcherzykowej, zwłaszcza w endometrium kategorii IIA, potwierdza fizjologiczną aktywację funkcji immunologicznej błony śluzowej, ale może również

wskazywać na fazozależne ryzyko inicjacji włóknienia. Dzięki badaniom wykonanym na modelu *in vitro* Doktorantka potwierdziła, że polaryzacja MΦ wpływa na ekspresję genów ECM oraz cytokin w fibroblastach, a sekretony obu otrzymanych linii makrofagów modulują ich migrację i aktywność metaboliczną. Autorka wykazała, że transkryptomiczna odpowiedź fibroblastów była istotnie zróżnicowana w zależności od typu MΦ, co potwierdza ich funkcjonalną odmienną, przy jednoczesnym ujawnieniu 234 wspólnych genów różnicowanych (DEGs), co może wskazywać na obecność pewnych konserwatywnych mechanizmów komunikacji międzykomórkowej.

Uzyskane wyniki mają również potencjał aplikacyjny. Doktorantka wykazała, że wewnątrzmaciczne podanie autologicznych MΦ jest bezpieczne (brak wzrostu CRP) i może wywoływać różne odpowiedzi molekularne w endometrium. Iniekcje MΦIFN γ /LPS indukowały ekspresję genów prozapalnych i prozłóknieniowych, natomiast podanie MΦIL-4/IL-13 wykazywało oddziaływanie w kierunku przeciwnym – immunomodulująco i potencjalnie antyfibrotycznie. Pomimo ograniczonego czasu ekspozycji (6 h), różnice w profilu transkryptomicznym były wyraźne, co wskazuje na szybki efekt działania tych komórek.

Uzyskane wyniki autorka w sposób spójny i wyczerpujący przedyskutowała z dostępnymi pozycjami literatury. Dyskusja prowadzona jest z dużą świadomością ograniczeń zastosowanego modelu *in vitro* – m.in. związanych z krótkim czasem ekspozycji fibroblastów na sekreton (6 h), brakiem dynamicznej obserwacji długofalowych efektów transkrypcyjnych oraz niemożnością pełnego odwzorowania warunków panujących *in vivo*. Autorka podkreśla także, że zaobserwowane różnice nie ograniczają się do fenotypu cytokinowego, ale obejmują kompleksowe zmiany w ścieżkach związanych z interakcją komórek z macierzą zewnątrzkomórkową, cytoszkieletem i aktywnością migracyjną, co czyni tę część rozprawy szczególnie wartościową z punktu widzenia badań podstawowych i potencjalnych możliwości aplikacyjnych, zwłaszcza w kontekście immunomodulacji procesu włóknienia.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka sformułowała 6 wniosków, spójnych z wynikami badań i logicznie podsumowujących cele trzech zadań badawczych.

Uwagi szczegółowe:

- w pracy występuje niespójność dotycząca kryteriów wyboru genów jako DEGs. W części metodycznej wskazano, że jako kryteria przyjęto wartość $\text{adjusted } p\text{-value} < 0.05$ oraz $\log_2\text{FC} < -1$ / $\log_2\text{FC} > 1$, natomiast w opisach wyników, m.in. w odniesieniu do Figury 45 oraz Tabel 11, 12 i 13, autorka podaje wyłącznie wartości $p\text{-value}$, bez uwzględnienia progów istotności

statystycznej po korekcji wielokrotnego testowania. Proszę o doprecyzowanie, które z podejść jest prawidłowe;

- w części eksperymentu *in vivo* (Research Task 3) badania wykonano na grupach kłaczy o liczebności 5 (Rycina 9), od których pobrano materiał na analizę białka CRP; natomiast wyniki dla stężenia CRP podano już dla liczebności w grupach $n=3$ (rozdział 6.3, Rycina 42); proszę o wyjaśnienie tych rozbieżności;
- opisy figur powinny zostać uzupełnione o informacje dotyczące nazw oprogramowań lub narzędzi wykorzystanych do przygotowania przedstawionych grafik.

Wniosek końcowy

Podsumowując, rozprawa wnosi istotny wkład w zrozumienie immunoregulacyjnych mechanizmów zachodzących w endometrium kłaczy, a wyniki mogą stanowić punkt wyjścia do opracowania strategii terapeutycznych immunomodulacyjnych. Zgłoszone uwagi nie umniejszają wartości pracy, jednak doprecyzowanie tych kwestii może być istotne przy przygotowaniu rozprawy do druku.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, wpisująca się w obszar dziedziny nauk rolniczych, dyscyplinę zootechnika i rybactwo, spełnia wymogi określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2024 r. poz. 1571 z późn zm.) i wnoszę o dopuszczenie **mgr inż. Magdy Słyszewskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. Katarzyna Ropka-Molik