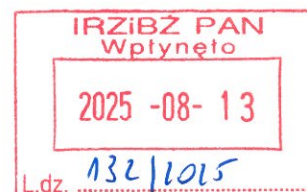


Olsztyn, 07.08.2025r.

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 mgr inż. Magdy Słyszewskiej

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

Rozprawa doktorska mgr inż. Magdy Słyszewskiej oparta jest na monografii, a badania były częścią projektu OPUS 2020/37/B/NZ9/03355, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań, NCN.

Rozprawa doktorska mgr inż. Magdy Słyszewskiej dotyczy ważnego zagadnienia z zakresu medycyny weterynaryjnej i biologii rozrodu – roli subpopulacji makrofagów endometrium w rozwoju włóknienia błony śluzowej macicy kłaczy (tzw. endometrozy). Praca jest obszerna i przejrzysta, składa się z czternastu rozdziałów obejmujących streszczenia w obu językach (angielskim i polskim), listę skrótów, wstęp, cele i hipotezy badawcze, szczegółowy opis planu poszczególnych eksperymentów i zastosowanych metod, prezentację wyników, ich dyskusję oraz wnioski. Struktura pracy jest logiczna, a poszczególne części płynnie się ze sobą łączą. Autorka wykazała się gruntowną znajomością literatury – we wstępie szeroko omówiono aktualny stan wiedzy na temat endometrozy u kłaczy, procesów włóknienia oraz funkcji makrofagów (zarówno prozapalnych MΦ1, jak i przeciwzapalnych MΦ2) w kontekście przebiegu procesów naprawczych i patologicznych.

Przedstawione cele i hipotezy są jasno sformułowane i wynikają z luk w wiedzy zaprezentowanej w przeglądzie literatury. W pracy zastosowano bardzo szeroki wachlarz metod badawczych: od qPCR, NGS, poprzez Western blot, LC-MS, immunofluorescencję, testy ELISA, cytometrię przepływową oraz inne. Tak kompleksowe podejście pozwoliło Autorce zbadać zagadnienie wieloaspektowo – od oceny dystrybucji makrofagów w tkance endometrium kłaczy o różnym stopniu zaawansowania endometrozy, poprzez określenie właściwości „wydzieliny” (sekretomu) makrofagów o odmiennych fenotypach, aż po zbadanie wpływu tych makrofagów na komórki docelowe (fibroblasty endometrium) zarówno w warunkach hodowli komórkowej, jak i w organizmie żywego zwierzęcia. Wyniki badań są zaprezentowane w sposób czytelny, z pomocą licznych tabel, schematów i fotografii mikroskopowych wysokiej jakości, co ułatwia ich analizę i zrozumienie. Na wyróżnienie

zasługuje zwłaszcza przygotowany przez Autorkę schemat graficzny planu badań, który znakomicie ilustruje układ i zależności między poszczególnymi doświadczeniami.

Z perspektywy merytorycznej rozprawa wnosi istotne nowe informacje. Autorce udało się wykazać, że w endometrium klaczy dotkniętych endometrozą dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy subpopulacjami makrofagów – stwierdzono przewagę makrofagów o fenotypie prozapalnym (MΦ1) nad populacją przeciwzapalną (MΦ2). Co ważne, sugeruje to, że przewaga MΦ1 może sprzyjać rozwojowi włóknienia poprzez podtrzymywanie stanu zapalnego i aktywację innych komórek układu odpornościowego, podczas gdy relatywny niedobór MΦ2 ogranicza procesy regeneracyjne i remodelujące macicy. W badaniach *in vitro* Autorka zaobserwowała, że oba typy spolaryzowanych makrofagów (zarówno MΦ1, jak i MΦ2 uzyskane w hodowli) wpływają na funkcje komórek fibroblastycznych endometrium, m.in. ich żywotność, proliferację i migrację – przy czym efekty te okazały się w dużej mierze porównywalne dla obu subpopulacji, co stanowi cenny i nieoczywisty wniosek. Makrofagi typu MΦ1 nie indukowały bezpośrednio większej depozycji kolagenu przez fibroblasty, natomiast podtrzymywały środowisko prozapalne (uwalniając cytokiny prozapalne i modulując ekspresję genów związanych z reakcją immunologiczną), co może pośrednio inicjować włóknienie. Z kolei makrofagi typu MΦ2 regulowały ekspresję genów związanych z przebudową tkanki i procesami zapalnymi w fibroblastach. Wskazuje to na ich rolę w przebudowie macierzy pozakomórkowej ECM – jednak ich mniejsza ilość w warunkach endometrozy zaburza te pro-regeneracyjne procesy, przyczyniając się najprawdopodobniej do postępującego zwłóknienia endometrium. Interesującym elementem pracy jest także podjęcie próby modelowania sytuacji *in vivo* – dokonano doświadczałnej infuzji autologicznych makrofagów o fenotypie MΦ1 lub MΦ2 do macicy klaczy. Pomimo ograniczonej skali takiego doświadczenia, pozwoliło ono ocenić odpowiedź komórek endometrium na poziomie ekspresji genów.

Podsumowując rozprawa została przygotowana na wysokim poziomie merytorycznym, a zakres przeprowadzonych badań świadczy o dużych umiejętnościach i dojrzałości badawczej Autorki. Uzyskane wyniki mają znaczenie poznawcze dla zrozumienia patogenезы endometrozy u klaczy i mogą mieć w przyszłości znaczenie aplikacyjne przy opracowywaniu strategii terapeutycznych (np. modulacja odpowiedzi immunologicznej w macicy). Warto zaznaczyć, że pomimo szerokiego zakresu tematycznego pracy, całość jest spójna, a poszczególne cele zostały zrealizowane. Język pracy (język angielski) jest poprawny i zrozumiały, a układ tekstu i jakość opracowania edytorskiego bardzo dobre.

Recenzowana praca jest wartościowa i w pełni zasługuje na pozytywną ocenę. Poniżej przedstawiam uwagi do niektórych rozdziałów rozprawy, ze szczególnym uwzględnieniem elementów wymagających poprawy lub doprecyzowania przed ostatecznym wysłaniem manuskryptów do publikacji.

Rozdział I: Wstęp

Rozdział wprowadzający prezentuje obszerny przegląd literatury dotyczącej endometrozy u klaczy, procesu włóknienia oraz roli układu immunologicznego (zwłaszcza makrofagów) w tych procesach. Na pochwałę zasługuje kompleksowość wprowadzenia – Autorka omówiła m.in. klasyfikację zmian endometrium według Kenney i Doiga, czynniki ryzyka rozwoju endometrozy, metody diagnozowania i leczenia tego schorzenia, a także przybliżyła mechanizmy biologiczne leżące u podstaw włóknienia (rola fibroblastów, metaloproteinaz i ich inhibitorów itp.). Szczegółowo scharakteryzowano również samą biologię makrofagów, ich

plastyczność fenotypową (MΦ1 vs MΦ2) oraz potencjalny udział w regulacji włóknienia w różnych modelach (co stanowi istotne tło teoretyczne dla podjętych badań). Wprowadzenie jest napisane rzetelnie i opiera się na aktualnych publikacjach, w tym tych najnowszych (są cytowane prace z lat 2023–2024, co świadczy o aktualności bibliografii).

Należy jednak zwrócić uwagę na styl i klarowność niektórych fragmentów. W części opisującej układ immunologiczny i funkcje makrofagów (szczególnie podrozdziały 1.2.2 do 1.4) tekst jest miejscami bardzo gęsty od informacji i dość trudny w odbiorze. Autorka mogłaby rozważyć uproszczenie lub lepsze uporządkowanie tego fragmentu, tak aby najważniejsze koncepcje (np. dualna rola makrofagów w procesach pro- i anty-fibrotycznych) były wyraźniej wyodrębnione i łatwiejsze do przyswojenia dla czytelnika.

Rozdział 2: Hipotezy badawcze

W rozdziale tym Autorka przedstawia założenia, które zamierzała zweryfikować w toku badań. Hipotezy sformułowano jasno i logicznie, odpowiadają one na zidentyfikowane we wstępie problemy badawcze. Jest ich kilka (cztery główne hipotezy), co odzwierciedla złożoność podjętej tematyki. Hipotezy dotyczą kolejno: (I) zmiany liczebności i proporcji makrofagów MΦ1/MΦ2 w endometrium kłaczy z endometrozą, (II) charakterystyki uzyskanych *in vitro* makrofagów MΦ1 i MΦ2 oraz ich przeciwnego wpływu na fibroblasty, (III) roli prozapalnych makrofagów MΦ1 w promowaniu stanu zapalnego i włóknienia w endometrium, oraz (IV) wpływu przeciwzapalnych makrofagów MΦ2 na szlaki związane z remodelowaniem macierzy pozakomórkowej.

Pozytywnie oceniam zgodność hipotez z wcześniejszym przeglądem literatury – jasno wynika z nich, jakie konkretne aspekty Autorka planuje zbadać, aby uzupełnić luki w wiedzy. Wszystkie hipotezy są weryfikowalne poprzez zaplanowane eksperymenty.

Rozdział 3: Cele pracy

Rozdział z celami pracy przedstawia główny cel rozprawy (określenie roli różnych subpopulacji makrofagów w rozwoju włóknienia endometrium u kłaczy z endometrozą) oraz szczegółowe cele badawcze powiązane z poszczególnymi etapami eksperymentalnymi. Cele szczegółowe obejmują m.in.: analizę ekspresji markerów makrofagów (CD68, iNOS, ARG1) i ich lokalizacji w tkance endometrium różnych kategorii (I, IIA, IIB, III) i faz cyklu, uzyskanie i scharakteryzowanie subpopulacji makrofagów oraz zbadanie wpływu ich sekretom na endometrialne fibroblasty, a także ocenę efektów podania tych makrofagów do macicy *in vivo*.

Cele są sformułowane poprawnie i są zgodne z hipotezami – każdy cel rozwija któryś z aspektów hipotez badawczych. Ich realizacja pozwala kompleksowo odpowiedzieć na pytanie główne pracy.

Rozdział 4: Projekt eksperymentów

W tym rozdziale Autorka przedstawiła ogólny zarys przeprowadzonych badań. Szczególnie pomocne są wspomniane wcześniej schematy graficzne ilustrujące plan doświadczeń. Taki sposób prezentacji jest bardzo przejrzysty i pomocny dla czytelnika, pozwalając zrozumieć kompleksowy projekt pracy na pierwszy rzut oka.

Rozdział 5: Materiały i metody

Rozdział metodologiczny opisuje szczegółowo materiał biologiczny oraz wszystkie zastosowane metody badawcze. Zawarto tu informacje o pozyskaniu próbek endometrium, o procedurach izolacji komórek, hodowli i stymulacji makrofagów, eksperymentach na fibroblastach, a także o technikach analitycznych. Zakres zastosowanych metod jest imponujący i świadczy o dużych kompetencjach badawczych Autorki. Opisy poszczególnych technik są na ogół wyczerpujące.

Mimo ogólnie bardzo wysokiego poziomu tej części pracy, dostrzegam kilka elementów wymagających uzupełnienia lub korekty:

- Niewielka liczba zwierząt w badaniach – Przeprowadzone eksperymenty opierają się na stosunkowo małych grupach klaczy. Przykładowo, w badaniu *in vivo* wykorzystano łącznie 10 klaczy (po 5 w każdej grupie doświadczalnej), a wiele analiz *in vitro* przeprowadzono na komórkach pochodzących od 5–6 zwierząt. Taka ograniczona liczebność próby rodzi pytania o moc statystyczną testów – czy była ona wystarczająca, by wykryć zakładane efekty. Brakuje informacji, czy Autorka przeprowadziła analizę mocy statystycznej przy planowaniu eksperymentów. Należy rozważyć dodanie takiej informacji lub dyskusję na temat wpływu ograniczonej liczby zwierząt na siłę wyciągniętych wniosków (szczególnie w kontekście wielu porównań statystycznych wykonywanych w pracy).
- Brak konsekwencji w podawaniu liczby zwierząt w opisach doświadczeń – W opisie poszczególnych eksperymentów nie zawsze jasno podano, ile zwierząt lub próbek wzięto do danej analizy. Dla czytelnika istotne jest, czy np. w każdym z eksperymentów w ramach Zadania 1 zastosowano próbki od tej samej grupy 10 klaczy, czy może od innej liczby. Miejscami pojawiają się niejasności – np. czytając metody można odnieść wrażenie, że w pewnych eksperymentach liczebność grup była bardzo mała (czy wręcz pojedyncza), co zapewne nie jest prawdą, a wynika jedynie z braku podanej wartości *n*. Należy uzupełnić opisy metod o jednoznaczne informacje dotyczące liczby zwierząt/próbek wykorzystanych w każdym doświadczeniu i każdej grupie badawczej. Przykładowo: „tkanki endometrium kategorii I, IIA, IIB i III pobrano od $n = X$ klaczy w każdej grupie”, „hodowle fibroblastów założono z materiału od $n = Y$ klaczy” itp. Ujednolicenie takiego opisu znacznie poprawi klarowność metod.
- Niejasność co do wykorzystania tych samych zwierząt w różnych doświadczeniach – W pracy użyto materiału biologicznego (krew i endometrium) pochodzącego od klaczy. Pojawia się pytanie, czy klacze od których pobrano krew to inna pula zwierząt niż te, od których pobrano endometrium. Również czy te klacze to te same konie poddane później infuzji domacicznej – jeśli tak, należy to jasno napisać i uzasadnić wybór.
- Brak pełnej charakterystyki zwierząt zgodnej z wytycznymi ARRIVE (nie dotyczy próbek pobranych z rzeźni) – Choć Autorka podaje ogólnie, że w eksperymencie *in vivo* użyto klaczy zimnokrwistych w wieku 2–5 lat, ważących ok 600kg, brakuje bardziej szczegółowego opisu zwierząt, który jest zalecany przez wytyczne ARRIVE dla przejrzystego raportowania badań na zwierzętach. Warto również dodać, czy oceny według Kenney & Doig dokonał doświadczony histopatolog i zawsze ta sama osoba.
- Brak opisu stanu macicy i obrazów z diagnostyki – Podczas zbierania materiału z „żywych klaczy” przeprowadzano badanie ginekologiczne z użyciem USG celem potwierdzenia fazy rui i wykluczenia zmian patologicznych. Warto rozbudować opis

tego etapu: dodać opis stanu macicy (np. stopień obrzęku endometrium, tonus macicy – obecnie uznaje się to za standard) podczas badania rektalnego/USG. Dodatkowo, można byłoby zamieścić zdjęcia ultrasonograficzne ilustrujące np. macicę klaczy w fazie folikularnej z obrzękiem endometrium – wzbogaciłoby to pracę o element dokumentacyjny i potwierdziło stan wyjściowy narządu przed podaniem makrofagów.

- Brak badań krwi na poziom progesteronu (P4) – Ustalanie fazy cyklu na podstawie obrazu jajników i zachowania klaczy jest standardową procedurą, jednak obecnie często uzupełnia się ją badaniem poziomu progesteronu we krwi, aby potwierdzić, że klacz jest rzeczywiście w fazie lutealnej.
- Brak opisu procedury pobierania biopsji endometrium – W tym rozdziale warto doprecyzować, jak technicznie pobierano biopsje endometrium zarówno u klaczy rzeźnych (tam wycinki były pobierane z rogów macicy), jak i u klaczy żywych (tutaj standardowy koński biopsator sięga jedynie do trzonu macicy). Nie ma informacji, jakim narzędziem i w jaki sposób wykonano te biopsje u „żywych klaczy” – czy użyto kleszczy biopsyjnych przez pochwę czy próby pobrano metodą endoskopową?
- ELISA – czułość metod – w pracy wykonywano oznaczenia ELISA ale nie podano intra- i inter-assay variability, co jest wymagane.
- Dobór metod analitycznych do oznaczenia białek – Zastosowano kilka technik do analizy białek, natomiast warto byłoby wyjaśnić, dlaczego różne białka badano różnymi metodami. Np. kolagen czy MMPs oznaczano metodą Western blot, a TIMP już za pomocą testu ELISA.

Rozdział 6: Wyniki

W tym rozdziale Autorka przedstawia uzyskane dane w podziale na trzy główne zadania badawcze, zgodnie z wcześniej opisanym planem. Prezentacja wyników jest przejrzysta i dobrze zorganizowana – kolejne podrozdziały odpowiadają eksperymentom zaplanowanym w ramach poszczególnych hipotez. Tekst rozdziału jest zwięzły, koncentruje się na najważniejszych obserwacjach, a szczegółowe dane liczbowe są umieszczone w tabelach i zilustrowane na wykresach.

Na uwagę zasługuje bardzo dobra jakość opracowania graficznego wyników: ryciny są estetyczne, czytelne i odpowiednio opisane. Liczne fotografie mikroskopowe (np. obrazy immunofluorescencji makrofagów w tkance endometrium) są wyraźne i wysokiej jakości – pozwalają dostrzec istotne szczegóły, co świadczy o umiejętnościach Autorki w zakresie dokumentacji mikroskopowej. W tabelach zebrano duże ilości danych, a ich czytelność jest dobra.

Uwzględnienia wymagają:

- Dokładne wartości p zamiast zakresów – W tekście wyników zastosowano konwencję opisu istotności statystycznej poprzez oznaczenia „ $p < 0,05$ ”. Dla większej rzetelności i transparentności obecnie przyjmuje się podawanie konkretnych wartości istotności (np. $p = 0,03$ zamiast ogólnego stwierdzenia $p < 0,05$).
- Pełne obrazy Western blot – W pracy przedstawiono wyniki Western blot, jednak widoczne są jedynie wycinki blotów (fragmenty zawierające prążki dla białek

docelowych i kontrolnych). Zgodnie z obecnymi standardami publikacyjnymi, zaleca się zamieszczenie pełnych skanów blotów (np. w materiałach uzupełniających). W rycinie nr 30 i 34 na zdjęciu z Western blotów kontrolne białko GAPDH ma podwójny prążek. Warto wyjaśnić w opisie figury, dlaczego widoczne są dwa pasma i które z nich było analizowane.

- Forma wykresów – Większość danych ilościowych przedstawiono na wykresach kolumnowych (bar graph) z zaznaczonym odchyleniem standardowym. Bardziej zasadnym byłoby użycie wykresów pudełkowych (box-plot). Box-ploty lepiej ukazują rozkład danych i są zalecane do prezentacji małych prób, ponieważ kolumny z błędem standardowym mogą sugerować precyzję, która przy małej próbie jest umowna.

Reasumując, rozdział wyników stoi na wysokim poziomie pod względem jakości danych i ich prezentacji. Zaproponowane powyżej poprawki dotyczą głównie standardów raportowania i drobnych usprawnień graficznych. Ich wprowadzenie uczyni wyniki jeszcze bardziej transparentnymi i przekonującymi.

Rozdział 7: Dyskusja

Rozdział dyskusji stanowi obszerną interpretację uzyskanych wyników na tle aktualnej wiedzy. Autorka szczegółowo omawia poszczególne zagadnienia, odnosząc się do literatury światowej z zakresu endometrozy, immunologii i patologii narządu rodniczego. Dyskusja została logicznie podzielona zgodnie z kolejnością zadań badawczych, co ułatwia śledzenie argumentacji. Na wstępie każdej części przypomniane są najważniejsze ustalenia z wyników, a następnie zestawiane z danymi innych autorów. Merytorycznie, dyskusja świadczy o dojrzałości naukowej Autorki – potrafi ona krytycznie ocenić własne wyniki i znaleźć dla nich wytłumaczenie w mechanizmach biologicznych. Dyskusja zawiera również odniesienia do potencjalnych zastosowań praktycznych – np. czy modulowanie populacji makrofagów mogłoby stać się strategią terapii endometrozy u klaczy. Autorka wspomina o możliwości wykorzystania komórek macierzystych czy modulacji szlaków sygnałowych, co pokazuje szerszą perspektywę. Takie spojrzenie perspektywiczne jest bardzo cenne w pracy doktorskiej.

Moje uwagi do dyskusji są nieliczne i mają charakter doprecyzowujący:

- Wyjaśnienie celu oznaczenia CRP – W pracy Autorka wspomina o mierzeniu poziomu CRP (białka ostrej fazy) po podaniu makrofagów do macicy. Dla czytelnika nie jest całkiem oczywiste, dlaczego wybrano akurat CRP jako wskaźnik – czy spodziewano się uogólnionej reakcji zapalnej? Warto dodać zdanie lub dwa wyjaśnienia. Np.: „W badaniu in vivo zmierzono poziom CRP we krwi klaczy po infuzji makrofagów, traktując go jako wskaźnik systemowej odpowiedzi zapalnej na lokalny zabieg. Wzrost CRP (bądź jego brak) miał odpowiedzieć na pytanie, czy podanie aktywowanych makrofagów wywołuje zauważalną reakcję ogólnoustrojową.” Ponieważ wyniki CRP były neutralne, można to krótko skomentować – że nie było zmian w stężeniu CRP, co oznacza, że reakcja miała charakter lokalny i nie zaburzała stanu ogólnego organizmu, co dobrze rokuje dla ewentualnych terapii.
- Immunofluorescencja vs immunohistochemia – czy użycie immunofluorescencji było najlepszym wyborem, czy może tradycyjna immunohistochemia obrazująca tkanki endometrium (IHC) byłaby lepsza. Być może warto w dyskusji wyjaśnić powód zastosowania IF. Np.: „Zastosowano barwienie immunofluorescencyjne ze względu na możliwość jednoczesnego wykrycia wielokolorowo dwóch markerów, co jest trudne do uzyskania metodą IHC na jednej próbce.” Brakuje również w opisie pod rycinami opisu lokalizacji miejsca barwienia np. cytoplazmatyczne, jądrowe, błonowe.

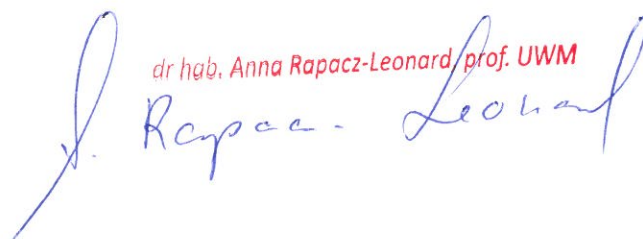
Rozdział 8 i 9: Podsumowanie wyników i wnioski

W zakończeniu pracy Autorka sformułowała konkretne wnioski, wypunktowane i odpowiadające poszczególnym hipotezom. Wnioski te wynikają wprost z uzyskanych danych i stanowią zwięzłe podsumowanie najważniejszych wyników rozprawy. Wnioski odzwierciedlają poszczególne rezultaty pracy i są one sformułowane bardzo klarownie.

Podsumowanie

Oceniana rozprawa doktorska mgr inż. Magdy Słyszewskiej jest pracą bardzo dobrą, nowatorską i świadczącą o wysokich kompetencjach Autorki. Przedstawione wyniki mają znaczenie zarówno poznawcze, jak i potencjalnie praktyczne dla hodowli koni. **Oceniam pracę jednoznacznie pozytywnie** i stwierdzam, że spełnia ona wymogi stawiane rozprawom doktorskim zgodnie w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.z 2024r. poz. 1571 z późn. zm.). W związku z powyższym przedstawiam Radzie Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie wniosek o dopuszczenie Pani mgr inż. Magdy Słyszewskiej do dalszych etapów postępowania mającego na celu nadanie stopnia doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo.

Wnoszę o przyznanie wyróżnienia przedłożonej rozprawie doktorskiej, ze względu na oryginalność podjętego tematu, ponadprzeciętny zakres badań, wysoką jakość i przejrzystość prezentacji wyników oraz potencjał aplikacyjny.


dr hab. Anna Rapacz-Leonard, prof. UWM