

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

Poznań 10.07.2025 r.

### **Recenzja**

pracy doktorskiej mgr inż. Magdy Słyszewskiej pt.:

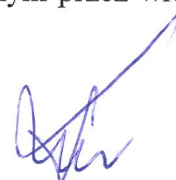
*Dynamics of endometrial macrophage subpopulations and their relevance in processes associated with the development of mare endometrial fibrosis in the course of endometrosis*

wykonanej w Zespole Molekularnych Podstaw Rozrodu Koni,  
Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie  
pod kierunkiem dr hab. Anny Szóstek-Mioduchowskiej

Rozprawa doktorska 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* jest napisana w języku angielskim i ma klasyczną formę wydruku komputerowego, z uwzględnieniem streszczenia w języku polskim oraz angielskim i tradycyjnym porządkiem redakcyjnym z wyszczególnieniem następujących rozdziałów: wykaz skrótów, wstęp, hipotezy badawcze i cele pracy, projekt eksperymentu, materiał i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie wyników, wnioski oraz wykaz literatury, tabel, rycin, jak również zamieszczono w pracy dane uzupełniające.

Badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej zostały sfinansowane z budżetu Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu OPUS 2020/37/B/NZ9/03355, a na realizację badań uzyskano zgodę (nr 27/2022) Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie.

Endometroza, czyli chroniczne degeneracyjne zapalenie błony śluzowej macicy, manifestująca się m.in. zaburzeniami w obrębie macierzy międzykomórkowej i różnego stopnia włóknieniem okołogruzołowym jest procesem intensywnie badanym przez wiele



zespołów, ze szczególnym nastawieniem na patogenезę tych zmian. Temu właśnie zagadnieniu Doktoranta poświęciła najwięcej uwagi we wstępie do pracy doktorskiej, analizując szczegółowo wyniki badań zawartych w wielu publikacjach, skupiając się na prawdopodobnej roli makrofagów w przebiegu tego procesu oraz szczegółowo opisując rolę i zmiany w obrębie fibroblastów obserwowane w procesie włóknienia.

Moim zdaniem niepotrzebnie w przeglądzie piśmiennictwa są poruszane zagadnienia związane z próbami leczenia endometrozy. Po pierwsze nie jest to tematem pracy doktorskiej, po drugie zwiększa to objętość i tak bardzo obszernej dysertacji. Niemniej przegląd piśmiennictwa jest napisany bardzo czytelnie, w przemyślany sposób, jest przez to łatwy w odbiorze i wskazuje na bardzo dobre teoretyczne przygotowanie Doktorantki do realizacji celów badawczych stawianych w ramach pracy doktorskiej. Ponadto dogłębna analiza piśmiennictwa pozwoliła na sprecyzowanie hipotez badawczych.

Uogólniając, w rozprawie doktorskiej przyjęto założenie, że odmienne subpopulacje makrofagów mogą występować w endometrium klaczy w różnym nasileniu, co może determinować kierunek zmian zachodzących w macierzy zewnątrzkomórkowej, wpływając na przebieg i intensywność procesów zwyrodnieniowych. W celu udowodnienia/zaprzeczenia postawionym hipotezom badawczym postanowiono przeanalizować występowanie subpopulacji makrofagów typu I i II w endometrium klaczy, a następnie oceniono wpływ sekretu końskich monocytów na zmiany markerów stanu zapalnego, profile transkryptomiczne oraz właściwości fibroblastów izolowanych z endometrium zakwalifikowanego do kategorii I wg Kenney i Doig (1986). Badania te przeprowadzono *in vitro*, a w ramach doświadczenia *in vivo* analizowano zmiany molekularne w endometrium po wewnątrzmacicznej inokulacji wyizolowanych uprzednio subpopulacji makrofagów. Obserwacje *in vivo* również ograniczono do klaczy zakwalifikowanych do kategorii I wg Kenney i Doig (1986).

Przyjęte hipotezy badawcze są jak najbardziej słuszne, wynikają bezpośrednio z aktualnego stanu wiedzy, a realizacja postawionych w pracy doktorskiej celów badawczych z wykorzystaniem nowoczesnych i zaawansowanych metod analitycznych gwarantuje uzyskanie odpowiedzi na nurtujące Doktorantkę pytania. W tym miejscu rodzi się jedynie pytanie dlaczego obserwacje ograniczono do klaczy zakwalifikowanych do kategorii I wg Kenney i Doig (1986)?

Materiał do badań pobrano poubojowo w ilości 109 wycinków endometrium pozyskanych w fazie lutealnej i 96 wycinków z fazy folikularnej cyklu płciowego. Klasyfikację fazy cyklu płciowego prowadzono w oparciu o makroskopowy obraz struktur

znajdujących się na jajnikach, co jest generalnie akceptowalne, choć większą precyzję uzyskano by w oparciu o dodatkowo wykonany pomiar stężenia progesteronu. Z kolei krew do izolacji monocytów pobrano przyżyciowo od sześciu zdrowych, nieźrebnych i „niecyklicznych” klaczy. Proszę o wyjaśnienie w tym aspekcie pojęcia „niecykliczne”, czy to było w trakcie zimowego anestrus? Również w przypadku pobierania materiału poubojowo powinna być sprecyzowana pora roku, w której pozyskiwano materiał, gdyż np. brak ciała żółtego i obecność dużego pęcherzyka w jesiennym okresie przejściowym wcale nie musi być powiązany z rują. Opis klasyfikacji klaczy do eksperymentu *in vivo* nie precyzuje czy któraś z klaczy już była ciężarna, czy rodziła. Szkoda, że nie pobrano próbek do cytologicznej i mikrobiologicznej oceny środowiska macicy, co dałoby więcej informacji odnośnie stanu endometrium. Niektóre klacze były bardzo młode, bowiem nie przekroczyły trzeciego roku życia (nie jest sprecyzowany wiek klaczy przynależny do każdej z osobna), co zmusza do zadania pytania, czy zbyt młody wiek, prawdopodobnie nie zapewniający osiągnięcia pełnej dojrzałości hodowlanej u koni zimnokrwistych nie wpłynął na wyniki eksperymentu. Niezbyt zrozumiałe jest przygotowanie klaczy do eksperymentu i podawanie hormonów w celu synchronizacji rui i owulacji z użyciem mało przydatnych w praktyce analogów GnRH.

Z opisu eksperymentu wynika, że najpierw klaczom podawano domacicznie PBS, wykonywano zaplanowane procedury, a w kolejnej rui tym samym klaczom podawano izolowane makrofagi i przeprowadzano te same procedury. W takim układzie doświadczenia ilość zwierząt wziętych do obserwacji wyniósł 5, a nie 10. Z kolei dane zawarte w streszczeniu oraz w rozdziale Wyniki wskazują, że odpowiednio makrofagi typu I i II były podawane po trzech klaczom w każdej grupie. Proszę wyjaśnić te rozbieżności. Proszę również wyjaśnić co było przesłanką do zastosowania 2 mln makrofagów podanych domacicznie w ramach eksperymentu przeprowadzonego *in vivo* oraz co było przesłanką do pobrania wycinka endometrium sześć godzin od wprowadzenia makrofagów do macicy? Zawsze nurtuje mnie pytanie jaki jest wpływ na środowisko macicy podawania niewielkich, kilkumililitrowych próbek (2 ml), ponieważ tak mała ilość nie jest w stanie pokryć całej powierzchni endometrium. Również ocena wpływu aplikowanych mediów do macicy po sześciu godzinach, w mojej opinii, nie jest w pełni miarodajna co do ustalenia wpływu na patogenezę endometrozy, bowiem przypadłość ta cechuje się nawet wieloletnim, stopniowym rozwojem zmian. Niemniej analiza przyjętych kryteriów w tak krótkim czasie po aplikacji wybranych czynników jest istotna w przypadku patogenezы postanówkowego zapalenia błony śluzowej macicy, która to choroba w dłuższej



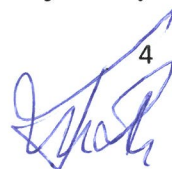
perspektywie może być podłożem dla endometrozy. Pomimo moich uwag i pytań odnośnie tej części eksperymentu uważam, że jest to bardzo istotna część pracy doktorskiej, w pełni nowatorska, polegająca na wprowadzeniu do macicy klaczy subpopulacji izolowanych makrofagów, a uzyskane wyniki rzucają zupełnie nowe światło na patogenezę chorób macicy klaczy.

Ponadto w zakresie metodyki prowadzonych badań na uwagę zasługuje precyzyjny opis izolacji komórek z endometrium oraz szczegółowy opis przeprowadzonych procedur laboratoryjnych. Uważam, że nakład pracy oraz mnogość eksperymentów znacząco wykracza ponad wymagania stawiane rozprawom doktorskim i również zasługuje na wyróżnienie.

Wyniki badań przedstawiono z należytą starannością, dokumentując je licznymi tabelami, wykresami oraz rycinami, co ułatwia ich analizę i odbiór. W ramach przeprowadzonych badań m.in. nie stwierdzono istotnych różnic w transkrypcji mRNA CD68 między nasileniem endometrozy oraz fazą folikularną i lutealną cyklu płciowego. Jednakże wykazano wyższą ekspresję transkrypcji mRNA, jak i ilości białka CD68 w fazie pęcherzykowej w porównaniu do fazy lutealnej cyklu rujowego. Nie zaobserwowano istotnych różnic w odsetku komórek CD68+iNOS+ARG1- oraz CD68+iNOS-ARG1+ między kategoriami zmian notowanych w endometrium i fazami cyklu rujowego, choć stwierdzono istotny wzrost odsetka komórek CD68+iNOS+ARG- w endometrium kategorii IIA, kategorii IIB oraz kategorii III w porównaniu do endometrium kategorii I. Również nie stwierdzono różnic w immunolokalizacji komórek CD68+iNOS+ oraz CD68+ARG1+ pomiędzy nasileniem zmian w endometrium oraz fazami cyklu rujowego. Wykazano, że eqMD-M $\Phi$ <sup>IFN $\gamma$ /LPS</sup> i eqMD-M $\Phi$ <sup>IL-4/IL-13</sup> zmieniają ekspresję czynników związanych z ECM oraz ekspresję markerów stanu zapalnego na poziomie mRNA w fibroblastach błony śluzowej macicy hodowanych w warunkach *in vitro*.

W ramach obserwacji prowadzonych *in vivo* wykazano, że domaciczne podanie eqMD-M $\Phi$ <sup>IFN $\gamma$ /LPS</sup> przyczyniło się do wzrostu, a podanie eqMD-M $\Phi$ <sup>IL-4/IL-13</sup> obniżyło istotnie ekspresję czynników związanych z ECM na poziomie mRNA. Ponadto domaciczne podanie eqMD-M $\Phi$ <sup>IFN $\gamma$ /LPS</sup> zwiększyło ekspresję markerów stanu zapalnego na poziomie mRNA.

Omawianie wyników jest prowadzone przez Doktorantkę adekwatnie do uzyskanych wyników. Doktorantka stwierdza, że wzrost obecności makrofagów w endometrium w kategorii IIA w porównaniu do kategorii I, przy braku różnic pomiędzy kategorią IIB i III wskazuje na ich istotną rolę w procesie inicjacji degeneracji błony



4

śluzowej macicy klaczy. Autorka wskazuje, że zaburzenie proporcji makrofagów I i II typu może być jednym z czynników determinujących rozwój endometrozy, a w szczególności wzrost liczby makrofagów typu I (CD68+iNOS+ARG-) towarzyszący postępującej endometreozie. Przewaga makrofagów typu 1 może sprzyjać aktywacji fibroblastów, co prowadzi do nadmiernego odkładania się macierzy pozakomórkowej i w konsekwencji do rozwoju włóknienia. Te stwierdzenia są poparte szeregiem obserwacji wykonanych w ramach eksperymentów *in vitro*.

W mojej ocenie najistotniejsza część pracy doktorskiej dotyczy eksperymentów wykonanych *in vivo*. Dzięki temu wyeliminowano pewne problematyczne niedogodności związane z wyciąganiem wniosków jedynie w oparciu o wyniki analiz uzyskanych na materiale pobieranym pośmiertnie. Należy podkreślić, że tego typu badania nie są obarczone problemami etycznymi, ponieważ klacze bardzo dobrze znoszą wykonywanie procedur zastosowanych w niniejszej pracy doktorskiej, a odpowiedź na wprowadzone do macicy różnorodne media ma charakter jedynie lokalny, bez oddziaływania ogólnoustrojowego, co również potwierdzono w prowadzonych obserwacjach, bowiem w trakcie eksperymentu nie stwierdzono wzrostu stężenia białek ostrej fazy we krwi. W tym miejscu pozwolę sobie zacytować jeden z ważniejszych fragmentów zawartych w rozdziale Dyskusja, który wskazuje na rozbieżności obserwacji prowadzonych na materiale pozyskanym pośmiertnie i przyżyciowo: *Wyniki eksperymentów in vitro przeprowadzonych w ramach Zadania Badawczego 2 wykazały zbieżną odpowiedź fibroblastów endometrium klaczy na eqMD-MΦ<sup>IFNγ/LPS</sup> oraz eqMD-MΦ<sup>IL-4/IL-13</sup>. Tymczasem badanie in vivo wykazało, że domaciczne podanie eqMD-MΦ<sup>IFNγ/LPS</sup> oraz eqMD-MΦ<sup>IL-4/IL-13</sup> wywołało zmiany w profilu transkryptomycznym, a także w transkrypcji mRNA składników związanych z macierzą pozakomórkową (ECM) i markerów zapalnych w endometrium klaczy, które często wykazywały przeciwny wzorzec. Słusznie Doktorantka zauważa, że wyniki uzyskane z obserwacji in vitro są wybiórczo jedynie pochodną aktywności izolowanych fibroblastów, a wyniki uzyskane z eksperymentu in vivo prezentują aktywność całej struktury histologicznej endometrium. Istotną informacją wynikającą z tej części obserwacji jest udowodnienie, że makrofagi eqMD-MΦ<sup>IFNγ/LPS</sup> oraz eqMD-MΦ<sup>IL-4/IL-13</sup> wywierają odmienne efekty na endometrium klaczy w aspekcie oddziaływania na macierz pozakomórkową oraz reakcję zapalną. W tej części Dyskusji zabrakło mi analizy uzyskanych wyników w oparciu o prace Woodward et al., (Reproduction 2013), oraz Wojtysiak et al. (2020). Pierwsza z tych prac analizuje odpowiedź endometrium na wprowadzone nasienie analizując ekspresję genów dla szeregu mediatorów zapalenia, a*

druga z tych prac opisuje sekrecję białek w macicy po sztucznej inseminacji. Wspólnym mianownikiem tych prac oraz badań własnych Doktorantki jest praktycznie ten sam czas pobierania prób do badań po zadziałaniu wybranego czynnika, tj. nasienia lub podania makrofagów. We wskazanych pracach wykazano, że w ciągu kilku godzin od domacicznej aplikacji czynnika drażniącego dochodzi do zmiany w ekspresji genów odpowiedzialnych za produkcję cytokin modulujących proces zapalny oraz zaobserwowano wzrost stężenia niektórych cytokin oraz białek. Pragnę zaznaczyć, o czym wspomniałem już wcześniej, że po wprowadzeniu do macicy klaczy obojętnie jakich substancji, momentalnie jest aktywowana odpowiedź zapalna, i część pracy doktorskiej prowadzona w ramach eksperymentu *in vivo* w zasadzie opisuje wczesne zmiany wywołane bodźcem drażniącym, który może w dłuższej perspektywie prowadzić do rozwoju endometrozy.

Oceniana praca analizuje wpływ makrofagów na zespół procesów degeneracyjnych, w tym włóknienia okołogruczołowego w przebiegu endometrozy ale nie bada czynników sprzyjających pojawianiu się makrofagów w endometrium. Zastanawia mnie jakie czynniki sprzyjają zwiększaniu się ich liczby i aktywacji makrofagów w endometrium. Wiemy, że każdy bodziec drażniący błonę śluzową macicy gwałtownie rekrutuje napływ neutrofilów, przewlekły stan zapalny sprzyja przewadze limfocytów w strukturze nacieku zapalnego, a pojawienie się eozynofilii jest prawdopodobnie powiązane z aspiracją powietrza do macicy. Niemniej cele postawione w pracy doktorskiej zostały zrealizowane.

Podsumowując uważam recenzowaną pracę doktorską za bardzo interesującą pozycję, rzucającą nowe światło na rolę makrofagów w modulacji procesów towarzyszących zmianom degeneracyjnym w endometrium klaczy, co stanowi istotny krok w zrozumieniu patogenetyki tych zmian. Doktorantka prezentuje wysoką wiedzę teoretyczną z zakresu problemów rozwiązywanych w pracy doktorskiej, czego dowodem jest wyczerpujący i napisany w oparciu o aktualną literaturę światową przegląd piśmiennictwa oraz zredagowana z dużą dojrzałością dyskusja. Na podkreślenie zasługuje również opanowanie przez Doktorantkę szeregu zaawansowanych technik badawczych koniecznych do realizacji założonych celów.

W oparciu o powyższe uważam, że praca doktorska 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*, odpowiada wymogom określonym 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

stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora. W związku z powyższym przedkładałam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie o dopuszczenie mgr. inż. Magdy Słyszewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie na bazie przesłanek wyszczególnionych w recenzji, wskazujących na wysoką wartość naukową pracy doktorskiej, zastosowanie nowoczesnych technik badawczych oraz mocno rozbudowaną część eksperymentalną pracy, znacznie wybiegającą ponad ogólnie stawiane wymagania, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej stosowną nagrodą.

