

Warszawa, 2020.07.31

dr hab. Anna Maria Duszewska, prof. nadzw. SGGW
Zakład Histologii i Embriologii
Katedra Nauk Morfologicznych
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa
tel.: 0225936217, fax: 0225936219
duszewskaanna@hotmail.com



RECENZJA

Rozprawy doktorskiej **Pani mgr Aleksandry Złotkowskiej** pt.: **Udział chemokin w przebudowie błony śluzowej macicy świni**, wykonanej pod kierunkiem dr hab. Anety Andronowskiej, profesor Instytutu w Zakładzie Mechanizmów Działania Hormonów, Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie.

Przedstawiona do oceny Rozprawa doktorska **Pani mgr Aleksandry Złotkowskiej** jest jednotematycznym cyklem opatrzonym tytułem „**Udział chemokin w przebudowie błony śluzowej macicy świni**”, w skład którego wchodzi 3 oryginalne publikacje.

W pierwszej publikacji: **Złotkowska A, Andronowska A.**: Variable chemokine expression in porcine trophoblasts and endometrium during the peri-implantation period. *Theriogenology*; 2019, 131: 16-27. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.03. 010, **Pani mgr Aleksandra Złotkowska** jest pierwszym autorem, a jej udział w niniejszej publikacji został oceniony na 65% i obejmował: współudział w opracowaniu koncepcji badań i projektowaniu doświadczeń, pobranie materiału i wykonanie doświadczeń, analiza i opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu. Praca opublikowana została w czasopiśmie *Theriogenology*, którego IF za rok 2019 wyniósł 2,29, a liczba punktów MNiSzW= 140.

W drugiej publikacji: **Złotkowska A, Andronowska A.**: Chemokines as the modulators of endometrial epithelial cells remodelling. *Scientific Reports*; 2019, 9: 12968 (1-9). doi: 10.1038/s41598-019- 49502-5, **Pani mgr Aleksandra Złotkowska** jest pierwszym autorem, a jej udział w niniejszej publikacji został oceniony na 70% i obejmował: współudział w opracowaniu koncepcji badań i projektowaniu doświadczeń, pobranie materiału i wykonanie doświadczeń, analiza i opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu. Praca opublikowana została w czasopiśmie *Scientific Reports*, którego IF za 2019 rok wyniósł

4,011, a liczba punktów MNiSzW= 140.

W trzeciej publikacji: **Złotkowska A, Andronowska A.**: Modulatory effect of chemokines on porcine endometrial stromal and endothelial cells. Domestic Animal Endocrinology; 2020. doi:10.1016/j.domaniend.2020.106475, **Pani mgr Aleksandra Złotkowska** jest pierwszym autorem, a jej udział w niniejszej publikacji został oceniony na 70% i obejmował: współudział w opracowaniu koncepcji badań i projektowaniu doświadczeń, pobranie materiału i wykonanie doświadczeń, analiza i opracowanie wyników, przygotowanie manuskryptu. Praca opublikowana została w czasopiśmie Domestic Animal Endocrinology, którego IF za 2019 rok wyniósł 2,3, a liczba punktów MNiSzW= 70.

W Rozprawie Doktorskiej wyodrębniono: **Streszczenie pracy** w języku polskim i angielskim; **Wykaz skrótów** w języku polskim i angielskim, **Wstęp, w którym zamieszczono** Hipotezę badawczą, Cel pracy oraz Zadania badawcze, Kolejne rozdziały to **Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski i Bibliografia** (87 pozycje). Na końcu zamieszczono trzy oryginalne **Publikacje** wraz z **Oświadczeniem współautora publikacji**.

Tematyka Rozprawy doktorskiej **Pani mgr Pani Aleksandry Złotkowskiej** wpisuje się w kierunek badań nad interakcją między zarodkiem a matką u świń, prowadzonych przez promotorkę **Kandydatki**, dr hab. Anetę Andronowską, profesor Instytutu. Dlatego podjęcie przez **Panią mgr Aleksandrę Złotkowską** niniejszych badań nad **Udziałem chemokin w przebudowie błony śluzowej macicy świni** było ze wszech miar uzasadnione.

Chemokiny są to specyficzne substancje uwalniane przez różne komórki organizmu w formie konstytutywnej, i wtedy uczestniczą w utrzymaniu homeostazy lub też w formie indukowanej, jako chemokiny zapalne, powstające w wyniku infekcji lub stanu zapalnego. Dość specyficzne znaczenie przypisuje się chemokinom w kontekście endometrium, które podlega regulacji w cyklu rujowym jak i ciąży na drodze endokrynej. W tym kontekście chemokiny, jako jeden z wielu czynników mogą w sposób pośredni i bezpośredni prowadzić do zmian morfologicznych, biochemicznych i molekularnych w obrębie endometrium jak również łożyska, które powstaje w następstwie implantacji. Badania **Pani mgr Pani Aleksandry Złotkowskiej** dotyczyły cyklu rujowego, między 8 a 12 dniem (Publikacja 2 i 3) oraz okresu okołointplantacyjnego, czyli od 10 do 14 dnia (Publikacja 1).

Między 8 a 12 dniem cyklu rujowego, w endometrium postępuje przerost nabłonka, elementów łącznotkankowych i naczyń krwionośnych, a także rozrost gruczołów. Istotne, że z rozszerzonych naczyń krwionośnych do podścieliska łącznotkankowego przechodzi płyn przesiękowy i krwinki. W związku z tym błona śluzowa macicy znacznie grubiej oraz ulega

rozpulchnieniu i w ten sposób zostaje przygotowana do ewentualnego przyjęcia zarodka oraz do wzięcia udziału w wytworzeniu łożyska.

Do macicy, zarodki świni (w stadium od 4 do 8 blastomerów) dostają się około 48 godzin po zapłodnieniu. Zarodki do około szóstego dnia pozostają w pobliżu czubka rogu macicy, po czym są przenoszone do miejsc implantacji. Jest to bardzo dynamiczny okres, w którym jeszcze do 11 dnia można obserwować migrację wewnątrzmaciczną zarodków, co więcej mogą one jeszcze w tym czasie zmieniać kształt z kulistego (2 mm) na wydłużony (5 cm). W 13 dniu blastocysty są już wydłużone do 100 cm. Ponieważ wydłużanie blastocyst nie jest synchroniczne, zarówno kuliste, jak i wydłużone blastocysty mogą występować na tym samym etapie ciąży, czyli do 13 dnia. To może wskazywać na niejednorodność interakcji między poszczególnymi zarodkami a endometrium.

W niniejszej Rozprawie doktorskiej **Pani mgr Aleksandry Złotkowskiej**, błonę śluzową ciężarnej macicy analizowano 10, 12 i 14-go dnia cyklu rujowego. Warto podkreślić, że implantacja u świń przypada na 12-16 dzień od owulacji i jest centryczna. U świń bariera między krążeniem maczynym a płodowym jest najmocniejsza i określana jak nabłonkowo-kosmówkowa, stąd też łożysko zaliczane jest do nieinwazyjnych. Warto jednak zaznaczyć, że już w momencie przylegania kosmówki do endometrium dochodzi do swoistej komunikacji między zarodkiem a matką na poziomie zarówno morfologicznym jak i molekularnym. Aczkolwiek interakcja między zarodkiem a endometrium obserwowana jest znacznie wcześniej poprzez obustronne uwalnianie wielu czynników a także obecności dla nich receptorów. Do 13 dnia rozwoju nabłonek kosmówkowy jest już przyczepiony do błony śluzowej macicy i podąża za fałdowaniem nabłonka matki, co trwa do 18 dnia. Dalsze procesy nie były przedmiotem rozpraw **Pani mgr Aleksandry Złotkowskiej**, stąd też nie zostały przeze mnie przytoczone.

Doktorantka **Pani mgr Aleksandra Złotkowska** postawiła **Hipotezę** badawczą, że: "Chemokiny produkowane przez obecne w świetle macicy zarodki, jak również wydzielane przez komórki błony śluzowej macicy świni oddziałują przez swoiste receptory zlokalizowane na komórkach nabłonka, zrębu oraz śródbłonka naczyń i kontrolują zmiany zachodzące w błonie śluzowej macicy w okresie okołoinplantacyjnym."

Dlatego **Celem pracy Pani mgr Aleksandry Złotkowskiej** było: „Określenie roli chemokin w przebudowie błony śluzowej macicy w okresie implantacji zarodka.”

Postawiony przez **Panią mgr Aleksandrę Złotkowską** Cel był weryfikowany przez realizację następujących zadań badawczych:

1. Określenie ekspresji i lokalizacji chemokin oraz ich receptorów w błonie śluzowej macicy

świni w cyklu rujowym i okresie wczesnej ciąży — badania *in vivo*

2. Określenie ekspresji chemokin oraz ich receptorów w zarodkach świni z okresu wczesnej ciąży — badania *in vivo*
3. Określenie wpływu sygnałów zarodkowych (IFNG, E2) na ekspresję wybranych chemokin w błonie śluzowej macicy świni — badania *in vitro*
4. Określenie wpływu chemokin na funkcjonowanie komórek nabłonka powierzchniowego błony śluzowej macicy świni — badania *in vitro*
5. Określenie wpływu chemokin na funkcjonowanie komórek zrębu błony śluzowej macicy świni — badania *in vitro*
6. Określenie wpływu chemokin na funkcjonowanie komórek śródbłonka błony śluzowej macicy świni — badania *in vitro*

W oparciu o wyniki swoich badań **Pani mgr Aleksandra Złotkowska** sformułowała następujące **Wnioski**:

1. Komórki błony śluzowej macicy świni są zdolne do produkcji badanych chemokin, a profil ich ekspresji uzależniony jest od fazy cyklu rujowego bądź też zaawansowania ciąży.
2. Zwiększona ekspresja chemokin w błonie śluzowej macicy zależy przede wszystkim od produkowanego przez zarodek IFNG, który powoduje zwiększenie ekspresji chemokiny CCL5 w komórkach nabłonka powierzchniowego, chemokin CCL2, CCL5, CCL11, CXCL9, CXCL10 w komórkach zrębu oraz CXCL10 i CXCL12 w komórkach śródbłonka.
3. 10-14 dniowe zarodki świni posiadają na swej powierzchni receptory zdolne do wiązania chemokin produkowanych przez komórki błony śluzowej macicy, oraz są w stanie same syntetyzować chemokiny umożliwiające komunikację zarodka z matką.
4. Chemokiny powodują zwiększenie stopnia proliferacji (CCL2, CCL4, CCL5, CCL8, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12) i migracji (CCL8) komórek nabłonka powierzchniowego. Wpływają również stymulująco (CXCL12) lub obniżają (CCL8) zdolność adhezji tych komórek.
5. Chemokiny stymulują proliferację (CCL2, CCL4, CCL5, CCL8, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL12) oraz migrację (CCL2, CXCL12) komórek zrębu.
6. Chemokiny pozytywnie wpływają na proliferację (CCL4, CCL8, CXCL2, CXCL8) oraz migrację (CCL4, CCL8) komórek śródbłonka, a także obniżają zdolność komórek śródbłonka do tworzenia struktur kapilaro-podobnych (CXCL8, CXCL10, CXCL12).

Na końcu rozdziału **Wnioski** zostało sformułowane zdanie: „Chemokiny, produkowane

przez zarodki i komórki błony śluzowej macicy, oddziałują przez receptory zlokalizowane na komórkach nabłonka powierzchniowego, zrębu i śródbłonka naczyń i poprzez regulację proliferacji, migracji i adhezji komórek uczestniczą w przebudowie błony śluzowej macicy w okresie okołomplantacyjnym”.

Jako Recenzentka jestem świadoma, że w skład jednotematycznego cyklu wchodzi trzy artykuły opublikowane w bardzo prestiżowych czasopismach i o wysokim IF, zwłaszcza praca w Scientific Reports. Bazując wyłącznie na tych publikacjach **Pani mgr Aleksandra Złotkowska** bezspornie spełnia wymogi stawiane Kandydatom do stopnia naukowego doktora.

Jednak wczytując się w Rozprawę doktorską **Pani mgr Aleksandry Złotkowskiej**, będącą zarówno swoistym podsumowaniem trzech oryginalnych publikacji, ale również służącą do wyprowadzenia wniosków końcowych, wychodzą pewne niespójności, a także nieścisłości:

1. Doktorantka napisała, że badania było prowadzone wg zaleceń Komisji Etycznej, ale nie poinformowała, czy na ich przeprowadzenie miała indywidualną zgodę.
2. W moim odczuciu w **TEMACIE** rozprawy doktorskiej powinno być „wybranych” chemokin.
3. We **WSTĘPIE** Doktorantka stwierdziła, że chemokiny są produkowane przez komórki immunologiczne. Należy jednak zaznaczyć, że chemokiny są syntetyzowane i uwalniane również przez wiele komórek nienależących do układu immunologicznego np. fibroblasty, fibrocyty i wiele innych typów komórek. Interesujące, że w kolejnych częściach rozprawy można wnioskować, że Doktorantka ma świadomość pochodzenia chemokin.
4. Pewne zastrzeżenia budzi liczebność i „reprezentatywność” materiału do badań.
 - 4a Materiał do badań *in vitro* wg opisu w rozprawie był pobierany 10 i 12 dnia cyklu rujowego, natomiast w publikacjach 2 i 3 podano, że od 8 do 12 dnia.
 - 4b Zamieszczanie budzi również analiza wyników tzn. w przypadku badań *in vivo* dane podane są dla 10,12 i 14-go dnia natomiast w badaniach *in vitro* wydają się być uśrednione (8-12 dnia), czyli z 5 dni od 5 loch.
 - 4c Wyrażam nadzieję, że w czasie obrony Doktorantka odpowie na moje wątpliwości (4a i 4b), które w sposób istotny wpływają na postrzeganie istotności analizy statystycznej, a tym samym na końcowe wnioskowanie.

5. Kolejną wątpliwość to reprezentatywność materiału. Zarówno w Rozprawie doktorskiej jak i poszczególnych publikacjach nie znalazłam informacji, z której części macicy pobierany był materiał, jakie wielkości (w cm^3) były pobierane wycinki. W publikacji 3 znalazłam, że 5 cm wycinki, ale to nie jest w mojej opinii zbyt precyzyjne określenie.
6. Kolejne zagadnienie dotyczy utrzymania ciąży u świń, gdzie estrogen wytwarzany przez blastocystę jest kluczowym czynnikiem dla jej kontynuacji. Przyjmuje się, że co najmniej cztery zarodki, po dwa w każdym rogu, są potrzebne do wytworzenia wystarczającego poziomu estrogenu, aby uniknąć luteolizy. Stąd też ciekawe, czy Doktorantka analizowała macice pod tym kątem.
7. W kontekście badań *in vitro* nasuwają się pytania:
 - 7a Co zdaniem Doktorantki wchodzi w skład zrębu macicy?
 - 7b Dlaczego stymulacja komórek nabłonka powierzchniowego oraz komórek śródbłonka naczyń przebiegała w temperaturze 37°C .
8. Pytania ogólne:
 - 8.a Dlaczego dane z zadania 3 i 4 były analizowane jednoczynnikową analizą wariancji z testem NIR Fishera'a a z zadania 5 i 6 jednoczynnikową analizą wariancji z testem post-hoc Dunett'a.
9. Wniosek 1 jest zbyt ogólny, zwłaszcza, że badania były prowadzone w fazie lutealnej oraz wyłącznie między 10 a 14 dniem ciąży. We Wnioskach 4,5 i 6 powinno być dodane, że w warunkach *in vitro*. Na końcu rozdziału **Wnioski** zostało zamieszczone zdanie: „Chemokiny, produkowane przez zarodki i komórki błony śluzowej macicy, oddziałują przez receptory zlokalizowane na komórkach nabłonka powierzchniowego, zrębu i śródbłonka naczyń i poprzez regulację proliferacji, migracji i adhezji komórek uczestniczą w przebudowie błony śluzowej macicy w okresie okołoinplantacyjnym”, w moim odczuciu zamiast „w okresie okołoinplantacyjnym” powinno być między 10 a 14 dniem ciąży.

Pomimo powyższych uwag, pragnę zaznaczyć, że wymienione przeze mnie niespójności oraz nieścisłości w żadnym stopniu nie obniżają bardzo wysokiej oceny recenzowanej Rozprawy doktorskiej **Pani mgr Aleksandry Złotkowskiej**. Na uznanie zasługuje podjęcie przez **Doktorantkę** tak trudnych, wielopłaszczyznowych badań, z zakresu embriologii, histologii, biologii molekularnej, immunologii, endokrynologii i rozrodu. Pomimo że, badania **Pani mgr Aleksandry Złotkowskiej** odnosiły się do krótkiego okresu okołoinplantacyjnego,

bo między 10 a 14 dniem ciąży to należy podkreślić, że ten okres charakteryzuje się dynamicznymi zmianami, zarówno w obrębie zarodka (gastrulacja oraz tworzenie błon płodowych) jak i matki (rozpoznanie ciąży, uruchomienie procesów immunosupresyjnych, zmiany morfologiczne, biochemiczne i molekularne w obrębie endometrium). Dlatego z uznaniem należy traktować podjęcie przez **Panią mgr Aleksandrę Złotkowską** niniejszych badań z wykorzystaniem nowoczesnej i zaawansowanej metodyki. Na szczególne uznanie zasługuje samodzielność **Doktorantki**, co wnioskuję z faktu, że w każdej z publikacji jest tylko dwóch autorów: **Pani mgr Aleksandra Złotkowska** i jej Promotorka. Jest to unikatowe zjawisko, świadczące o ponadprzeciętnym zaangażowaniu merytorycznym i metodycznym **Doktorantki** w Rozprawę doktorską.

Podsumowując rozprawę doktorską **Pani mgr Aleksandry Złotkowskiej** pt.: **Udział chemokin w przebudowie błony śluzowej macicy**, opartą na jednotematycznym cyklu złożonym z trzech oryginalnych publikacji, stwierdzam, że podjęta tematyka badawcza pozwoliła na osiągnięcie wartościowych wyników, poszerzających wiedzę z okresu okołointplantacyjnego u świń, przez co niniejsza **Rozprawa doktorska** charakteryzuje się wyjątkowymi walorami poznawczymi.

Przedstawiona do oceny **Rozprawa doktorska**, w oparciu o cykl publikacji, wnosi nową wiedzę do nauki, o czym świadczy opublikowanie wyników badań w renomowanych czasopismach, o bardzo wysokim IF. Całkowity IF **Pani mgr Aleksandry Złotkowskiej** wyniósł = **8,601**, co jest osiągnięciem znacząco przekraczającym wymagania stawiane rozprawom doktorskim - Ustawa o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U., nr 65, z dnia 14 marca 2003 roku).

Przekładam zatem **Radzie Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie** wniosek o dopuszczenie **Pani mgr Aleksandry Złotkowskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego w celu nadania stopnia naukowego doktora.

Z poważaniem

dr hab. Anna Maria Duszewska, prof. SGGW

