Wojciech Niżański

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

UP Wrocław

Wrocław 29.09.2020

Sz. Pan Prof. dr hab. Krzysztof Wąsowicz

Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Szanowny Panie Profesorze,

Niniejszym przedkładam recenzję pracy doktorskiej lek. wet. Blanki Bukowskiej pt. „Endometrialna ekspresja cyklooksygenazy 2 oraz syntazy prostaglandyny F2α i prostaglandyny E u suk w różnych fazach cyklu płciowego oraz z podklinicznym *endometritis* i w różnym wieku" wykonanej w Katedrze Rozrodu Zwierząt z Kliniką, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego pod kierunkiem: prof. dr hab. Tomasza Janowskiego, promotor pomocniczy dr n. wet. Anna Rapacz-Leonard.

Moja ocena pracy jest wysoce pozytywna.

Z poważaniem

Wojciech Niżański

Prof. dr hab. Wojciech Niżański
Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
UP we Wrocławiu

Wrocław, 27.09.2020 r.

Ocena

pracy doktorskiej lek. wet. Blanki Bukowskiej pt. „Endometrialna ekspresja cyklooksygenazy 2 oraz syntazy prostaglandyny F2α i prostaglandyny E u suk w różnych fazach cyklu płciowego oraz z podklinicznym *endometritis* i w różnym wieku"
wykonanej w Katedrze Rozrodu Zwierząt z Kliniką, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego
pod kierunkiem: prof. dr hab. Tomasza Janowskiego

promotor pomocniczy dr n. wet. Anna Rapacz-Leonard

Metropatie należą do najpoważniejszych i najpowszechniej wystepujących chorób układu rozrodczego suk. Szacuje się, że dotyczą one około 20-30% populacji suk nie poddanych gonadektomii. Każdy praktykujący lekarz weterynarii małych zwierząt w codziennej rutynowej pracy spotyka się z przypadkami tzw. zespołu CEH (ang. cystic endometrial hyperplasia)-pyometra, tj. stanami patologii błony śluzowej macicy o etiologii endokrynnej powikłanej zwykle zakażeniem. Brak podjęcia leczenia ropnego zapalenia błony śluzowej macicy prowadzi do śmierci zwierzęcia. Pomimo faktu, iż choroba jest poważna i częsta, niemiernie mało wiemy na temat jej etiopatogenezy. Powszechnie panuje pogląd o pierwotnej roli hormonów steroidowych w etiologii schorzenia. Panuje przekonanie, iż zmiany strukturalne zachodzące w endometrium pod ich wpływem są przyczyną predyspozycji do zakażeń i do rozwoju stanu zapalnego. Inne hipotezy mówią, że jest zgoła odmiennie, że to właśnie pierwotna infekcja bakteryjna zwiększa reaktywność i uwrażliwia endometrium na działanie hormonów, powodując jego nadmierny rozrost w fazie gestagennej, co rozpoczyna sekwencję zdarzeń prowadzącą w efekcie do pyometry.

Od wielu lat doskonalone są metody diagnozowania oraz terapii zespołu CEH-pyometra. W ostatnich dekadach prowadzono również badania nad monitorowaniem przebiegu metropatii za pomocą czułych markerów nasilenia reakcji zapalnej i odpowiedzi ogólnoustrojowej. Jednak niemal zupełnie brak prac dotyczących badań na poziomie molekularnym, które pomogłyby rozwiązać dylemat dotyczący roli czynników hormonalnych i enzymatycznych biorących udział w etiologii i patogenezie schorzenia. Zrozumienie istoty przemian powodujących pojawianie się patologii oraz wyjaśniających stopień jej zaawansowania, może być pomocne w skuteczniejszym prognozowaniu ryzyka wystąpienia i diagnozowaniu choroby oraz opracowywaniu nowych metod jej terapii farmakologicznej.

Właśnie w ten nurt wpisuje się praca Doktorantki. Praca ta jest kontynuacją dobrze zaplanowanych, konsekwentnych i rozpoznawalnych w świecie badań nad patologią rozrodu małych zwierząt prowadzonych w ośrodku prowadzonym przez Promotora pracy – prof. dr hab. Tomasza Janowskiego.

Opracowanie dotyczące metropatii suk oprócz wartości poznawczej, posiada niezwykle duży potencjał aplikacyjny. Z uwagi na brak wyczerpujących danych w piśmiennictwie, uwzględniających badania molekularne i duże zapotrzebowanie na tego rodzaju prace, ich potencjał publikacyjny jest również duży.

Podstawą formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej lek. wet. Blanki Bukowskiej jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 17 lipca 2020 r.

Przedstawiona rozprawa doktorska jest monografią i liczy 145 stron. Została zrealizowana w Katedrze Rozrodu Zwierząt z Kliniką, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pod kierunkiem prof. dr hab. Tomasza Janowskiego. Promotorem pomocniczym jest dr Anna Rapacz-Leonard z tego samego ośrodka.

Praca składa się ze spisu treści, wykazu najważniejszych skrótów, streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, celu badań, materiału i metod, wyników, dyskusji, wniosków, wykazu piśmiennictwa oraz załączników zawierających ważniejsze protokoły barwienia cytologicznego i histologicznego oraz izolacji DNA.

Znajdujący się na początku pracy wykaz skrótów pomaga czytelnikowi w przyswojeniu tekstu. Zawiera długą, 3-stronicową listę rozwinięcia zastosowanych skrótów, może nawet nieco zbyt szczegółową, bowiem przytaczanie skótu oznaczającego mikrogram, mikrolitr, mikromol, mililitr, sekundę czy załącznik można było pominąć. Umieszczone na początku manuskryptu pracy streszczenia w języku polskim i angielskim są syntetycznym opisem przeprowadzonych badań. W obu przypadkach streszczenia napisane są poprawnym językiem.

We wstępie pracy Doktorantka przedstawia cykl płciowy suk, budowę histologiczną endometrium oraz sekwencje jego przebudowy. W dalszej kolejności opisuje stany zapalne błony śluzowej macicy u suk. Na pochwałę zasluguje bardzo dobry opis patomechanizmu CEH, endometritis oraz pyometry suk. Dalej Autorka skupia sie na informacjach na temat ekpresji genów w macicy w stanach zapalnych z uwzględnieniem związanych z chemokinami, cytokinami, działaniem przeciwbakteryjnym, modulacją wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, receptorami Toll-like – 4 i -2 oraz ekspresją genów syntazy

PG w tym PGE2 i PGF2α. Autorka słusznie wyraża pogląd, iż każdą z form endometritis, traktować należy jako odrębne schorzenie o odmiennej i specyficznej etiopatogenezie, stąd należy je odmiennie diagnozować i leczyć. Doktorantka podaje także wiele danych związanych z odpowiedzią ustroju w przypadkach metropatii, w tym związanych ze zmieniającymi sie poziomami białek ostrej fazy zapalnej. Zwraca wreszcie uwagę, na prawdpodobną rolę podklinicznego endometritis w przypadkach zaburzeń płodności samic, w tym dotyczących wczesnej utraty ciąży. W następnym podrozdziale Wstępu Autorka opisuje szlak kwasu arachidonowego i syntezę prostagalnmdyn oraz ich fizjologiczną rolę.

Reasumując, wstęp jest bardzo dobrym opracowaniem na temat cyklu janikowego i metropatii suk, pogłębionym o opis przemian w macicy na poziomie molekularnym. Napisany jest dobrym językiem naukowym. Rozdział ten jest niezwykle szczegółowy. Najbardziej cenię jego część poświęconą zapaleniom macicy i szlakowi przemian kwasu arachidownego. Uważam, że tekst jest tak interesujący, że należy pokusić się o opublikowanie tych dwóch tematów w formie prac przeglądowych w renomowanych czasopismach naukowych.

Sugeruję kilka drobnych poprawek edycyjnych tekstu, np. poprawienie "labolatorium" na "laboratorium", zrezygnowanie z terminologii potocznej typu "chipsy" i poprawienie na "komórki powierzchowne skeratynizowane" w opisie badań cytologicznych, zmianę opisu "zamknięta forma choroby" na "ropomacicze/endometritis przy zamkniętej szyjce" (str 29). Zastanowiłbym się także nad wprowadzeniem w tekście nazwy "diestrus" zamiast "metestrus", jako lepiej pasującej do opisu części fazy lutealnej suk występującej po cieczce. Zdaje sobie sprawę z faktu, że w żadnym wypadku nie jest to błąd i że oba terminy funkcjonują równorzędnie w piśmiennictwie, ale być może już czas, aby rozpocząć starania nad osiągnięciem konsensusu terminologicznego w tej kwestii.

Celem pracy było: 1. Określenie ekspresji mRNA kodującego COX-, PGES i PGFS w endometrium suk w różnych fazach cyklu płciowego, 2. Określenie immunolokalizacji białek COX-2, PGES i PGFS w strukturach endometrium, 3. Określenie ekspresji mRNA kodującego COX-2, PGES i PGFS w endometrium suk z endometritis subklinicznym oraz bez tego schorzenia, a także u zwierząt młodych i starych. Celami dodatkowymi było: 1. Określenie występowania i rodzajów zmian histopatologicznych w endometrium suk w różnych fazach cylu płciowego oraz w różnym wieku, 2. Ocena cytologiczna endometrium suk w różnych fazach cyklu płciowwgo z subklinicznymi zmianami histopatologicznymi oraz u zdrowych.

Badania przeprowadzono na 48 dojrzałych płciowo, nieciężarnych, zdrowych klinicznie sukach rasowych i mieszańcach w wieku 1-9 lat poddanych standardowej owariohisterektomii. Suki były dokładnie zbadane ginekologicznie. Materiał pochodzący z macicy poddawano badaniom cytologicznym, histologicznym, molekularnym oraz określono immunolokalizację białek. Doktorantka opisuje w dysertacji dokładnie aspekty techniczne metodyki, w tym metody pobierania krwi, oznaczeń hormonów oraz przeprowadzania badania cytologicznego. Na podstawie badania klinicznego i badań laboratoryjnych zwierzęta podzielono na 3 grupy względem fazy cyklu jajnikowego: Grupa I Anoestrus (n=16), grupa II-Proestrus i Oestrus (n=16) oraz grupa III (M) Metestrus (n=16). Badania właściwe polegały na badaniu cytologicznym i bakteriologicznym wymazu z rogu macicy, izolacji RNA z homogenatu tkanek macicy i badaniu ekspresji genów COX-2, PGES i PGFS za pomocą RT-PCR, badaniu immunohistochemicznym w celu określenia obecności i immunolokalizacji białek COX-2, PGES i PGFS oraz klasycznym badaniu histologicznym. Autorka opisuje niezwyle szczegółowo metodykę badania genetycznego. Nie dojrzałem jednak w tej częsci pracy cytowania piśmiennictwa dotyczącego tej tematyki. Jednak opis metodyki przeprowadzony jest w tym obszarze bardzo skrupulatnie, z wizualizacją efektów rozdzielania produktów PCR dla genu referencyjnego, opisem starterów użytych w badaniach, wydajności starterów, wykresami amplifikacji real-time PCR dla badanych genów. Opisano także dokładnie metodykę badań immunohistochemicznych. Tutaj na podkreślenie zasługuje fakt, że Autorka posłużyła sie zwalidowanymi przciwciałami i cytuje w tym zakresie stosowne piśmiennictwo. W nastepnej kolejności Doktorantka opisuje metodykę wykonywania badania histologicznego, bakteriologicznego, cytologicznego i szczegóły analizy statystycznej. Ta ostatnia polegała na zastosowawniu testów nieparametrycznych Kruskala-Wallisa oraz analizy post hoc Manna-Whitneya U, analizy wariancji Tukeya-Kramera i Duncana a w odniesieniu do kalkulacji korelacji - test Cohena kappa.

Wykorzystany materiał i zastosowane metody badawcze uznaję za trafne. Podziw budzi ogrom pracy metodycznej i duża liczba ocenianych parametrów. Metodyka ta zasługuje na duże wyróżnienie. Praca ma tło kliniczne, jednak istota jej leży w zaawansowanych technikach laboratoryjnych. Atutem pracy jest swoiste podejście symbiotyczne do obszaru kliniki i badań podstawowowych. Na pochwałę zasługuje też bardzo klarownie zaprojektowany schemat doświadczenmia. Ten ambitny projekt, został rzetelnie zrealizowany, a zaawansowana metodyka jest adekwatna do prowadzonych

badań. Na podkreślenie zasluguje fakt wzajemnego uzupełnienia i komplementarności badań genetycznych i badań dotyczączcych immunolokalizacji oraz ekspresji białek. W dobrze dobranej metodyce widać też rękę promotorów prowadzących Doktorantkę. Mogę jedynie wspomnieć, że Autorka powinna też dodać pozycje piśmiennictwa opisujące metodykę badań RT-PCR oraz konieczne jest poprawienie błędu literowego w nazwie rozdziału, zamiast "Matariały i metody"-"Materiały i metody". Nie znalazłem w tekście informacji na temat przeszłości reprodukcyjnej samic. Być może podzielenie ich na grupy samic, które urodziły wcześniej i samic, które nie były ciężarne, względnie nie mogly zajść w ciążę, wniosłoby dodatkowe ciekawe obserwacje.

Omówienie wyników zostało przeprowadzone przez Autorkę bardzo skrupulatnie i zobrazowane jest czytelnymi rycinami. Na początku rozdziału "Wyniki" znajdujemy opis ekspresji mRNA COX-2 i PGES. Okazało sie że najwyższa ekspresja COX-2 i PGES występowała w fazie anoetrus oraz przypadkach endometritis. Później następuje dokładny opis immunolokalizacji badanych czynników. Dominowala lokalizacja w nabłonku powierzchownym oraz strukturach okołogruczołowych i naczyniach krwionośnych macicy. Tę część wyników zobrazowano tabelami zawierającymi barwne fotogafie oraz tabelami przedstawiającymi intensywność barwienia immunohistochemicznego. W dalszej kolejności opisano wyniki badań histologicznych endometrium i opisano zjawisko podklinicznych zmian endometrium. Uzyskano tu interesujące wyniki. Okazało się bowiem, iż u suk w wieku >5 lat dochodzi niemal w każdym przypadku do zmian endometrium na pozimie histologicznym. U 40% suk w tej grupie wiekowej obserwowoano endometritis a u 40% CEH. Nie potwierdzono tu ani jednego przypadku prawidłowej błony śluzowej macicy. Wreszcie na końcu opisano wyniki badań cytologicznych i bakteriologicznych endometrium. Interesujące, iż nie zaobserwowoano ewidentnych różnic w obrazach cytologicznych wymazów z endometrium, pobranych w stanach fizjologicznych i przy endometritis. Wyniki te zatem były diagostycznie mało przekonujące, pomimo zastosowania szczoteczki cytologicznej. Obserwacje te wpisują się w wieloletnią debatę na temat możliwości zastosowania w praktyce klinicznej cytologii endometrium u suk. Wyniki niniejszej pracy przemawiają za tym, iż cytologia edometrialna u suk nie stanowi tak wartościowej metody diagnostytcznej metropatii, jak ma to miejsce u samic dużych zwierząt. Ta obserwacja posiada niezwykle doniosłe znaczenie dla praktyki. Rozdział napisany jest czytelnie i jasno. Wyniki zilustrowane są rycinami i tabelami. Tekst został starannie podzielony na podrozdziały i logicznie posegregowany, a kolejność prezentowanych wyników jest przejrzysta i zrozumiała. Różnice statystyczne

przedstawiono jasno i czytelnie.

W rozdziale „Dyskusja" Doktorantka daje niezwykle szeroki ogląd na opracowywane zagadnienia. Pogłębia opis wyników oraz komentuje je. Tłumaczy uzyskane zależności i trafnie konfrontuje z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów. Czyni to bardzo wprawnie pomimo tego, że publikacji dotyczących molekularnych aspektów metropatii suk opublikowano niezwykle mało. Również ten rozdział oceniam bardzo pozytywnie. Autorka porusza się swobodnie w omawianych zagadnieniach i posiada na tym polu dużą wiedzę. Na podkreslenie zasługuje kilka błyskotliwych uwag Autorki w tej części tekstu. Autorka słusznie spekuluje, ze zwiększona ekspresja COX-2 i PGES w anoestrus jest prawdopodobnie wyrazem przebudowy endometrium trwającego u tego gatunku przez specyficznie długi okres czasu. Wysoka ekspresja COX-2 w stanach endometritis może wskazywać na celowość podjęcia badań nad skutecznością terapii metropatii suk inhibitorami cyklooksygenazy 2. Doktorantka wskazuje na fakt, że w dużej części populacji suk, zwłaszcza starszych, widoczne są histologiczne cechy zapalenia macicy (podkliniczne endometritis). Stan taki może upośledzać implantację zarodków, prowadząc do wczesnej śmierci zarodkowej. Wreszcie, jak wspomniano, Autorka dowiodła ograniczonej przydatnosci diagnostycznej cytologii endoemetrialnej u suk. Dyskusja zakończona jest jasnym i syntetycznym podsumowaniem.

Sfrmuowano następujące wnioski: 1. Ekspresja mRNA COX-2 i PGES w endometrium suk w cyklu płciowym ma głównie miejsce w okresie anoestrus, a także u zwierząt z podklicznym endometritis. Natomiast zjawiska tego nie obserwowano lub było tylko epizootyczne w pozostałych fazach cyklu oraz u suk w różnych grupach wiekowych, 2. Nabłonek wyścielający światło macicy oraz gruczołowy, a także naczynia krwionośne, były głównymi miejscami lokalizacji białkowych produktów mRNA COX-2, PGFS I PGES, 3. Wydzaje się, że w endometrium suk w fizjologicznych cyklach oraz z klinicznie zdrową macicą ma głównie miejsce ekspresja czynników szlaku metabolicznego PGE, natomiast ekspresja PGF2α jest mniej aktywna, 4. U suk klinicznie zdrowych oraz z makroskopowo prawidłowym endometrium będacych w fizjologicznym cyklu występuje duży odsetek uteropatii, z dominującą obecnością histopatologicznego endometritis (35-60%) i dużo mniejszą częstotliwością CEH (6-25%). Wraz z wiekiem odsetek suk dotkniętych tymi schorzeniami wzrasta, natomiast faza cyklu płciowego nie miała wpływu na to zjawisko, 5. Cytologiczna ocena endometrium metodą cytobrush nie poswala na precyzyjne określenie jego stanu. Nie wykazano wysokiego stopnia korelacji między wynikami histopatologicznymi a odsetkiem PMNs w wymazach cytologicznych

endometrium u suk z lekkim stanem zapalnym mimo, iż obserwowano statystycznie istotną różnicę między odsetkiem PMNs u suk z endometritis oraz ze zdowym endometrium.

Spis piśmiennictwa zawiera 249 pozycji, głównie opublikowanych w liczących się czasopismach z listy JCR. Praca uzupełniona jest 19 tabelami i 28 rycinami oraz opisem pięciu procedur barwienia preparatów histologicznych, immunohistochemicznych i cytologicznych oraz protokołami izolacji RNA i odwrotnej transkrypcji.

Do szczególnych walorów przedłożonej pracy zaliczam:

1. Niezwykle aktualną tematyke badań, z dużym potencjałem publikacyjnym
2. Solidną podbudowę badań klinicznych wynikami analiz sięgających biologii molekularnej i immunohistochemii
3. Błyskotliwe komentarze i spekulacje w rodziale Dyskusja dotyczące ekstensywności podklinicznego endometritis, niskiej przydatności cytologii endometrialnej u suk i wskazanie na hipotetyczne możliwości aplikacji wyników badań genetycznych w opracowywaniu modeli terapeutycznych metropatii
4. Bogatą, zaawansowaną metodykę dopełniających się wzajemnie badań laboratoryjnych i klinicznych
5. Ogrom pracy, którą należało wykonać dla realizacji tak ambitnego i kompleksowego planu oznaczeń dużej liczby paramerów
6. Dobrze napisany tekst pracy i szerokie piśmiennictwo. Umiejętność prowadzenia głębokiej i syntetycznej dyskusji naukowej.

Korekty wymagają jedynie pojedyncze błędy literowe pracy. Wyrażone drobne uwagi i sugestie nie wpływają na wartość merytoryczną pracy i są formą konstruktywnych komentarzy, przy dostrzeganiu ogromnej wartości opracowania. Całość pracy oceniam bardzo dobrze. Jest to doktorat dopracowany i rzetelny.

Podsumowując, pracę doktorską lek. wet. Blanki Bukowskiej oceniam bardzo pozytywnie. Praca została dobrze zaplanowana, rzetelnie zrealizowana i wnosi nowe dane w dyscyplinę 'weterynaria'. Posiada ona nie tylko wartość poznawczą, ale i duży potencjał aplikacyjny. Doktorantka wykazała się dużymi umiejętnościami w posługiwaniu się warsztatem naukowym.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Blanki Bukowskiej odpowiada w pełni wymogom stawianym dysertacjom na stopień naukowy doktora, określonym w art. 13

Ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016 r. poz. 882 z późn. zm.).

W oparciu o przedłożoną ocenę przedkładam wniosek Radzie Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o dopuszczenie lek. wet. Blanki Bukowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę potencjał aplikacyjny oraz wkład przedstawionych badań w rozwój reprezentowanej dyscypliny składam wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

Prof. dr hab. Wojciech Niżański

