dr hab. Marek Szczubiał, profesor UP

Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Lublin, 17.09. 2020 r.

Recenzja

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 w Olsztynie pod kierunkiem

promotora prof. dr hab. Tomasza Janowskiego

i promotora pomocniczego dr n. wet. Anny Rapacz-Leonard

Podstawą formalną niniejszej oceny jest pismo WMW-DZ.6312.5.2020 Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 7 sierpnia 2020 r., informujące o powołaniu mnie, zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego z dnia 17 lipca 2020 r., na recenzenta 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".

Rosnące zainteresowanie hodowlą psów rasowych wiąże się z oczekiwaniem właścicieli suk wysokiej efektywności rozrodu u tych samic. Jednocześnie suki charakteryzują się wieloma odmiennościami, w stosunku do samic innych gatunków, w przebiegu funkcji rozrodczych, co powoduje, że wiele mechanizmów dotyczących regulacji procesów rozrodczych oraz etiopatogenezy

chorób układu rozrodczego, mających wpływ na płodność tych samic, nie zostało do końca wyjaśnione.

W procesach rozrodu kluczową rolę odgrywa macica, zapewniając odpowiednie środowisko do zagnieżdżenia i rozwoju zarodka, a następnie płodu. Dlatego od jej właściwego stanu zdrowotnego zależy powodzenie w rozrodzie. Choroby macicy u suk są główną przyczyną ich niepłodności. Szacuje się, że w około 30-35% przypadków problemy z zachodzeniem w ciążę tych samic mają tło maciczne. Podkreślić należy również, że choroby te mają często ciężki kliniczny przebieg i poza niepłodnością mogą także powodować istotne zagrożenie dla zdrowia, a nawet życia zwierzęcia. Wiele wskazuje, że u suk ich specyficzny cykl płciowy, charakteryzujący się długimi fazami oddziaływania hormonów sterydowych oraz możliwością długotrwałego wnikania bakterii do jamy macicy jest czynnikiem ryzyka wystąpienia patologicznych zmian w błonie śluzowej macicy (*endometrium*) i pozostałych warstwach ściany macicy. Zakłada się, że z wiekiem i liczbą przebytych cykli płciowych stopień tego ryzyka wzrasta. Jednak ze względu na specyfikę budowy pochwy i szyjki macicy *endometrium* suk nie jest dostępne do badania metodami powszechnie stosowanymi u samic innych gatunków zwierząt i co za tym idzie zmiany w *endometrium* w przebiegu cyklu płciowego i poprzedzające występowanie objawów klinicznych jego schorzeń nie zostały dokładnie przebadane i poznane.

Szczególnego znaczenia dla procesów rozrodu u suk nabiera podkliniczne zapalenie *endometrium*, które obniża znacznie skuteczność rozrodu, zwłaszcza w dużych hodowlach suk rasowych, utrzymywanych w nieodpowiednich warunkach sanitarno-higienicznych. Przyjmuje się, że mechanizm negatywnego oddziaływania podklinicznego *endometritis* na płodność suk polega na tworzeniu niewłaściwego środowiska macicy, a w konsekwencji znacznego wzrostu odsetka wczesnej śmierci zarodkowej. Jednak, mimo dużej wagi, problematyka podklinicznego *endometritis* u suk została dotychczas zbadana jedynie fragmentarycznie i wiele zależności, takich jak wpływ poszczególnych faz cyklu płciowego i wieku suk na ten proces, wymaga dalszych badań.

Jednym z istotnych elementów reakcji zapalnej u ludzi i zwierząt są prostaglandyny, których biosynteza szybko wzrasta w tkankach dotkniętych procesem zapalnym. Prostaglandynami, które regulują reakcję zapalną, a jednocześnie odgrywają niezwykle ważną rolę w procesach rozrodczych są prostaglandyna E2 (PGE2) oraz prostaglandyna F2α (PGF2α). Produkcja obu tych prostaglandyn może odbywać się w *endometrium* macicy i zależy głównie od aktywności cyklooksygenazy 2 (COX-2) oraz swoistych dla nich enzymów tj. syntazy prostaglandyny E2 (PGES) i syntazy prostaglandyny F2α (PGFS). Dotychczas niewiele badań poświęcono zagadnieniu produkcji prostaglandyny E2 i prostaglandyny F2α oraz aktywności głównych enzymów biorących udział w ich syntezie *w endometrium* suk w przebiegu cyklu płciowego oraz w przypadku patologii *endometrium.*

W świetle powyższych danych uznaję podjęte przez lek. wet Biankę Bukowską badania za w pełni uzasadnione i aktualne. Doktorantka podjęła się w nich ambitnego zadania dokonania kompleksowej oceny stanu *endometrium* suk w różnych fazach cyklu płciowego, u zwierząt zdrowych i z podklinicznym *endometritis* oraz w różnym wieku. Wykorzystała w tym celu molekularne badania głównych enzymów szlaku syntezy prostaglandyny E2 i prostaglandyny F2α oraz badania histologiczne, cytologiczne i mikrobiologiczne *endometrium*.

Przedstawiona do oceny praca doktorska lek. wet. Bianki Bukowskiej obejmuje 145 stron maszynopisu, 19 tabel, 28 rycin i 249 pozycji piśmiennictwa. Napisana została według typowego dla takich opracowań układu. Rozpoczyna się spisem treści oraz wykazem ważniejszych skrótów i symboli, ułatwiających poruszanie się w tekście i czytanie pracy. Następnie zamieszczono streszczenia w języku polskim i w języku angielskim. Kolejne rozdziały to: wstęp, cel badań, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, wykaz cytowanej literatury oraz załączniki zawierające protokoły dotyczące metodyki badań.

W obszernym „Wstępie", podzielonym na podrozdziały, Doktorantka wprowadza w sposób bardzo szczegółowy, ale jednocześnie przejrzysty, w oparciu o aktualne piśmiennictwo, w zagadnienia, które są tematem recenzowanej dysertacji. Na początku „Wstępu" charakteryzuje cykl płciowy suk, opisując szczegółowo przebieg koncentracji hormonów płciowych w poszczególnych fazach cyklu oraz towarzyszące temu charakterystyczne zmiany w układzie rozrodczym i zachowaniu suki, a także zmiany w obrazie cytologicznym rozmazów pochwowych. Podkreśla przy tym odrębności w przebiegu cyklu płciowego u suk, w porównaniu do samic innych gatunków. Następnie, w oparciu o dotychczasowe badania histologiczne, immunohistochemiczne i cytologiczne, opisuje zmiany w strukturze *endometrium* oraz wyglądzie populacji komórek *endometrium* suk w poszczególnych fazach cyklu płciowego. W kolejnym podrozdziale „Wstępu" Doktorantka dokonuje przeglądu aktualnej wiedzy na temat stanów zapalnych błony śluzowej macicy suk, podkreślając, że są one główną przyczyną niepłodności u tych samic. Zwraca jednocześnie uwagę, że etiopatogeneza wielu z tych patologii macicy pozostaje nie w pełni wyjaśniona. Szczególnie dotyczy to podklinicznego zapalenia błony śluzowej macicy, które jest trudne do zdiagnozowania ze względu na skąpe objawy i trudności z pobieraniem próbek z macicy suk. W końcowym podrozdziale „Wstępu" Doktorantka przedstawia aktualną wiedzę na temat syntezy prostaglandyn, ich funkcji w organizmie oraz roli w procesach zapalnych. Dużo miejsca poświęca prostaglandynie E2 i prostaglandynie F2α oraz enzymom biorącym udział w szlaku metabolicznym tych hormonów.

Ta część dysertacji, którą należy ocenić wysoko, świadczy o bardzo dobrym opanowaniu przez Doktorantkę zagadnień będących przedmiotem ocenianej pracy. Doktorantka bardzo skrupulatnie zebrała i naukowo opracowała obszerną literaturę, dokonując jednocześnie wnikliwego i selektywnego jej przeglądu, który uzasadnia cel i założenia badań. „Wstęp", wspólnie z rozdziałem

„Cele pracy", w sposób jednoznaczny wskazuje na celowość i aktualność podjętych przez Doktorantkę badań.

Głównymi celami pracy było określenie ekspresji mRNA dla cyklooksygenazy 2 (COX-2), syntazy prostaglandyny F2α (PGFS) i syntazy prostaglandyny E2 (PGES) w *endometrium* suk w różnych fazach cyklu płciowego, u suk z podklinicznym *endometritis* i suk w różnym wieku oraz określenie immunolokalizacji białek COX-2, PGFS i PGES w strukturach *endometrium* suk. Dodatkowymi celami badań było określenie występowania i rodzajów zmian histopatologicznych w *endometrium* suk w różnych fazach cyklu płciowego i w różnym wieku oraz ocena cytologiczna *endometrium* suk w różnych fazach cyklu płciowego, z podklinicznymi zmianami histopatologicznymi oraz u zwierząt zdrowych.

Cele badań w sposób logiczny wynikają z informacji przedstawionych we „Wstępie" i zostały dobrze oraz jasno sformułowane, a ich realizacja sugeruje pogłębienie dotychczasowej, fragmentarycznej wiedzy na temat zmian w *endometrium* w przebiegu cyklu płciowego u zdrowych suk oraz z podklinicznym *endometritis*, a także wpływu wieku suk na stan *endometrium* w kontekście ryzyka wystąpienia schorzeń macicy.

W rozdziale „Materiał i metody" podzielonym na podrozdziały Doktorantka przedstawia charakterystykę zwierząt, od których pochodził materiał użyty do badań oraz podaje zastosowaną metodykę badań. Z rozdziału tego wynika, że badania wykonano na 48 klinicznie zdrowych sukach, dojrzałych płciowo, nieciężarnych, rasowych i mieszańcach, w wieku od 1 do 9 lat, wolnych od patologii macicy diagnozowanych ultrasonograficznie i makroskopowo. We wstępnej fazie badań dokonano kwalifikacji zwierząt do zasadniczej części badań i określono fazę cyklu płciowego w oparciu o badanie kliniczne ogólne, badanie ginekologiczne zewnętrzne i wewnętrzne oraz oznaczanie poziomu progesteronu w surowicy krwi. Na podstawie stwierdzonej fazy cyklu zwierzęta podzielono na 3 podstawowe grupy badawcze, po 16 zwierząt w każdej. Grupę I stanowiły suki w fazie bezrujowej cyklu płciowego (*anestrus)*, grupę II suki w cieczce tj. w fazie przedrujowej (8 suk) lub rujowej (8 suk) (*proestrus/estrus*) i grupę III suki w fazie porujowej cyklu płciowego (*metestrus*). Następnie wszystkie zwierzęta poddano standardowemu zabiegowi usunięcia macicy i jajników (owariohysterektomii). Bezpośrednio po dokonanej resekcji macicy ze środkowej części rogu macicy pobierano próbki *endometrium* do badań molekularnych, histopatologicznych, cytologicznych oraz bakteriologicznych. W ramach badań molekularnych określano metodą real-time PCR ekspresję mRNA dla cyklooksygenazy 2 (COX-2), syntazy prostaglandyny F2α (PGFS) i syntazy prostaglandyny E2 (PGES) oraz metodą immunohistochemiczną immunolokalizację produktów białkowych genów *COX-2*, *PGFS* i *PGES* w strukturach *endometrium* objętych badaniami suk. W badaniach immunohistochemicznych do oceny obecności COX-2 użyto dostępnego na rynku mysiego przeciwciała monoklonalnego, a w pozostałych przypadkach – wyizolowanych z krwi świnki morskiej – zrealizowanych na zamówienie przeciwciał swoistych dla psa. Badania histopato-

logiczne wykonano klasyczną metodą, sporządzając rutynowe preparaty histologiczne barwione metodą hematoksylina i eozyna (H&E). Badania cytologiczne *endometrium* przeprowadzano pobierając wymazy z błony śluzowej macicy metodą cytobrush i określając liczbę neutrofilów (PMNs) i ich procentową proporcję do liczby komórek nabłonkowych. Badania bakteriologiczne wykonywano wykorzystując gotowe, współcześnie używane podłoża hodowlane przygotowane na płytkach Petriego. Ostateczną identyfikację bakterii przeprowadzano za pomocą komercyjnych testów lateksowych (PathoDextra Strep Grouping Kit) oraz testów biochemicznych (API 20E, API 20NE, API Staph, API Strep). Na podstawie badań histopatologicznych *endometrium,* przeprowadzonych u suk wszystkich grup, utworzono dodatkowe grupy zwierząt tj. z podklinicznym *endometritis* (n=21) oraz z normalnym *endometrium* (n=21), porównując w nich ekspresję ww. enzymów metabolizmu prostaglandyn. Ponadto całą populację zwierząt objętych badaniami podzielono na 2 grupy wiekowe tj. <5 lat (n=38) i ≥5 lat (n=10), dokonując takiego samego porównania.

Należy stwierdzić, że badania zostały dobrze zaplanowane, a do ich realizacji zastosowano wiele różnych metod badawczych, pozwalających na kompleksową ocenę *endometrium*. Wszystkie procedury badawcze są przez Doktorantkę bardzo dokładnie i w sposób zrozumiały opisane oraz poparte odpowiednim piśmiennictwem źródłowym. Dodatkowe informacje dotyczące metodyki badań są zaprezentowane w postaci odpowiednich rycin i tabel oraz zawarte w siedmiu załącznikach. Zastosowane metody badawcze są aktualne i adekwatne do celów badań i nie budzą w związku z tym merytorycznych zastrzeżeń. Wątpliwości nie budzi również dobór i ilość zwierząt do badań oraz analiza statystyczna uzyskanych wyników, w której zastosowano właściwie dobrane metody statystyczne.

W rozdziale „Wyniki" Doktorantka prezentuje w sposób przejrzysty rezultaty badań własnych w formie opisowej w krótkich podrozdziałach oraz w postaci 10 rycin i 13 tabel, wykonanych starannie i przedstawiających poszczególne elementy wyników wyraźnie i przekonywująco.

Wyniki badań molekularnych pozwalają jednoznacznie stwierdzić istnienie istotnych różnic w ekspresji mRNA dla cyklooksygenazy 2 (COX-2) i syntazy prostaglandyny E2 (PGES) w *endometrium* suk w różnych fazach cyklu płciowego, przy czym najwyższą ekspresję obserwowano w fazie *anestrus*, a najniższą w fazie *metestrus*. Ponadto istotnie wyższa ekspresja mRNA dla COX-2 i PGES występowała w *endometrium* suk z podklinicznym *endometritis*, w porównaniu do zdrowego *endometrium*. Natomiast ekspresja mRNA dla syntazy prostaglandyny F2α (PGFS) była generalnie niska i brak było różnic między grupami badawczymi, co sugeruje, że szlak metaboliczny prostaglandyny F2α w *endometrium* suk w trakcie cyklu płciowego i podczas podklinicznego zapalenia *endometrium* jest mało aktywny. Te informacje pogłębiają wiedzę o mechanizmach procesu zapalnego o charakterze podklinicznym w błonie śluzowej macicy u suk, a ponadto mogą stanowić podstawę do badań nad nowymi metodami leczenia tego schorzenia.

Badania immunohistochemiczne wykazały, że głównym miejscem lokalizacji produktów białkowych genów kodujących COX-2, PGES i PGFS jest nabłonek wyścielający i gruczołowy *endometrium* oraz naczynia krwionośne.

Badania histopatologiczne wykazały, że u suk klinicznie zdrowych z makroskopowo prawidłowym *endometrium*, będących w fizjologicznym cyklu płciowym, występuje wysoki odsetek podklinicznego *endometritis* (31,25% - 62,5%) i dużo mniejszy odsetek torbielowatego przerostu *endometrium* - CEH (6%-25%). Na występowanie tych patologii nie miała wpływu faza cyklu, natomiast istotny wpływ miał wiek zwierząt. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że w grupie zwierząt 5 letnich i starszych nie stwierdzano w ogóle macic o fizjologicznym *endometrium*, przy jednocześnie wysokiej częstotliwości występowania *endometritis* (60%) i CEH (40%).

Interesujące są również wyniki badań cytologicznych *endometrium* suk. Wskazują one, że w *endometrium* suk niezależnie od fazy cyklu, wieku i toczącego się procesu patologicznego występuje niski odsetek neutrifilów - PMNs (<2%). Ponadto analiza stopnia zgodności między wynikami badań histopatologicznych i cytologicznych wykazała niską czułość badania cytologicznego w stosunku do badania histopatologicznego *endometrium* suk. Stanowi to ważną informację z klinicznego punktu widzenia, oznacza bowiem, że badanie cytologiczne ma niską wartość, jako metoda diagnostyczna, w rozpoznawania patologii macicy u suk.

W „Dyskusji" Doktorantka przedstawia wnikliwą i krytyczną analizę uzyskanych rezultatów badań własnych i konfrontuje je z danymi aktualnego i trafnie dobranego piśmiennictwa. W wielu miejscach słusznie zwraca uwagę na brak wcześniejszych badań tego typu, co podkreśla ich nowatorski charakter. Ta część dysertacji dobitnie świadczy o dużym zasobie wiedzy Doktorantki, umiejętności analizowania informacji naukowych i logicznego wyciągania wniosków oraz potwierdza słuszność koncepcji stanowiących podstawę opracowania celu pracy.

Na podstawie rozważnej interpretacji uzyskanych wyników Doktorantka formułuje pięć generalnie trafnych wniosków, odnoszących się do założeń i celu badań oraz znajdujących uzasadnienie w wynikach badań.

Oceniając generalnie bardzo pozytywnie przedstawioną mi do recenzji pracę, z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia, których Doktorantce nie udało się uniknąć.

Uważam, że w tytule zamiast sformułowania „…oraz syntazy prostaglandyny F2α i prostaglandyny E powinno być „… oraz syntazy prostaglandyny F2α i syntazy prostaglandyny E2" ewentualnie „syntaz prostaglandyny F2α i prostaglandyny E2". Są to bowiem 2 różne enzymy, a nie jeden, jak sugerowałoby określenie użyte obecnie w tytule.

Pewną wątpliwość budzi włączenie w jedną grupę badawczą suk w fazie *proestrus* i suk fazie *estrus*. W mojej opinii, dla pełnego zobrazowania zmian w *endometrium* w przebiegu całego cyklu płciowego bardziej korzystne byłoby analizowanie tych zmian w każdej z czterech jego faz.

Na stronie 82 w opisie wyników badań histopatologicznych brak jest zgodności między informacją zawartą w przedostatnim zdaniu tego podrozdziału, a danymi przedstawionymi w Tabeli 14.

W mojej opinii, pewnej korekty wymaga również druga części wniosku 1, w której zawarto stwierdzenie, że ekspresji mRNA dla COX-2 i PGES nie obserwowano u suk w różnych grupach wiekowych. Przedstawione wyniki badań wskazują tylko, że nie było różnic statystycznie istotnych, w ekspresji tych czynników, między grupą zwierząt młodych i starych.

Kilka uwag dotyczy piśmiennictwa. Nie znalazłem bowiem w spisie piśmiennictwa kilku pozycji, które są cytowane w pracy (Wallace i in. 2000, Fransson i in. 1997, De Bosschere i in. 2012, Borges i in. 2014, Fontbonne i in. 2007). Z kolei znajdują się w nim pozycje, które w pracy nie były cytowane (Fontbonne 2011, 2020, Kempisty i in. 2013, Kowalewski i in. 2006). Jedna z prac (Singh i in. 2018) została dwukrotnie zamieszczona w spisie piśmiennictwa. Ujednolicenia wymaga również sposób podawania nazwy czasopism w spisie piśmiennictwa - albo pełna nazwa czasopisma, albo jego skrót. Ponadto w pracy występują drobne błędy w sposobie cytowania danych literaturowych, m.in. nieprawidłowości w pisowni nazwisk autorów, niejednolity sposób wskazywania współautorów (i in. lub i wsp.).

Poczynione uwagi nie umniejszają w żadnym stopniu merytorycznej wartość ocenianej dysertacji i mojej ogólnej bardzo pozytywnej jej oceny. Jednak w celu uniknięcia nieścisłości w pracy powinny być uwzględnione przed jej opublikowaniem.

Reasumując stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Bianki Bukowskiej jest oryginalnym i bardzo wartościowym opracowaniem, wnoszącym nowe elementy wiedzy dotyczące fizjologii i patologii macicy suk. Recenzowana dysertacja oprócz niewątpliwej wartości poznawczej stanowi również źródło cennych informacji dla praktyki weterynaryjnej, wskazując wysoką częstotliwość występowania u suk podklinicznego *endometritis*, szczególnie u zwierząt starszych oraz niską wartość badania cytologicznego, jako metody diagnostycznej w rozpoznawania patologii macicy u suk.

Uważam, że rozprawa doktorska lek. wet. Bianki Bukowskiej odpowiada w pełni warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W mojej opinii, stanowi podstawę do nadania stopnia naukowego doktora.