

Warszawa, 27.05.2022r.

dr hab. Katarzyna Kosińska-Kaczyńska, prof. CMKP  
II Klinika Położnictwa i Ginekologii  
Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie  
Szpital Bielański ul. Ceglowa 80  
01-809 Warszawa

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr Michała Zycha

*„Wpływ hormonów płciowych na cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy  
u kobiet dotkniętych problemem poronień oraz kobiet rodzących bez  
kompliakcji”*

Promotor: dr hab. n. med. Radosław Zagożdżon

Promotor pomocniczy: dr n. med. Filip Dąbrowski

Przedłożona mi do recenzji praca doktorska mgr Michała Zycha pt. „*Wpływ hormonów płciowych na cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy u kobiet dotkniętych problemem poronień oraz kobiet rodzących bez komplikacji*” jest monografią, która powstała na podstawie przeprowadzonych przez Doktoranta oryginalnych badań molekularnych u pacjentek z poronieniami nawracającymi, kobietami w I trymestrze ciąży oraz po porodzie.

Temat badań podjęty przez Doktoranta, prowadzonych pod kierownictwem promotora prof. Radosława Zagożdżona oraz promotora pomocniczego dr Filipa Dądrowskiego, jest niezwykle ciekawy i aktualny. Definicja poronień nawracających opiera się na rozpoznaniu dwóch lub więcej strat ciąży. Sytuacja ta dotyczy około 1-2% kobiet i wiąże się nie tylko z niepowodzeniami położniczymi, ale wywiera również piętno na zdrowiu psychicznym dotkniętych pacjentek. U podłoża nawracających poronień, zwłaszcza w I trymestrze ciąży, leżą zaburzenia adaptacji immunologicznej organizmu ciężarnej względem rozwijającego się w niej jaja płodowego. Tolerancja immunologiczna na styku matka-płód jest niezbędna do prawidłowego rozwoju ciąży. Zarodek jest rodzajem przeszczepu semi-allogenicznego i dlatego do utrzymania ciąży bez jej odrzucania konieczna jest adaptacja macicznego układu odpornościowego. Defekty immunologiczne, dotyczące zarówno macicznych komórek NK, jak poszczególnych populacji limfocytów, mogą przyczyniać się do zaburzeń implantacji i wczesnego poronienia. Prawdopodobnie złożoność procesów, leżących u podłoża analizowanych patologii sprawia, że zagadnienia te nie są nadal w pełni wyjaśnione. Stąd wybór tematyki uważam za zasadny i ważny w aspekcie poznawczym. Doktorant podjął się bardzo ciekawego, ale i trudnego wyzwania badania immunologicznych cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy u pacjentek, które donosiły ciążę i tych, u których doszło do dwóch lub więcej poronień oraz oceny wpływu hormonów płciowych na ekspresję tych cząsteczek. Praca ma charakter odkrywczy, brak jest doniesień naukowych związanych z wpływem hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy w kontekście poronień nawracających czy ciąży.

Licząca 213 stron dysertacja jest skonstruowana w sposób typowy. Znajdują się tu następujące rozdziały: wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki i ich omówienie, dyskusja, wnioski oraz streszczenie w języku polskim i języku angielskim, piśmiennictwo, załącznik ze zgodą komisji bioetycznej oraz spis 35 tabel. Nie zawiera natomiast spisu rycin.

Wstęp rozprawy podzielono na pięć podrozdziałów, które szczegółowo omawiają błonowe i rozpuszczalne cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy oraz rolę układu immunologicznego w ciąży. Wprowadzenie jest napisane w sposób ciekawy i poprawny, oraz świadczy o dobrej znajomości tematyki, która jest w obszarze badawczych zainteresowań

Doktoranta. Szczegółowo omówił on charakterystykę poszczególnych cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy. Ta część napisana jest bardzo ciekawie i wnikliwie. Literatura dobrana jest właściwie i wyczerpująco. Doktorant podaje również definicję poronienia nawykowego. Należy zauważyć, iż obecnie nie używa się tego terminu, który błędnie wprowadza wrażenie „nawyku poronień”. W nazewnictwie polskim definicja ta została zmieniona na poronienia nawracające. Natomiast w 2017 r. ESHRE zmodyfikowało ten termin jeszcze bardziej i obecnie w piśmiennictwie anglojęzycznym stosuje się nazwę recurrent pregnancy loss, co odpowiada nawracającym stratom ciąży. W ten sposób w definicji zrezygnowano z kryterium czasowego. Stosowanie innej terminologii nie umniejsza w żaden sposób wartości pracy. Warto natomiast byłoby dodać w monografii w jakim przedziale czasowym odbywała się rekrutacja pacjentek do badania.

Doktorant prawidłowo sformułował trzy cele badawcze. Głównym celem przedstawionej rozprawy była ocena wpływu hormonów płciowych takich jak progesteron,  $\beta$ -estradiol i dihydrotestosteron na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu odpornościowego w trzech grupach kobiet: kobiet z poronieniami nawracającymi, kobiet w ciąży oraz kobiet niebędących w ciąży, u których poprzednie ciąży rozwijały się prawidłowo. Przeprowadzone badania miały na celu ustalenie istotnych parametrów, pozwalających w przyszłości na ocenę wystąpienia ryzyka poronienia oraz znalezienie metody wpływającej na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na badanych komórkach układu odpornościowego.

W rozdziale Materiał i Metody Doktorant scharakteryzował metodologię badań, szczegółowo opisał cytometrię przepływową oraz testy immunologiczne Luminex. Do oceny obecności cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na komórkach układu immunologicznego wykorzystano metodę cytometrii przepływowej, natomiast stężenia rozpuszczalnych cząsteczek kontrolujących i ich ligandów zostały oznaczone przy wykorzystaniu platformy Luminex. Hodowle komórkowe stymulowane hormonami płciowymi zostały założone w komórek jednojądrzastych, wyizolowanych z krwi obwodowej pobranej od uczestniczek. Chciałabym jednak wyjaśnić, dlaczego wpływ hormonów płciowych na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy na limfocytach T regulatorowych został oceniony tylko w hodowlach niestymulowanych OKT-3? W tym rozdziale rozprawy znajduje się także charakterystyka badanych grup. Grupy dobrane są właściwie. Sugerowałabym przeniesienie omówienia charakterystyki porównawczej grup do rozdziału wyniki, natomiast rozszerzenie kryteriów włączenia do grupy z poronieniami nawracającymi o dodatkowe informacje – np. stosowane leki (w tym immunomodulujące). Jako kryteria wyłączenia podano rozpoznane anatomiczne, genetyczne, mikrobiologiczne, immunologiczne lub hormonalne przyczyny poronień – właściwym byłoby omówić, w jaki sposób diagnozowano powyższe przyczyny poronień.

W kolejnej części Doktorant prezentuje wyniki i ich omówienie. Są one nowatorskie i bardzo interesujące, ponieważ wskazują na istnienie różnic w ekspresji PD1, LAG-3 oraz VISTA na subpopulacjach limfocytów T oraz różnicy w ekspresji TIM-3 na komórkach NK oraz

limfocytach T cytotoksycznych pomiędzy kobietami z poronieniami nawracającymi a kobietami ciężarnymi. Również stężenia rozpuszczalnych form cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy okazały się różne pomiędzy badanymi grupami. Doktorant wykazał również, że wśród testowanych hormonów płciowych największy wpływ na ekspresję cząsteczek kontrolujących układ odpornościowy ma progesteron w stężeniu 500 ng/ml. Wyniki przedstawione są szczegółowo, ale czytelnie i opatrzone pięknymi rycinami. Proponowałabym rozpoczęcie ich omawiania od przedstawienia charakterystyki badanych grup, stosując do analizy porównawczej metody statystyczne. Do grupy kobiet z rozpoznanymi poronieniami nawracającymi włączono te, u których dochodziło do strat ciąży przed 22 tygodniem. Bardzo ciekawe byłoby przedstawienie dokładnych danych, w jakich tygodniach dochodziło do obumarcia ciąży lub poronienia, jako że przyczyny poronień nawracających są różne w I i II trymestrze ciąży. Taka analiza mogłaby wnieść do pracy kolejne ciekawe aspekty.

W rozdziale piątym rozprawy doktorskiej znajduje się dyskusja, która świadczy o dużej znajomości poruszanych zagadnień. Doktorant sprawnie posługuje się warsztatem badawczym, poprawnie prowadzi dyskusje i wskazuje na możliwe przyczyny uzyskanych wyników, jednocześnie tłumacząc złożoność omawianej problematyki. Cytowane piśmiennictwo zawiera aż 318 pozycji, w większości są to najnowsze publikacje. Ich dobór pozwala stwierdzić, że Doktorant orientuje się bardzo dobrze w aktualnym stanie badań dotyczącym immunologii poronień nawracających. Dyskusja jest ciekawa, logiczna i wyczerpuje poruszane zagadnienie. Doktorant poprawnie formułuje wnioski, które odpowiadają założonym celom.

Streszczenie w języku polskim i angielskim są napisane prawidłowo i odzwierciedlają zawartość rozprawy.

Badanie zostało zaprojektowane prawidłowo. Doktorant zrealizował postawione sobie w pracy cele. Autor prawidłowo wyciągnął wnioski na podstawie przeprowadzonej analizy. Sposób, w jaki Doktorant przeprowadził całe badanie, dobrał grupy, metodę, postawił cele, wyciągnął i przedstawił wnioski, świadczą o umiejętności prawidłowego prowadzenia procesu badawczego i dojrzałości Doktoranta jako badacza. Praca napisana jest poprawnym językiem, z pojedynczymi błędami stylistycznymi.

Krytyczne spostrzeżenia są właściwie wskazówkami, a nie uwagami krytycznymi, i nie umniejszają wartości dysertacji. Pragnę podkreślić, że Doktorant podjął interesujący temat badawczy i podszedł do jego rozwiązania we właściwy sposób oraz uzyskał bardzo ciekawe i wartościowe wyniki.

*Po szczegółowej analizie przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej Pana magistra Michała Zycha pt.: „Wpływ hormonów płciowych na cząsteczki kontrolujące układ odpornościowy u kobiet dotkniętych problemem poronień oraz kobiet rodzących bez komplikacji” stwierdzam, że rozprawa spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668) dlatego*

*rekomenduję Radzie Dyscyplin Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu  
Medycznego dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego.*

Z wyrazami szacunku