

Lublin, 02.06.2022 r.

dr hab. Wojciech Łopuszyński, prof. uczelni
Katedra Patomorfologii i Weterynarii Sądowej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. wet. Joanny Skoniecznej-Kurpiel pt.: „Analiza morfologiczna interakcji bioresorbowalnego stentu ze ścianą cewki moczowej królika” wykonanej w Zakładzie Histologii i Embriologii Katedry Biostruktury i Fizjologii Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem promotora dr. hab. Jana P. Madeja prof. uczelni.

Prezentowaną ocenę dysertacji doktorskiej lek. wet. Joanny Skoniecznej-Kurpiel wydaję w związku z pismem Pana Przewodniczącego Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, prof. dr. hab. Wojciecha Niżańskiego z dnia 4 maja 2022 r.

Przedstawiona do ponownej oceny rozprawa doktorska lek. wet. Joanny Skoniecznej-Kurpiel obejmuje przeprowadzone przez Autorkę badania doświadczalne o charakterze kliniczno-morfologicznym. Celem badań była ocena morfologiczna i morfometryczna ściany fizjologicznej oraz drażnionej mechanicznie cewki moczowej samca królika nowozelandzkiego białego w połączeniu z oceną zmian zachodzących w ścianie cewki moczowej pod wpływem wprowadzonego bioresorbowalnego stentu przy uwzględnieniu jego biointegracji z otaczającymi tkankami i bioresorpcji. Jako uzasadnienie dla przeprowadzonych badań Doktorantka podaje stale wzrastającą liczbę przypadków zwężenia cewki moczowej u ludzi wymagających leczenia szpitalnego m. in.



z zastosowaniem stentów. Wskazuje również na królika nowozelandzkiego białego, jako gatunek zwierzęcia modelowego w badaniach dotyczących zakażeń dróg moczowych i leczenia chorób urologicznych, zwłaszcza zwężenia cewki moczowej u ludzi. Gruntowne uzasadnienie celowości przeprowadzonych badań zamieszczone zostało w obszernym wstępie, stanowiącym pierwszy rozdział dysertacji. Doktorantka przedstawiła w nim epidemiologię, etiologię i patogenezę zwężenia cewki moczowej człowieka, a także scharakteryzowała stosowane w przeszłości i współcześnie metody leczenia tej patologii ze szczególnym uwzględnieniem stosowania stentów. Powołując się na licznie cytowane piśmiennictwo Doktorantka wymieniła zalety i wady poszczególnych metod leczenia, a w odniesieniu do stentów dokonała retrospektywnego przeglądu wyników badań nad ich zastosowaniem w urologii. Czytając wstęp odnosi się wrażenie, że Doktorantka przystępując do realizacji zadania badawczego przygotowała się bardzo starannie i wnikliwie. Skrupulatnie zebrała i naukowo opracowała obszerną literaturę dokonując jednocześnie wnikliwego i selektywnego jej przeglądu. Zaproponowana forma jest przystępna i wyczerpująca, dzięki czemu czytelnik zostaje zaznajomiony z zagadnieniami związanymi z problematyką badawczą. Informacje zawarte we wstępie uzasadniają wybór tematu pracy doktorskiej zarówno w aspekcie poznawczym, jaki i klinicznym. Odnoszę jednak wrażenie, że niektóre informacje zawarte w podrozdziałach 1.2.1 i 1.2.2., charakteryzujące królika domowego i jego zastosowania w badaniach naukowych zostały przedstawione zbyt obszernie i nie mają bezpośredniego związku z wykonywanymi przez Doktorantkę badaniami. Natomiast informacje zawarte w podrozdziale 1.2.3 poparte danymi literaturowymi, a odnoszące się do wykorzystania królika nowozelandzkiego białego w badaniach układu moczowego jednoznacznie uzasadniają zastosowanie tego gatunku jako zwierzęcia modelowego w przeprowadzonych przez Doktorantkę badaniach. Kolejnymi rozdziałami dysertacji, która ma klasyczny układ są: cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Praca obejmuje 131 stron tekstu wraz z wykazem piśmiennictwa w liczbie 283 pozycji, 9 tabel, 13 rycin i 95 kolorowych mikrofotografii zamieszczonych w oddzielnej części monografii.

W rozdziale „Cel pracy” zostały sprecyzowane trzy nadrzędne cele badawcze logicznie wynikające z informacji zaprezentowanych we wstępie.



Rozdział „Materiał i metody” w sposób szczegółowy opisuje wszystkie procedury badawcze, które zostały przeprowadzone na 26 samcach królika nowozelandzkiego białego w wieku 3-4 miesięcy o wadze 2,1-3 kg. Badania wykonano w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki - Konkurs OPUS 11 nr DEC-2016/21/B/ST8/01972 pt.: "Interakcja bioresorbowalnego materiału z tkanką w warunkach zmiennych odkształceń na przykładzie cewki moczowej" we współpracy z Zakładem Inżynierii Biomedycznej Uniwersytetu Zielonogórskiego. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. Jak wynika z informacji zawartych w dysertacji Doktorantka będąc członkiem zespołu badawczego wykonującego grant odgrywała istotną rolę w przeprowadzonych badaniach. Odpowiadała za wykonanie oceny histologicznej i morfometrycznej fizjologicznej oraz podrażnionej mechanicznie cewki moczowej, a następnie badała biointegrację wprowadzonego implantu z otaczającymi tkankami, stopień jego bioresorpcji oraz wpływ na strukturę całej ściany cewki moczowej królika. Pracownicy Zakładu Inżynierii Biomedycznej Uniwersytetu Zielonogórskiego w ramach tego projektu przygotowali natomiast materiał oraz opracowali konstrukcję stentów wykonanych na bazie alginianu sodu o odpowiednich właściwościach mechanicznych. W eksperymencie klinicznym uczestniczyli również pracownicy Katedry Chorób Wewnętrznych z Kliniką Koni, Psów i Kotów, Katedry Epizootologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych oraz Katedry i Kliniki Chirurgii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Potwierdza to, że Doktorantka odegrała istotną rolę w przeprowadzonych badaniach eksperymentalnych biorąc udział w opracowaniu ich koncepcji i planowaniu przebiegu, opracowaniu metodyki oraz wykonaniu doświadczeń. Zaangażowanie w badania dowodzi umiejętności nawiązywania współpracy ze specjalistami różnych specjalności oraz efektywnej pracy w zespole badawczym.

W badaniach przetestowano dwa typy stentów wyprodukowane na bazie alginianu sodu. Króliki zostały podzielone na 4 grupy tj. grupę kontrolną liczącą 7 szt. zwierząt, grupę doświadczalną D z drażnioną mechanicznie cewką moczową liczącą również 7 szt. zwierząt oraz 2 grupy doświadczalne, S1 i S2, z wprowadzonymi różnymi stentami liczące po 6 królików każda. Cewki moczowe królików z grupy doświadczalnej D były jednorazowo drażnione szczoteczką cytologiczną, a następnie pobierane do badań morfologicznych po 6 tygodniach. W przypadku grup z implantowanymi stentami



pozostawiano je w świetle cewki moczowej przez okres 1, 3 i 6 tygodni. Od każdego królika po zakończeniu doświadczenia pobrano cewkę moczową wraz z dodatkowymi gruczołami płciowymi do badań morfologicznych. Tkanki były utrwalane w 10% formalinie, a następnie odwadniane w szeregu alkoholowym, prześwietlane w ksylenie i zatapiane w parafinie. Cewki moczowe zostały pokrojone w odstępach co 2 mm zaczynając od ujścia. Doktorantka analizowała zmiany morfologiczne i dokonywała pomiarów morfometrycznych w mikroskopie świetlnym i mikroskopie stereoskopowym, które sprzężono z kamerami i oprogramowaniem do analizy obrazu mikroskopowego. Badania mikroskopowe przeprowadzono na skrawkach wykonanych techniką parafinową i zabarwionych rutynowo hematoksyliną i eozyną oraz dodatkowo metodami histochemicznymi służącymi do wykrywania i różnicowania włókien kolagenowych, sprężystych, elastyny, mucyny i soli wapnia. Protokoły przedstawionych metod barwienia zostały szczegółowo opisane w podrozdziale 3.7.

Uzyskane wyniki badań zostały przedstawione w formie opisowej, tabelarycznej i graficznej oraz udokumentowane mikrofotografiami z mikroskopu świetlnego. U królików, u których wykonano mechaniczne podrażnienie cewki moczowej zaobserwowano rozprostowanie fałdów błony śluzowej i zmniejszenia obwodu jej światła. W obrazie mikroskopowym zaobserwowano natomiast prawie całkowity zanik fałdów błony śluzowej cewki moczowej, któremu towarzyszyło spłaszczenie komórek nabłonka dwuwarstwowego cylindrycznego oraz wyraźne zagęszczenie fibroblastów i fibrocytów w blaszce właściwej błony śluzowej z nieznacznym odczynem zapalnym. U dwóch królików, którym wprowadzono stent rurowy nr 1. na bazie alginianu sodu na okres jednego tygodnia, wstąpiło szereg powikłań takich jak przemieszczenie stentu, odkształcenie stentu i wydalenie stentu. Powikłania te doprowadziły do wystąpienia zapalenia cewki moczowej oraz dodatkowych gruczołów płciowych przy obecności różnie nasilonych zmian wstecznych i zaburzeń w krążeniu. U pozostałych królików tej grupy obecność stentów, które ulegały częściowej lub całkowitej bioresorpcji towarzyszyły zmiany grubości nabłonka cewki moczowej i różnie nasilony odczyn zapalny, zmiany wsteczne i zaburzenia w krążeniu. U 6 królików po zaimplantowaniu stentu nr 2. jedynie u jednego wystąpiło powikłanie w postaci migracji stentu. U pozostałych królików obecność stentu wywołała zapalenie cewki moczowej o zróżnicowanym nasileniu, któremu towarzyszyły zmiany wsteczne i zaburzenia



w krążeniu. Stenty w tej grupie doświadczalnej nie uległy bioresorpcji i spowodowały rozszerzenie cewki moczowej.

Zdaniem recenzenta badania zostały poprawnie zaplanowane pod względem technicznym i właściwie dobrano metody barwienia i oceny preparatów mikroskopowych. Poważną wątpliwość stanowi natomiast liczba królików w grupach doświadczalnych z implantowanymi stentami, która moim zdaniem była zbyt mała. Zakładając, że grupie 6 królików wszczepiano określony typ stentu, a następnie poddawano je eutanazji celem pobrania wycinków do badań morfologicznych i morfometrycznych po 1, 3 i 6 tygodniach, to ostateczną ocenę i wnioski w wyznaczonych okresach czasowych stanowiły obserwacje poczynione jedynie na dwóch osobnikach. Tym samym siła przeprowadzonej analizy statystycznej, w której wykazano istotne różnice pomiędzy grupami liczącymi dwa przypadki jest moim zdaniem bardzo mała. Uważam również, że w rozdziale „Wyniki” powinny zostać podane konkretne dane liczbowe pomiarów morfometrycznych odnoszące się do grup doświadczalnych, tak jak to ma miejsce w przypadku grupy kontrolnej i zgodnie z zapisem w podrozdziale 3.6 (Analiza statystyczna). Dane z grup doświadczalnych jedynie fragmentarycznie podawane są w rozdziale „Dyskusja” w powiązaniu z cytowanymi danymi piśmiennictwa, co bardzo utrudnia ich analizę. Pozytywnie natomiast oceniam umieszczone w pracy ryciny, na których w formie graficznej zaprezentowano uzyskane wyniki ze wszystkich grup. Zaznaczam jednak, że powinny one stanowić uzupełnienie, a nie główne źródło informacji o danych uzyskanych w badaniach. Podobne zastrzeżenie zgłaszam odnośnie barku danych liczbowych w stosunku do wyników badania fizykochemicznego i osadu moczu. Wyniki te zostały przedstawione przejrzysto jedynie w przypadku grupy kontrolnej. Natomiast w odniesieniu do grup z wprowadzonymi stentami wyniki te nie są kompletne (brak danych dotyczących ciężaru właściwego moczu i jego odczynu, obecności białka, glukozy, urobilinogenu i in.).

Godne podkreślenia są natomiast wyniki badań morfologicznych i morfometrycznych przeprowadzone w grupie 7 królików z grupy kontrolnej. Badania te umożliwiły bardzo szczegółowe opisanie morfologii cewki moczowej i dodatkowych gruczołów płciowych i oszacowanie wskaźników morfometrycznych, które mogą być traktowane jako wzorcowe dla prawidłowej cewki moczowej i dodatkowych gruczołów płciowych królika nowozelandzkiego białego. Dodatkowo na podstawie badań tej grupy



królików opracowano wzorcowe parametry fizykochemiczne oraz składniki osadu moczu.

Uzyskane wyniki obserwacji klinicznych jak i wyniki badań morfologicznych i morfometrycznych poddano dyskusji tematycznej, którą podzielono na trzy obszary dotyczące: budowy fizjologicznej cewki moczowej i dodatkowych gruczołów płciowych, modelu zwężenia cewki moczowej przedniej u różnych gatunków zwierząt oraz implantacji stentów u zwierząt i człowieka. W pierwszej części dyskusji Doktorantka przedstawiła budowę anatomiczną i histologiczną cewki moczowej z uwzględnieniem różnic występujących u człowieka i różnych gatunków zwierząt. Moim zdaniem niektóre elementy zawarte w tej części dyskusji, a odnoszące się do anatomii porównawczej cewki moczowej są zbędne. Budowa anatomiczna i fizjologia układu moczowo-płciowego również w aspekcie porównawczym została szczegółowo opisana w podręcznikach anatomii i fizjologii zwierząt i człowieka o czym wspomina Doktorantka w pierwszej części dyskusji na str. 77. Dalsza część dyskusji odnosząca się do wyników badań dotyczących budowy cewki moczowej męskiej królika przeprowadzona jest poprawnie, podobnie jak dyskusja odnosząca się do pozostałych wyszczególnionych obszarów. W przeprowadzonej dyskusji autorka przedstawiła wyniki badań własnych w kontekście właściwie dobranych i cytowanych rezultatów uzyskanych w różnych okolicznościach przez innych autorów. Szczególnie interesująca jest część poświęcona implantacji stentów u zwierząt i człowieka, z której wynika, że podjęcie badań w obszarze nakreślonej problematyki należy przyjąć z uznaniem biorąc pod uwagę ich aktualność, znaczenie tematu i także możliwość przeniesienia uzyskanych wyników do praktyki klinicznej.

Rozważna interpretacja poczynionych obserwacji oparta na uzyskanych wynikach oraz skonfrontowanie ich z cytowanymi wynikami innych autorów upoważniły Doktorantkę do wysunięcia sześciu wniosków obejmujących całość analizowanych badań.

Po przeanalizowania całości rozprawy nasuwają mi się następujące pytania i uwagi:

1. Dlaczego stenty implantowano tylko królikom zdrowym, a nie uwzględniono implantacji królikom z podrażnioną wcześniej cewką moczową, u których wystąpiło jej zwężenie?

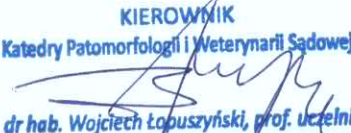


2. Jakimi kryteriami kierowano się decydując o pobieraniu moczu do badań laboratoryjnych metodą cystocentezy?
3. W jaki sposób wyliczono pole widzenia o powierzchni 71 000 μm^2 pod powiększeniem 400x przy analizie morfometrycznej liczby fibroblastów/fibrocytów ?
4. Niektóre terminy anatomiczno - patologiczne użyte w pracy są niezrozumiałe lub nieprecyzyjne np.: str. 63 „światło prostaty” str. 69 „spadek grubości błony śluzowej”, str. 96 „pogrubiona tkanka łączna luźna”

Przedstawione uwagi nie umniejszają jednak wartości merytorycznej pracy i mojej ogólnej pozytywnej oceny dysertacji.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja doktorska jest oryginalnym dorobkiem naukowym lek. wet. Joanny Skoniecznej-Kurpiel o wartościowych walorach poznawczych. Spełnia ona wymogi i warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.), oraz Rozporządzeniu Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 19 stycznia 2018 r. w sprawie szczegółowego trybu i warunków przeprowadzania czynności w przewodzie doktorskim, w postępowaniu habilitacyjnym oraz w postępowaniu o nadanie tytułu profesora (Dz.U. 2018 poz. 261) w związku z art.179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - przepisy wprowadzające Ustawę Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz.1669).

W związku z powyższym zgłaszam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. wet. Joanny Skoniecznej-Kurpiel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry Patomorfologii i Weterynarii Sądowej

dr hab. Wojciech Łopuszyński, prof. uczelni

