

Lublin, 14. 01. 2025 r.

Prof. dr hab. n. med. Marek Gogacz

Recenzja

rozprawy doktorskiej **lek. Aleksandry E. Mrozikiewicz**

**pt. „CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA WYBRANYCH WARIANTÓW POLIMORFICZNYCH
GENÓWSZŁAKU ANGIOGENEZY ORAZ OCENA ICH ŁOŻYSKOWEJ EKSPRESJI
W GRUPIE KOBIET PO ZASTOSOWANIU TECHNIK WSPOMAGANEGO ROZRODU”**

wykonanej pod kierownictwem naukowym prof. dr hab. n. med. Piotr Jędrzejczaka
z Katedry i Zakładu Biologii Komórki, Uniwersytetu Medycznego im. Karola
Marcinkowskiego w Poznaniu.

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Przewodniczącego Rady Kolegium Nauk Medycznych, prof. dr hab. n. med. Przemysława Miłkowskiego (KKN/849/2024), zgodnie z uchwałą Kapituły Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Rozprawa doktorska lek. Aleksandry E. Mrozikiewicz została przygotowana zgodnie z Ustawą z dnia 20 lipca 2018r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (§ 190 ust.3).

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi cykl trzech publikacji odnoszących się do problematyki zaburzeń rozrodu - nawracających zaburzeń implantacji zarodka, podstaw genetycznych zaburzenia, mianowicie oceny polimorfizmu wybranych genów biorących udział w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych - niezwykle ważnego w kontekście rozrodu procesu waskulo i angiogenezy. Doktorantka konsekwentnie opisuje problematykę i poddaje analizie za pomocą zaawansowanych technik z zakresu biologii molekularnej, grupy genów u kobiet z zaburzeniami rozrodu co uzasadnia połączenie prac w jeden, powiązany i spójny tematycznie cykl.

Rozprawa doktorska liczy 109 stron i obejmuje: wykaz stosowanych skrótów oraz spis treści. Spis treści jest zarazem rozbudowany i przejrzysty. Znajdują się w nim:

M.G.

1. Wykaz publikacji stanowiących podstawę postępowania w sprawie o nadanie stopnia naukowego doktora
2. Aktywność naukowa osoby ubiegającej się o nadanie stopnia naukowego doktora
3. Przedmiot badań i komentarz z dziewięcioma podpunktami
4. Założenia rozprawy doktorskiej
5. Omówienie publikacji wchodzących w skład cyklu
6. Implikacje kliniczne i wnioski
7. Piśmiennictwo
8. Streszczenie w języku polskim
9. Streszczenie w języku angielskim
10. Kopie publikacji wchodzących do cyklu
11. Oświadczenia współautorów
12. Zgoda komisji bioetycznej przy uniwersytecie medycznym w Poznaniu
13. Spis tabel i rycin

Tytuł pracy doktorskiej zaś odpowiada tematyce zawartej w publikacjach. W skład cyklu wchodzi trzy publikacje:

1. Mrozikiewicz AE, Ożarowski M, Jędrzejczak P. Biomolecular Markers of Recurrent Implantation Failure - A Review. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 18;22(18):10082. doi: 10.3390/ijms221810082. PMID: 34576245; PMCID: PMC8472752.
2. Mrozikiewicz AE, Kurzawińska G, Ożarowski M, Walczak M, Ożegowska K, Jędrzejczak P. Polymorphic Variants of Genes Encoding Angiogenesis-Related Factors in Infertile Women with Recurrent Implantation Failure. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 21;24(5):4267. doi: 10.3390/ijms24054267. PMID: 36901702; PMCID: PMC10001634.
3. Mrozikiewicz AE, Kurzawińska G, Walczak M, Skrzypczak-Zielińska M, Ożarowski M, Jędrzejczak P. Up-regulated mRNA expression of VEGFA receptors (FLT1 and KDR) in placentas after assisted reproductive technology fertilization. *J Appl Genet.* 2024 Jan 18. doi: 10.1007/s13353-023-00823-2. PMID: 38238614

Pierwsza z prac jest pracą przeglądową, opublikowaną w roku 2021. Dwie kolejne prace opublikowane w roku 2023 i 2024 to prace oryginalne. Wszystkie prace opublikowane były w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym w języku angielskim. Na podkreślenie zasługuje znaczący współczynnik wpływu wszystkich przedstawionych prac - w kolejności - 6,208; 4,9 oraz 2,0 jak oraz wysoka punktacja MEiN – 140 pkt każdej z prac.

Łączna wartość tych publikacji według kryteriów MEiN (zgodnie z rokiem opublikowania) wynosi zatem **420** punktów a wartość współczynnika IF według listy JCR wynosi **13,108**. Wyżej wymienione prace są opracowaniami zbiorowymi, w których Doktorantka jest pierwszym autorem i ma dominujący wkład w tworzeniu koncepcji prac

M.G.

doświadczalnych, realizacji badań, opracowaniu i analizie uzyskanych wyników oraz przygotowaniu manuskryptów do publikacji. Pozytywna ocena prac przez recenzentów i redaktorów oraz prestiż czasopism w których zostały opublikowane, wskazuje, że badania zostały właściwie zaplanowane i przeprowadzone oraz reprezentują wysoki poziom naukowy, stanowiąc tym samym cenny wkład do nauki.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Etycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu – uchwały nr 1062/16 i 197/18. Współautorzy zamieszczonych prac złożyli także oświadczenia, w których przedstawili swój wkład, mierzony udziałem procentowym w ich powstaniu.

Zważywszy, że oryginalne prace badawcze, składające się na rozprawę doktorską, były już poddane ocenie tematyczno-merytorycznej, moja recenzja przygotowanej rozprawy przede wszystkim skoncentruje się na kompleksowej ocenie dysertacji zawartej na stronach 9-35 opracowania. Ta część opracowania, będąca autorskim opracowaniem Doktorantki, pokazuje bowiem Jej duży i usystematyzowany zasób wiedzy, umiejętności formułowania wniosków i postępowania się piśmiennictwem naukowym.

Merytoryczna ocena rozprawy doktorskiej

Jednym z najsilniejszych pragnień człowieka jest posiadanie zdrowego potomstwa. We wstępie Doktorantka przedstawia znaczenie i złożoność problematyki niepłodności, która dotyka w Polsce około 15-20% dorosłych starających się o potomstwo. Bardzo zwięźle przedstawia przyczyny schorzenia, metody terapeutyczne oraz wyodrębnia różne płaszczyzny schorzenia, którym najczęściej zajmuje się zespół wielodyscyplinarny. Następnie omówiona została szczegółowo także tematyka nawracających niepowodzeń implantacji (RIF), których etiologia nie została wyjaśniona. Stanowią one poważny problem w grupie leczących się z powodu niepłodności kobiet i występują u około 10% par poddanych procedurze in vitro. Bardzo szczegółowo zostały omówione potencjalne przyczyny RIF, ze szczególnym naciskiem na angiogenezę, która odgrywa kluczową rolę w procesie implantacji zarodka. Na uwagę zasługują przejrzyste ryciny na których przedstawiona została niezwykle ważna rola angiogenezy w patogenezie różnych schorzeń. Omówione zostały szczegółowo i obszernie czynniki biorące udział w procesie tworzenia nowych naczyń w łożysku wraz z ich receptorami oraz uwzględnieniem mechanizmów molekularnych. Zawarte w dysertacji, dopracowane ryciny oraz tabela ułatwiają zrozumienie złożonego procesu tworzenia nowych naczyń oraz czynią tą część przejrzystą. Następnie przedstawiona została potencjalna rola i znaczenie modulacji epigenetycznej prowadząca do zaburzeń ekspresji genów związanych

M.G.

z angiogenezą w nawracających niepowodzeniach implantacji. Warto podkreślić w tym miejscu niezwykle ciekawą problematykę angiogenezy, która zafascynowała naukowo Doktorantkę. Podjęła się oceny wybranych czynników naczyniowo-śródbłonkowych wzrostu (VEGFs - *vascular endothelial growth factors*), czynników wzrostu fibroblastów (FGFs - *fibroblast growth factors*) oraz ich receptorów: fms-podobna kinaza tyrozynowa 1 (FLT1 - *fms related receptor tyrosine kinase 1*) oraz receptor zawierający wstawkę kinazy (KDR - *kinase insertion domain receptor*).

Celem przeprowadzonych badań była ocena częstości występowania wybranych wariantów polimorficznych genów szlaku angiogenezy oraz ocena ich łożyskowej ekspresji w grupie kobiet po zastosowaniu technik wspomaganego rozrodu. Cel ten realizowano poprzez cele szczegółowe:

1. Analizę danych klinicznych matek oraz noworodków w grupie pacjentek po zapłodnieniu *in vitro* oraz w grupie kontrolnej
2. Porównanie częstości występowania genotypów i alleli wariantów genów VEGFA (rs699947), FLT1 (rs722503), KDR (rs2071559, rs1870377) i FGF2 (rs308395) u kobiet z niepłodnością oraz z nawracającymi niepowodzeniami implantacji (RIF) z grupą kontrolną
3. Oszacowanie istniejących powiązań pomiędzy polimorfizmami SNPs badanych genów (VEGFA, FGF2, KDR i FLT1) poprzez analizę haplotypów i interakcji pomiędzy genotypami
4. Porównanie ekspresji mRNA genów związanych z angiogenezą (VEGFA, FGF2, KDR i FLT1) w łożyskach z ciąż po zapłodnieniu metodami wspomaganego rozrodu z zarodków świeżych i mrożonych z ekspresją tych genów w łożyskach pochodzących z ciąż poczętych naturalnie
5. Ocenę ekspresji badanych genów (VEGFA, FGF2, KDR i FLT1) w zależności od miejsca pobrania tkanki łożyska (część środkowa z brzegiem łożyska) oraz płci noworodków (męska/żeńska)
6. Analizę korelacji pomiędzy łożyskową ekspresją badanych genów związanych z angiogenezą VEGFA, FLT1, KDR oraz FGF

Na kolejnych stronach autoreferatu znajduje się omówienie osiągnięć badawczych Doktorantki opisanych w cyklu publikacji w odniesieniu do aktualnego stanu wiedzy. W tej części dysertacji Doktorantka wykazała się dojrzałością naukową i zdolnością do kompleksowej interpretacji uzyskanych przez siebie wyników w odniesieniu do danych literaturowych. Niezwykle ciekawe z punktu widzenia użytecznego są niektóre z uzyskanych

M.G.

wyników. I tak wykazano że pokazano, że wariant rs2071559 genu KDR może być związany ze zwiększonym ryzykiem niepłodności a wariant rs699947 VEGFA ze zwiększonym ryzykiem RIF w grupie niepłodnych kobiet z populacji polskiej leczonych technikami IVF.

Ta część dysertacji kończy się podsumowaniem najważniejszych osiągnięć Doktorantki w postaci 5 sformułowanych wniosków przedstawionych poniżej.

1. Analiza polimorfizmu -604T>C (rs2071559) genu KDR wykazała jego możliwy wpływ na zwiększenie ryzyka wystąpienia niepłodności u kobiet
2. Nosicielstwo wariantu -2578A genu VEGFA może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nawracających niepowodzeń implantacji (RIF) w grupie badanych pacjentek leczonych z powodu niepłodności
3. Zastosowanie procedury zapłodnienia in vitro może wpływać na istotne zmniejszenie ekspresji genu VEGFA w łożysku
4. Istnieje potencjalny wpływ na zwiększenie ekspresji genu FLT1 w łożyskach pochodzących z ciąży, w których podano zarodki mrożone oraz na zwiększenie ekspresji łożyskowej genu KDR w grupach, w których podano zarodki świeże i mrożone
5. Ekspresja analizowanych genów szlaku angiogenezy wydaje się nie być zależna od płci noworodka oraz miejsca pobrania tkanki z łożyska

W mojej opinii wnioski sformułowane są prawidłowo i są interesującymi zarówno z punktu widzenia badacza jak i klinicysty. Kontynuacja badań w tym kierunku o której wspomina doktorantka może przyczynić się do opracowania skutecznych strategii terapeutycznych w leczeniu niepłodności i zoptymalizować postępowanie w grupie kobiet zagrożonych nawracającymi niepowodzeniami implantacji o czym wspomina doktorantka.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Aleksandry E. Mrozikiewicz charakteryzuje się trafnością wyboru tematyki poddanej wnikliwej analizie. W przedstawionym do recenzji cyklu publikacji Doktorantka wykazała się szeroką wiedzą i umiejętnością prowadzenia badań naukowych w tym umiejętnością wykorzystania dostępnej bibliografii, sformułowania celów zaplanowanych badań naukowych oraz wniosków z nich wyływających.

Zawarty w rozprawie cykl publikacji jest spójny tematycznie co warto jeszcze raz podkreślić, analizuje problematykę niepowodzeń rozrodu w szczególności odnosi się do *badania odmienności istotnych czynników biorących udział w procesie angiogenezy, przy wykorzystaniu zaawansowanych technik genetycznych opartych o amplifikację DNA i badanie jego fragmentów restrykcyjnych w oparciu o ich długość (PCR-RFLP - polymerase*

M.G.

chain reaction/restriction fragment length polymorphism). Tematyka doktoratu omówiona została bardzo szeroko, szczegółowo i zarazem przejrzyście. W związku z tym stanowi cenne uzupełnienie piśmiennictwa naukowego w tym zakresie. Należy wspomnieć też o staranności i poprawności językowej pracy.

Ze względu na niezwykle istotną i ciekawą tematykę jak i dużą wartość poznawczą przedstawionej do recenzji pracy, jest ona niezwykle cennym uzupełnieniem literatury przedmiotu i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie. Obok aktywności naukowej Doktorantki (zbiorczy IF 31.894, łączna punktacja MEiN 940.000) na podkreślenie zasługuje także jej aktywność organizacyjna (m.in. współorganizacja dwóch kongresów o zasięgu międzynarodowym) oraz dydaktyczna – prowadzenie zajęć ze studentami w języku polskim i angielskim.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa lek. Aleksandry E. Mrozikiewicz spełnia wszystkie wymogi i kryteria podstawy prawnej, art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”, jakim powinna odpowiadać praca na stopień doktora nauk medycznych. Zwracam się zatem do Kolegium Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o dopuszczenie lek. Aleksandry E. Mrozikiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, ze względu na nowatorską, istotną naukowo, klinicznie i społecznie tematykę podjętych badań, wagę uzyskanych wyników w toku przeprowadzonych badań, które spotkały się także z pozytywną opinią recenzentów znaczących czasopism, zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy.

M. Gogaw