



**Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie**

WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką

10-719 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 14, tel. (89) 523-34-97

Dr hab. Anna Domosławska

Olsztyn 24.02.2023.

Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

UW-M w Olsztynie

Ul. Oczapowskiego 14

10-719 Olsztyn

OCENA

pracy doktorskiej lek. wet. Tomasza Jasińskiego

pt. „Rola szlaku NF- κ B zależnego w patogenezie wybranych chorób błony śluzowej macicy klaczy”

Rozprawa doktorska lek. wet. Tomasz Jasińskiego oparta jest na czterech publikacjach oryginalnych, zamieszczonych w czasopismach z listy JCR o wysokim współczynniku wpływu (IF).

1. Domino M., Jasiński T., Kautz E., Juszcuk-Kubiak E., Ferreira-Dias G., Zabielski R., Sady M., Gajewski Z. Expression of genes involved in the NF- κ B-dependent pathway of the fibrosis in the mare endometrium. *Theriogenology* 2020; 147, 18-24 (Punkty MNiSZW=140, IF=2,740)

2. Jasiński T., Zdrojkowski Ł., Kautz E., Juszcuk-Kubiak E., Ferreira-Dias G., Domino M. Equine Endometritis Pathological Features: Are They Dependent on NF- κ B Signaling Pathway? *Animals* 2021; 11, 3151 (Punkty MNiSZW=100; IF=3,231).

3. Jasiński T., Zdrojkowski Ł., Kautz E., Juszczyk-Kubiak E., Ferreira-Dias G., Domino M. The NF- κ B-signaling pathway in mare's endometrium infiltrated with the inflammatory cells. *Reproduction in Domestic Animals* 2022; 57,598-610 (Punkty MNiSZW=100; IF=1,858).

4. Jasiński T., Zdrojkowski Ł., Ferreira-Dias G., Kautz E., Juszczyk-Kubiak E., Domino M. Molecular mechanism of equine endometritis: the NF- κ B-dependent pathway underlies the ovarian steroid receptors' dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 23,7360 (Punkty MNiSZW=140, IF=6,208).

Sumaryczny IF wynosi 14,037.

Aplikant przeprowadził badania nad rolą szlaku czynnika jądrowego κ B (NF- κ B) zależnego w patogenezie wybranych chorób błony śluzowej macicy klaczy, skupiając się na jej zapaleniu oraz endometrozie. Oba te schorzenia są jednym z ważniejszych czynników prowadzących do upośledzenia zdolności rozrodczych klaczy, a co za tym idzie również przyczyna poważnych strat finansowych w branży hodowli koni. Badania doktoranta miały na celu ustalenie czy ekspresja genów na poziomie mRNA dla białka chemotaktycznego monocytów-1 (MCP-1), interleukiny-6 (IL-6) i syntaz hialuronowych (HAS) może dzielić kanoniczne (RelA/(NF- κ B)) i niekanoniczne (NF- κ B2) szlaki aktywacji zależne od NF- κ B i zmieniać się zależnie od kategorii i typów endometrozy oraz stanu zapalnego błony śluzowej. Doktorant posiadał niezbędne umiejętności pracy w laboratorium, profesjonalnie zaprezentował wyniki swoich badań w przedstawionym cyklu publikacji oraz ogólnym podsumowaniu dysertacji.

Oceniana praca doktorska obejmuje 71 stron maszynopisu z wyłączeniem kopii publikacji, 2 tabele oraz 12 rycin. Tekst pracy został podzielony w typowy sposób dla prac naukowych na rozdziały główne i podrozdziały, co ułatwia lekturę całej pracy. Układ redakcyjny rozprawy jest bez zarzutu, jednakże należy uwzględnić kilka poprawek dotyczących odmiany wyrazów, co zostało zamieszczone w treści recenzji. W pracy, po stronie tytułowej, stosownych oświadczeniach, zamieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim. Kolejne strony zawierają przejrzysty spis treści, wykaz prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz wykaz skrótów, co ułatwia rozumienie tekstu. Autor konsekwentnie posługuje się skrótami w treści pracy.

Wstęp.

Wstęp rozprawy doktorskiej Autor podzielił na 6 podrozdziałów. Omówił zwięźle rolę błony śluzowej macicy (endometrium) w ochronie ściany macicy przed uszkodzeniami i

zakażeniami, opisując zastosowanie poszczególnych biomarkerów do oceny transformacji mikroblastów, asynchronicznego różnicowania nabłonka gruczołowego, upośledzenia odporności wrodzonej, wytwarzania składników macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) o zróżnicowanych funkcjach biologicznych oraz do oceny aktywacji szlaku fibrogenezy poprzez działanie prozapalne na komórki zrębu. Autor omówił najważniejsze cechy zapalenia błony śluzowej macicy, podkreślając wiodącą rolę zapalenia przewlekłego, które jest jedną z najważniejszych przyczyn niepłodności klaczy w każdym wieku. Kolejny podrozdział autor poświęcił wyjaśnieniu procesów związanych z przewlekłą chorobą błony śluzowej macicy, jaką jest endometroza, z uwzględnieniem klasyfikacji stopnia jej nasilenia zaproponowanej przez Kenney'a i Doig'a oraz stopnia uszkodzenia komórek nabłonka gruczołowego i aktywności metabolicznej komórek zrębu okołogruzołowego zaproponowanej przez Hoffmann'a i wsp. Autor podniósł również rolę jajnikowych hormonów steroidowych w regulacji wzrostu i różnicowania komórek błony śluzowej macicy. W przedostatnim podrozdziale omówił On w sposób jasny i zwięzły rolę czynnika jądrowego κ B w regulacji zapalenia i włóknienia, który to jest czynnikiem transkrypcyjnym, odgrywającym kluczową rolę w wielu odpowiedziach komórkowych na zmiany środowiska zewnątrzkomórkowego. Autor we wstępie postawił cztery hipotezy badawcze związane z patogenezą endometrozy klaczy:

1. Zależna od szlaku kanonicznego i niekanonicznego NF- κ B regulacja transkrypcji MCP-1, IL6 i HAS 1-3 aktywuje procesy zapalne w błonie śluzowej macicy klaczy.
2. Zależna od szlaku kanonicznego i niekanonicznego NF- κ B regulacja transkrypcji MCP-1, IL-6 i HAS 1-3 aktywuje procesy zwyrodnieniowe w błonie śluzowej macicy klaczy w zależności od stopnia zaawansowania endometrozy.
3. Zależna od szlaku kanonicznego i niekanonicznego NF- κ B regulacja transkrypcji MCP-1, IL-6 i HAS 1-3 aktywuje procesy zwyrodnieniowe w błonie śluzowej macicy klaczy w zależności od typu histologicznego endometrozy.
4. Zaburzenia morfologiczne i czynnościowe błony śluzowej macicy klaczy o podłożu endokrynologicznym, wskazane jako jeden z mechanizmów endometrozy, mogą być powiązane ze szlakiem sygnalizacji NF- κ B.

Uwagi redakcyjne dotyczące wstępu:

Strona 19- należy poprawić w zdaniu:” Ponadto ograniczony naciek zapalny....., jest obecna” na „jest obecny”;

Celem pracy było określenie czy transkrypcja RelA, NF- κ B1, NF- κ B2, MCP-1, IL-6 i HAS 1-3 zmienia się w błonie śluzowej macicy klaczy:

1. Z zapaleniem w zależności od intensywności i rodzaju nacieku zapalnego.
2. Z endometrozą w zależności od stopnia zaawansowania endometrozy.
3. Z endometrozą w zależności od typu histologicznego endometrozy.
4. Zależnie od transkrypcji ESR1, ESR2, PRG oraz czy transkrypcja ESR1, ESR2, PRG w błonie śluzowej macicy klaczy z endometrozą zmienia się w zależności od stopnia zaawansowania i typu histologicznego endometrozy.

Materiały i metody. Rozdział ten rozpoczyna się od omówienia pobierania materiału biologicznego, jaki stanowiły wycinki błony śluzowej macicy i jajników oraz próbki krwi. Wszystkie próby zostały pobrane poubojowo od klaczy ras gorąco krwistych w wieku od 3 do 25 lat. Autor szczegółowo omawia procedury jakim poddawano poszczególne próby. Autor wykonał precyzyjnie określenie fazy cyklu jajnikowego, zarówno na podstawie badania makroskopowego jajników jak i stężenia jajnikowych hormonów steroidowych 17β -estradiolu i progesteronu zgodnie z protokołem zaproponowanym przez da Costa i wsp. W zależności od stężenia hormonów próbki przypisano do odpowiedniej grupy środkowej fazy lutealnej (MLP) lub pęcherzykowej (FLP) lub obu. Na żadnym z jajników nie stwierdzono makroskopowych cech patologii. Badanie histopatologiczne błony śluzowej macicy klaczy zostało przeprowadzone z próbek zatopionych w parafinie - całą procedurę autor opisał wyczerpująco. Kryteria klasyfikacji zostały szczegółowo omówione w publikacjach. Na uwagę zasługuje fakt dużej dokładności autora przy pobieraniu i ocenie próbek, gdyż przy ocenie transkrypcji badanych genów w błonie śluzowej macicy klaczy, żadna z próbek nie została wykluczona z powodu niewystarczającej zawartości RNA. W tych badaniach Autor badał każdą próbkę w dwóch powtórzeniach, a surowe dane transkrypcji genów znormalizowano przy użyciu średniej geometrycznej mRNA wykrytego z dwóch genów referencyjnych.

W podrozdziale opisującym metody statystyczne Autor użył kilku metod statystycznych w zależności od otrzymanych danych, co zostało zawarte w poszczególnych publikacjach jednotematycznego cyklu.

Wyniki otrzymane przez autora, opublikowane w jednotematycznym cyklu prac pozwalają stwierdzić, że:

1. Transkrypcja RelA, NF- κ B1, NF- κ B2i HAS nie zmienia się w błonie śluzowej macicy klaczy z zapaleniem w zależności od intensywności i rodzaju nacieku zapalnego. W błonie śluzowej macicy klaczy transkrypcja MCP-1 i IL-6 wzrasta wraz z nasileniem stanu zapalnego. Produkcja MCP-1, IL-6, HAS 2 i HAS 3 nie jest regulowana przez szlak zależny

od NF- κ B, co może sugerować, że szlak ten nie jest zaangażowany w regulację zapalenia błony śluzowej macicy.

2. Transkrypcja RelA, NF- κ B1, NF- κ B2, IL-6 i HAS 1-3 zmienia się w błonie śluzowej macicy klaczy z endometrozją w zależności od stopnia zaawansowania endometrozy, co wskazuje na zaangażowanie szlaków zależnych od NF- κ B w patogenezę endometrozy. Aktywacja szlaków kanonicznych i niekanonicznych prowadzi do zmniejszenia transkrypcji IL-6 i zwiększa transkrypcję HAS 1 i HAS 3. Najistotniejsze zmiany transkrypcji genów docelowych zaobserwowano jedynie w fazie pęcherzykowej cyklu jajnikowego, co sugeruje hormonozależną aktywację badanych szlaków włóknienia.

Uwaga redakcyjna: W ostatnim zdaniu należy poprawić z „hormonozależną aktywację badanych szlaku włóknienia” na „hormonozależną aktywację badanych/badanego, szlaków/szlaku włóknienia”

3. Transkrypcja RelA, NF- κ B, MCP-1, IL-6 i HAS zmienia się w błonie śluzowej macicy klaczy z endometrozją w zależności od typu histologicznego endometrozy potwierdzając zaangażowanie szlaków zależnych of NF-KB w patogenezę endometrozy. Aktywacja szlaku kanonicznego NF- κ B wzrasta w obydwóch typach niszczącej endometrozy, co wskazuje udział NF- κ B w regulacji odkładania ECM i niszczenia błony podstawnej nabłonka gruczołowego. Traskrypcja MCP-1 wzrasta w fazie pęcherzykowej w nieaktywnej, niszczącej endometrozie, podczas gdy transkrypcja IL-6 i HAS 2 wzrasta w fazie środkowej lutealnej w aktywnej niszczącej endometrozie.

4. Transkrypcja ESR1, ESR2 i PGR zmienia się w błonie śluzowej macicy klaczy z endometrozją w zależności od stopnia zaawansowania oraz typu histologicznego endometrozy. Transkrypcja ESR1 jest niższa w błonie śluzowej macicy z niszcząca i nieniszcząca endometrozją niż w błonie śluzowej zdrowej, lecz nie spada wraz ze stopniem zaawansowania choroby. Transkrypcja ESR1 i ESR2 różni się pomiędzy fazą pęcherzykową i środkową lutealną w poszczególnych kategoriach i typach histopatologicznych endometrozy co wskazuje na większy udział dysregulacji zależnej od ER- α i ER- β niż dysregulacje zależne od PR w patogenezie endometrozy.

Uwaga redakcyjna: Należy poprawić w ostatnim zdaniu „ dysregulacji zależnej od, niż dysregulacje zależna od” na „ dysregulacji zależnej od ... niż dysregulacje zależne od”

5. Transkrypcja ESR1, ESR2 i PGR koreluje z transkrypcją RelA, NF- κ B1, NF- κ B2, MCP-1, IL-6 i HAS1-3 w błonie śluzowej macicy klaczy w zależności od stopnia zaawansowania oraz typu histopatologicznego endometrozy. Wykazano hormonozależną aktywację

endometrozy, silniejszą w przypadku niszczącej endometrozy, w której pośredniczy kanoniczny szlak zależny od NF- κ B.

Z powyższych wyników autor wyciągnął następujące wnioski:

1. Szlak zależny od NF- κ B nie jest zaangażowany w aktywację procesu zapalnego w błonie śluzowej macicy klaczy.
Uwaga redakcyjna: Należy poprawić w pierwszym wersie z „aktywuję” na „aktywację”;
2. Szlak kanoniczny i niekanoniczny zależny od NF- κ B jest zaangażowany w regulację stopnia zaawansowania endometrozy poprzez hamowanie transkrypcji IL-6 i nasilenie transkrypcji HAS 1 i HAS 3.
3. Szlak kanoniczny zależny od NF- κ B jest zaangażowany w regulację typu histologicznego endometrozy, poprzez nasilenie transkrypcji MCP-1, IL-6 i HAS 2 odpowiednio w aktywnej i nieaktywnej – niszczącej endometrozie.
4. Szlak kanoniczny i niekanoniczny zależny od NF- κ B bierze udział w hormonozależnej aktywacji endometrozy, silniej związanej z dysregulacją ER- α i ER- β niż dysregulacją PR. Wykazana hormonozależna aktywacja jest silniejsza w niszczącej, w której pośredniczy kanoniczny szlak zależny od NF- κ B niż w nieniszczącej endometrozie.

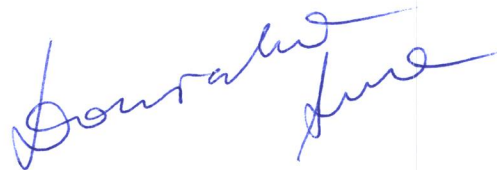
Przedstawione wnioski odnoszą się logicznie do postawionych celów badań i są czytelnie sformułowane.

Spis piśmiennictwa zawiera 122 cytowane pozycje przedstawione w sposób ujednolicony. Przywołane prace są aktualne, zawarte zarówno w poszczególnych artykułach jednotematycznego cyklu prac, jak i zebrane w całość na stronach od 61 do 71.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że uwagi i spostrzeżenia mają jedynie charakter redakcyjny, w żaden sposób nie umniejszając wartości merytorycznej pracy. Na podkreślenie i docenienie zasługuje aktualność tematyczna przedstawionego zagadnienia, zwięzłość dysertacji i wartość aplikacyjna. Stwierdzam, że Pan lek. wet. Tomasz Jasiński wykazał odpowiedni poziom przygotowania do prowadzenia działalności naukowo-badawczej. Wyrażam nadzieję, że będzie On kontynuował badania nad endometrozją błony śluzowej klaczy, gdyż jest to temat cały czas aktualny i nadal nie do końca poznany.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska obejmująca cykl jednotematycznych artykułów, wnosi istotne elementy do nauki, spełniając wszystkie warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym (Dz. U. z 2022 r., poz. 574 z późn. zm.).

W związku z powyższym przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie wniosek o dopuszczenie Pana lek. wet. Tomasza Jasińskiego do dalszych etapów postępowania mającego na celu nadanie stopnia naukowego doktora.

A handwritten signature in blue ink, written in a cursive style. The signature appears to be 'Dorota Jasińska'.