

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. wet. Tomasza Jasińskiego pt.:**  
***Rola szlaku NF- $\kappa$ B zależnego w patogenezie wybranych chorób błony śluzowej macicy klaczy***  
**wykonanej w Katedrze Chorób Dużych Zwierząt i Klinice, Instytutu Medycyny**  
**Weterynaryjnej, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie**  
**pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Domino**  
**i promotora pomocniczego dr hab. Bartosza Pawlińskiego**

**Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej**

Podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora jest cykl wykazanych poniżej czterech zbieżnych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR o łącznym IF 14,037 i sumarycznej punktacji wg aktualnie obowiązujących wytycznych Ministerstwa Edukacji i Nauki wynoszącej 480.

1. Domino M., Jasiński T., Kautz E., Juszczyk-Kubiak E., Ferreira-Dias G., Zabielski R., Sady M., Gajewski Z. Expression of genes involved in the NF- $\kappa$ B-dependent pathway of the fibrosis in the mare endometrium. *Theriogenology* 2020; 147, 18-24. (DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.055) (Punkty MNiSzW2020 = 140, IF2020 = 2,740).

2. Jasiński T., Zdrojkowski Ł., Kautz E., Juszczyk-Kubiak E., Ferreira-Dias G., Domino M. Equine Endometrosis Pathological Features: Are They Dependent on NF- $\kappa$ B Signaling Pathway? *Animals* 2021; 11, 3151. (DOI: 10.3390/ani11113151) (Punkty MEiN2021 = 100, IF2021 = 3,231).

3. Jasiński T., Zdrojkowski Ł., Kautz E., Juszczyk-Kubiak E., Ferreira-Dias G., Domino M. The NF- $\kappa$ B-signalling pathway in mare's endometrium infiltrated with the inflammatory cells. *Reproduction in Domestic Animals* 2022, 57, 598–610. (DOI: 10.1111/rda.14099) (Punkty MEiN2021 = 100, IF2021 = 1,858).

4. Jasiński T., Zdrojkowski Ł., Ferreira-Dias G., Kautz E., Juszczyk-Kubiak E., Domino M. Molecular mechanism of equine endometrosis: the NF- $\kappa$ B-dependent pathway underlies the ovarian steroid receptors' dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, 23, 7360. (DOI: 10.3390/ijms23137360) (Punkty MEiN2021 = 140, IF2021 = 6,208).

Prace te opatrzone są wspólnym tytułem *Rola szlaku NF- $\kappa$ B zależnego w patogenezie wybranych chorób błony śluzowej macicy klaczy* i zostały przedstawione do recenzji w formie autoreferatu naukowego. Doktorant w trzech artykułach, za wyjątkiem pracy opublikowanej w *Theriogenology* jest pierwszym autorem. Należy nadmienić, że prace te powstały w ramach współpracy międzynarodowej, a źródłem finansowania był grant NCN, DEC.2018/02/X/NZ4/00101 zatytułowany: „Ocena procesu włóknienia błony śluzowej macicy klaczy w przebiegu endometrosis na poziomie genowym”, którego kierownikiem była promotor rozprawy doktorskiej dr hab. Małgorzata Domino.

## **Wstęp**

Doktorant w oparciu o przegląd aktualnej literatury charakteryzuje znaczenie napływu leukocytów do błony śluzowej macicy klaczy i ich powiązanie z przebudową macierzy zewnątrzkomórkowej oraz wzrostem produkcji kolagenu, czego konsekwencją jest włóknienie okołogruzołowe i degeneracja endometrium. Szczegółowo charakteryzuje endometriozę, analizując spojrzenie wielu autorów na jej patogenезę, wpływ na płodność klaczy oraz diagnostykę. W tej części pracy scharakteryzowano również typy endometritis w zależności od tego, czy w nacieku zapalnym dominują neutrofile lub limfocyty oraz zwięźle przedstawiono rolę cytokin w regulacji procesu zapalnego endometrium. Omówiono również znaczenie stymulacji hormonalnej w prawidłowej funkcji błony śluzowej macicy klaczy z uwzględnieniem roli i występowania receptorów dla estrogenów i progesteronu. Doktorant poświęcił również sporo uwagi regulacjom przebiegającym z udziałem NF- $\kappa$ B i ich powiązaniu z procesem zapalnym i włóknieniem. Wstęp pracy doktorskiej odzwierciedla tematykę przeprowadzonych badań własnych i legitymizuje odpowiednie przygotowanie teoretyczne Doktoranta do prowadzenia badań w tym zakresie.

## **Hipotezy badawcze i cel badań**

Na podstawie analizy literatury sformułowano cztery hipotezy badawcze:

(1) *Zależna od szlaku kanonicznego i niekanonicznego NF- $\kappa$ B regulacja transkrypcji MCP-1, IL-6 i HAS 1-3 aktywuje procesy zapalne w błonie śluzowej macicy klaczy* (artykuł nr 3).

(2) *Zależna od szlaku kanonicznego i niekanonicznego NF-κB regulacja transkrypcji MCP-1, IL-6 i HAS 1-3 aktywuje procesy zwyrodnieniowe w błonie śluzowej macicy klaczy w zależności od stopnia zaawansowania endometrozy (artykuł nr 1).*

(3) *Zależna od szlaku kanonicznego i niekanonicznego NF-κB regulacja transkrypcji MCP-1, IL-6 i HAS 1-3 aktywuje procesy zwyrodnieniowe w błonie śluzowej macicy klaczy w zależności od typu histologicznego endometrozy (artykuł nr 2).*

(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-κB (artykuł nr 4).*

Weryfikacja hipotez była przeprowadzona w oparciu o realizację celów badań, w których skupiono się na wykazaniu, czy transkrypcja RelA, NF-κB1, NF-κB2, MCP-1, IL-6 i HAS 1-3 jest zależna od:

- (1) *intensywności i rodzaju nacieku zapalnego (realizacja celu w pracy nr 3);*
- (2) *od stopnia zaawansowania endometrozy (realizacja celu w pracy nr 1);*
- (3) *od typu histologicznego endometrozy (realizacja celu w pracy nr 2);*
- (4) *od transkrypcji ESR1, ESR2 i PGR oraz czy transkrypcja ESR1, ESR2 i PGR w błonie śluzowej macicy klaczy z endometrozą zmienia się w zależności od stopnia zaawansowania i typu histologicznego endometrozy (realizacja celu w pracy nr 4).*

## **Material i metody**

W każdym z artykułów wchodzących w skład pracy doktorskiej w szczegółowy sposób przedstawiono pozyskiwanie materiału do badań i zastosowane metody badawcze. Syntetyczny opis metodyki jest następujący: krew, wycinki błony śluzowej macicy oraz jajniki pobierano w trakcie komercyjnego uboju, a takie pozyskiwanie materiału nie wymaga zgody Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach. W 120 pozyskanych wycinkach bez cech endometrozy badano transkrypcję RelA, NF-κB1, NF-κB2, MCP-1, IL-6 i HAS 1-3, a w 100 wycinkach bez cech zapalenia, lecz z endometrozą klasyfikowaną z uwagi na stopień jej zaawansowania oraz typ histologiczny badano transkrypcję ESR1, ESR2, PGR, RelA, NF-κB1, NF-κB2, MCP-1, IL-6 i HAS 1-3. Faza cyklu jajnikowego była określana na podstawie ogólnie przyjętych zasad badania makroskopowego jajników oraz oznaczaniu koncentracji estradiolu i progesteronu. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

## **Wyniki**

W ramach przeprowadzonych badań wykazano, że transkrypcja RelA, NF- $\kappa$ B1, NF- $\kappa$ B2 i HAS 1 nie jest zależna od intensywności i rodzaju nacieku zapalnego. Z kolei transkrypcja MCP-1 i IL-6 oraz HAS 2 i HAS 3 wzrasta wraz z nasileniem zapalenia. Co istotne wykazano, że produkcja MCP-1, IL-6, HAS 2 i HAS 3 nie jest regulowana przez szlak zależny od NF- $\kappa$ B co sugeruje, że szlak ten nie jest zaangażowany w regulację zapalenia błony śluzowej macicy (artykuł nr 3).

Z kolei transkrypcja RelA, NF- $\kappa$ B1, NF- $\kappa$ B2, IL-6 i HAS 1-3 jest zależna od stopnia zaawansowania endometrozy i ta forma regulacji wskazuje na związek z patogenezą endometrozy, przy czym najistotniejsze zmiany transkrypcji genów odnotowano w fazie pęcherzykowej cyklu jajnikowego, co sugeruje hormonozależność procesu włóknienia (artykuł nr 1).

Aktywacja szlaku kanonicznego NF- $\kappa$ B wzrasta w przebiegu niszczącej endometrozy, co wskazuje na udział NF- $\kappa$ B w regulacji odkładania ECM (artykuł nr 2).

Również transkrypcja ESR1, ESR2 i PGR zmienia się w zależności od stopnia zaawansowania oraz typu histologicznego endometrozy. Transkrypcja ESR1 i ESR2 różni się pomiędzy fazą pęcherzykową i fazą środkową lutealną w poszczególnych kategoriach i typach histopatologicznych endometrozy co wskazuje na większy udział dysregulacji zależny od ER- $\alpha$  i ER- $\beta$  niż dysregulacji zależnej od PR w patogenezie endometrozy (artykuł nr 4).

Ponadto wykazano, że transkrypcja ESR1, ESR2 i PGR koreluje z transkrypcją RelA, NF- $\kappa$ B1, NF- $\kappa$ B2, MCP-1, IL-6 i HAS 1-3 w zależności od stopnia zaawansowania oraz typu histologicznego endometrozy, co potwierdza hormonozależną aktywację endometrozy, silniejszą w przypadku niszczącej endometrozy (artykuł nr 4).

Odbiór uzyskanych wyników ułatwia bogata dokumentacja graficzna, a ich omówienie jest wyczerpujące i wskazuje na bardzo dobre zrozumienie badanych zagadnień przez Doktoranta.

Pracę doktorską kończą cztery odpowiednio wyciągnięte wnioski, przyporządkowane wynikom uzyskanym w każdym z opublikowanych artykułów.

## **Spostrzeżenia dotyczące pracy doktorskiej**

Analizując autoreferat oraz publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej muszę stwierdzić bardzo dobre przygotowanie teoretyczne do prowadzenia badań w wybranym

zakresie. Tematyka podjętych badań jest bardzo interesująca z poznawczego punktu widzenia i stanowi próbę dania odpowiedzi na nurtujące nas pytania dotyczące patogenezy endometrozy. Hipotezy badawcze i cel badań zostały prawidłowo sformułowane. Bardzo dobrze, że zakres prowadzonych badań nie ograniczył się do poszukiwania odpowiedzi na te pytania w oparciu o prowadzenie analiz bazujących jedynie na tradycyjnym podziale endometrozy wg wytycznych zaproponowanych przez Kenney i Doig (1986), ale uwzględniono również podział zaproponowany przez Hoffmann i wsp. (2009), dzielący endometrozę na nieaktywną-niszczącą, nieaktywną-nieniszczącą, aktywną-niszczącą i aktywną-nieniszczącą. Takie podejście do analizowanego problemu sprzyja lepszemu zgłębieniu analizowanego tematu. Zastosowana metodologia badawcza w każdym z punktów nie budzi zastrzeżeń, a bogaty i zaawansowany warsztat laboratoryjny daje gwarancję uzyskania miarodajnych wyników. Należy również podkreślić dobrą interpretację uzyskanych wyników. Za najważniejsze osiągnięcie pracy doktorskiej uznaję wykazanie, że szlaki NF- $\kappa$ B, kanoniczny i niekanoniczny są zaangażowane w rozwój endometrozy, a przebieg zapalenia błony śluzowej macicy nie jest zależny od NF- $\kappa$ B. Dodatkowo wskazano na hormonozależną aktywację szlaków włóknienia zależnych od NF- $\kappa$ B.

Jednakże przeprowadzone badania dotyczą jedynie pomiaru ekspresji genów, a do uzyskania pełnego obrazu analizowanych zagadnień wskazany byłby również pomiar produktu tych genów, a więc odpowiednich białek. Również przeprowadzenie badań na materiale pobranym podczas uboju nie daje możliwości odniesienia uzyskanych wyników do stanu klinicznego narządu płciowego klaczy. Przy takim sposobie pozyskiwania próbek do analizy nic nie wiadomo na temat historii rozrodu tych klaczy i nic nie wiadomo o ich ewentualnych problemach z płodnością. Nic nie wiemy również o ewentualnej historii leczenia i o możliwym wpływie stosowanych leków na uzyskane wyniki. Powyższe uwagi wypływają z klinicznego punktu widzenia, a posiadanie tych informacji oraz dodatkowo wyników badania ultrasonograficznego macicy w zakresie możliwości gromadzenia płynu, czy nadmiernego obrzęku endometrium oraz dodatkowo analiza wyników badania mikrobiologicznego endometrium pozwoliłyby spojrzeć na uzyskane w ramach pracy doktorskiej wyniki w sposób bardziej kompleksowy.

## **Podsumowanie**

Pomimo pewnych uwag uważam, że praca doktorska zasługuje na wyróżnienie. Jest to bardzo dobre opracowanie powstałe w oparciu o nowoczesny warsztat metodyczny, a uzyskane wyniki są niezmiernie interesujące z poznawczego punktu widzenia. Interpretacja wyników jest

kompleksowa i wyczerpująca, co wskazuje na bardzo dobre zrozumienie badanych zagadnień. Odpowiednio zaplanowane podejście do badań naukowych zaowocowało publikacją czterech artykułów naukowych w czasopismach o bardzo wysokich wskaźnikach metrycznych. Dlatego też składam wniosek do Rady Dyscypliny Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW o przyznanie lek. wet. Tomaszowi Jasińskiemu stosownej nagrody za pracę doktorską.

### **Wniosek końcowy**

Uważam, że praca doktorska lek. wet. Tomasza Jasińskiego pt.: *Rola szlaku NF- $\kappa$ B zależnego w patogenezie wybranych chorób błony śluzowej macicy klaczy* odpowiada wymogom określonym w art. 187 ust.1-4 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2022 r. poz. 574) stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora. Dlatego też przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW o dopuszczenie lek. wet. Tomasza Jasińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

