

dr hab. Roman Dąbrowski, prof. uczelni
Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
UP w Lublinie

Lublin, 12.02.2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pana lek. wet. Tomasza Jasińskiego

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

Podstawą formalną recenzji jest uchwała Rady Dyscypliny Weterynaria, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie z dnia 14 grudnia 2022 roku.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierownictwem naukowym Pani dr hab. Małgorzaty Domino, przy udziale promotora pomocniczego Pana dr hab. Bartosza Pawlińskiego, z Katedry Chorób Dużych Zwierząt i Kliniki Instytutu Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Badania oraz wyniki, które zostały zaprezentowane w ocenianej dysertacji doktorskiej, zostały sfinansowane ze środków przyznanych w ramach grantu zatytułowanego „Ocena procesu włóknienia błony śluzowej macicy kłaczy w przebiegu endometrosis na poziomie genowym”, NCN, DEC.2018/02/X/NZ4/00101, realizowanego pod kierownictwem Pani dr hab. Małgorzaty Domino.

Rozprawa doktorska lek. wet. Tomasza Jasińskiego została przygotowana bardzo starannie i liczy łącznie 143 ponumerowanych stron wydruku komputerowego. Składa się z 9 głównych rozdziałów zatytułowanych: Wykaz artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, Wykaz skrótów, Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki i dyskusja, Wnioski, Piśmiennictwo i Załączniki. W skład w/w rozdziałów głównych wchodzi liczne podrozdziały. Dysertację doktorską rozpoczyna Oświadczenie Autora pracy, zaś kończy Jego zgoda na udostępnienie swojej pracy w czytelni Biblioteki SGGW.

Pracę doktorską Pana lek wet T. Jasińskiego stanowią, według załączonej dokumentacji, cztery wskazane przez Doktoranta, monotematyczne, oryginalne publikacje. Podejmowana w nich problematyka badawcza dotyczy prześledzenia wybranych biomarkerów reakcji zapalnej w przebiegu zapalenia błony śluzowej macicy oraz jej zwyrodnienia u kłaczy. Prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych indeksowanych przez *Journal Citation Report (JCR)* o *Impact*



Factor (IF) od 1,858 do 6,208. Łączna suma punktów MNiSzW wszystkich przedstawionych prac wynosi: 480, a sumaryczny IF – 14,037. Prace zostały opublikowane w latach 2020-2022, na łamach takich czasopism jak: *Theriogenology*, *Animals*, *Reproduction in Domestic Animals* oraz *International Journal of Molecular Sciences*. Wszystkie prace są opracowaniami zbiorowymi, co świadczy o umiejętności pracy Autora w zespołach badawczych. W 3 publikacjach Doktorant jest pierwszym autorem, a w jednej - drugim.

Warto w tym miejscu podkreślić, iż publikacje wchodzące w skład dysertacji doktorskiej zostały już pozytywnie ocenione przez co najmniej ośmiu niezależnych, bardzo wymagających specjalistów z zakresu fizjologii, endokrynologii, biologii, medycyny molekularnej oraz patologii rozrodu oraz przez cztery kolegia redakcyjne prestiżowych, wysoko indeksowanych czasopism naukowych (praca numer 4 została opublikowana na łamach czasopisma o IF 6,208).

Problem naukowy, jego sformułowanie i aktualność podjętego zagadnienia naukowego

Stany zapalne macicy, obejmujące jej błonę śluzową (*endometritis*) jak i rzadziej mięśniówkę (*myometritis*) zaliczane są do najczęściej występujących chorób układu rozrodczego u kłaczy, niezależnie od ich wieku. *Endometritis* rozwija się zazwyczaj na skutek zaburzeń prawidłowego funkcjonowania lokalnych mechanizmów obronnych macicy, których zadaniem jest eliminowanie ze światła macicy m.in. bakterii, składników nasienia jak i czynników prozapalnych. Z danych piśmiennictwa wiadomo, że macica kłaczy „dysponuje” nieswoistymi jak i swoistymi mechanizmami obronnymi, chroniącymi ją przed zakażeniem. Do nieswoistych mechanizmów obronnych zaliczyć można ochronne działanie śluzu wraz z zawartym w nim lizozymem, fagocytozę czy też czynniki działające opsonizująco. Natomiast własny układ immunologiczny stanowią skupiska grudek limfatycznych, w których syntetyzowane są i wydzielane na powierzchnię śluzówki przeciwciała należące do immunoglobulin klasy A.

Pomimo ogromnego postępu w dziedzinie medycyny weterynaryjnej i laboratoryjnej diagnostyki schorzeń układu rozrodczego, stany zapalne macicy u kłaczy nie są w dalszym ciągu diagnozowane prawidłowo. Sprawia to, że chore zwierzęta są często mylnie uznawane za zdrowe i nie zostają poddawane leczeniu w odpowiednim czasie. Objawy kliniczne u kłaczy chorej na *endometritis* są znacznie słabiej wyrażone w porównaniu do objawów widocznych i diagnozowanych u innych samic zwierząt towarzyszących i gospodarskich. U kłaczy bowiem, rzadziej dochodzi do gromadzenia się tak dużej ilości płynu w świetle macicy, jak to jest obecne u psów, kotów i krów. Wynika to z faktu słabszej, w porównaniu do innych samic, zdolności sekrecyjnej gruczołów zlokalizowanych w błonie śluzowej macicy u kłaczy.

Brak podjęcia szybkiej i skutecznej terapii *endometritis*, przyczynia się do zaburzeń płodności kłaczy, czego konsekwencją mogą być problemy związane z ich zażrebiem. Trudności wynikające z zażrebiem kłaczy to istotne zmartwienie każdego hodowcy wiążące się z dużymi stratami



Inną przyczyną poważnych strat finansowych w branży hodowli koni jest endometroza (*endometrosi*), która charakteryzuje się obecnością nieodwracalnych zmian zwyrodnieniowych w obrębie błony śluzowej macicy klaczy. Powyższe straty hodowlane wynikają z faktu, iż *endometrosi* jest jedną z głównych przyczyn występowania u ciężarnych klaczy wczesnej zamieralności zarodków (WZZ). Do powszechnej literatury termin endometroza został po raz pierwszy wprowadzony dopiero pod koniec XX wieku. Już wówczas, określenie to mówiło wyraźnie o zwyrodnieniu błony śluzowej macicy klaczy, które dawniej opisywane było jako przewlekłe uszkodzające *endometritis (chronic degenerative endometritis)*. Jak dotąd, etiopatogeneza endometrozy nie została do końca wyjaśniona.

Sprawny układ immunologiczny oraz optymalna odpowiedź organizmu na bodziec inicjujący proces zapalny są jednym z czynników zapewniających prawidłową homeostazę organizmu i tym samym prawidłowe funkcjonowanie układu rozrodczego klaczy. W przebiegu procesów zapalnych w obrębie macicy i jajników u wszystkich samic, w tym również u klaczy dochodzi do aktywacji ogólnosystemowych i miejscowych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej, czego konsekwencją są m.in. zmiany stężeń biomarkerów reakcji zapalnej. Ponadto, w błonie śluzowej macicy klaczy, zarówno naciek zapalny jak i produkcja cytokin są modulowane przez różne mechanizmy regulacji komórkowej i genowej. Jednym z takich mechanizmów jest szlak zależny od NF- κ B. Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF- κ B, może być aktywowany na drodze klasycznej (kanonicznej), alternatywnej (niekanonicznej) i atypowej. Zarówno kanoniczna, jak i niekanoniczna droga aktywacji NF- κ B jest regulowana przez układ ujemnych i dodatnich sprzężeń zwrotnych.

Mając na uwadze fakt, iż w przebiegu procesów zapalnych w obrębie błony śluzowej macicy szlak NF- κ B pełni znaczącą rolę w procesach odpornościowych i zapalnych podjęte przez Doktoranta próby jego prześledzenia w patogenezie zapalenia błony śluzowej macicy i endometrozy, są wysoce interesujące, nowatorskie i poznawcze. Każda bowiem kolejna/dodatkowa analiza markerów reakcji zapalnej w przebiegu *endometritis* i *endometrosi* u klaczy, przysłuży się do poznania przyczyny ich występowania. Posiadany przez Doktoranta warsztat badawczy jak i Jego duża wiedza z tego zakresu, pozwoliła na wysunięcie czterech hipotez, takich jak: a) zależna od szlaku kanonicznego i niekanonicznego NF- κ B regulacja transkrypcji MCP-1, IL-6 i HAS 1-3 aktywuje procesy zapalne w błonie śluzowej macicy klaczy; b) 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; c) 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; d) 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. Doktorant podejmuje cele badawcze, które miały wykazać, czy transkrypcja RelA, NF- κ B1, NF- κ B2, MCP-1, IL-6 i HAS 1-3 zmienia się w błonie śluzowej macicy kłaczy: 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 oraz zależnie od transkrypcji ESR1, ESR2 i PGR oraz 4) czy transkrypcja ESR1, ESR2 i PGR w błonie śluzowej macicy kłaczy z endometrozą zmienia się w zależności od stopnia zaawansowania i typu histologicznego endometrozy.

Informacje stanowiące aktualną wiedzę dotyczącą powyższej problematyki badawczej, Doktorant w sposób czytelny, przejrzysty, usystematyzowany i logiczny przedstawia we wstępie swojej pracy doktorskiej. Bardzo płynnie wprowadza Recenzenta w podejmowany przez siebie temat, rozpoczynając naukową część rozprawy pod tytułem „Zastosowanie biomarkerów w ocenie zapalenia błony śluzowej macicy i endometrozy”. Należy podkreślić, iż w całym rozdziale „Wstęp”, który liczy łącznie 11 stron wydruku komputerowego, Autor cytuje 122 pozycje literaturowe. W większości przypadków są to publikacje pochodzące z ostatnich 10 lat, publikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu zagranicznym. Z takiego doboru piśmiennictwa wynika, że Autor bardzo dobrze opanował warsztat badawczy, co sprawia iż tę część dysertacji oceniam bardzo wysoko. Uważam również, że łącznie z rozdziałem „Hipotezy badawcze” i „Cel pracy” w sposób jednoznaczny wskazują na potrzebę podjęcia badań, które są prezentowane przez Doktoranta w ocenianej dysertacji doktorskiej.

Zaplanowane badania zostały w pełni zrealizowane przy użyciu adekwatnych do tego celu metod badawczych opisanych w rozdziale „Materiał i metody”. W sposób jasny i czytelny Doktorant przedstawia założenia dotyczące zakresu swoich badań. Analiza laboratoryjna została przeprowadzona na materiale biologicznym, którym były wycinki błony śluzowej macicy i jajniki oraz próbki krwi pobrane poubojowo. Materiał został pobrany łącznie od 220 kłaczy, będących w wieku od 3 do 25 lat, ras gorącokrwistych, w sezonie rozrodczym (od kwietnia do września). Pomimo, iż pobranie materiału nie podlegało przepisom o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych i dydaktycznych (ustawa krajowa: Dz. U. 2015 poz. 266 oraz dyrektywa UE: 2010-63-UE) i zgodnie z decyzją II Lokalnej Komisji Etyki ds. Doświadczeń na Zwierzętach SGGW w Warszawie z dnia 27 października 2021 r., badania te nie wymagały zgody Komisji Etycznej. Warto w tym miejscu wyraźnie zaznaczyć, iż zebranie materiału od tak dużej populacji zwierząt wymagało sporego zaangażowania i poświęcenia Doktoranta w badania własne.

Zaproponowany podział zwierząt na dwie grupy badawcze jest prawidłowy. Stanowią je kłacze, u których stwierdzono zapalenie błony śluzowej macicy bez endometrozy (n=120) oraz kłacze, u których stwierdzono endometroze, bez zapalenia błony śluzowej macicy (n=100). Praca jest rozbudowana metodycznie. Autor opisuje w sposób bardzo szczegółowy wykorzystane przez siebie w przebiegu doświadczenia metody. W dużej części przypadków, są to metody szczegółowo opisane



w publikacjach swojego autorstwa (Jasiński i wsp., 2022a, Jasiński i wsp., 2021, Jasiński i wsp., 2022b, Domino i wsp., 2020). Świadczy to o bardzo dobrze przygotowanym warsztacie doświadczalnym jak i naukowym Doktoranta, godnym do naśladowania. Wyniki badań własnych zostały poddane analizie statystycznej, przy użyciu oprogramowania GraphPad Prism6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Wykorzystane analizy są adekwatne do zamierzonego celu, stosuje się je powszechnie w tego typu badaniach i nie budzą one merytorycznych zastrzeżeń.

Kolejnym rozdziałem w ocenianej rozprawie doktorskiej jest rozdział „Wyniki i dyskusja”. Liczy on łącznie 22 strony wydruku komputerowego i składa się z pięciu podrozdziałów. Jest to działanie celowe i w pełni czytelne Doktoranta. W każdym podrozdziale Autor zamieszcza wyniki badań własnych w postaci rycin, osobno je omawia w zależności od danej grupy badawczej i oznaczanych parametrów, doskonale przy tym polemizując z innymi autorami zajmującymi się podobną problematyką badawczą. Polemika oraz uwagi własne Autora przedstawione w tej części dysertacji nadały dodatkowego waloru naukowego i tak wysoko ocenianej przeze mnie pracy doktorskiej. Rozdział ten kończy Podsumowanie, w którym Autor w sposób treściwy, rzeczowy oraz konstruktywny uwypuklił najistotniejsze aspekty wyników badań własnych. Reasumując, uważam, że rozdział „Wyniki i dyskusja” stanowi bardzo dobre podsumowanie wyników badań własnych wszystkich czterech publikacji, układa się w logiczną i konsekwentną całość, dokumentuje poprawność hipotez badawczych, jak i trafność wyboru metodyki.

Wnioski wynikające z prac mają niebagatelne znaczenie dla postępu nauki w zakresie rozrodu zwierząt, zwłaszcza jeśli chodzi o laboratoryjną diagnostykę stanów zapalnych macicy i endometrozy u kłaczy.

Krótkie, zwięzłe streszczenia w j. polskim i angielskim stanowią dopełnienia w całości tej bardzo wartościowej i interesującej pracy doktorskiej.

Część krytyczna rozprawy:

- 1) na stronie 17, w rozdziale Wstęp, Doktorant pisze: „Błona śluzowa ogranicza presję środowiska zewnętrznego, która u kłaczy jest większa w fazie pęcherzykowej (FLP, follicular phase) niż w fazie środkowej lutealnej (MLP, mid-luteal phase) cyklu jajnikowego. Ponadto presja środowiska zewnętrznego rośnie po inseminacji/kryciu, podczas i po porodzie, a nawet podczas wykonywania procedur diagnostycznych”. Bardzo proszę o doprecyzowanie terminu „presja środowiska zewnętrznego”;
- 2) strona 33, rozdział 5, brakuje informacji jak długo przechowywany był materiał badawczy w temperaturze +4°C od pobrania do analizy;
- 3) rozdział 8 - Piśmiennictwo. W rozdziale tym zauważyłem kilka drobnych uchybień: a) w niektórych pozycjach piśmiennictwa brak ich chronologicznego układu związanego z rokiem opublikowania; b) Doktorant, powołując się na publikację autorstwa Szóstek i wsp., (na stronie 17), podaje rok publikacji 2011, a powinno być 2013; c) w tekście pracy, brak pozycji publikacji Amara



i wsp., 2020, na którą Doktorant powołuje się na stronie 18 dysertacji (myślę, że Autor miał na myśli pracę Amaral i wsp., Front. Vet. Sci, 2020); d) brak w pracy pozycji autorstwa Moore i wsp., 2003, którą Doktorant zamieścił w rozdziale Piśmiennictwo (poz. 69); e) brak jest pełnych danych literaturowych pozycji 63 i 103 piśmiennictwa;

4) drobne literówki, które w ocenie ogólnej pracy nie mają większego znaczenia.

Zauważone powyższe uwagi nie umniejszają wysokiej i pozytywnej oceny przedstawionej mi do recenzji pracy.

Wniosek końcowy

Podsumowanie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej pt. „Rola szlaku NF- κ B zależnego w patogenezie wybranych chorób błony śluzowej macicy klaczy” autorstwa Pana lek. wet. Tomasz Jasińskiego pod kierownictwem naukowym Pani dr hab. Małgorzaty Domino, przy udziale promotora pomocniczego Pana dr hab. Bartosza Pawlińskiego, z Katedry Chorób Dużych Zwierząt i Kliniki Instytutu Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie jest wysoce pozytywne. Przedłożona praca jest bardzo wartościowa ze względu na podjęty przez Doktoranta temat badawczy dotyczący szlaku kanonicznego i niekanonicznego aktywacji NF- κ B w przebiegu stanów zapalnych błony śluzowej macicy klaczy jak i endometrozy. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż podjęte przez Doktoranta badania zostały już wysoko docenione w świecie nauki. Potwierdzeniem tego faktu są przytaczane powyżej 4 artykuły, wchodzące w skład ocenianej rozprawy doktorskiej, które zostały opublikowane na łamach czasopism o wysokim współczynniku IF. Dodatkowo, na dzień pisania recenzji (12.02.2023) prace te doczekały się już 7 cytowań przez innych badaczy (bez autocytowań, wg bazy Web of Science Core Collection). Mając na uwadze wzrostowe tendencje cytowań oraz podjętą tematykę badań, można przypuszczać, iż w niedługim okresie czasu prace te zostaną jeszcze bardziej docenione zarówno na polu krajowym, jak i zagranicznym.

Przedstawione moje krytyczne śladowe uwagi mają charakter całkowicie dyskusyjny. Nie obniżają one merytorycznej wartości pracy jako całości. Uważam, że rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w Art. 186 ust. 1 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2022 poz. 574) i stanowi podstawę do nadania stopnia naukowego doktora. Przedkładam zatem wniosek Radzie Dyscypliny Weterynaria, Instytutu Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie o przyjęcie pracy i dopuszczenie lekarza weterynarii Tomasz Jasińskiego do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim.


dr hab. Roman Dąbrowski, prof. uczelni