Prof. zw. dr hab. Tadeusz Kuder
Zakład Anatomii
Instytut Nauk Medycznych
Collegium Medicum
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

Kielce, 18-01-2023

**O C E N A**

**rozprawy doktorskiej lek. wet. Bartosza Micińskiego, pt.: „Wpływ stanu zapalnego macicy wywołanego inokulacją bakterii E. coli na kodowanie chemiczne wyznakowanych neuronów macicznych zwoju przyszyjkowego u świni domowej", wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Jarosława Całki i dr hab. Michała Bulca, prof. UWM**

**Podstawa formalna:**

Zgodnie z Uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dn. 02.12. 2022 r. zostałem powołany na recenzenta w/w rozprawy doktorskiej.

**Ogólna charakterystyka rozprawy:**

Tekst rozprawy doktorskiej powstał na bazie dwóch prac oryginalnych, opublikowanych w specjalistycznych czasopismach z tzw. „Listy Filadelfijskiej" o sumarycznym współczynniku oddziaływania, IF = 6.023 i 240 punktach MEiN.

1. **Miciński B., Jana B., Całka J.:** Endometritis decreases the population of uterine neurons in the paracervical ganglion and changes the expression of sympathetic neurotransmitters in sexually mature gilts. BMC Vet. Res. 2022 Sept 10; 18(1):342. Doi:10.1186/s12917-022-03406-1. (**IF=2.792**).
2. **Miciński B., Jana B., Całka J.:** Uterine Inflamation Changes the Expression of Cholinergic Neurotransmitters and Decreases the Population of AChE-Positive, Uterus-Innervating Neurons in the Paracervical Gannglion of Sexually Mature Gilts. Animals (Basel). 2022 Jun 29;12(13): 1676. Doi: 10.3390/ani12131676. (**IF=3.231**).

Jak wynika z zamieszczonych oświadczeń autorów udział Doktoranta (pierwszego autora) w obydwu pracach wynosił po 60% i polegał na opracowaniu koncepcji badań, i ich przeprowadzeniu, analizie wyników, wnioskowaniu, przygotowaniu i tłumaczeniu manuskryptów oraz korekcie tekstów w odpowiedzi na recenzje.

Rozprawa doktorska, przygotowana na podstawie w/w publikacji liczy 58 stron tekstu i 32 strony załączników (kserokopie publikacji i oświadczenia autorów).

Zaczyna się spisem treści oraz wykazem publikacji stanowiących rozprawę (2 str). Kolejnymi rozdziałami są streszczenia w języku polskim i angielskim (5 str.), wykaz skrótów stosowanych w tekście (2 str.), wstęp (4 str.), cel pracy (1 str). Następne 8 stron autor przeznaczył na opisanie materiałów i metod. Uzyskane wyniki badań prezentowane są n 15 stronach, dyskusja na 8 stronach; wnioski zajmują 2 str. a piśmiennictwo 9 str.

**Szczegółowa charakterystyka rozprawy**

W moim przekonaniu doktorant podjął się opracowania bardzo ważnego problemu zmian w strukturach układu nerwowego, zaopatrujących macicę, na skutek idukowanej endometriozy, czyli zapalenia macicy. Jest to jeden z najczęstszych stanów patologicznych macicy zarówno u zwierząt gospodarskich, jak i u kobiet. W świecie zwierząt gospodarskich przyczynia się do obniżenia wskaźników rozrodczych i wzrostu kosztów hodowlanych. U kobiet może być przyczyną niepłodności.

Długotrwały proces zapalny w układzie rozrodczym powoduje zaburzenia w układzie hormonalnym, między innymi spadek poziomu estradiolu. To z kolei powoduje zmiany w układzie nerwowym, zwłaszcza w zwojach przyszyjkowych (*paracervical ganglion*), które są głównym źródłem zaopatrzenia autonomicznego macicy. Dlatego poznanie mechanizmów patogenezy endometriozy, w tym wpływu czynników wywołujących stan zapalny macicy jest niezwykle istotne nie tylko dla nauk weterynaryjnych ale również dla nauk medycznych, bowiem wyniki niniejszej pracy doktorskiej poza wartościami poznawczymi mają znaczenie praktyczne i mogą być wykorzystywane nie tylko przez morfologów ale i przez klinicystów.

Wyszczególnione cztery szczegółowe cele badawcze, które postawił doktorant są jasno sprecyzowane i gwarantują wyjaśnienie generalnego problemu, czyli zmian kodowania wyznakowanych neuronów macicznych zwoju przyszyjkowego świni domowej po zakażeniu macicy bakteriami *Eschericia coli*. Moim zdaniem taki sposób indukcji stanu zapalnego macicy był właściwy, gdyż głównym źródłem endometriozy są właśnie zakażenia bateryjne.

Badania eksperymentalne przeprowadzono na dwóch grupach badawczych i grupie kontrolnej (wyodrębnionych losowo). Pierwszej grupie eksperymentalnej podawano domacicznie zawiesinę bakterii *E.coli* (n=4), drugiej eksperymentalnej podawano domacicznie płyn fizjologiczny – 0,9% NaCl (N=3); w grupie kontrolnej (n=4) przeprowadzono tylko „ślepą operację" laparoskopii. 28 dni wcześniej, wszystkim zwierzętom podano w zabiegu laparoskopowym do prawego i lewego rogu macicy znacznik neuronalny transportu wstecznego -FB, w celu wykazania źródeł unerwienia tego narządu. W ósmym dniu po podaniu zawiesiny bakterii od wszystkich zwierząt pobierano szyjki macicy wraz ze zwojami

przyszyjkowymi. W celu analizy neuronów przyszyjkowych stosowano metodę podwójnych barwień immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem przeciwciał pierwotnych przeciwko wybranym substancjom biologicznie czynnym oraz histochemiczna metodę Karnovsky'ego-Rootsa, w celu wykazania aktywności acetylocholinesterazy. Ponadto badano także histopatologicznie macice zwierzą w celu potwierdzenia stanu zapalnego tego narządu. Wyniki badań opracowano statystycznie programem Statistica 13, uwzględniając poziom istotności $p<0,05$. Na przeprowadzone badania doktorant miał zgodę Komisji Etycznej w Olsztynie (Uchwała LKE 65/2015).

Uwzględniając powyższe informacje należy stwierdzić, że były to nowoczesne i adekwatne metody do tego typu badań, pozwalające na realizację założonych celów badawczych i jednocześnie gwarantujące wiarygodność wyników. Chciałby także nadmienić, że Katedra Fizjologii Klinicznej i Katedra Anatomii Zwierząt UWM w Olsztynie specjalizują się w badaniach eksperymentalnych nad autonomicznym układem nerwowym i mają w tej kwestii bardzo duże doświadczenie i osiągnięcia.

Uzyskane wyniki są pierwszym opisem zmienności fenotypowej neuronów współczulnych i przywspółczulnych zwoju przyszyjkowego macicy świni, po indukowanej bakteryjnie endometriozie. Wykazały one wzrost populacji neuronów współczulnych o fenotypach: DβH+/VIP+; DβH-/VIP+; DβH+/SOM+; DβH-/SOM+; DβH+/NPY+ oraz DβH+/nNOS+ i DβH-/nNOS+. Jednocześnie obserwowano spadek populacji neuronów o wzorach kodowania: DβH+/VIP-; DβH-/VIP-; DβH-/SOM-; DβH-/NPY+; DβH-/NPY-oraz DβH+/nNOS- i DβH-/nNOS-.

Z kolei w komórkach przywspółczulnych zwoju przyszyjkowego obserwowano wzrost populacji neuronów o fenotypach: VAChT+/VIP+; VAChT+/VIP-; VAChT-/VIP+; VAChT+/SOM+; VAChT+/SOM-; VAChT-/SOM+ oraz VAChT+/nNOS- i VAChT-/nNOS-. Obserwowano również zmniejszenie populacji neuronów VAChT-/VIP-; VAChT-/SOM-; VAChT+/nNOS+ oraz VAChT-/nNOS- . Zaobserwowano także syntezę *de novo* GAL(aniny) i wzrost populacji neuronów o fenotypach: VAChT+/GAL+; VAChT+/GAL-; VAChT-/GAL+ oraz zmniejszenie ilości neuronów VAChT-/GAL-. Opisane zmiany populacji neuronów występowały wyłącznie w grupie zwierząt eksperymentalnych z iniekcją bakterii *Escherichia coli*.

Neurony zaopatrujące macicę świni zlokalizowane były w doogonowej części zwoju przyszyjkowego, z przewagą ilościową w zwoju prawym.

Doktorant analizując wyniki swoich badań w rozdziale Dyskusja, wskazuje, że reakcja układu nerwowego w postaci zmian ilościowych i jakościowych neuronów zwojów

przyszyjkowych macicy wskazuje na istotne właściwości neuroprotekcyjne i przeciwzapalne poszczególnych neurotransmiterów. Np. NPY i SOM mogą pełnić rolę wspomagającą w procesie usuwania wysięku w zmienionej zapalnie macicy. Sugeruje także możliwość praktycznego wykorzystania tych wyników do opracowania profilaktyki i leczenia stanów zapalnych układu rozrodczego. Interpretując zmniejszenie ekspresji AChE autor wyjaśnia tozmianą poziomu progesteronu i estradiolu w przebiegu zapalenia macicy. W konkluzji doktorant stwierdza, że obserwowane zmiany profilu chemicznego badanych neuronów zwoju macicznego świadczą o istotnej roli neurotransmiterów w adaptacji lokalnego układu nerwowego w przebiegu zapalenia macicy.

Reasumując należy stwierdzić, że recenzowana rozprawa doktorska została bardzo dobrze zaplanowana i zrealizowana. Zastosowane zostały adekwatne i nowoczesne metody badawcze. Uzyskane wyniki autor przedyskutował z odpowiednio dobranym piśmiennictwem (89 pozycji, w tym 2 doktoranta). Jak już zaznaczyłem na początku oceny, uzyskane wyniki mają nie tylko wartość poznawczą ale także praktyczną dla nauk weterynaryjnych, a pośrednio również dla nauk medycznych.

Przygotowując opracowanie zbiorcze doktorant nie ustrzegł się pewnych błędów, które z obowiązku recenzenta muszę przedstawić. Uważam, że w tytule rozprawy należało napisać w pełnym brzmieniu nazwę bakterii *Escherichia coli*. Ponadto, zgodnie z panującymi zasadami powinna ona być pisana kursywą. W moim przekonaniu określenie „adrenergiczne neurony" w świetle obecnego stanu wiedzy na temat układu autonomicznego, jak i wyników niniejszych badań, świadczących o ewidentnej kolokalizacji różnych neurotransmiterów jest nieprecyzyjne. Zatem bardziej adekwatnym określeniem byłoby „neurony współczulne, immunoreaktywne wobec DβH", bowiem noradrenalina jest jednym z kotransmiterów.

Te drobne uwagi krytyczne nie wpływają na moją wysoką całościową ocenę pracy doktorskiej lek. wet, Bartosza Micińskiego, która spełnia wszystkie wymagania określone w art. 13, ustęp 1, Ustawy z dnia 14 marca 2003roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2016r. poz. 882 ze zm.), stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z wnioskiem o dopuszczenie lek. wet. Bartosza Micińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie mając na uwadze wartość merytoryczną artykułów, składających się na pracę doktorską, jak i nowoczesność, oryginalność oraz potencjalne znaczenie praktyczne ocenianej rozprawy doktorskiej wnioskuję o wyróżnienie jej autora stosowną nagrodą.