Olsztyn, 21.11.2022 r.

Prof. dr hab. Jarosław Całka
Katedra Fizjologii Klinicznej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
UWM w Olsztynie

Opinia o pracy 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"

Pracę doktorską lek. wet. Bartosza Micińskiego stanowi cykl dwóch artykułów oryginalnych opublikowanych w czasopismach *BMC Veterinary Research* o aktualnym IF wynoszącym 3,231 i liczbie punktów MEiN równej 140 oraz *Animals* o aktualnym IF wynoszącym 2,792 i liczbie punktów MEiN równej 100:

- **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 Sep 10;18(1):342. doi: 10.1186/s12917-022-03406-1. (IF 2.792)
- **Miciński B**.; Jana B.; Całka J. Uterine Inflammation Changes the Expression of Cholinergic Neurotransmitters and Decreases the Population of AChE-Positive, Uterus-Innervating Neurons in the Paracervical Ganglion of Sexually Mature Gilts. Animals (Basel). 2022 Jun 29;12(13):1676. doi: 10.3390/ani12131676. (IF 3.231)

Lek. wet. Bartosz Miciński odegrał pierwszoplanową rolę w opracowaniu koncepcji badań i ich przeprowadzeniu, jak również analizie, interpretacji wyników i wnioskowaniu. Doktorant samodzielnie przygotował oba manuskrypty w języku angielskim i po uwzględnieniu uwag współautorów przedłożył do oceny w czasopismach, a następnie dokonał korekty w odpowiedzi na recenzje. Udział lek. wet. Bartosza Micińskiego w obu pracach wynosi 60%.

Głównym celem badań doktoranta było poznanie wpływu stanu zapalnego macicy na ekspresję neurotransmiterów w neuronach unerwiających macicę zwoju przyszyjkowego (PCG) wyznakowanych wstecznym markerem u dojrzałych płciowo loch. Szczegółowe cele

pracy skupiały się na określeniu sposobu rozmieszczenia neuronów macicznych na obszarze zwoju oraz różnic w ich ilości i lokalizacji, zarówno w zwoju prawym, jak i lewym, określeniu zmienności ilościowej we wstecznie wyznakowanych neuronach w PCG po obu stronach szyjki macicy w odpowiedzi na zapalenie, jak również określeniu wzoru kodowania chemicznego neuronów współczulnych i przywspółczulnych we wstecznie wyznakowanych neuronach PCG oraz zmienności fenotypu tych neuronów w odpowiedzi na wywołany stan patologiczny. Dodatkowo, badania miały na celu określenie ilości neuronów macicznych zwoju przyszyjkowego dodatnich dla acetylocholinoesterazy i ich zmienności w odpowiedzi na ten sam stan zapalny.

Materiał badawczy stanowiło 11 dojrzałych płciowo loch podzielonych na 3 grupy – jedną eksperymentalną i dwie kontrolne. W dniu 0 doświadczenia wszystkim zwierzętom podano znacznik neuronalny Fast Blue do prawego i lewego rogu macicy. Dwadzieścia osiem dni po iniekcji znacznika u zwierząt z pierwszej grupy kontrolnej wykonano ponowną laparotomię, lochom z drugiej grupy kontrolnej do rogów macicy podano płyn fizjologiczny, natomiast lochy z grupy E. coli otrzymały domaciczną iniekcję zawiesiny bakteryjnej. Po upływie 8 dni od operacji wszystkie zwierzęta zostały poddane eutanazji, a tkanki pobrane i utrwalone.

W PCG grupy zwierząt otrzymujących iniekcję *E. coli* prowadzący badania lek. wet. Bartosz Miciński odnotował zmniejszenie całkowitej ilości neuronów FB-pozytywnych w stosunku do grupy kontrolnej i grupy z iniekcją płynu fizjologicznego. Stosując metodę podwójnych barwień immunofluorescencyjnych z wykorzystaniem przeciwciał pierwotnych przeciwko wybranym substancjom biologicznie czynnym doktorant ustalił zmienność fenotypową neuronów PCG o charakterze współczulnym i przywspółczulnym. Wykorzystując β–hydroksylazę dopaminy (DβH) jako znacznik neuronów współczulnych wykazał wzrost populacji komórek o fenotypie DβH+/VIP+, DβH+/NPY+, DβH+/SOM+, DβH+/nNOS+ oraz spadek w populacji neuronów wykazujących ekspresję jedynie DβH, jak również komórek nerwowych nieadrenergicznych, VIP-, SOM- i nNOS-dodatnich. Dzięki zastosowaniu przeciwciał skierowanych przeciwko pęcherzykowemu transporterowi acetylocholiny (VAChT) w celu wyznakowania populacji neuronów przywspółczulnych doktorant zaobserwował wzrost populacji neuronów macicznych PCG wykazujących ekspresję VAChT+/VIP+, VAChT+/VIP-, VAChT+/SOM+, VAChT+/SOM- VAChT+/GAL- oraz VAChT+/nNOS-, jak również wzrost populacji niecholinergicznych neuronów VIP-, SOM- oraz nNOS-pozytywnych. W wyniku opisywanego w pracy stanu zapalnego macicy populacja cholinergicznych neuronów immunoreaktywnych wobec nNOS w badanym zwoju uległa

zmniejszeniu. Badania przeprowadzone przez doktoranta po raz pierwszy wykazały pojawienie się populacji zarówno cholinergicznej, jak i niecholinergicznej syntetyzującej GAL w grupie zwierząt otrzymujących zawiesinę *E. coli*. Dodatkowo, dzięki zastosowaniu histochemicznej metody Karnovsky'ego–Rootsa w celu wykazania aktywności acetylocholinoesterazy doktorant wykazał obecność tego enzymu w komórkach nerwowych zwoju przyszyjkowego unerwiających macicę oraz opisał zmienność w odpowiedzi na wywołany stan patologiczny.

W mojej opinii praca doktorska lek. wet. Bartosza Micińskiego jest odpowiednio przygotowana. Opiera się na prawidłowo zaplanowanych i poprawnie przeprowadzonych doświadczeniach, a uzyskane wyniki istotnie rozszerzają aktualny stan wiedzy na temat wpływu zapalenia macicy na odpowiedź autonomicznego układu nerwowego u świń. Należy podkreślić, że praca jest w pełni oryginalna i nie narusza praw osób trzecich.

prof. dr hab. Jarosław Całka