



Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie • Wydział Bioinżynierii Zwierząt
Katedra Genetyki Zwierząt

University of Warmia and Mazury • Faculty of Animal Bioengineering
Department of Animal Genetics

ul. M. Oczapowskiego 5 • 10-719 Olsztyn, Poland • tel./fax (48 89) 523 49 77 • e-mail: pawbrym@uwm.edu.pl •



Olsztyn, 27. 12. 2024 r.

dr hab. Paweł Brym

Katedra Genetyki Zwierząt

Wydział Bioinżynierii Zwierząt

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

mgr inż. Anny Wójtowicz

pt. „The effect of Th1 and Th2 cell subsets and their mediators on the processes associated with the development of fibrosis in the progression of endometriosis in the mare”

Recenzja została przygotowana na wniosek Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, przedstawiony w piśmie Pana Dyrektora prof. dr. hab. Mariusza Piskuly czł. koresp. PAN z dnia 29 października 2024 r.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr inż. Anny Wójtowicz pt. „The effect of Th1 and Th2 cell subsets and their mediators on the processes associated with the development of fibrosis in the progression of endometriosis in the mare” została wykonana pod opieką naukową Promotor, Pani dr hab. Anny Szóstek-Mioduchowskiej, w Zespole Immunologii i Patologii Rozrodu, Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN w Olsztynie. Badania zostały zrealizowane w oparciu o projekt SONATA15 2019/35/D/NZ9/02989 finansowany przez Narodowe Centrum Nauki.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska ma formę pracy pisemnej, napisanej w języku angielskim o łącznej długości tekstu obejmującej 305 stron maszynopisu. Pierwsze 172 strony charakteryzują się klasycznym dla tego typu opracowań układem, ze strona tytułową, spisem treści, streszczeniami w językach angielskim i polskim, listą użytych skrótowców oraz następującymi rozdziałami: wstęp z obszernym przeglądem piśmiennictwa, hipotezy badawcze, cele badawcze, materiały i metody, wyniki, dyskusja, podsumowanie wyników, wnioski i bibliografia. Na potrzeby ilustracji treści i prezentacji wyników przygotowano 55 starannie wykonanych, czytelnych, poprawnie opisanych rycin, prezentujących różne typy wykresów wraz z statystyczną istotnością obserwowanych różnic a także schematy, zdjęcia dokumentujące rozdziały elektroforetyczne, barwienia histochemiczne i immunofluorescencyjne oraz wyniki testów funkcjonalnych takich jak test migracji komórkowej, czy test

skurczu żelu kolagenowego. Ryciny te, nie tylko prawidłowo dokumentują uzyskane wyniki i podnoszą wizualną atrakcyjność pracy, ale także ułatwiają czytelnikowi porównywanie różnych danych i zrozumienie złożonych informacji, takich jak np. przebieg zastosowanych procedur badawczych. Piśmiennictwo uwzględnia 254 aktualne i trafnie dobrane tematycznie pozycje oryginalne bądź przeglądowe, stanowiące osiągnięcia autorów zagranicznych i krajowych. Końcowe 132 strony rozprawy stanowią suplement, w którym w 9 tabelach scharakteryzowano parametry opisujące ilość i jakość uzyskanych odczytów oraz skuteczność ich mapowania względem sekwencji referencyjnej (*Equus caballus* 3.0) po sekwencjonowaniu poszczególnych bibliotek NGS, a także zaprezentowano kompletne listy genów o zróżnicowanej ekspresji (DEGs) w fibroblastach po stymulacji wraz z wartościami krotności ekspresji i statystycznej istotności wyników uzyskanych w poszczególnych eksperymentach. Od strony formalnej i językowej oceniana rozprawa doktorska nie budzi zastrzeżeń.

Ocena merytoryczna pracy

Prawidłowy rozród jest podstawowym warunkiem istnienia każdego gatunku zwierząt. W przypadku konia domowego, choroby endometrium są częstą przyczyną niepłodności u klaczy i jednym z głównych aspektów wpływających na opłacalność hodowli. Obejmują one różne formy endometrosis i endometritis, zaburzenia różnicowania tkanki gruczołowej oraz angiozę. Będące przedmiotem dysertacji endometrosis to przewlekłe i degenerujące zapalenie błony śluzowej macicy u klaczy, charakteryzujące się postępującym nagromadzeniem składników macierzy pozakomórkowej i w konsekwencji rozwojem włóknienia, zaburzającego prawidłową strukturę i funkcję endometrium. Pomimo postępów poczynionych w ostatnich latach, etiologia i mechanizmy związane z patogenezą endometrosis są nadal stosunkowo słabo poznane, diagnostyka opiera się o inwazyjne i pracochłonne badania histopatologiczne biopsji endometrium, zaś dostępne metody terapeutyczne są często mało skuteczne. Ponadto obserwowana niska wartość parametru dziedziczalności dla cech związanych z rozrodem i zdrowotnością powoduje nieskuteczność klasycznych metod genetyki cech ilościowych w zakresie poprawy tych cech. Konieczna jest więc intensyfikacja badań podstawowych nad molekularnymi uwarunkowaniami procesów związanych z przebiegiem endometrosis. Nowa wiedza na temat potencjalnych markerów diagnostycznych, zmian w przebiegu różnicowania komórkowego i funkcji wydzielniczych komórek endometrium oraz udziału mechanizmów immunologicznych, pomoże rozszyfrować patogenezę endometrosis i przyczyni się do rozwoju nowych metod leczenia. Przedstawiona do oceny praca doktorska, doskonale wpisuje się w ten nurt, obierając za swój przedmiot analizę subpopulacji limfocytów pomocniczych Th1 i Th2 oraz ich mediatorów na procesy związane z rozwojem włóknienia w przebiegu tego schorzenia. Podjęta przez Doktorantkę tematyka jest w pełni uzasadniona i stanowi logiczną kontynuację i rozszerzenie wcześniejszych prac realizowanych przez Promotora pracy i zespół badawczy w którym praca była realizowana.

Rozdział pierwszy „Introduction”, który pełni rolę wstępu i przeglądu piśmiennictwa, został w mojej opinii zredagowany prawidłowo. W sposób syntetyczny ale jednocześnie wszechstronny i wyczerpujący, Autorka zapoznaje czytelnika z problematyką endometrosis u klaczy i aktualnym stanem

wiedzy na temat etiologii i patogenezy tego schorzenia. Szczegółowy opis znaczenia subpopulacji limfocytów pomocniczych i wydzielanych przez nie cytokin w patogenezie różnych chorób związanych z włóknieniem u ludzi i w mysich modelach tych schorzeń, skutecznie uwidacznia lukę w wiedzy w tym zakresie, u konia domowego w kontekście zapalenia endometrium.

Cele i hipotezy pracy zostały sformułowane poprawnie. Hipotezy weryfikowano realizując 3 zadania badawcze.

Strona metodyczna dysertacji jest z jednej strony imponująco wyrafinowana a z drugiej wybrana adekwatnie do postawionych celów i realizowanych zadań badawczych. Jako materiał badawczy wykorzystano skrawki endometrium klasyfikowane do 4 kategorii (wg Kenneya i Doiga, 1986) odzwierciedlających stopień nasilenia zmian histopatologicznych w błonie śluzowej macicy, które były pobierane od klaczy w środkowej fazie lutealnej i w fazie pęcherzykowej cyklu rujowego. Ponadto jako materiał wykorzystywano limfocyty T, izolowane ze skrawków endometrialnych ww. kategorii oraz fibroblasty wyizolowane z skrawków endometrium kategorii I (bez zmian zapalnych) oraz kategorii IIb (zmiany umiarkowane ale z wyraźną proliferacją gruczołów, znacznym włóknieniem i obecnością cyst), pozyskane od klaczy w fazie pęcherzykowej cyklu, które następnie hodowano in vitro, poddawano stymulacji i odpowiednim analizom w ramach poszczególnych eksperymentów. Dodatkowo, na potrzeby przygotowania pohodowlanych mediów warunkowanych, zawierających sekretomy odpowiednio komórek Th1 i Th2, wykorzystano jako materiał badawczy komórki PBMC z krwi obwodowej klaczy, z których izolowano limfocyty dziewicze Th0, a które następnie poddano procedurom różnicowania in vitro w kierunku subpopulacji Th1 i Th2. Uznanie budzi opanowanie przez Doktorantkę niezwykle bogatej palety metod, począwszy od hodowli fibroblastów i limfocytów w warunkach in vitro, poprzez cytometrię przepływową, oznaczenia stężeń białek metodą ELISA, analizy ekspresji genów na poziomie transkrypcji i translacji z wykorzystaniem qRT-PCR i techniki western-blot, oznaczenia aktywności litycznej metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej techniką zymografii, barwienia histochemiczne i immunoflorescencyjne, komórkowe testy funkcjonalne, aż po bioinformatyczną analizę danych RNA-seq oraz zastosowanie różnych metod statystyki matematycznej. Świadczy to o dużej wiedzy Doktorantki, o Jej znacznych umiejętnościach laboratoryjnych i zdobytych w trakcie realizacji badań doświadczeniu naukowym. Rozdział Materiały i metody jest obszerny i podzielny na liczne podrozdziały poświęcone poszczególnym rodzajom badanych komórek i tkanek, układom eksperymentalnym i zastosowanym metodom. Jego lektura nasunęła mi pewne pytania i uwagi które wymagają dodatkowych wyjaśnień. Proszę Doktorantkę o odpowiedź lub komentarz.

1. Jakiej rasy były konie od których pobierano materiał? Jak przedstawiała się ewentualna struktura spokrewnienia zwierząt od których pozyskiwano materiał badawczy?
2. W podrozdziale Ekstrakcja RNA z tkanek (strony 49-50) podano, że jakość uzyskanych preparatów RNA była badana spektrofotometrycznie. Czy wykonano kontrolę stopnia podegradowania RNA? Powszechnie uważa się że jest to kluczowy parametr wpływający na poprawność późniejszych oznaczeń ekspresji genów techniką qRT-PCR. Ta partia materiału

była wykorzystana w zadaniu badawczym 1 eksperymencie 2 pt „The endometrial expression of IFN- γ , IL-4, IL-13 and their respective receptors in the endometrium of mares with endometrosis”. Czy zdaniem Doktorantki, ewentualna zmienność w jakości preparatów RNA mogłaby mieć wpływ na obserwowane na rycinach 11-13 wartości odchylenia standardowego dla pomiarów ekspresji genów w obrębie poszczególnych grup histopatologicznych, co ostatecznie utrudniło wykazanie statystycznej istotności różnic w poziomach ekspresji pomiędzy porównywanymi grupami?

3. Z kolei w podrozdziale Ekstrakcja RNA z komórek (strony 50-51) podano że jakość preparatów RNA izolowanych z fibroblastów po hodowli in vitro kontrolowano prawidłowo za pomocą parametru RIN (RNA Integrity Number). Moje wątpliwości budzi zdanie “All samples had RIN approximately 10 and were processed further” Jaka wartość liczbową kryje się za słowem approximately? Jakie były rzeczywiste wartości parametrów charakteryzujących jakość i wydajność izolacji RNA w tej grupie próbek (wartość średnia $\pm$ odchylenie standardowe)? W mojej opinii, uniwersalnym rozwiązaniem dla wszystkich dylematów dotyczących ewentualnego wpływu jakości RNA na uzyskane wyniki, byłoby zastosowanie odpowiedniej weryfikacji statystycznej, wskazującej na brak różnic w wartościach średnich RIN pomiędzy porównywanymi grupami.
4. Autorka podaje, że do analizy danych qRT-PCR wykorzystano metodę (Zhao & Fernald, 2005) pozwalającej m.in. szacować wydajność reakcji PCR bez konieczności sporządzania tzw. krzywej standardowej. Ponieważ zasada metody była dla mnie niejasna, zdecydowałem się na zapoznanie się z oryginalną publikacją: wtedy zwróciłem uwagę, że wzory na szacowanie względnej początkowej koncentracji matrycy różnią się pomiędzy pracą przywoływaną jako referencja a tym, co jest zapisane na stronie 53 dysertacji. Powstaje pytanie: jaki algorytm ostatecznie zastosowano? Na podstawie opisu metodyki przedstawionego w pracy nie jestem także w stanie prześledzić zastosowanej metody normalizacji danych. Autorka pisze, że do normalizacji danych qRT-PCR zastosowano dwa geny referencyjne SDHA i HPRT1 powołując się na publikację Szóstek-Mioduchowska et al. 2023, nie jest jednak jasne, jak pomiary dla tych 2 genów referencyjnych, wykorzystano w algorytmie przedstawionym na stronie 53. Czy zastosowano jakąś wartość średnią? Na sam koniec podrozdziału autorka pisze, że do selekcji genów referencyjnych zastosowała analizę stabilności ekspresji w oparciu o algorytm NormFinder. Niestety brak jest danych w metodyce, jakie inne geny oprócz SDHA i HPRT1 były analizowane jako kandydujące do miana genu referencyjnego zaś w rozdziale Wyniki nie przedstawiono żadnych rezultatów z użycia tej procedury.
5. W podrozdziale na stronie 53 dotyczącym przygotowania bibliotek i sekwencjonowania nowej generacji, Autorka pisze, że zostały one wykonane komercyjnie w firmie Macrogen Europe. Fakt ten nie budził moich zastrzeżeń do momentu napotkania zdania: „The libraries were sequenced in a single 50bp run (1x50 bp) on the HiScanSQ system using the TruSeq

SBSv3 Sequencing Kit...”, aby w kolejnym zdaniu przeczytać: „The NGS analysis was performed with the use of NovaSeq 6000 sequencing platform”. System HiScan SQ Illuminy to dość zaawansowana wiekowo, platforma hybrydowa, umożliwiające skanowanie macierzy w technologii BeadArray i sekwencjonowanie raczej krótkich odczytów z zastosowaniem tzw. 4-kolorowej chemii do sekwencjonowania. Platforma Illumina NovaSeq 6000 to drugi biegun technologii NGS jest ultra-wysokoprzepustowa, umożliwia sekwencjonowanie miliardów sekwencji jednocześnie, oferowane jest sekwencjonowanie 2x 150bp paired-end z wykorzystaniem tańszej 2-kolorowej chemii. Platforma ta jest bardzo popularna w komercyjnych centrach genomowych takich jak Macrogen, bo drastycznie ogranicza koszty sekwencjonowania w przeliczeniu na 1 bp, pojedynczy transkryptom lub genom. Powstaje pytanie: na jakiej platformie przeprowadzono sekwencjonowania poszczególnych bibliotek? Drugie ważniejsze pytanie brzmi: czy rzeczywiście prowadzono odczyty pojedyncze w układzie 1x 50bp ? Jeśli tak, to jakimi kryteriami kierowano się podejmując taką decyzję? Dłuższe odczyty 2x 75 bp, 2x 100bp lub 2 x 150 bp mogłyby znacząco poprawić możliwości detekcji alternatywnych transkryptów oraz polimorfizmów SNV w obrębie sekwencji kodujących, które mogłyby uczestniczyć w patogenezie endometrosis.

6. W podrozdziale zatytułowanym Analiza bioinformatyczna danych NGS, Autorka twierdzi używając czasu teraźniejszego, że dane źródłowe RNA-seq uzyskane podczas realizacji pracy są publicznie/otwarcie dostępne bez ograniczeń i zdeponowane w bazie SRA pod podanymi w pracy numerami dostępowymi. Niestety, na dzień 27 grudnia 2024 r nie jest to prawda. Oczywiście w pełni rozumiem potrzebę ograniczenia dostępu do tych cennych danych, aż do momentu ich opublikowania w periodyku naukowym, niemniej wydaje mi się, że rozwiązaniem dla tej sytuacji, byłoby zgłoszenie danych jako BioProject, gdzie publicznie dostępny byłby tylko tytuł, autorzy oraz abstrakt, zaś same dane udostępnione byłby w wybranym przez autorów terminie.
7. Z obowiązku recenzenta muszę także zauważyć kilka drobnych uchybień, które znalazłem w tekście rozdziału Materiały i metody:
 - a. Str. 39, tabela 2: IL4 powinna być umieszczona w tabeli jako stymulator różnicowania w kierunku limfocytów Th2 a nie Th1
 - b. str. 50, brak nazwy producenta odczynnika TRI reagent pomimo odwołania się, że odczynnik użyto zgodnie z protokołem producenta
 - c. str. 51 prawidłowa nazwa systemu użytego do elektroforezy kapilarnej to Agilent 2100 Bioanalyzer
 - d. str. 52 ponieważ Doktorantka wykorzystywała ilościowy PCR w czasie rzeczywistym do badań poziomu transkryptu mRNA po odwrotnej transkrypcji (RT) na cDNA, to poprawne nazewnictwo dla tej techniki brzmi: qRT-PCR lub RT-qPCR. Używany

przez Doktorantkę termin qPCR, raczej powinien być używany kontekście badań ilościowych DNA np. oznaczanie ilości transgenów lub miana wirusa w próbce

- e. str.52 w pracy na potrzeby analizy qRT-PCR używano komercyjnie zaprojektowanych testów, określanych terminem gene expression assays. Taki zestaw zawiera oprócz znakowanej sondy (probes) także parę starterów. Stary znak handlowy TaqMan Probe firmy Applied Biosystems jest już nieużywany a numery katalogowe przedstawione w Tabeli 3, prowadzą do produktów opisanych jako ThermoFisher Assays ID. Sugerowałabym aktualizację tabeli 3 a także zmianę jej nazwy np. The list of probe-primer sets used for qRT-PCR
- f. str. 53 i 54 zgodnie z spisem bibliograficznym (pozycja 123) prawidłowa cytacja dla oprogramowania DESeq2 to Love et al., 2014. Natomiast prawidłowa pozycja referencyjna dla pakietu topGO to Alexa & Rahnenfuehr, 2024 (błąd występuje także na stronie 154 w spisie bibliograficznym)

Przeprowadzone przez Doktorantkę badania i otrzymane wyniki umożliwiły weryfikację postawionych hipotez i jednocześnie znacząco poszerzyły dotychczasową wiedzę na temat wpływu dwóch subpopulacji limfocytów pomocniczych Th: Th1 i Th2 oraz ich mediatorów: IFN- γ , IL-4 i IL-13 na procesy komórkowe i molekularne zachodzące w fibroblastach błony śluzowej macicy kłaczy. Należy podkreślić nowatorski aspekt przeprowadzonych badań. Duża liczba uzyskanych danych nie ma swoich odpowiedników w badaniach przeprowadzonych na innych gatunkach. Doktorantka wykazała, że końskie fibroblasty izolowane z endometrium o różnym nasileniu zmian histopatologicznych po stymulacji IL4, IL13 lub medium pochodzącym zawierającym sekret limfocytów Th2 charakteryzują się znaczącym podobieństwem w globalnym obrazie profili transkryptomycznych oraz w poziomach ekspresji wybranych markerów związanych macierzą międzykomórkową ECM. Potwierdza to hipotezę, że subpopulacja limfocytów Th2, poprzez wydzielane cytokiny IL4 i IL13, wzmacnia proliferację fibroblastów, aktywuje syntezę składników ECM, reguluje ekspresję genów związanych z przebudową tkanek i aktywuje różne szlaki komórkowe prowadzące ostatecznie do rozwoju włóknienia. Nieoczekiwane wyniki uzyskane w kontekście roli limfocytów Th1 i IFN- γ na przebieg procesów związanych z rozwojem włóknienia okazały się mniej konkluzyjne. W doświadczeniach analizujących wpływ medium warunkowanego po hodowli limfocytów Th1 wykazano, że sekret Th1 stymuluje aktywność proliferacyjną i metaboliczną fibroblastów, co znajduje odbicie w zróżnicowanej ekspresji aż 2140 genów zaangażowanych m.in. w cykl komórkowy, metabolizm oraz procesy kluczowe dla odkładania ECM, takie jak interakcja ECM-receptor, trawienie i wchłanianie białek, adhezja ogniskowa, szlaki sygnałowe NF- κ B i JAK-STAT, a także w wiązanie kolagenu. Z kolei interferon γ wpływał na proliferację fibroblastów, ale nie miał wpływu na profil transkryptomiczny i ekspresję genów markerów związanych z ECM w fibroblastach endometrium kłaczy. Uważam, że ta niespójność w efekcie działania limfocytów Th1 i jednej z ich podstawowych cytokin jest bardzo intrygująca i nasuwa mi pewne pytania i uwagi, które wymagają dodatkowych wyjaśnień od Doktorantki.

1. Na stronie 78 rozprawy zamieszczono rycinę 22, obrazującą wyniki analizy składowych głównych czyli PCA, na podstawie której, przyjęto założenie, że IFN- γ nie ma wpływu na profil transkryptomyczny. Nie mam tu żadnej pewności, bo nazwy zbiorów danych na rycinie nie są spójne z opisem zbiorów danych zaprezentowanym w tabeli 4 suplementu, ale zauważyłem pewną stratyfikację w poziomie. Na górze są zbiory z końcówką A17, niżej A28, zaś na dole A21 i A25. Czy są to replikaty? Czy w trakcie analizy w DESeq2 zastosowano korekcję na tzw. batch effect? Jeśli nie, to może warto to zrobić i sprawdzić, czy w rezultacie jakiś wpływ interferonu się jednak ujawni.
2. Do stymulacji fibroblastów używano INF- γ w stężeniu 10ng/ml. Czy są dostępne jakieś dane ile interferonu było w medium Th1-CM? Czy zdaniem Doktorantki ewentualny efekt dawki mógłby być przyczyną różnic w odpowiedzi fibroblastów na Th1-CM i INF- γ ?
3. Interferon używany do stymulacji komórek in vitro był zgodnie z informacją katalogową interferonem końskim ale rekombinowanym i produkowanym przez komórki drożdży. Czy są dostępne dane literaturowe lub bioinformatyczne potwierdzające, że użyty interferon gamma firmy Kingfisher Biotech pod względem chemicznym i funkcjonalnym, to ta sama substancja, którą wydzielają limfocyty Th1 u koni? Czy zdaniem Doktorantki ewentualne modyfikacje potranslacyjne mógłby być przyczyną różnic w odpowiedzi fibroblastów na Th1-CM i INF- γ ?

W mojej ocenie dyskusja przedstawiona jest w sposób przejrzysty i zrozumiały z uwzględnieniem aktualnego piśmiennictwa. Sposób jej przeprowadzenia świadczy o dużej wiedzy i dojrzałości naukowej Doktorantki i generalnie nie budzi zastrzeżeń. W oparciu o uzyskane wyniki Doktorantka sformułowała 5 wniosków, które w świetle zaprezentowanych danych uważam za prawidłowe.

Do szczególnych osiągnięć ocenianej pracy doktorskiej zaliczam:

1. uzyskanie pionierskich wyników potwierdzających obecność subpopulacji limfocytów Th1 i Th2 w endometrium klaczy o różnym nasileniu zmian histopatologicznych związanych z endometrosis
2. uzyskanie pionierskich wyników wskazujących, że aktywność sekrecyjna limfocytów Th1 i Th2 może stymulować proliferację endometrialnych fibroblastów, indukować zmiany w poziomie ekspresji markerów macierzy międzykomórkowej (FN1, ACTA2, MMP2, TIMP1 i TIMP2) oraz różnicować profile transkryptomiczne fibroblastów w odpowiedzi na sekretomy poszczególnych subpopulacji
3. uzyskanie pionierskich wyników wskazujących, że fibroblasty izolowane z endometrium bez cech włóknienia (kategoria I) i z zaawansowanym włóknieniem (kategoria IIb) wykazują charakterystyczne różnice w profilach transkryptomicznych w odpowiedzi na

stymulację zarówno IL4 jak i IL13, co pośrednio dowodzi istotnej roli, jaką pełnią te cytokiny w progresji fibrozy w patogenezie endometrosis u kłaczy

Posumowanie i wniosek końcowy

Przedstawione w niniejszej recenzji uwagi i komentarze stanowią element naukowego dyskursu. Nie pomniejszają one istotnie wartości merytorycznej ocenianej rozprawy doktorskiej, której niezaprzeczalnymi walorami są oryginalność, nowoczesny warsztat badawczy i precyzyjny opis wyników, na bazie których wyciągnięto prawidłowe wnioski. Bez wątpienia stwierdzić należy, że przedstawiona do oceny dysertacja doktorska Pani mgr inż. Anny Wójtowicz jest wartościowym dziełem naukowym, zawierającym szereg pionierskich wyników rozszerzających wiedzę z zakresu molekularnych aspektów oddziaływania limfocytów pomocniczych z fibroblastami endometrium w procesach związanych z rozwojem endometrosis u kłaczy. W związku z powyższym, pozytywnie opiniuje przedłożoną do recenzji rozprawę doktorską Pani mgr inż. Anny Wójtowicz pt. „The effect of Th1 and Th2 cell subsets and their mediators on the processes associated with the development of fibrosis in the progression of endometrosis in the mare” i stwierdzam, że spełnia ona wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742, ze zm.) stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora nauk rolniczych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo. Dlatego wnioskuję do Rady Naukowej Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie o dopuszczenie Pani mgr inż. Anny Wójtowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. Paweł Brym

