

Warszawa, dnia 15.06.2023

Anna Cywińska, prof. dr hab.
Katedra Nauk Podstawowych i Przedklinicznych
Instytut Medycyny Weterynaryjnej
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej lek. wet. Beaty Nowickiej pt. „Wpływ desmopatii proksymalnego przyczepu mięśnia międzykostnego na stężenie wybranych adipokin i interleukiny – 8 we krwi koni, z uwzględnieniem ich aktywności fizycznej”
przygotowanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Izabeli Polkowskiej
oraz dr Macieja Przewoźnego (promotor pomocniczy)**

Recenzję wykonano na podstawie powołania mnie na recenzenta przez Radę Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie
uchwałą z dnia 25.04.2023 oraz umowy nr 15/2023

Choroby ścięgien i więzadeł są najczęstszą przyczyną osiągnięcia niezadowalających wyników sportowych, przerw w treningu, a nawet całkowitej eliminacji konia z aktywności wyczynowej czy wykonywanej wcześniej pracy. Narażenie na rozwój patologii konkretnych ścięgien i więzadeł różni się w zależności od konkurencji sportowej, jednak choroby mięśnia międzykostnego (SL- suspensory ligament) wymieniane są jako częste zarówno u koni skokowych, WKKW, ujeżdżeniowych, rajdowych, startujących w konkurencjach Western, jak i koni rekreacyjnych. Diagnostyka chorób SL opiera się na badaniach klinicznych i obrazowych, jednak obserwowane zmiany mogą się znacznie różnić, a brak kulawizny nie wyklucza choroby. Badania parametrów krwi w kontekście chorób ścięgien u koni opisywane są rzadko, zatem lek. wet. Beata Nowicka w swojej pracy doktorskiej podjęła się trudnego i nowatorskiego zadania. Tytuł pracy umożliwia szerokie potraktowanie zagadnienia i uwzględnienie aspektów zarówno diagnostycznych jak i dotyczących patogenezы choroby, co znalazło odzwierciedlenie w rozprawie, wiele zagadnień poruszonych przez Doktorantkę wymaga jednak dalszych badań.

Mięsień międzykostny jest strukturą zbudowaną głównie z tkanki łącznej, ale zawiera też włókna mięśniowe i tkankę tłuszczową zlokalizowaną w większości w proksymalnej części SL. Anatomicznie w SL wyróżnia się część proksymalną, obszar główny oraz gałęzie SL. Temu podziałowi odpowiada kliniczna klasyfikacja chorób SL. W recenzowanej pracy skupiono się na proksymalnej części SL (PSL). Do rozwoju patologii w obrębie bliższego przyczepu SL dochodzi kiedy jest on poddany działaniu zbyt dużych sił (obciążeń mechanicznych) podczas ruchu, może to być jednorazowy incydent lub kumulacja powtarzających się submaksymalnych obciążeń powodujących mikrouszkodzenia. Proces patologiczny obejmuje fazę ostrą, charakteryzującą się rozerwaniem włókien kolagenowych

i uszkodzeniem naczyń mikrokrążenia oraz napływem leukocytów i uwalnianiem mediatorów zapalenia, fazę naprawczą, gdy powstaje blizna oraz fazę przebudowy powstałej blizny. Uważa się, że na ten klasyczny schemat zapalenia w wyniku uszkodzenia nakłada się wpływ postępującego zwyrodnienia PSL. Z tego powodu Sue Dyson zaproponowała stosowanie nazwy desmopatia w miejsce *desmitis*, co jest bardziej właściwe zwłaszcza w przypadku niektórych koni, u których stwierdza się histologicznie zmiany zwyrodnieniowe, a zmiany zapalne są niewielkie lub nawet nieobecne.

Wobec faktu, że PSL zawiera istotną ilość tkanki tłuszczowej, która może wydzielać adipokiny wpływające na przebieg zapalenia oraz procesów zwyrodnieniowych Doktorantka postanowiła zbadać związki pomiędzy stężeniami adipokin we krwi a występowaniem patologii PSL. Podjęte przez Doktorantkę badania są nowatorskie i otwierają nowy kierunek w badaniach patogenezy chorób więzadeł i ścięgien u koni.

Recenzowana rozprawa doktorska ma tradycyjną formę manuskryptu, liczy 120 stron, zawiera 16 tabel, 9 wykresów, 12 rycin (zdjęcia i ultrasonogramy oraz schemat), spis 238 pozycji piśmiennictwa, wykaz skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Autorka pracy, lek. wet. Beata Nowicka opublikowała dotychczas 17 prac (według bazy danych UP w Lublinie), w tym 7 w czasopismach JCR (według bazy ORCID).

Manuskrypt ma układ klasyczny. Wstęp, podzielony na 11 podrozdziałów zawiera szczegółowy przegląd piśmiennictwa na temat chorób układu mięśniowo-szkieletowego, szczególnie mięśnia międzykostnego oraz adipokin i interleukiny – 8 (IL-8). Autorka opisała wymieniane w piśmiennictwie naukowym dane na temat występowania i przyczyn kulawizn u koni wyczynowych, przyczyny tych zmian oraz czynniki ryzyka. W dalszej części wstępu skupiła się na budowie, funkcji oraz chorobach SL i możliwościach diagnostyki patologii w tym rejonie. Kolejne podrozdziały poświęciła adipokinom, którym przypisuje się rolę w regulacji zapalenia oraz procesów zwyrodnieniowych: rezystynie, wisfatynie i leptynie oraz IL-8 (obecnie CXCL8), chemokinie zaliczanej do cytokin prozapalnych, która występuje również w tkance tłuszczowej. We wstępie pojawiło się kilka nieścisłości, Autorka używa dwóch nazw: adipocytokiny i adipokiny (dotyczy to całej pracy). Wprawdzie w piśmiennictwie naukowym można znaleźć obydwie nazwy, powszechnie używa się jednak nazwy adipokiny, a w pracy doktorskiej warto zachować jednolitość nazewnictwa. W tekście znalazły się też niezręczności stylistyczne, np.: „efekty dychotomiczne związane z procesami tkanki łącznej i stawów” (str. 29) czy „leptyna jest wyrażana nie tylko przez adipocyty” (str. 30) – wierzę, że jest to związane z korzystaniem przez Doktorantkę z piśmiennictwa przede wszystkim anglojęzycznego i zostanie skorygowane podczas przygotowania wyników do publikacji w czasopiśmie anglojęzycznym. Wstęp uzupełniają zdjęcia, ultrasonogramy i obraz MRI, jednak poza jednym przypadkiem (ryc. 7) brakuje podania autora tych zdjęć. Wstęp w przejrzysty sposób prowadzi do sformułowania celu pracy i hipotez badawczych.

Za cel recenzowanej pracy Autorka przyjęła ocenę stężenia adipokin i CXCL8 u koni z desmopatiami PSL w kończynach piersiowych lub miednicznych i określenie związku tych stężeń z użytkowaniem i utrzymaniem konia oraz wiekiem, płcią i wskaźnikami hematologicznymi i biochemicznymi krwi. Grupę kontrolną stanowiły konie bez desmopatii PSL. Autorka dokładnie podała hipotezy badawcze zerowe oraz alternatywne, co sprawia, że rozdział Cel pracy i hipotezy badawcze zajmuje 5 stron. W moim odczuciu korzystniejsza byłaby krótsza i bardziej zwięzła forma. Zważywszy, że w piśmiennictwie brak jest danych na

temat związku stężeń adipokin we krwi i występowaniem patologii PSL u koni, wykonanie kompleksowej analizy jest cenne zarówno z naukowego jak i klinicznego punktu widzenia.

Badania wykonano u 36 koni, 27 z nich wykazywało kulawiznę i leczono je z powodu desmopatii PSL, a 9 to grupa kontrolna, czyli konie bez objawów patologii układu ruchu. Kryteria doboru koni opracowano bardzo starannie – założono ten sam wiek i kondycję konia (body condition scoring - BSC) i określono kryteria wykluczenia z badania. Autorka planując badanie zadbała zatem o zminimalizowanie wpływu czynników zmieniających stężenia adipokin we krwi. Szkoda, że wiek koni w grupie badanej i kontrolnej okazał się istotnie różny, jednak badania z udziałem pacjentów często nie dają możliwości utworzenia homogennych grup. Zarówno elementy wywiadu, jak i badania klinicznego i obrazowego opisano przejrzysto i dokładnie. W tabeli 2. podano charakterystykę koni z chorobami PSD i kontrolnych zgodnie z założeniami opisanymi w celach pracy. W części 5.3.3 opisującej badania laboratoryjne podano, że „materiał pobierano przy pomocy próbeko-strzykawkę z odpowiednim podłożem” – sugeruje to wykonanie badań mikrobiologicznych, których chyba nie wykonywano? W tej części zaprezentowano również wyniki, które moim zdaniem powinny podane później, czyli w rozdziale Wyniki wraz z istotnością statystyczną różnic (lub jej brakiem).

W rozdziale Wyniki Autorka wprowadza kolejny podział na grupy: w zależności od użytkowania koni (TRN – pracujące i NTR – niepracujące) i ich utrzymania (PA – padokowane i NPA – niepadokowane), nie podano jednak liczb koni w poszczególnych grupach. Podział ten realizuje cele pracy, jednak w grupach znalazły się zarówno konie chore jak i zdrowe (co zaznaczono dopiero w kolejnych podrozdziałach), co sprawia, że wyniki mogą być obarczone większym błędem. Może warto zastosować ten podział tylko w grupie koni chorych? Stężenia badanych adipokin i CXCL8 porównano w układach konie chore i zdrowe; trenujące i nietrenujące oraz padokowane i niepadokowane.

Wyniki przedstawiono w tabelach, a parametry istotnie się różniące również na wykresach (choć prezentowanie tych samych wyników w różnych formach nie jest potrzebne). Dziwią mnie jednak wartości p przekraczające 1 (1,895 i 1,576) w tabeli 7. Niejasna jest też tabela 8, można odnieść wrażenie, że wszystkie konie chore – ORT były padokowane, a konie kontrolne niepadokowane. Mam nadzieję, że publiczna obrona rozprawy będzie okazją do wyjaśnienia tych kwestii, tym bardziej, że na wykresie 9 przedstawiono, że stężenie rezystyny jest istotnie wyższe w grupie padokowanej (jak rozumiem chorych, padokowanych koni?). Spostrzeżenie to jest ciekawe, ponieważ stężenie rezystyny było niższe u koni chorych niż u zdrowych, co mogłoby sugerować, że padokowanie korzystnie wpływa na stan chorych koni, skoro podwyższa stężenie rezystyny?

Kolejne części rozdziału wyniki dotyczą korelacji pomiędzy badanymi parametrami. Szkoda, że w tabelach podano tylko wartości r i p bez wartości badanych parametrów, choć znacznie rozbudowałyby to tabele. Opisy wyników budzą wątpliwości. Korelacje pomiędzy stężeniem rezystyny a parametrami biochemicznymi krwi były umiarkowane, jedynie stężenie wapnia w grupie koni kontrolnych było silnie ($r=857$) skorelowane ze stężeniem rezystyny. Poprawy wymaga opis korelacji dotyczących stężenia leptyny – korelowało ono silnie i dodatnio z wiekiem, ale tylko w grupie koni kontrolnych. Ponadto silną dodatnią korelację stwierdzono u koni kontrolnych pomiędzy stężeniem leptyny i MLR (choć stosunek monocytów i limfocytów może mieć ograniczoną wiarygodność) oraz leptyny i CXCL8

u koni kontrolnych, inne istotne korelacje były umiarkowane. Stężenie wisfatyny nie korelowało ze stężeniem leptyny u chorych koni ($r=0,075$, $p=0,72$). Mam nadzieję, że publiczna obrona rozprawy będzie okazją do doprecyzowania opisu wyników, może warto przedstawić tylko istotne statystycznie wartości?

Dyskusja wyników była dużym wyzwaniem, z którym lek. wet. Beata Nowicka poradziła sobie bardzo dobrze. Z uwagi na brak w piśmiennictwie naukowym danych na temat związku pomiędzy chorobami więzadeł czy ścięgien u koni a stężeniami adipokin we krwi, konieczne było odniesienie się do wyników uzyskanych u pacjentów innych gatunków z uwzględnieniem specyfiki chorób koni. Dyskusję rozpoczyna przypomnienie znaczenia chorób SL. W tej części niejasne jest jednak stwierdzenie, że „wśród koni ze zdiagnozowanym PSD u ponad 80% pacjentów wystąpiła niechęć do ruchu, u 40% z grupy 27 ze zdiagnozowanym PSD nie zgłoszono oznak bólu”. Zgodnie z tym, co wcześniej podawano w pracy grupa koni chorych liczyła 27 osobników, $80+40=120$ (%) – tkwi tu zatem jakiś błąd... ponadto w rozdziale Materiał i metody podano, że kryterium kwalifikacji do grupy badanej była m. in. kulawizna trwająca nie krócej niż 21 dni, skąd zatem brak oznak bólu? Kolejna część dyskusji dotyczy patofizjologii bólu. Zasadne jest odniesienie do patologii ścięgna Achillesa i sugestia, że adipokiny pochodzące z tkanki tłuszczowej w SL mogą mieć istotne znaczenie dla czucia bólu wynikającego z postępu zmian zwyrodnieniowych. Według Sue Dyson, ból związany z desmopatią może wynikać z ucisku okolicznych nerwów, co może mieć związek z postępującym zwyrodnieniem. Doktorantka słusznie podkreśliła, że przewlekłe choroby PSD prowadzą do zmiany udziału tkanki tłuszczowej na korzyść tkanki łącznej. Potwierdzają to zaprezentowane w pracy wyniki Autorki wskazujące na niższe stężenie rezystyny (i wyższe CXCL8) u chorych koni. Kolejnym potwierdzeniem jest omówienie wyników badań ultrasonograficznych. Szkoda, że w części Wyniki nie zamieszczono tych obrazów – byłoby to dodatkową zaletą pracy. Dalsza część dyskusji poświęcona jest przede wszystkim adipokinom i CXCL8 oraz ich roli w regulacji zapalenia i innych procesów patologicznych. W pracy nie stwierdzono różnic w stężeniu wisfatyny pomiędzy grupą koni chorych i zdrowych, w dyskusji Autorka zaznaczyła ten fakt, pozostawiła jednak niedosyt w kwestii interpretacji braku różnic. Wydaje się to ważne w kontekście uznania wisfatyny za ważny czynnik prozapalny (co również zaznaczono w dyskusji). Mam nadzieję, że publiczna obrona pracy będzie okazją do rozwinięcia tego zagadnienia.

Lek. wet. Beata Nowicka podjęła trudne i nowatorskie badania. Istnieją doniesienia na temat roli adipokin w rozwoju chorób układu ruchu u innych gatunków, zatem rozpoczęcie takich badań u koni niesie możliwości poznania nowych aspektów tych chorób. Autorka zaproponowała dalsze kierunki badań i mam nadzieję, że będzie je kontynuowała.

Pracę kończy 8 bardzo rozbudowanych wniosków. W mojej opinii stanowią one przede wszystkim podsumowanie wyników, zabrakło tam podkreślenia istotnych spostrzeżeń, o których napisano w dyskusji, a nawet w streszczeniu pracy.

Moim obowiązkiem jest również ocena formy pracy, która wymaga korekt przed opublikowaniem w czasopiśmie naukowym, choć wydaje się, że publikacja wyników w języku angielskim będzie łatwiejsza i wyeliminuje wspomniane już niezręczności stylistyczne. Warto jednak pamiętać, że w przypadku adipokin określa się ich stężenie we krwi, nie „poziom stężenia” a tym bardziej nie „miano adipokin”.

Na pochwałę zasługuje dokumentacja fotograficzna, mam jednak nadzieję, że w publikacjach wyników znajdzie się więcej ultrasonogramów badanych koni. Proponuję również uzupełnienie tabel z wartościami r i p o wartości badanych wskaźników, nawet jeśli miałyby zostać zredukowane jedynie do wskaźników które istotnie ze sobą korelują. W tabelach zawierających wyniki badań hematologicznych brakuje jednostek, warto też wyjaśnić skróty również w legendach tych tabel. W niektórych miejscach istotnej korekty wymaga tekst opisujący wyniki.

Powyższe uchybienia edytorskie mogą utrudniać czytanie pracy, ale w żadnym stopniu nie obniżają jej wartości merytorycznej

W podsumowaniu opinii na temat rozprawy doktorskiej lek. wet. Beaty Nowickiej należy podkreślić przede wszystkim nowatorski charakter badań. Kompleksowa analiza stężeń wybranych adipokin i CXCL8 u koni z desmopatią PSL otwiera nowy kierunek w badaniach chorób więzadeł i ścięgien u koni.

W trakcie dyskusji podczas publicznej obrony rozprawy będzie z pewnością okazja do rozmowy z Autorką na temat:

1. Możliwych przyczyn braku różnic w stężeniu innych niż rezystyna adipokin (szczególnie wisfatyny) pomiędzy końmi chorymi i zdrowymi
2. Znaczenia sposobu utrzymania podczas leczenia i rehabilitacji koni z desmopatią PSL
3. Podziału na grupy na podstawie obecności choroby, użytkowania i utrzymania
4. Stwierdzenia kulawizny u chorych koni (grupa ORT)
5. Drobnych uchybień w opracowaniu manuskryptu:

Wymienione uwagi stanowią głos w dyskusji i nie obniżają w żadnym stopniu wartości zaprezentowanej pracy.

Przedstawiona do oceny praca lek. wet. Beaty Nowickiej stanowi znaczny dorobek naukowy Autorki, spełnia wymagania stawiane pracom na stopień naukowy doktora i w pełni odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U . 2018 poz. 1668 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z wnioskiem o dopuszczenie lek. wet. Beaty Nowickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Cywińska, prof. dr hab.

