



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Lekarski

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
Kierownik : prof. dr hab. n. med. dr h.c. Jacek Szepietowski
ul. Chałubińskiego 1, 50-368 Wrocław

Tel. +4871/327-09-41 Fax. +4871/327-09-42

e-mail: dermwen@umed.wroc.pl <http://www.derm.umed.wroc.pl>

Wrocław, 2023-08-13

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu DZIEKANAT WYDZIAŁU MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ 21-08-2023 l. dz.....Zal znak sprawy:
--

OCENA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Marty Rykały

pt. "Identyfikacja układu receptorów endokannabinoidowych w skórze i mózgu koni."

Układ endokannabinoidowy odgrywa istotną rolę w szeregu procesach w organizmach żywych, łącznie z regulacją dobowego rytmu snu i czuwania, transmisją sygnałów czuciowych, wpływem na procesy zapamiętywanie i uczenia się oraz homeostazą układu immunologicznego. Układ endokannabinoidowy tworzą receptory kannabinoidowe, ligandy oraz endogenne enzymy kontrolujące ich poziom. W organizmach zarówno bezkręgowców, jak i kręgowców zidentyfikowano receptory kannabinoidowe zarówno w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, jak i w szeregu innych komórkach, włączając w to komórki układu immunologicznego. Również w skórze człowieka wykazano ekspresję receptorów kannabinoidowych. Dokonano tego zarówno w stanie fizjologii, jak i patologii, głównie związanej ze stanem zapalnym skóry. Dotychczasowe zainteresowania receptorami endokannabinoidowymi mojego zespołu związane były głównie z sugestią ich udziału w tworzeniu doznania świadomego. Należy podkreślić, że w obecnie w medycynie istnieje trend wykorzystywanie kannabinoidów, szczególnie kanabidiolu, w celach terapeutycznych. Osobiście jednak uważam, że konieczne są jeszcze bardziej precyzyjne badania aby upowszechnić stosowanie kannabinoidów w różnego rodzaju zaburzeniach. Jak podaje Doktorantka do tej pory badania nad receptorami kannabinoidowymi w organizmie konia

koncentrowały się jedynie nad ich ekspresją w zwojach korzeni grzbietowych rdzenia kręgowego. Temat więc rozprawy doktorskiej lek. wet. Marty Rykały dotyczący oceny ekspresji receptorów endonanabinoidowych w skórze koni zdrowych jest jak najbardziej aktualny, trafny i w pełni uzasadniony.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 137 stron oprawionego wydruku komputerowego, w tym 11 zestawień tabelarycznych, 36 rycin/wysokiej jakości barwnych fotografii i 214 pozycji piśmiennictwa, w większości pochodzącego z ostatnich lat. Za cenne uważam zamieszczenie na początku rozprawy wykazu skrótów, co ułatwia czytelnikowi śledzenie poszczególnych części rozprawy doktorskiej.

Układ pracy jest typowy dla rozprawy doktorskiej; zawiera wstęp, cel pracy badawczej, materiał i metody badawcze, wyniki, dyskusję, wnioski, streszczenie w języku polskim i języku angielskim oraz wykaz piśmiennictwa.

Wstęp rozprawy doktorskiej składa się z kilku rozdziałów. W pierwszej części Doktorantka zwięźle przedstawiła historię kannabinoidów, a następnie omówiła szczegółowo układ endokannabinoidowy, zwracając szczególną uwagę na receptory kannabinoidowe, ich ligandy i typy kannabinoidów. Za ciekawy uznaję podrozdział odnoszący się do zastosowania kannabinoidów w medycynie człowieka i medycynie weterynaryjnej. Z wielkim zainteresowaniem zapoznałem się z budową skóry koni, układem immunologicznym skóry oraz rolą receptorów kannabinoidowych w neuroimmunologicznych procesach w obrębie skóry. Ogólnie, całość wstępu jest ciekawą lekturą, odpowiednio wprowadzającą czytelnika do badań własnych Doktorantki. Sugerowałbym jedynie dołożenie większej staranności językowej w redagowaniu tekstu. I tak np., proponuję nie używać terminu „celubka włosa”, który praktycznie nie występuje w dermatologii (przynajmniej w medycynie człowieka), a jego użycie jest raczej pewnym slangiem w potocznej polszczyźnie.

Założenia i cele pracy zostały przedstawione klarownie i zebrane w pięciu szczegółowych punktach. Doktorantka postanowiła przeprowadzić analizę ekspresji mRNA genów i białek receptorów kannabinoidowych w pośmiertnie pobranych bioptatach skóry koni zdrowych i porównać wyniki z ekspresją badanych receptorów kannabinoidowych w tkance mózgowej koni. Założeniem rozprawy było też przeprowadzenie analizy ilościowej jak i analizy dystrybucji tkankowej receptorów CB1R i CB2R wraz z identyfikacją i kolokalizacją zakończeń nerwowych w skórze koni zdrowych. Wszystkie przedstawione przez Doktorantkę szczegółowe cele badawcze zostały zrealizowane, prowadząc w konsekwencji do nowatorskich własnych spostrzeżeń. Obrazuje to, że lek. wet. Marta Rykała posiadała umiejętność prawidłowego planowania badań naukowych.

Badaniami objęto 15 zdrowych koni, 8 klaczy i 7 wałachów, przeznaczonych do uboju w celach konsumpcyjnych. Pośmiertnie pobrano bioptyaty skóry z okolicy grzbietowej śródreżca kończyn piersiowych. Jako materiał referencyjny posłużyły bioptyaty kory mózgowej okolicy czołowej uzyskane od 3 powyżej opisanych koni zdrowych. W pracy wykorzystano szereg metod badawczych. Między innymi wykonano klasyczne badanie histologiczne z wybarwieniem hematoksyliną i eozyną, technikę Western-Blot, immunofluorescencji, technikę PCR w czasie rzeczywistym czy mikroskopię konfokalną. Opis wykorzystanych odczynników i urządzeń w procesie badawczym oraz zastosowanych technik badawczych jest szczegółowo przedstawiony. Metody badawcze zostały dobrane wzorowo aby zrealizować założone cele badawcze projektu. Uwagę zwraca analiza statystyczna otrzymanych wyników z zastosowaniem dobrze wyselekcjonowanych testów. Znacznie uwiarygodnia ona przedstawione w dalszej części rozprawy wyniki własne Doktorantki.

Wyniki pracy zostały zebrane na licznych rycinach oraz zaopatrzone słownym opisem. Zobrazowanie głównych wyników w formie graficznej wraz z ich słownym opisem umożliwia czytelnikowi z łatwością zrozumienie podstawowych przesłanek pracy doktorskiej. Pragnę zwrócić uwagę na bardzo wysokiej jakości ryciny stanowiące zbiór zdjęć z mikroskopii konfokalnej. Jestem pod ich wielkim wrażeniem. W mojej ocenie podkreślają one wysoką rangę ośrodka, w którym badania zostały zrealizowane.

Do najważniejszych spostrzeżeń Doktorantki zaliczam wykazanie ekspresji obu receptorów kannabinoidowych w skórze zdrowej konia. Zarówno receptory CB1R jak i CB2R wykazano w strefie okołonaczyniowej, komórkach śródbłonna oraz w okolicy skupisk komórek nerwowych. Receptory CB2R występowały w zmniejszonym zagęszczeniu. W porównaniu z referencyjną tkanką mózgową ekspresja CB1R w skórze była znacząco mniejsza, natomiast CB2R była na podobnym poziomie. Ekspresję CB1R w keratynocycie zidentyfikowano w obrębie błony komórkowej oraz w obszarze cytoplazmy, przy czym ulegała ona zmniejszeniu w kierunku jądra komórkowego. Immunoreaktywność CB1R uwidoczniła została również w pojedynczych jądrach keratynocytów. Podobną lokalizację reprezentowała ekspresja CB2R, przy czym była ona bardziej jednorodna w odniesieniu do ekspresji CB1R. Bardzo interesujące okazało się udokumentowanie jednorodnej ekspresji CB1R w całym naskórku, przy czym ekspresja CB2R była najniższa w warstwie podstawnej naskórka, nieco wyższa w obrębie warstwy kolczystej i porównywalna w warstwie ziarnistej, jasnej i rogowej. Ponadto okazało się, że w warstwie podstawnej naskórka CB1R wykazuje kolokalizację z neurobiologicznym markerem PGP 9.5. Ekspresję CB1R i CB2R wykazano

również w strukturach skóry właściwej z pewnymi różnicami w dystrybucji ekspresji obu receptorów w poszczególnych strukturach i poziomach skóry właściwej.

Dyskusja wyników jest dość obszerna i ciekawa. Lek. wet. Marta Rykała swobodnie porusza się po zagadnieniach, niekiedy trudnych do jednoznacznej interpretacji, związanych z rozprawą doktorską. Podoba mi się krytyczne podejście do interpretacji otrzymanych własnych wyników badań i umiejętne odniesienie ich do doniesień literaturowych. Wartościowe jest przedstawienie przez Doktorantkę ograniczeń (limitacji) projektu, do których lek. wet. Marta Rykała zalicza pobranie materiału od relatywnie niewielkiej liczby zwierząt. Omówienie wyników uważam za rzetelnie przeprowadzone i odpowiednio zredagowane. Wolałbym jednak aby Doktorantka używała słowa „liczba”, a nie „ilość” pisząc o rzeczach policzalnych, jak np. liczba włosów.

Rozprawę wieńczą cztery wnioski. Zostały one opracowane z wykorzystaniem uzyskanych wyników własnych, jak i ich odniesienia do współczesnej wiedzy (dwa pierwsze wnioski). Kolejne dwa wnioski są sugestią Doktorantki co do kierunku prowadzenia dalszych badań w tym zakresie, dążących finalnie do ich aplikacyjnego wykorzystania.

Praca zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, co jest wymogiem ustawowym rozprawy doktorskiej. Szczególne znaczenie przy przedstawieniu pracy doktorskiej w języku polskim odgrywa streszczenie w języku angielskim. Podanie w streszczeniu jednego zdania w wynikach: „Normal equine skin demonstrated constant gene and protein expression of CBRs.” uważam za sformułowanie zbyt skondensowane i nie wystarczające. Autorka posiada wiele wartościowych wyników, które należałoby zawrzeć w podrozdziale Study Results streszczenia, szczególnie, że w monografii nie ma ograniczeń odnoszących się do liczby słów w streszczeniu.

Piśmiennictwo rozprawy jest bogate. Lek. wet. Marta Rykała wykorzystała liczne prace, które trafnie wyselekcjonowała w odniesieniu do własnego materiału. Godnym podkreślenia jest zamieszczenie prac autorów rodzimych, co świadczy to o uważnym śledzeniu piśmiennictwa z zakresu omawianej tematyki przez Doktorantkę. Sugerowałbym stworzenie wykazu piśmiennictwa w sposób bardziej jednolity. I tak, w przypadku niektórych pozycji (np. poz. 171) podawany jest jeden autor i „et al.”, w innych (np. poz. 200) trzech autorów i „et al.”, a w jeszcze innych (np. poz. 208) umieszczeni są wszyscy (nawet 10.) autorzy. Osobiście też uważam, że, ponieważ praca przedstawiona jest jako monografia napisana w języku polskim, to poszczególne pozycje piśmiennictwa powinny być podane również w formułe polskiej. Oznacza to, że w spisie nie powinno pojawiać się sformułowanie „et al.” tylko „i wsp.”). Ponadto spis piśmiennictwa przygotowany jest w sposób

niezrozumiały i bardzo niestaranny. Z pewnością nie jest to spis alfabetyczny, przyjmuję więc, że powinien być sporządzony według kolejności cytowania. Jednakże pierwszą cytowaną w rozprawie pozycją jest pozycja o numerze 157.

Reasumując, uważam rozprawę doktorską lek. wet. Marty Rykały za bardzo wartościowe rozwiązanie postawionego sobie celu badawczego. Jest to praca nowatorska, wnosząca nowe dane do współczesnej wiedzy i dająca rzetelne podstawy do planowania dalszych badań naukowych.

Po zapoznaniu się z całością rozprawy początkowo miałem niedosyt, że badania zawarte w przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej nie zostały jeszcze opublikowane, do czego chciałem Doktorantkę jak najbardziej zachęcić. Z dużym jednak zdziwieniem w literaturze odnalazłem opublikowaną pracę zatytułowaną „The cannabinoid receptors system in horses: tissue distribution and cellular identyfikation in skin” opublikowaną w J Vet Intern Med w 2022 roku. Praca ta zawiera dane umieszczone w ocenianej rozprawie doktorskiej. Obejmuje też dane odnoszące się do badań na komórkach, które nie stanowią elementu ocenianej rozprawy doktorskiej. Pierwszym autorem tejże pracy jest dr Piotr Kupczyk, będący promotorem pomocniczym ocenianej rozprawy. Doktorantka – lek. wet. Marta Rykała znajduje się na drugim miejscu w tej pracy. Nie jest też ona autorem korespondencyjnym. Mam więc wątpliwości czy przedstawiona jako monografia rozprawa doktorska nie powinna być klasyfikowana jako autoplgiat. Analizując spis piśmiennictwa pracy doktorskiej odnajduję cytowanie powyższej opublikowanej pracy pod numerem 208. Cytowana jest ona jedynie w kontekście własnej modyfikacji badania immunofluorescencyjnego. Praca opublikowana w 2022 roku jest po części identyczna z ocenianą rozprawą doktorską. Zawiera te same ryciny, zarówno z badania histologicznego, jak i badań molekularnych. Jak więc mam traktować informację Autorki przedstawionego do oceny doktoratu datowanego na rok 2023, że do tej pory badania nad receptorami endokannabinoidowymi nie były dokonywane/publikowane. Przecież Autorka jest sama współautorem pracy, która to opisuje w roku 2022. Czy jest to jedynie niezręczność redakcyjna czy celowe wprowadzenie czytelnika w błąd pozostawiam do oceny poszczególnym osobom zapoznającym się z rozprawą doktorską lek. wet. Marty Rykały. Rozprawa doktorska, w obliczu jej opublikowania z innym pierwszym autorem niż Doktorantka, budzi moje wątpliwości co do samodzielności wykonania projektu przez lek. wet. Martę Rykałę. W przedstawionym maszynopisie pracy doktorskiej nie ma wzmianki jaki wkład w pracę posiada sama Doktorantka, a jej brak jako pierwszego autora publikacji sugeruje jednoznacznie, że wkład ten nie był kluczowy. Istnieje przecież możliwość publikowania prac z zaznaczeniem, że

dwoje pierwszych autorów ma równorzędny udział w tworzenia dzieła. Zdaję sobie sprawę, że w dzisiejszej nauce pojedyncza jednostka „nie przemieni świata”, a projekty oparte na współpracy dają zdecydowanie lepsze, bardziej wartościowe rezultaty. Jednakże my dzisiaj mówimy specyficznie o rozprawie doktorskiej młodej adeptki nauki. Artykuł 13 ust.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki (na podstawie tej ustawy realizowany jest obecny proces doktorski) jednoznacznie mówi, że rozprawa doktorska powinna wykazywać umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Ponadto w punkcie 4 tego paragrafu odnajdujemy, że rozprawę doktorską może stanowić samodzielna i wyodrębniona część pracy zbiorowej, jeżeli wykazuje ona indywidualny wkład kandydata przy opracowywaniu koncepcji, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy. W obecnej sytuacji, jako recenzent, nie posiadam podstaw do stwierdzenia samodzielnego prowadzenia pracy naukowej przez Doktorantkę, a tym samym stwierdzenia, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska lek. wet. Marty Rykały spełnia wymogi ustawowe. Projekt naukowy wraz z wynikami uważam za nowatorski i bardzo cenny. Sugeruję jednak aby Doktorantka wraz z promotorem i promotorem pomocniczym jednoznacznie określili wkład/udział samej Doktorantki w tworzenie tegoż projektu. W mojej ocenie konieczne jest przedstawienie oświadczeń poszczególnych autorów opublikowanej pracy jaki był ich wkład w tę pracę i na czym on polegał. Żywię nadzieję, że takie postępowanie umożliwi, przynajmniej w mojej ocenie, dalsze procedowanie procesu doktorskiego lek. wet. Marty Rykały.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA KLINIKA
DERMATOLOGII, WENEROLOGII I ALERGOLOGII
kierownik
prof. dr hab. Jacek Szepietowski

Prof. dr hab. n. med. dr h.c. Jacek Szepietowski



UNIwersYTET MEDYCZNY

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Lekarski

Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
Kierownik : prof. dr hab. n. med. dr h.c. Jacek Szepietowski
ul. Chałubińskiego 1, 50-368 Wrocław

Tel. +4871/327-09-41 Fax. +4871/327-09-42

e-mail: dermwen@umed.wroc.pl <http://www.derm.umed.wroc.pl>

Wrocław, 2023-09-10

UZUPEŁNIENIE OCENY

rozprawy doktorskiej lek. wet. Marty Rykały

pt. "Identyfikacja układu receptorów endokannabinoidowych w skórze i mózgu koni."

Po uzupełnieniu przez Doktorantkę oraz obu promotorów rozprawy wymaganych, w mojej opinii, dokumentów jednoznacznie stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska lek. wet. Marty Rykały pt. „Identyfikacja układu receptorów endokannabinoidowych w skórze i mózgu koni” spełnia wymogi ustawowe (Artykuł 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz o Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki). Mam więc zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu moją wysoce pozytywną opinię wraz z wnioskiem o dopuszczenie lek. wet. Marty Rykały do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA I KLINIKA
DERMATOLOGII, WENEROLOGII I ALERGOLOGII
Kierownik

prof. dr hab. Jacek Szepietowski

Prof. dr hab. n. med. dr h.c. Jacek Szepietowski

Przewodniczący
Rady Dyscypliny Weterynaria

prof. dr hab. Wojciech Nizański