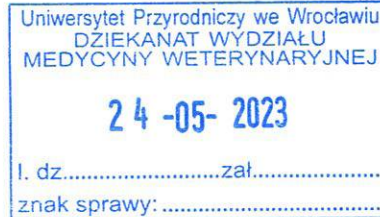


Olsztyn.18.05.2023

Dr hab. Anna Domosławska-Wyderska  
Katedra Rozrodu Zwierząt z Kliniką  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej  
UW-M w Olsztynie  
Ul. Oczapowskiego 14  
10-719 Olsztyn



### OCENA

pracy doktorskiej lek. wet. Pauliny Golach

pt. „Ocena wybranych markerów stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego u suk z nowotworem gruczołu mlekowego przed i po zabiegu mastektomii”

Rozprawa doktorska lek. wet. Pauliny Golach oparta jest na monografii

Badania epidemiologiczne pokazują, że guzy gruczołu sutkowego stanowią około 50% wszystkich nowotworów u samic psów. Ryzyko rozwoju nowotworów sutka związane jest z wpływem hormonów płciowych, czynnikami genetycznymi, środowiskowymi oraz dietą zwierząt. Etiologia i mechanizmy molekularne zaangażowane w patogenezę choroby nadal nie są do końca poznane i wymagają dalszych badań. Autorka pracy doktorskiej skupiła się na wpływie zaburzeń stanu równowagi oksydacyjno-redukcyjnej oraz powiązanego z nim procesu zapalnego na guzy gruczołu sutkowego u suk.

Oceniana praca doktorska obejmuje 173 strony maszynopisu, w tym 44 tabele i 8 rycin. Tekst pracy został podzielony w typowy sposób dla prac naukowych na rozdziały główne i podrozdziały, co ułatwia lekturę całej pracy. Układ redakcyjny rozprawy jest prawidłowy, jednakże należy uwzględnić kilka poprawek dotyczących odmiany wyrazów, co zostało zamieszczone w treści recenzji. W pracy, po stronie tytułowej, zamieszczono przejrzysty spis treści, a streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografię i spis rycin, i tabel zamieszczono na końcu pracy. Autorka nie zamieściła wykazu skrótów, co ułatwiłoby rozumienie tekstu.

**Wstęp.**

Wstęp rozprawy doktorskiej Autorka podzieliła na 5 podrozdziałów. Omówiła zwięźle i wyczerpująco budowę, rozwój i funkcję gruczołu sutkowego u samicy psa. Autorka opisała działanie układu hormonalnego odgrywającego główną rolę w synchronizacji mammogenezy z laktogenezą. Omówiła występowanie (wiek, stan płciowy- sterylizowane czy niesterylizowane), klasyfikację nowotworów gruczołu mlekowego oraz molekularne mechanizmy ich rozwoju. Jako że jedną z przyczyn powstawania nowotworów gruczołu mlekowego u suk jest stres oksydacyjny, Autorka wyczerpująco omówiła to w rozdziale 1.3.1. opisując zaburzenia równowagi pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu (RFT), a zdolnością komórek do ich usuwania lub naprawy wywołanych uszkodzeń. Wyczerpująco omówiła mechanizmy antyoksydacyjne- czynniki utrzymujące homeostazę redox: antyoksydanty nieenzymatyczne, enzymy przeciwutleniające i naprawcze, synergistycznie działającą barierę enzymatyczną, która tworzą dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza glutationowa (GR) i transferaza glutationowa (GST). Czynniki zaburzające homeostazę w organizmie prowadzi do powstania nieswoistej reakcji obronnej – reakcji ostrej fazy i stanu zapalnego, co Autorka również opisała we wstępie pracy doktorskiej. Autorka podkreśliła, że pomimo faktu, iż stres oksydacyjny i procesy zapalne mają wpływ na progresję nowotworów, nadal brakuje doniesień na ten temat. Jako, że dostępna literatura niejednoznacznie potwierdza wpływ owariohisterektomii i wieku w momencie przeprowadzenia zabiegu na ryzyko powstania nowotworu sutka, Autorka zdecydowała się na sprawdzenie, czy istnieje związek pomiędzy markerami stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego, a występowaniem tego typu nowotworów. Podjęła się zbadania korelacji parametrów oksydo-redukcyjnych ze zmianami profilu wybranych białek ostrej fazy (albuminy, fibrynogen, CRP) w przebiegu choroby, co może umożliwić wybór testów do wykorzystania w diagnostyce i kontroli terapii.

**Celem pracy** było poszerzenie stanu wiedzy o roli stresu oksydacyjnego oraz stanu zapalnego u suk z nowotworem gruczołu sutkowego. Cele szczegółowe obejmowały przeprowadzenie badań przed i po zabiegu hemimastektomii/mastektomii poddanych lub nie równoległemu zabiegowi owariohisterektomii:

1. Ogólna ocena parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi u suk oraz histopatologiczna ocena zmian nowotworowych
2. Ocena statusu antyoksydacyjnego (SOD, GPx, CAT, TAS) oraz stężenia produktów oksydacji (MDA, 8-OHdG, poziom karbonylacji białek)
3. Analiza stężenia białek ostrej fazy (CRP, fibrynogen, albumina)

4. Określenie korelacji pomiędzy badanymi parametrami stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego w oparciu o białka ostrej fazy

**Materiały i metody.** Rozdział ten rozpoczyna się od omówienia schematu postępowania w planowaniu i przebiegu badań. Do badań zakwalifikowano 36 suk różnych ras przyjętych w trybie planowym na wydziale Medycyny Weterynaryjnej UP we Wrocławiu. Zwierzęta były w podobnym przedziale wiekowym, a średnia wieku wynosiła 10 lat i 9 miesięcy. Nie kwalifikowano do badań zwierząt w rui, z chorobami współtowarzyszącymi lub nieprawidłowościami w badaniach laboratoryjnych. Po wstępnej kwalifikacji wykluczono również suki, u których wykryto przerzuty do płuc, guzy na śledzionie, zaawansowany proces nowotworowy, zgon przed zabiegiem chirurgicznym oraz wykryto ciężę urojone. To Autorce pozwoliło na ujednoczenie materiału badawczego. Grupę kontrolną stanowiło 14 suk, z czego 8 zostało wcześniej poddanych zabiegowi usunięcia jajników i macicy. Pozostałe nadal miały zachowane narządy rozrodcze. Wszystkie zwierzęta były w fazie anestrus, a średnia wieku wynosiła 9 lat. Do badania histopatologicznego Autorka pobierała materiał w postaci guza/guzów gruczołu sutkowego wraz z lokalnymi węzłami chłonnymi, które zostały poddane klasyfikacji i ocenie stopnia złośliwości. Materiałem do badań oznaczenia aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych, stężenia produktów oksydacji, wybranych parametrów BOF była krew żylna pobierana w tym samym czasie co krew do badań morfologicznych i biochemicznych.

Na uwagę zasługuje fakt dużej dokładności Autorki przy pobieraniu i ocenie próbek oraz wykonania oznaczeń w dwóch lub trzech replikatach technicznych.

W podrozdziale opisującym metody statystyczne Autorka użyła kilku metod statystycznych w zależności od otrzymanych danych, co zostało zawarte w opisie rozdziału 3.8.

**Wyniki** otrzymane przez autorkę, pozwalają stwierdzić, że:

1. Analiza danych dotycząca zwierząt doświadczalnych z grupy B1 i B2 wykazała tendencję dodatniej korelacji stadium zaawansowania klinicznego (S) do stopnia złośliwości histologicznej (G) zmian nowotworowych.
2. Wśród wszystkich zbadanych nowotworów tylko dwa przypadki okazały się niezłośliwe. W grupie B1 najczęściej występował rak prosty cewkowy, a w grupie B2 rak prosty cewkowy oraz rak mieszany. Jako niezłośliwy dominował gruczolak prosty w obu grupach. Rak prosty cewkowy występował najczęściej jako guz I stopnia złośliwości w obu grupach. W drugiej kolejności był rak mieszany z GI w grupie B1, a najbardziej

- złośliwą zmianą w grupie B1 był rak lity o stopniu GIII. W grupie B2 był to rak lity o stopniu GII. Analiza stadium zaawansowania klinicznego wykazała, że najczęstszymi zmianami nowotworowymi w grupie B1 były guzy w stadium klinicznym I (11 przypadków), w grupie B2 nie wykazano takiej tendencji. W grupie B1 stwierdzono zmiany klasyfikujące się do SI i SII. W stadium SIV znalazły się dwa przypadki z grupy B2. SV były dyskwalifikowane z badania.
3. W ocenie morfologicznej krwi w grupach badawczych stwierdzono wzrost liczny bazofili w grupie B1' i B2 w stosunku do grupy K i B1 jednak bez przekroczenia norm fizjologicznych. Stosunek NEU/LYM został przedstawiony w Tab. 8. Analiza biochemiczna krwi wykazała zmiany w obrębie enzymów wątrobowych oraz stosunek ALB/GLOB- współczynnik AGR co zamieszczono w tabeli 9.
  4. Tabela 10 zawiera analizę aktywności enzymów oksydacyjnych: CAT, SOD, GPx. CAT utrzymywał się na podobnym poziomie u wszystkich suk i nie był istotny statystycznie. Analiza aktywności SOD wykazała istotny statystycznie spadek we wszystkich grupach badawczych w stosunku do grupy K. Aktywność GPx (GPx1 i GPx3) była najniższa u suk z grupy B1', a wyższa w grupie B2 w porównaniu z pozostałymi grupami. Z kolei przeprowadzone analizy TAS nie wykazały różnic istotnych statystycznie pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi, a grupa kontrolna.
  5. Analiza produktów oksydacji wykazała wzrost stężenia MDA we wszystkich grupach w stosunku do grupy K. Stężenie 8-OHdG we krwi u wszystkich badanych zwierząt utrzymywało się na podobnym poziomie i nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie. Z kolei stężenia grup karbonylowych wykazały, że zwierzęta z grup K, B1 i B1' cechowały się podobnymi wartościami jednak niższymi niż w grupie B2 (tab. 12).
  6. W ocenie wybranych białek ostrej fazy na uwagę zasługuje stężenie białka c-reaktywnego w grupie B2 w której wynik kilkakrotnie przekroczył przyjętą normę fizjologiczną. Zmodyfikowana prognostyczna skala Glasgow przedstawia rokowanie suk z grup badawczych w związku z ogólnoustrojową odpowiedzią zapalną i została przedstawiona w tabeli 13.

Staranna analiza otrzymanych wyników jest dużą zaletą tej pracy.

Doktorantka przedstawiła 9 wniosków, z których wszystkie znajdują odniesienie do postawionych sobie celów:

1. Wykazano dodatnia korelacje pomiędzy stężeniem CRP, a występowaniem nowotworu gruczołu sutkowego i powiązaniem z nim procesem zapalnym. Obniżone stężenie CRP po



- zabiegu mastektomii może stanowić wskaźnik przebiegu stanu zapalnego podczas procesu zdrowienia suk.
2. Pomimo wzrostu poziomu fibrynogenu we krwi, korelacja między jego stężeniem, a rozwojem nowotworu wymaga dalszych badań.
  3. Niższe stężenie albumin u chorych zwierząt związane jest ze stanem zapalnym wywołanym przez proces nowotworowy, a wysoka korelacja pomiędzy poziomem ALB, a stężeniem MDA i 8-OHdG wskazuje na dualizm działania albuminy w przebiegu choroby nowotworowej.
  4. Tendencja do zwiększonej aktywności CAT koreluje z odpowiedzią na zwiększony poziom RFT, szczególnie w zaawansowanych stadiach choroby nowotworowej i rozwiniętym stanie zapalnym.
  5. Po zabiegu mastektomii z lub bez owarioriektomii zaobserwowano istotny wzrost aktywności SOD oraz tendencję spadkową aktywności GPx, wskazując na zmniejszenie stresu oksydacyjnego. Natomiast utrzymujący się zwiększony poziom MDA może świadczyć o trwającym procesie zapalnym, związanym ze wzrostem uszkodzenia oksydacyjnego lipidów w okresie pooperacyjnym.
  6. Bardzo niskie stężenie 8-OHdG u suk z nowotworami gruczołu sutkowego może świadczyć o jego znikomym udziale w tym procesie. Wyniki badań wskazują na niską przydatność 8-OHdG jako markera nowotworów gruczołu sutkowego u psów w przeciwieństwie do nowotworów piersi u ludzi.
  7. Stwierdzono, że wzrost ilości PLT powiązany jest ze stopniem zaawansowania nowotworów, a niedoszacowanie występowania trombocytozy, wskazuje na konieczność zdefiniowania ścieżki molekularnej odpowiedzialnej za zwiększone wytwarzanie PLT w przebiegu rozwoju nowotworów gruczołu mlekowego.
  8. Przeprowadzone badania wskazują na potrzebę opracowania metod i testów specyficznych dla psów w celu lepszego diagnozowania i badania nowotworów gruczołu sutkowego. Wykazano niską przydatność parametrów czerwonych. Wyliczenia wskaźników rokowniczych oraz oznaczenia stężeń analizowanych parametrów wskazują, że: 1. Wyższe stężenie globulin może stanowić odzwierciedlenie natężenia stanu zapalnego wskazując na złe rokowanie; 2. Niski wskaźnik AGR u psów ze złośliwym nowotworem gruczołu sutkowego może świadczyć o gorszym rokowaniu i stanowić prognostyczny wskaźnik przeżycia; 3. Wskaźnik NLR oraz mGPS mogą być wykorzystywane w celu określenia rokowania i rozwoju choroby nowotworowej gruczołu sutkowego u psów.

9. Analizy statystyczne wyników w podgrupach suk sterylizowanych i niesterylizowanych generalnie nie wykazały, aby zabieg ten w sposób istotny wpływał na wyniki.

**Dyskusja** napisana jest spójnie, wyczerpująco przedstawia analizę zależności pomiędzy założeniami, a wynikami badań. Tak jak cała praca napisana jest czytelnie i bardzo ładnym językiem.

**Spis piśmiennictwa** zawiera 448 cytowane pozycje przedstawione w sposób ujednoczony. Przywołane prace są starannie wybrane, dawne i aktualne związane z tematem pracy.

Przeredagowania wymaga:

- Autorka używa nazwy „estrogen”, a bardziej poprawne będzie albo wyszczególnienie, który z estrogenów – estradiol 17 $\beta$  czy estron lub stosowanie określenia „estrogeny” (strona 14, str.15, 16, 22, 23)
- strona 17- przy wymienianiu ras psów lepsze byłoby ujednoczenie językowe – wszystkie rasy są wymienione w języku polskim oprócz „brittany spaniel” czyli spaniel bretoński; dodatkowo dobrze byłoby wymieść, która odmiana cocker spaniela- angielski czy amerykański
- str.18 wers 16 niepotrzebny dwukropek po „wraz z”
- str 30 wers 9 – niepotrzebny znak „?” na końcu zdania

Podsumowując, pragnę podkreślić, że uwagi i spostrzeżenia mają jedynie charakter redakcyjny, w żaden sposób nie umniejszając wartości merytorycznej pracy. Na podkreślenie i docenienie zasługuje aktualność tematyczna przedstawionego zagadnienia, zwięzłość dysertacji i wartość aplikacyjna. Stwierdzam, że Pani lek wet. Paulina Golach wykazała odpowiedni poziom przygotowania do prowadzenia działalności naukowo-badawczej. Analiza objęta tematem rozprawy doktorskiej jest oparta na wystarczającym materiale chorych zwierząt i została przeprowadzona bardzo starannie, kompetentnie, z dużym nakładem pracy. Jej wyniki mają znaczenie zarówno poznawcze jak i praktyczne. Wyrażam nadzieję, że będzie Ona kontynuowała badania nad procesami nowotworowymi gruczołu sutkowego, nie tylko u suk, gdyż jest to temat cały czas aktualny i nadal nie do końca poznany.

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca doktorska wnosi istotne elementy do nauki, spełniając wszystkie warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytułach naukowych oraz stopniach i tytułach w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) w zw. z art. 179 ust.3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. z późn. zm.

Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z dn. 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669 z późn. zm.). Ze względu na innowacyjny charakter badań nad procesami nowotworowymi gruczołu sutkowego u psów oraz naukowego i praktycznego znaczenia uzyskanych wyników wnioskuję o wyróżnienie pracy lek.wet. Pauliny Gołach stosowną nagrodą.

W związku z powyższym przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie Pani lek. wet. Pauliny Gołach do dalszych etapów postępowania mającego na celu nadanie stopnia naukowego doktora.

A handwritten signature in blue ink, reading "Jacek Hyciura". The signature is written in a cursive style and is positioned diagonally on the page.