

Lublin, 02.06.2023 r.

dr hab. Wojciech Łopuszyński, profesor uczelni
Katedra Patomorfologii i Weterynarii Sądowej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Recenzja

rozprawy 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”
wykonanej

w Zakład Fizjologii Zwierząt, Katedry Biostruktury i Fizjologii Zwierząt
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu
pod kierunkiem promotora dr hab. Bożeny Króliczewskiej, prof. uczelni
oraz promotora pomocniczego dr n. wet. Jolanty Bujok

Prezentowaną ocenę dysertacji 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” wydaję w związku
z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia
21.03.2023 r.

Powstanie nowotworu jest procesem wieloetapowym. Czynniki rakotwórcze przeważnie
nie wywołują bezpośrednio rozwoju nowotworu, ale indukują powstawanie endogennych
czynników pośrednich, których oddziaływanie zapoczątkowuje w komórce lub grupach komórek
proces transformacji nowotworowej. W organizmach zwierząt i człowieka funkcjonuje również
szereg naturalnych mechanizmów antykancerogennych, w których uczestniczą między innymi
witaminy C i E, glutation oraz szereg enzymów takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza
czy peroksydaza glutationowa, które aktywnie unieczynnają lub osłabiają szkodliwe wpływy
kancerogenów. Wytwarzanie reaktywnych form tlenu będących naturalnym produktem tlenowego
metabolizmu komórek odgrywa ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu wielu procesów
komórkowych. Zaburzenie równowagi między wytwarzaniem reaktywnych form tlenu,



a wydajnością systemów antyoksydacyjnych prowadzi do wystąpienia stresu oksydacyjnego, co skutkuje uszkodzeniami ważnych makrocząsteczek komórkowych, tj. DNA, białek i lipidów. Istnieje wiele przesłanek wskazujących na udział reaktywnych form tlenu w transformacji nowotworowej komórek. Reakcja ostrej fazy stanowi natomiast element odporności nieswoistej i obejmuje najwcześniej zachodzące zmiany w odpowiedzi na uszkodzenie tkanek. Białka ostrej fazy to grupa białek, które w badaniach laboratoryjnych są cennymi wskaźnikami obecności stanu zapalnego w organizmie. Rola zmian ilościowych i jakościowych białek ostrej fazy w przebiegu procesu nowotworowego nie jest do końca poznana.

Doktorantka wybierając, jako materiał do badań suki z nowotworami gruczołu sutkowego postanowiła ocenić zmienność parametrów morfologicznych i biochemicznych, równowagi oksydacyjno-redukcyjnej oraz stężeń białek ostrej fazy we krwi przed i po zabiegu mastektomii.

Wybór tematu pracy doktorskiej należy uznać za trafny i aktualny, za czym przemawiają zarówno dane epidemiologiczne jak i względy praktyczne. Nowotwory gruczołu sutkowego należą do najczęściej występujących nowotworów u suk wykazując pod względem histologicznym i klinicznym wiele podobieństw do nowotworów piersi u kobiet. Dotychczas przeprowadzono niewiele badań dotyczących oznaczenia parametrów stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego w odniesieniu do nowotworów gruczołu sutkowego suk, jak również nieznana jest rola tych wskaźników w etiopatogenezie i przebiegu choroby nowotworowej.

Przesłana do recenzji praca liczy 173 strony maszynopisu i zawiera spis treści oraz tekst podzielony na rozdziały: wstęp, cel badań, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz bibliografię liczącą aż 448 pozycji piśmiennictwa, a także 8 rycin i 44 tabele umieszczone w tekście pracy i ujęte w osobnym spisie.

W obszernym wstępie, zawartym na 32 stronach i podzielonym na podrozdziały, doktorantka charakteryzuje nowotwory gruczołu sutkowego suk uwzględniając najnowsze informacje dotyczące ich epidemiologii, etiologii i patogenezy, ze szczególnym uwzględnieniem wpływu zabiegu owariohisterektomii oraz prezentuje ich klasyfikację kliniczną i histopatologiczną. Wnikliwie opisuje również zagadnienie stresu oksydacyjnego i jego wpływ na rozwój nowotworów gruczołu sutkowego, a także rolę białek ostrej fazy, jako markerów stanu zapalnego i ich wykorzystanie w ocenie zaawansowania procesu nowotworowego. Czytając wstęp odnosi się wrażenie, że Doktorantka przygotowała się bardzo starannie i wnikliwie do realizacji zadania badawczego, o czym świadczy obszernie cytowana, naukowo opracowana, aktualna literatura. Zaproponowana forma jest poprawna i wyczerpująca, dzięki czemu czytelnik zostaje



zaznajomiony z zagadnieniami związanymi z problematyką badawczą. Odnoszę jednak wrażenie, że informacje zawarte w podrozdziałach 1.1.1 „Budowa i rozwój gruczołu sutkowego”, 1.1.2. „Funkcja gruczołu sutkowego” i 1.3. Molekularne mechanizmy rozwoju nowotworów gruczołu sutkowego” zostały przedstawione zbyt obszernie i nie mają bezpośredniego związku z wykonywanymi przez Doktorantkę badaniami.

Szereg wątpliwości i pewnego rodzaju dezorientację czytającego budzi natomiast sposób w jaki zredagowano cel badań w powiązaniu z tytułem pracy oraz informacjami zawartymi w rozdziale: „Materiał i metody”. Pierwsza wątpliwość dotyczy nomenklatury przedmiotu badań. W tytule pracy mowa jest o nowotworach gruczołu mlekowego, podczas gdy w celu badań i pozostałych rozdziałach stosowany jest termin nowotwory gruczołu sutkowego. Ponadto, jako cel szczegółowy Doktorantka wskazuje przeprowadzenie badań i analiz u suk przed i po zabiegu hemimastektomii/mastektomii poddanych lub nie jednoczesnemu zabiegowi owariohisterektomii na co nie wskazuje tytuł pracy. Zdaniem recenzenta rozbieżności te winny być skorygowane. Druga, wątpliwość dotyczy sformułowania odnoszącego się do jednoczesnego przeprowadzenia zabiegu owariohisterektomii podczas zabiegu mastektomii. Czytając cel badań odnosi się wrażenie, że podczas chirurgicznego usuwania nowotworu gruczołu sutkowego, u części suk jednocześnie wykonany będzie zabieg owariohisterektomii, a u części takiego zabiegu nie będzie się wykonywać. Czyli do badań kwalifikowanie były suki niepoddane wcześniej zabiegowi owariohisterektomii. Takie same informację wypływają z analizy ryc 5. „Schemat postępowania w planowaniu i przebiegu badań”, umieszczonej na str. 40 w rozdziale „Materiał i metody”. Tymczasem z informacji zawartej na str. 43 wynika, że 12 z 16 zwierząt z grupy badawczej B1 miało zachowane gonady z macicą. Jak rozumiem pozostałe 4 były poddane kastracji wcześniej, co wykluczało możliwość dokonania wyboru przeprowadzenia zabiegu owariohisterektomii lub pozostawienia macicy i gonad podczas zabiegu mastektomii. Znajduje to również potwierdzenie na str. 59 w rozdziale „Wyniki”. Dodatkowo liczebność grupy badawczej B1 w opisie na stronie 43 i w tabeli 1 na str. 42 wynosi 16 osobników, podczas gdy na wspomnianej rycinie 5. wynosi 22 osobniki. Przedstawione powyżej wątpliwości skłaniają do zadania pytań. Czy zwierzęta z grupy badawczej były kastrowane jednocześnie z zabiegiem mastektomii? Jeśli tak to co stanowiło naukową przesłankę i kryterium do przeprowadzenia lub nie przeprowadzenia zabiegu owariohisterektomii jednocześnie z zabiegiem mastektomii? Jeżeli natomiast część suk została poddana zabiegowi owariohisterektomii wcześniej (tzn. przed zabiegiem mastektomii) to co stanowiło przesłankę dla porównywania ocenianych parametrów



badan laboratoryjnych krwi, stresu oksydacyjnego i ostrego zapalenia pomiędzy grupą suk kastrovani i niekastrovani jeśli wszystkie samice zakwalifikowane do badan (jak rozumiem te niekastrowane) znajdowały się w fazie anestrus cyklu płciowego. Doktorantka podaje też, że fazę cyklu płciowego ustalono na podstawie danych z wywiadu (informacja ta znajduje się str. 43 rozdziału „Materiał i metody”) i odnosi się ona zarówno do suk z grupy kontrolnej jaki i badawczej. W tym miejscu pragnę wyrazić wątpliwość odnośnie wywiadu jako jedyne go kryterium do ustalenia fazy anestrus cyklu rujowego w badaniach naukowych. Kolejne pytanie dotyczy przesłanki dla rozróżnienia zabiegu hemimastectomii od mastectomii. W pracy nie natrafiono na porównanie wpływu rozległości zabiegu chirurgicznego usunięcia nowotworu gruczołu sutkowego na oceniane parametry.

Rozdział „Materiał i metody” w części dotyczącej metodyki badan napisany jest poprawnie. Znajdujemy w min szczegółowy opis pobierania materiału do badan laboratoryjnych i histopatologicznych, zastosowane w ocenie nowotworów klasyfikacje histopatologiczne i metodykę oznaczeń poszczególnych parametrów morfologicznych i biochemicznych krwi, statusu antyoksydacyjnego oraz stężeń białek ostrej fazy. Moje uwagi do tej części pracy odnoszą się natomiast do opisu metod statystycznych, w którym zabrakło informacji, czy była sprawdzona zgodność wartości poszczególnych zmiennych w poszczególnych analizowanych grupach z rozkładem normalnym. Wątpliwość ta wynika z analizy wartości niektórych parametrów uzyskanych w zastosowanych analizach. Np. w tabeli nr 13 średnie stężenie CRP w grupie B1 wyniosło 7,56 $\mu\text{g/mL}$ przy odchyleniu standardowym 14,05, a w grupie B2 51,48 $\mu\text{g/mL}$ z odchyleniem standardowym 61,61, co wskazuje na bardzo duży rozrzut danych. Ponadto uważam, że jako kryterium włączenia do grup badawczych należało uwzględnić rozpoznanie histopatologiczne nowotworu złośliwego. Z dalszej analizy rozprawy wynika bowiem, że zarówno w grupie B1 jak i B2 stwierdzono po jednym przypadku nowotworu niezłośliwego – gruczolaka prostego. Uwzględniając różnice pomiędzy nowotworami złośliwymi i niezłośliwymi, a w szczególności tempo i sposób wzrostu, zdolność do dawania przerzutów oraz tendencję do występowania martwicy, będącej ważnym czynnikiem stymulującym zapalenie, suki z nowotworami niezłośliwymi powinny być wyłączone z badan. Chyba że, zdiagnozowano by większą liczbę przypadków i utworzono odrębną grupę badawczą. Natomiast dodatkowym kryterium wyłączającym zwierzęta z badan winno być wcześniejsze usunięcie guza nowotworowego z gruczołu sutkowego, co umożliwiłoby utworzenie jak najbardziej jednolitej grupy badawczej. Tymczasem do grupy B2 włączono sukę, u której rok przed przystąpieniem



do badań wykonano zabieg hemimastektomii w związku z wykryciem zmian w gruczole sutkowym (brak informacji jaka zmiana została rozpoznana histopatologicznie). Skutkiem nieprecyzyjnie sformułowanego celu badań odnoszącego się w szczególności do terminu wykonania zabiegu owariohisterektomii jest dezorientacja czytającego odnośnie wydzielonych grup badawczych. W części pracy mówi się o sukach sterylizowanych i niesterylizowanych (np. str. 75, tabela 14. „Analiza porównawcza otrzymanych wyników badania morfologicznego krwi (średnia \pm SD) w grupie kontrolnej (K), uwzględniająca podział na samice sterylizowane (Ks) i niesterylizowane (Kns)”), a w innych miejscach o sukach przed i po zabiegu owariohisterektomii (np.: str. 87, podrozdział 4.8.5 „Statystyczna ocena stężenia produktów oksydacji we krwi suk przed i po zabiegu owariohisterektomii”). Tu powstaje następne pytanie. Czy i kiedy pobierano krew do badań od suk przed i po zabiegu owariohisterektomii? Zdaniem recenzenta wprowadzenie do pracy podziału na suki kastrowane i niekastrowane przy założeniu, że będą one w fazie anestrus było niepotrzebne przede wszystkim z uwagi na ich zbliżony status hormonalny. Potwierdziły to uzyskane wyniki analiz statystycznych niewykazujące różnic istotnych statystycznie w stosunku do większości badanych parametrów (wniosek nr 9). Zasadnym natomiast byłoby zrealizowanie założenia zawartego w celu badań, a mianowicie wykonanie u części suk jednocześnie z zabiegiem mastektomii zabiegu owariohisterektomii. Mogłoby to dostarczyć cennych informacji odnośnie przebiegu okresu pooperacyjnego w aspekcie oceny statusu antyoksydacyjnego i zapalenia po zabiegu chirurgicznym usunięcia nowotworu gruczołu sutkowego w zależności od wykonanego, bądź nie, równoległe zabiegu owariohisterektomii. Niestety, celu tego nie zrealizowano.

Następnym rozdziałem są „Wyniki”. Doktorantka przedstawia w nim bardzo szczegółowo dane kliniczne operowanych suk, wyniki oceny histopatologicznej usuniętych nowotworów z uwzględnieniem stopniowania ich złośliwości histologicznej, klasyfikacji TNM oraz stopnia zaawansowania klinicznego. W dalszej części znajdują się opracowane statystycznie wyniki badań morfologicznych i biochemicznych krwi oraz parametrów równowagi oksydacyjno-redukcyjnej i stężeń wybranych białek ostrej fazy. Pomimo, że ta część pracy wykonana jest bardzo starannie, a uzyskane wyniki prezentowane są w przejrzystych tabelach, nie mogę zgodzić się z przyjętym przez Doktorantkę sposobem porównywania wyników w tabelach nr 14-16, 18-20, 22-24, 26-28, 30-32, 34-36, w których wartości badanych parametrów w wydzielonych z grupy głównej dwóch podgrupach suk sterylizowanych i niesterylizowanych porównywane są z tymi samymi wartościami w grupie głównej, z której wydzielono wspomniane podgrupy.



Jako logiczne uznaję jedynie wyniki porównania wartości badanych parametrów pomiędzy podgrupami suk sterylizowanych i niesterylizowanych. Jednocześnie w wyniku zastosowanego podziału uwzględniającego zabieg owariohisterektomii, w grupach badawczych B1, B1' i B2 liczba osobników kastrowanych była zbyt mała aby można było tę grupę uwzględnić w analizie statystycznej, co znacznie obniża wartość pracy.

Uzyskane dane, zarówno liczbowe, jak i natury strukturalnej, odnoszące się do patologii nowotworów gruczołu sutkowego badanych zwierząt poddano dyskusji tematycznej, która stanowi zwartą całość. Omawiany rozdział w sposób wyróżniający konfrontuje wyniki własnych obserwacji z rezultatami uzyskiwanymi w różnych okolicznościach przez innych autorów. Doktorantka w zręczny sposób połączyła ze sobą i zinterpretowała uzyskane wyniki w logiczny i interesujący sposób. Zadanie to nie było łatwe ze względu na dużą liczbę przeprowadzonych analiz. Na uznanie zasługuję bardzo trafny dobór obszernie cytowanej i aktualnej literatury naukowej. W przeprowadzonej dyskusji autorka przedstawiła wyniki badań własnych w kontekście właściwie dobranych i cytowanych rezultatów uzyskanych przez innych autorów. Zaletą jej jest wnikliwa analiza zmienności poszczególnych parametrów również w kontekście obserwowanych zmian histopatologicznych, co wskazuje na dobrą znajomość problematyki będącej przedmiotem dysertacji doktorskiej. Tę część pracy, obok wstępu, oceniam najlepiej.

Interpretacja poczynionych obserwacji oparta na uzyskanych wynikach oraz skonfrontowanie ich z cytowanymi wynikami innych autorów upoważniły Doktorantkę do wysunięcia 9 wniosków obejmujących całokształt analizowanych badań. Zdanie wprowadzające do rozdziału „Wnioski” zawiera nieścisłość odnośnie okresu prowadzenia badań. Autorka stwierdza w nim, że wyniki i analizy „pokazują współzależność procesu zapalnego oraz stresu oksydacyjnego w przebiegu rozwoju choroby nowotworowej”, tymczasem w rzeczywistości nie śledzono przebiegu choroby nowotworowej u badanych suk, a jedynie dwukrotnie pobrano materiał do badań tj. przed i miesiąc po zabiegu mastektomii (w okresie remisji). Dlatego też we wnioskach nie powinno się odnosić otrzymanych wyników i ich analiz do rozwoju nowotworu, a raczej do procesu zdrowienia suk. Wniosek nr 8 w części odnoszącej się do wskaźników rokowniczych jest moim zdaniem zbyt daleko idący. Autorka nie przeprowadziła analizy przebiegu choroby nowotworowej do wykonania zabiegu mastektomii w związku z czym nie może wnioskować o wartości rokowniczej NLR oraz MGPS w rozwoju choroby nowotworowej. Nie przeprowadziła również analizy przebiegu okresu pooperacyjnego u leczonych zwierząt



z zastosowaniem statystycznej analizy przeżycia, nie ma więc podstaw do wnioskowaniu o prognostycznej wartości wskaźnika przeżycia w przypadku AGR.

Dodatkowo mam kilka uwag odnoszących się do terminologii i błędów literowych w całej pracy:

- str. 8. „... hemangiosarkomy, chłoniaka, guzów komórek tucznych i osteosarkomy.”, powinno być: naczyńniakomiesaka, chłoniaka, guzów komórek tucznych i kostniakomięsaka (ujednolicenie nazewnictwa),

- str. 10. – termin „listwa mleczna” nie jest terminem anatomicznym

- str. 19. - „... kalponinie i bałku p53...” - czy nie powinno być kalponinie i bałku p63?

- str. 62, rycina 7. – „... zmiany w większej ilości gruczołów...” powinno być zmiany w większej liczbie gruczołów.

- str. 91, tabela 37 – liczebność grupy B2 w kolumnie 2 powinna wynosić 6, a nie 16.

Reasumując, mimo pewnych krytycznych uwag i zastrzeżeń wynikających przede wszystkim ze sposobu planowania badań, biorąc pod uwagę ogrom włożonej pracy, a także oryginalność i aktualność poruszanej tematyki stwierdzam, że przedłożona mi do oceny dysertacja doktorska lek. wet. Pauliny Golach spełnia wymogi i warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art.179 ust.1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. - przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz.1669).

W związku z powyższym zgłaszam wniosek do Wysokiej Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. wet. Pauliny Golach do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry Patomorfologii i Weterynarii Sądowej

dr hab. Wojciech Łopuszyński, prof. uczelni

