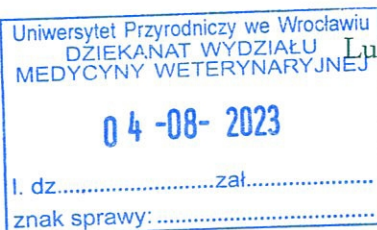


dr hab. Roman Dąbrowski, prof. uczelni
Katedra i Klinika Rozrodu Zwierząt
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
UP w Lublinie



Lublin, 03.08.2023 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani lek. wet. Barbary Granosik

pt.: „Ocena skuteczności wybranych metod przedoperacyjnego leczenia nowotworów listwy mleczej u suk”

Podstawą formalną recenzji jest uchwała nr 41.2023.Wet. Rady Dyscypliny Weterynaria, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 27 czerwca 2023 roku.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska została wykonana pod kierownictwem naukowym Pana dr hab. Michała Dziecioła, profesora uczelni, z Katedry Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Rozprawa doktorska lek. wet. Barbary Granosik została przygotowana bardzo starannie i liczy łącznie 120 ponumerowanych stron wydruku komputerowego. Składa się z 12 głównych rozdziałów zatytułowanych: Wstęp, Cele pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie w j. polskim i angielskim, Spis tabel i rycin, Literatura, Publikacje oraz Oświadczenia współautorów. W skład w/w rozdziałów głównych wchodzi liczne podrozdziały.

Z załączonej dokumentacji wynika, że część wyników badań dotyczących grupy badawczej przedstawionych w niniejszej pracy doktorskiej zostało opublikowanych w pracy naukowej autorstwa Pieczewska i wsp. *Animals* 2021, 11, 527.

Podejmowana przez Panią lek. wet. B. Granosik problematyka badawcza dotyczy bardzo aktualnego problemu klinicznego jakim jest terapia nowotworów gruczołu mlekowego u suk. Doktorantka podejmuje się próby oceny skuteczności wybranych metod przedoperacyjnego leczenia nowotworów listwy mleczej u samic psów. Jak wiadomo, zmiany nowotworowe w obszarze listwy mleczej, to szczególnie częsty i istotny problem lekarza weterynarii w jego codziennej praktyce lekarsko-weterynaryjnej. Nowotwory bowiem, należą do najgroźniejszych chorób u ludzi i zwierząt, zagrażających ich życiu. Pod względem częstości występowania nowotwory gruczołu mlekowego u suk zajmują drugie miejsce po nowotworach skóry. Na podstawie licznych danych piśmiennictwa wiadomo, że zdecydowana większość guzów przebadanych histopatologicznie to nowotwory o charakterze



złośliwym, spośród których najczęściej diagnozowany jest rak cewkowy. Natomiast w przypadku nowotworów łagodnych - niezłośliwy guz mieszany. Dostyć rzadko diagnozowany rak zapałny jest najbardziej agresywną postacią nowotworu sutka u psów, o wyjątkowo niskim wskaźniku przeżywalności u tych zwierząt.

Rozpoznanie wstępne choroby nowotworowej gruczołu mlekowego u suk polega na przeprowadzeniu badania klinicznego i wykonaniu podstawowych badań dodatkowych takich jak biopsja cienkoigłowa, badanie ultrasonograficzne jamy brzusznej i klatki piersiowej oraz radiologiczne. Są to badania kwalifikujące chorego pacjenta do wybranej przez lekarza metody postępowania terapeutycznego. Jednakże, ostateczne rozpoznanie charakteru nowotworu można dokonać dopiero na podstawie badania histopatologicznego wyizolowanej chorobowo zmienionej listwy mleczej, które możliwe jest dopiero po chirurgicznym usunięciu całego guza.

Terapia nowotworu gruczołu mlekowego jest trudna, zależy od wielkości i rodzaju guza. Od wielu lat u psów ze złośliwymi nowotworami sutka stosuje się klasyfikację kliniczną opracowaną na podstawie oceny wielkości ogniska pierwotnego (T – tumor), badania regionalnych węzłów chłonnych (N – noduli) i występowania przerzutów (M – metastasis) - system TNM. W zależności zatem od stadium zaawansowania klinicznego, we wstępnym badaniu klinicznym można po części określić rokowanie co do przebiegu choroby jak i podjąć wybraną próbę jej terapii.

Powszechnie znane są dwie metody leczenia nowotworów listwy mleczej u suk: chirurgiczna i farmakologiczna. Metoda chirurgiczna jest uznawana za skuteczną i jednocześnie najtańszą formę leczenia. Chirurgiczne metody leczenia są niekiedy jedyną szansą na odzyskanie powrotu do zdrowia chorego pacjenta. Stosuje się je także w celu zmniejszenia cierpienia chorego zwierzęcia i poprawy jakości jego życia, gdy nowotwór jest w bardzo zaawansowanym stadium.

Z kolei, metoda farmakologiczna związana jest z faktem, iż u suk w zdrowej tkance gruczołu mlekowego oraz u samic z nowotworami w jej obrębie zaobserwowano ekspresję różnych receptorów, spośród których receptory dla estrogenów (ER) i progesteronu (PR) wymieniane są najczęściej. Pierwsze badania opisujące zależność występowania nowotworów gruczołu mlekowego od hormonów płciowych zostały opublikowane w 1889 roku i od tamtej pory powyższy obszar badawczy jest w dalszym ciągu podejmowany i dokumentowany przez licznych badaczy. Zatem fakt, iż guzy gruczołu mlekowego u suk są hormonozależne sprawia, że ich terapia może być przeprowadzona metodą farmakologiczną.

Z dostępnych danych literaturowych wynika, że inną, w niektórych przypadkach skuteczną metodą terapii nowotworów gruczołu mlekowego u suk jest chemioterapia - leczenie cytotoksyczne (powodujące śmierć komórek). Polega ona na aplikacji środków cytostatycznych, działających na funkcje życiowe komórek. Jednakże jest to metoda opisana potocznie jako leczenie systemowe,

któremu poddawany jest cały organizm cierpiącego psa.

Z kolei leczenie promieniowaniem jonizującym (radioterapia), jest najczęściej stosowana w połączeniu z innymi metodami leczenia onkologicznego. W medycynie ludzkiej jest ona rutynowo wręcz stosowana jako kontynuacja leczenia chirurgicznego lub jako terapia paliatywna, podczas gdy w medycynie weterynaryjnej, brak jest jak dotąd danych piśmiennictwa opisujących tą metodę jako aplikowaną w tego typu schorzeniach u psów.

Wobec wszystkich powyższych faktów, lek. wet. Barbara Granosik podejmuje próbę oceny skuteczności wybranych metod przedoperacyjnego leczenia nowotworów gruczołu mlekowego u suk, ograniczając tym samym ryzyko związane z procedurą chirurgiczną, która w niektórych przypadkach niesie za sobą ryzyko zagrożenia życia pacjenta.

Informacje stanowiące aktualną wiedzę dotyczącą podejmowanej problematyki badawczej, lek. wet. B. Granosik w sposób usystematyzowany i przejrzysty przedstawia w rozdziale Wstęp, który składa się z kilkunastu (osiemnastu) podrozdziałów. Autorka opisuje budowę gruczołu mlekowego u suk oraz wprowadza czytającego w problematykę związaną z chorobami, które mogą być diagnozowane w obrębie gruczołu mlekowego, kładąc istotny nacisk na nowotwory listwy mlecznej i ich hormonozależność. W sposób czytelny przedstawia klasyfikację histologiczną nowotworów powołując się na obowiązujący od 2011 roku ich podział. Obejmuje on nowotwory niezłośliwe oraz poszczególne typy histologiczne nowotworów złośliwych (nowotwory pochodzenia nabłonkowego – np. raki, nowotwory pochodzenia mezenchymalnego – mięsaki, złośliwe guzy mieszane), zmiany rozrostowe/dysplastyczne, guzy brodawki sutka. Autorka ocenianej pracy wskazuje, iż klasyfikacja ta została uznana jako niezależny wskaźnik prognostyczny, skorelowany z zachowaniem biologicznym tych nowotworów. W kolejnych podrozdziałach Doktoranta opisuje metody diagnostyczne i terapeutyczne guzów gruczołu mlekowego u suk, nawiązując jednocześnie do alternatywnej metody ich leczenia jaką jest zastosowanie zimnej plazmy atmosferycznej (ZPA). W tej części pracy Doktorantka w większości cytuje piśmiennictwo z ostatnich 15 lat. Większość pozycji jest anglojęzyczna. Z takiego doboru piśmiennictwa, wynika, że lek. wet. B. Granosik bardzo dobrze opanowała warsztat badawczy, co sprawia iż tę część dysertacji oceniam wysoko. Uważam również, że łącznie z rozdziałem „Cele pracy” w sposób jednoznaczny wskazuje na potrzebę podjęcia badań, które są prezentowane przez Doktorantkę w ocenianej dysertacji doktorskiej.

Oceniając krytycznie tą część pracy uważam, iż podrozdział 1.5 powinien stanowić kontynuację podrozdziału wcześniejszego - 1.4.5, co czytającemu ułatwiłoby szybsze zrozumienie ciągłości wypowiedzi Doktorantki. Uważam również, że tytuł podrozdziału 1.5.1 powinien brzmieć np. Zimna plazma atmosferyczna – dane piśmiennictwa. Moja powyższa uwaga wynika z faktu, iż w tej części dysertacji Doktorantka dokonuje przeglądu danych literaturowych bezpośrednio związanych z Jej

celem badawczym. Wobec powyższego, wydaje się być słuszne podzielić ten podrozdział (1.5.1) na dwa odrębne: jako przegląd piśmiennictwa, w którym opisane zostałyby wykorzystanie ZPA w codziennej praktyce lekarskiej oraz hipoteza badawcza. Taki układ byłby bardziej czytelny i łatwo wprowadzający czytającego w kolejny rozdział (nr 2), w którym Doktorantka jasno i czytelnie precyzuje dwa cele swojej pracy doktorskiej. Są nimi: 1) ocena wpływu redukcji powierzchni guza nowotworowego, będącego efektem terapii z wykorzystaniem aglepristonu, na wyniki pomiaru gęstości tkanki guza, jako parametru wykorzystywanego do różnicowania łagodnych i złośliwych typów nowotworów listwy mleczej u suk. 2) ocena skuteczności alternatywnej formy terapii guzów nowotworowych opartej o oddziaływanie zimnej plazmy atmosferycznej.

Oba cele są interesujące, jednakże cel pierwszy, w którym Autorka planuje porównać gęstość tkanek nowotworowych przed i po leczeniu prep. Alizin z praktycznego punktu widzenia uważam za wysoce obiecujący. Wprowadzenie bowiem nowych metod diagnostycznych do diagnostyki i terapii każdej jednostki chorobowej u zwierząt, a zwłaszcza choroby nowotworowej jest bardzo istotne dla praktykującego lekarza weterynarii.

W kolejnym rozdziale „Materiał i metody” lek. wek. B. Granosik informuje czytającego, iż zakres prac przewidzianych w ramach pracy doktorskiej był poddany ocenie Komisji Etycznej do spraw Doświadczeń na Zwierzętach. Wszystkie procedury zostały zatwierdzone przez II Lokalną Komisję Etyczną przy Uniwersytecie Przyrodniczym we Wrocławiu (pozwolenie nr 27/2018 oraz 26/2020). Podjęte w tej części pracy badania zostały w pełni zrealizowane przy użyciu adekwatnych do tego celu metod badawczych.

W sposób jasny i czytelny Doktorantka przedstawia założenia dotyczące zakresu badań, które zostały wykonane na reprezentowanej liczbie samic psów ($n=26$) różnych ras oraz mieszańcach będących pacjentami Katedry Rozrodu z Kliniki Zwierząt Gospodarskich, które w oparciu o dane uzyskane z wywiadu oraz wyników badań dodatkowych podzielono na dwie grupy. Grupę I ($n=10$, w wieku od 6 do 10 lat) stanowiły suki, które w przeszłości nie zostały poddane zabiegowi owariohisterektomii, a stężenie progesteronu w tej grupie suk wynosiło powyżej 5 ng/ml. Dodatkowo, badaniem klinicznym stwierdzono pojedyncze zmiany na listwie mleczej, jednak bez oznak stanu zapalnego gruczołu mlekowego. Zwierzęta te były zakwalifikowane do leczenia preparatem Alizine, Virbac, Francja. Grupę II ($n=14$, w wieku od 6 do 19 lat) stanowiły suki, które w przeszłości miały wykonany zabieg owariohisterektomii, a stężenie progesteronu było poniżej 1 ng/ml. Dodatkowo, posiadały pojedyncze mierzalne zmiany w obrębie gruczołu mlekowego, jednak bez oznak stanu zapalnego gruczołu mlekowego. Samice z tej grupy zakwalifikowano do terapii alternatywnej – z wykorzystaniem ZPA.

Z punktu oceny recenzenta uważam, że w tej części pracy (w podrozdziale 3.1.1) brakuje informacji na

jakiej podstawie część suk nie została dopuszczona do zaplanowanych badań (zostały zdyskwalifikowane). Proszę wyjaśnić co autorka miała na myśli „choroby współistniejące”. Uważam również, iż mając na uwadze fakt, że masa ciała odgrywa istotną rolę w rozwoju nowotworu u suk, w tym miejscu powinna zostać zamieszczona informacja o wadze psów zakwalifikowanych do badań oraz podanie ich średniej oceny kondycji ciała (BCS).

W większości pozostałych podrozdziałów, Doktorantka czytelnie opisuje wykorzystane w przebiegu doświadczenia metody i schemat badań in vivo oraz in vitro. Świadczy to o Jej dobrze przygotowanym warsztacie zarówno doświadczalnym jak i naukowym. W tej części pracy jak również i w kolejnych jej częściach powtarzane są jednakże kilkakrotnie informacje o liczbie psów objętych doświadczeniem. Moim zdaniem jest to zbędne ponieważ już na samym wstępie tego rozdziału te dane zostały zamieszczone. Brakuje również informacji w jaki sposób i czym mierzono zmiany nowotworowe w płaszczyźnie dwuwymiarowej. Opisany w podrozdziale 3.3.1 wywiad nie powinien być podzielony na części ogólną, rozrodową oraz dotyczącą zmian na listwie mlecznej. Powszechnie przyjmuje się, iż badanie kliniczne układu rozrodczego oraz rozpoznanie danej jednostki chorobowej u zwierząt opiera się na wywiadzie ginekologiczno-położnicznym, który obejmuje wszystkie aspekty stanu ogólnego pacjenta związane z układem rozrodczym, w tym listwy mlecznej oraz badania dodatkowe. W tej części pracy niepotrzebne są również ryciny 2-5, które przedstawiają przykładowe obrazy badań dodatkowych, do których brakuje odnośników w pracy.

Przeprowadzone analizy statystyczne przy użyciu programu Statistica 13 uzyskanych wyników badań są adekwatne do zamierzonego celu. Stosuje się je powszechnie w tego typu badaniach i nie budzą one merytorycznych zastrzeżeń. Sugeruję jednakże podanie więcej danych odnośnie samego programu przed oddaniem pracy do druku np. Software Inc., USA.

Wyniki swoich badań, Doktorantka przedstawia w postaci rycin i tabel. Stanowią one podsumowanie wszystkich ocenianych parametrów laboratoryjnych, układają się w logiczną i konsekwentną całość, dokumentują poprawność oraz właściwość wyboru metodyki. Wyniki mają charakter nowatorski, są interesujące w aspekcie zarówno poznawczym jak i aplikacyjnym, stanowią duży wkład naukowy w dziedzinie patologii procesów rozrodczych u suk, a zwłaszcza w aspekcie diagnostyki różnicowej łagodnych i złośliwych nowotworów gruczołu mlekowego u suk. W części krytycznej tego rozdziału rozprawy, muszę zwrócić uwagę na brak analizy statystycznej wyników badań morfologicznych i biochemicznych pomiędzy 1 i 14 dniem obserwacji w obu grupach suk. Przykładowo, z zamieszczonych wyników w tabelach 6 i 7 wynika, że średnia arytmetyczna stężenia aminotransferazy alaninowej (ALT) w 1 dniu obserwacji wynosi $72,33 \pm 43,73$ (U/L), podczas gdy w 14 dniu doświadczenia $62,87 \pm 43,39$ (U/L). Podobne pytanie zachodzi w przypadku liczby płytek krwi (PLT). Przykładowo, z zamieszczonych wyników w tabelach 9 i 10 wynika, iż średnia arytmetyczna

PLT w 1 dniu badania wynosiła $305,43 \pm 127,98 \times 10^9/L$, podczas gdy 14 dnia obserwacji ich wartość spadła do $293,50 \pm 107,56 \times 10^9$. Czy w obu przypadkach były to spadki statystycznie istotne? Proponowałbym również zamieścić w tabelach numer 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12 jedynie średnią arytmetyczną pojedynczych wyników i ich odchylenie standardowe wraz z wartościami min-max danego oznaczanego parametru w obu grupach zwierząt, zamiast wpisywania do tabel wszystkich, poszczególnych wyników badań. Brakuje również w tabelach referencji na którą powinna się Doktorantka powołać podając wartości fizjologiczne dla psów przy poszczególnych oznaczanych parametrach. W każdym podrozdziale opisującym wyniki badań, powinna być zamieszczona informacja typu „Wyniki badań zostały zobrazowane w tabeli numer, rycina numer”. Uważam również, iż wyniki analizy endokrynologicznej krwi powinny być zobrazowane w formie tabeli, podobnie jak wyniki badań morfologicznych czy biochemicznych, zwłaszcza w przypadku suk z grupy I. Ponadto, brakuje opisu wyników badań klinicznych takich jak: ocena kondycji ogólnej zwierząt, pomiaru temperatury, tętna, oddechów, wyglądu błon śluzowych naturalnych otworów ciała, osłuchiwanie klatki piersiowej oraz omacywania jamy brzusznej, zmian na listwie mlecznej (ich lokalizacja, wielkość, kształt, tkliwość oraz konsystencja), o których Doktoranta pisze w podrozdziale 3.3.2. Proszę o wyjaśnienie co Autorka miała na myśli „stan obecny zwierząt”. Proponuję również posługiwać się terminologią –ciepłota wewnętrzna ciała.

W rozdziale „Dyskusja” na 19 stronach wydruku komputerowego Doktorantka konfrontuje wyniki badań własnych z nowoczesnym trafnie dobranym piśmiennictwem, łącząc w logiczne ciągi informacyjne wiadomości dotyczące tematu badawczego jakim jest ocena skuteczności wybranych metod przedoperacyjnego leczenia nowotworów gruczołu mlekowego u suk. Polemika z innymi badaczami zajmującymi się podobną problematyką badawczą nadaje dodatkowego waloru naukowego i tak wysoko ocenianej przeze mnie pracy doktorskiej. W wielu przypadkach Pani lek. wet. B. Granosik wskazuje na oryginalność własnych wyników badań oraz sugeruje możliwość przydatności ich wykorzystania w codziennej praktyce klinicznej. W części krytycznej tej części pracy uważam jednakże, że niektóre informacje w niej zawarte powinny być zamieszczone w części wprowadzającej – we wstępie pracy. Tym samym, dyskusja koncentrowałaby się tylko i wyłącznie na polemice Autorki z wynikami badań innych badaczy podejmujących podobną problematykę badawczą, a nie na przeglądzie piśmiennictwa.

Reasumując uważam, że rozdział „Wyniki” i „Dyskusja” układają się w logiczną, konsekwentną i merytoryczną całość. Stanowią dopełnienie wcześniejszych rozdziałów dysertacji.

Wnioski w liczbie 7 wynikające z uzyskanych wyników badań, są sformułowane właściwie, poprawnie i dokumentują poprawność założeń badawczych Autorki, jak i trafność wyboru metodyki. Mają również duże znaczenie dla postępu nauki w zakresie rozrodu zwierząt oraz procesu

terapeutycznego w aspekcie podjęcia próby niechirurgicznego leczenia nowotworów

gruczołu mlekowego u suk. Chciałbym w tym miejscu wyraźnie podkreślić wagę wniosków nr 2 i 3. Z praktycznego punktu widzenia są one bardzo interesujące i nowatorskie. Po pierwsze, wskazują na fakt, iż w praktyce lekarsko-weterynaryjnej sonoelastografia może być wykorzystana jako metoda diagnostyczna umożliwiająca nieinwazyjne rozpoznanie łagodnych guzów nowotworowych gruczołu mlekowego u suk. Po drugie zmniejszenie rozmiarów zmian nowotworowych, będące konsekwencją terapii prep. Alizin, nie wpływa na gęstość tkanki nowotworowej, a przez to można uznać, iż nie zaburza diagnostyki sonoelastograficznej, wykorzystanej w rozpoznaniu różnicowym łagodnych i złośliwych guzów sutka u suk.

Rozdział „Literatura” obejmuje 211 pozycji piśmiennictwa, które w większości jest angiłojęzyczne. W części krytycznej tej części dysertacji zwracam uwagę, iż niektóre przytoczone wykazy bibliograficzne są niepełne, co przejawia się np. brakiem podania Volumenu, Numeru czasopisma czy też stron periodyku, na których została opublikowana publikacja. W niektórych pracach brakuje cyfrowego identyfikatora dokumentu elektronicznego (DOI), np. pozycja 15, 38 piśmiennictwa.

Krótkie, zwięzłe streszczenia w j. polskim i angielskim stanowią dopełnienia w całości tej bardzo wartościowej i interesującej pracy doktorskiej.

Oceniając rozdział „Spis treści” rozprawy doktorskiej zauważyłem błąd dotyczący numeracji rozdziałów. Z załączonej do recenzji dokumentacji wynika, że głównych rozdziałów dysertacji jest 11, podczas gdy Autorka w dokumentacji podaje ich 12.

Wszystkie zauważone powyższe uwagi nie umniejszają wysokiej i pozytywnej oceny przedstawionej mi do recenzji pracy.

Wniosek końcowy

Podsumowanie ocenianej przeze mnie rozprawy doktorskiej pt. „Ocena skuteczności wybranych metod przedoperacyjnego leczenia nowotworów listwy mlekowej u suk” autorstwa Pani lek. wet. Barbary Granosik pod kierownictwem naukowym Pana dr hab. Michała Dziecioła, profesora uczelni, z Katedry Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich, Wydziału Medycy Weterynaryjnej, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu jest wysoce pozytywne. Przedłożona praca jest bardzo wartościowa ze względu na podjęty przez Doktorantkę temat badawczy dotyczący oceny skuteczności wybranych metod przedoperacyjnego leczenia nowotworów gruczołu mlekowego u suk. Jasno przedstawione cele pracy zostały w pełni zrealizowane.

Przedstawione uwagi i uchybienia mają charakter dyskusyjny i redakcyjny, do których Doktorantka będzie mogła się odnieść podczas publicznej rozprawy. Nie obniżają one merytorycznej wartości pracy jako całości. Oceniana rozprawa doktorska przedstawia znaczne wartości aplikacyjne, a otrzymane wyniki, przegląd literatury i dyskusja istotnie wzbogacają wiedzę naukową w tej dziedzinie

wartości pracy jako całości. Oceniana rozprawa doktorska przedstawia znaczne wartości aplikacyjne, a otrzymane wyniki, przegląd literatury i dyskusja istotnie wzbogacają wiedzę naukową w tej dziedzinie badań. . Uważam zatem, że rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r. Nr 65 poz. 595 z późn. zm.) i stanowi podstawę do nadania stopnia naukowego doktora. Przedkładam zatem wniosek Radzie Dyscypliny Weterynarii, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o przyjęcie pracy i dopuszczenie lekarza weterynarii Barbary Granosik do dalszych etapów postępowania w przewodzie doktorskim. Ponadto, duża wiedza teoretyczna oraz warsztat badawczy Pani lek. wet. Barbary Granosik w posługiwaniu się zastosowanymi technikami badawczymi, a także bardzo szeroki wachlarz oznaczeń i nowatorskich technik badawczych, uzyskane wyniki badań i ich całościowe zestawienie, a także wyciągnięte wnioski, zwłaszcza wnioski 2 i 3 mające charakter aplikacyjny, upoważniają mnie do wystąpienia do Rady Dyscypliny Weterynarii, UPWr o wyróżnienie jej stosowną nagrodą.



dr hab. Roman Dąbrowski, prof. uczelni