AUTOREFERAT

dr n. wet. Anna Śmiech

KATEDRA I KLINIKA CHORÓB WEWNĘTRZNYCH ZWIERZĄT

ZAKŁAD PATOMORFOLOGII I WETERYNARII SĄDOWEJ

WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY W LUBLINIE

Lublin 2019

Imię i nazwisko

Anna Śmiech

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

22.06.1992 r. – tytuł lekarza weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza w Lublinie.

19.03.1993 r. – Prawo wykonywania zawodu lekarza weterynarii wydane przez Lubelską Okręgową Izbę Lekarsko-Weterynaryjną.

22.03.2001 r. – stopień doktora nauk weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza w Lublinie. Rozprawa doktorska pt. „*Zastosowanie metod immunohistochemicznych w diagnostyce różnicowej i histogenezie nowotworów gruczołu mlekowego u suk”*. wykonana w Katedrze Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie – Promotor Prof. dr hab. Zbigniew Nozdryn-Płotnicki.

2. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych

01.10.1993 r. – asystent w Katedrze Anatomii Patologicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza w Lublinie.

01.05.2001 r. do chwili obecnej – adiunkt w Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych Zwierząt, Zakład Patomorfologii i Weterynarii Sądowej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, wcześniej w Katedrze Anatomii Patologicznej

3. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust.2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).

3.1. Jednotematyczny cykl publikacji:

Badania epidemiologiczne i analizy molekularne w nowotworach komórek tucznych u psów

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

3.1.1. Śmiech A, Ślaska B, Łopuszyński W, Jasik A, Szczepanik M, Wilkołek P. Canine mast cell tumours – an epidemiological study according to the histological malignancy grade. Polish Journal of Veterinary Sciences 2017,20,455–465.

IF = 0,839; 20 pkt. MNiSW

Wkład w autorstwo: 80% - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie badań, określenie celu badań, zebranie materiału, współudział w wykonaniu analiz, interpretacja uzyskanych wyników badań, napisanie wstępnej wersji manuskryptu, korekta manuskryptu autor korespondencyjny.

3.1.2.Śmiech A, Ślaska B, Łopuszyński W, Jasik A, Bochyńska D, Dąbrowski R. Epidemiological assessment of the risk of canine mast cell tumours based on the Kiupel two-grade malignancy classification. Acta Veterinaria Scandinavica 2018, 60:70.

IF = 1,497; 35 pkt. MNiSW

Wkład w autorstwo: 80% - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie badań, określenie celu badań, zebranie materiału, współudział w wykonaniu analiz, reklasyfikacja histologiczna guzów z komórek tucznych, interpretacja uzyskanych wyników badań, napisanie wstępnej wersji manuskryptu, korekta manuskryptu -autor korespondencyjny.

3.1.3. Śmiech A, Łopuszyński W, Ślaska B, Bulak K, Jasik A. Occurrence and distribution of canine cutaneous mast cell tumour characteristics among predisposed breeds. Journal of Veterinary Research 2019, 63, DOI:10.2478/jvetres-2019-0002.

IF = 0,811; 20 pkt. MNiSW

Wkład w autorstwo: 80% - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie badań, oraz określenie celu badań, ocena histopatologiczna, interpretacja uzyskanych wyników badań, napisanie wstępnej wersji manuskryptu, korekta manuskryptu, autor korespondencyjny.

3.1.4. Śmiech A, Ślaska B, Surdyka M, Grzybowska-Szatkowska L, Łopuszyński W, Różańska D. Identification of additional mitochondrial DNA mutations in canine mast cell tumours. Acta Veterinaria Scandinavica 2016,58:28.

IF = 1,472; 30 pkt. MNiSW

Wkład w autorstwo: 60% - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie badań, określenie celu badań, analiza histopatologiczna, interpretacja uzyskanych wyników badań, napisanie wstępnej wersji manuskryptu, korekta manuskryptu autor korespondencyjny.

3.1.5.Śmiech A, Ślaska B, Bownik A, Grzybowska-Szatkowska L, Dutka J, Łopuszyński W. Heteroplasmic mutations and polymorphism in the *CYB* gene of mitochondrial DNA in canine mast cell tumours. In Vivo 2019, 33, 57-63.

IF = 1,116; 20 pkt. MNiSW

Wkład w autorstwo: 60% - opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie badań, określenie celu badań, analiza histopatologiczna, interpretacja uzyskanych wyników badań, napisanie wstępnej wersji manuskryptu, korekta manuskryptu, autor korespondencyjny.

Łączna punktacja 5 prac wchodzących w skład jednotematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi:

– wg listy czasopism punktowanych MNiSW– **125 pkt.**

– sumaryczny Impact Factor (IF) według listy Journal Citation Reports (JCR) – **5.735**

*** W przypadku prac przyjętych do druku, lub które ukazały się drukiem w roku 2019 punkty MNiSW oraz wartość IF podano za rok 2018.**

Fotokopie publikacji oraz oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie pracy znajdują się w załączniku nr 6 i 7.

3.2. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Od momentu podjęcia pracy w Katedrze Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie do chwili obecnej moje zainteresowania naukowe skupiają się głównie wokół onkologii weterynaryjnej. Jest to związane ze stale wzrastającą liczbą diagnozowanych nowotworów u zwierząt żyjących w bezpośredniej bliskości człowieka, przede wszystkim u psów (1, 13, 15, 20, 21, 79). Dane statystyczne wskazują, że 50 % psów, które dożyły 10 lat umiera z powodu nowotworów (1, 15). W obrębie tego gatunku najczęściej diagnozowane są nowotwory skóry, wśród których 7%- 21% stanowią guzy z wywodzące się komórek tucznych (7, 21,76). Nowotwory komórek tucznych (ang. Mast Cell Tumours, MCT) charakteryzują się różnorodnym przebiegiem klinicznym. Mogą one pojawiać się w formie niewielkich odgraniczonych pojedynczych lub mnogich guzków, naciekać okoliczne tkanki, a także dawać przerzuty do węzłów chłonnych i narządów wewnętrznych (6, 14, 36, 49, 50). Pomimo licznych badań nad wyłonieniem czynników określających prawdopodobny przebieg choroby najważniejszym wskaźnikiem prognostycznym pozostaje nadal stopień zróżnicowania histologicznego (4,18, 28, 29,30, 31, 33, 42, 53, 54, 56, 58,78). Warunkuje on nie tylko różnorodny obraz morfologiczny guzów i ich potencjał przerzutowy oraz związane z tym rokowanie, ale również odpowiedź na leczenie (7, 14, 34,49). Na podstawie oceny stopnia złośliwości możemy z dużym prawdopodobieństwem przewidzieć zachowanie biologiczne danego nowotworu (58). Do 2011 roku jedynym używanym systemem różnicowania stopnia złośliwości mastocytom była trójstopniowa skala wg. Patnaika i wsp. opublikowana w 1984 roku, która wyodrębniała guzy dobrze zróżnicowane, pośrednio i nisko zróżnicowane określane w literaturze odpowiednio jako GI, GII, GIII (52). Klasyfikacja ta opierała się na ocenie i zestawieniu cech mikroskopowych takich jak: głębokość nacieku nowotworowego, zróżnicowanie komórek i jąder, obecność ziarnistości metachromatycznych, występowanie komórek wielojądrowych oraz ognisk martwicy i obrzęku. Ze względu na heterogenny charakter guzów (61) o pośrednim stopniu zróżnicowania oraz nieprzewidywalny przebieg kliniczny, Kiupeli wsp. (35) zaproponowali nowy dwu stopniowy system oceny złośliwości wyróżniający stopień niski (ang.low-grade) oraz wysoki (ang. high-grade). Nowa klasyfikacja oparta jest na morfologii jądra komórkowego oraz liczbie figur podziału mitotycznego. Do mastocytom o wysokim stopniu złośliwości włącza się zmiany, w których stwierdza się co najmniej 7 figur podziału

mitotycznego, 3 komórki wielojądrzaste, 3 komórki o dziwacznym jądrze (ang. bizzare) w 10 hpf oraz 10 % komórek z jądrem dwukrotnie powiększonym (karyomegalia). Wszystkie inne guzy nie spełniające tych kryteriów zaliczane są do niskiego stopnia złośliwości (35). Zgodnie z nowym systemem oceny, guzy o wysokim stopniu złośliwości cechują się bardziej agresywnym przebiegiem, skłonnością do wznowy i przerzutów oraz krótszym czasem przeżycia. Średni czas przeżycia kształtuje się w granicach 4 miesięcy dla guzów MCT o wysokim stopniu złośliwości oraz 2 lata dla guzów MCT o niskim stopniu złośliwości (35). Pomimo przeprowadzenia klinicznych badań porównawczych skali Patnaika i Kiupela najczęściej do oceny guzów z komórek tucznych patolodzy używają obu skal jednocześnie (57,62). Jak wynika z danych z piśmiennictwa największe ryzyko zachorowania na mastocytomę występuje u bokserów, ale często wymieniane są również shar-pei, rodezjany, mopsy, wyżły weimarskie, beagle oraz labrador i golden retrievery (2,15). Pomimo wykazania predyspozycji rasowych niewiele jest informacji dotyczących powiązania danej rasy z klinicznym przebiegiem nowotworu. Dotychczasowe raporty potwierdziły występowanie guzów z komórek tucznych o bardziej łagodnym przebiegu u bokserów i mopsów (43,48). U golden retrieverów stwierdzono pojawienie się guzów rozsianych, a u shar-pei o bardziej o agresywnym charakterze i często w młodym wieku (14, 45). Nowotwory te występują w każdym wieku najczęściej jednak między 7,5 a 9 rokiem życia i nie stwierdza się predylekcji płci (14, 47, 50, 76). Najczęściej występują na tułowiu (50-60%), kończynach (25-40%) oraz głowie i szyi (10%)(76). Z kolei do gorzej rokujących lokalizacji należy okolica kroczowa, pachwinowa, okołodbytowa oraz połączenia skórno-śluzówkowe (6, 14, 19, 47, 59, 76). Dotychczasowe badania epidemiologiczne najczęściej obejmowały ocenę ryzyka wystąpienia mastocytomy u poszczególnych ras psów zamieszkujących dany region geograficzny. Przedstawiono zachorowalność na ten rodzaj nowotworu w zależności od wieku psa, płci, masy ciała, oraz u psów poddanych zabiegowi kastracji oraz sterylizacji (3, 38, 48, 60, 73,77, 79, 82). Tylko w jednym raporcie określono ryzyko wystąpienia guzów komórek tucznych o różnym stopniu zróżnicowania z uwzględnieniem rasy, płci i wieku (48). Należy podkreślić, że do chwili obecnej nie przeprowadzono szerszych badań epidemiologicznych obejmujących występowanie guzów komórek tucznych psów na terenie Polski. Brak w piśmiennictwie prac epidemiologicznych obejmujących stopień złośliwości histologicznej, który jest najważniejszym czynnikiem rokowniczym stanowiły inspirację do podjęcia tej tematyki badawczej. Analizy postanowiłam przeprowadzić w oparciu o skalę Patnaika (52) i Kiupela (35) uwzględniając takie parametry jak rasę wiek i wielkość psów, płeć oraz lokalizację guza. W dalszym etapie zdecydowałam dokładnie prześledzić przebieg kliniczny nowotworu w

rasach, u których stwierdziłam zwiększone ryzyko wystąpienia guzów komórek tucznych. Takie badania nie były jeszcze dotąd wykonywane a uzyskane wyniki pozwolą dokładniej poznać biologię nowotworu i a przyszłości stanowić inspirację do badań genetycznych. Koncentrując się na guzach komórek tucznych u psów drugi aspekt mojej pracy naukowej stanowiły były badania molekularne. Mimo, że po raz pierwszy nowotwór ten został opisany w 1905. etiologia jego nie jest do końca wyjaśniona (36). Dotychczasowa wiedza dotycząca zaburzeń w materiale genetycznym guzów z komórek tucznych skupiała się przede wszystkim na DNA jądrowym (ang. nuclear DNA, nDNA). Potwierdzono występowanie mutacji *c-kit* w obrębie eksonu 11 w 30% nowotworów z komórek tucznych (16, 40, 74,75, 81). Zidentyfikowano także rzadziej występujące mutacje w eksonie 8,9 (39). Występowanie tych mutacji tylko w niektórych mastocytomach II i III stopnia sugeruje, że w etiologii biorą udział również inne czynniki. Wraz z rozwojem technik biologii molekularnej coraz częściej przypisuje się mitochondriom udział w procesie kancerogenezy. Mitochondria posiadają własny genom, który odznacza się wyższą zmiennością w stosunku do genomu jądrowego. Częstość mutacji mitochondrialnego DNA (ang. Mitochondrial DNA, mtDNA) jest ponad 10-krotnie większa w porównaniu do DNA jądrowego (nDNA) (9,10,22,65). Badania ostatnich lat dokumentują znaczącą rolę polimorfizmów i mutacji mitochondrialnego DNA w patogenezie wielu chorób u ludzi w tym również nowotworowych (9, 10, 22, 24). Mutacje w mtDNA powodują syntezę nieprawidłowych białek kompleksów fosforylacji oksydacyjnej, upośledzenie oddychania komórkowego, zaburzenia produkcji ATP oraz wzmożoną produkcję reaktywnych form tlenu (22,64). Z genomem mitochondrialnym związane jest zjawisko heteroplazmii. Każda komórka zawiera od setek do tysięcy kopii mtDNA. Jeśli w komórce obecny jest zarówno zmutowany jak i normalny dziki mtDNA wówczas mówimy o heteroplazmii. Występowanie tylko jednego typu mtDNA (zmutowanego lub normalnego) przemawia za homoplazmią (9, 22, 65). Z reguły większość zmian w obrębie sekwencji nukleotydowych mtDNA w komórkach nowotworowych ma charakter homoplazmatyczny, aczkolwiek w pojedynczych przypadkach odnotowuje się również heteroplazmię (10, 22, 65, 66, 67). Pojawiać się ona może na początku procesu nowotworowego, kiedy komórki mogą zawierać zmutowane oraz dzikie kopie mtDNA. Dopiero kolejne podziały zmutowanych komórek prowadzą do homoplazmii. Coller i wsp. (8) sugeruje, że homoplazmia jest wynikiem przypadkowej segregacji mitochondriów podczas podziałów. W kolejnych podziałach może przetrwać heteroplazmia lub też może wystąpić homoplazmia w wyniku dryfu genetycznego (22). Ze względu na dryf, eliminowane są rzadkie warianty mtDNA. Należy podkreślić, że wzajemne proporcje między zmutowanyma

dzikim mtDNA mogą ulegać różnym nasileniom podczas podziałów prowadząc do zmian fenotypu komórkowego (17). Mutacje i polimorfizmy identyfikowane są wzdłuż całego genomu mitochondrialnego, jednak do najbardziej interesujących obiektów badań należy pętla D. Jest ona jedynym hiperzmiennym niekodującym fragmentem mtDNA złożonym z ok. 1100 par zasad. Jest to obszar gdzie zachodzi inicjacja transkrypcji i replikacji mtDNA. Zmiany w tym rejonie mogą wpływać na zmianę efektywności replikacji DNA poprzez modyfikację wiązań aktywatorów i czynników transkrypcyjnych (9,10,22,65). Pętla D znana jest jako siedlisko mutacji i polimorfizmów, których występowanie odnotowano w wielu nowotworach u ludzi, między innymi w raku żołądka prostaty, płuc, nerki, tarczycy i glejaku wielopostaciowym (27, 32, 44, 69, 70). Intensywne badania prowadzono także na przykładzie raka sutka u kobiet (37, 55, 71). Zaobserwowano powiązanie wystąpienia mutacji z parametrami klinicznymi. Stwierdzono że liczba mutacji w pętli D może być wskaźnikiem złego rokowania (26,37). Kuo i wsp. (37) udowodnili, że pacjentki z dwoma lub większą liczbą mutacji mają istotnie niższe przeżycie w porównaniu do tych z jedną mutacją. Z kolei badania Igmana i wsp. (26) pozwoliły ustalić wzorce polimorfizmów specyficznych dla raka sutka, które mogą predysponować do rozwoju nowotworu. Polimorfizmy mogą również wpływać na procesy fizjologiczne w komórkach oraz transformację nowotworową (11, 22, 23).Nie można też wykluczyć również polimorfizmów specyficznych dla danej haplogrupy jako czynników rozwoju nowotworów, stąd przy określeniu mutacji i polimorfizmów wskazane jest określenie haplotypów badanych osobników (9). Wiedza na temat występowania mutacji i polimorfizmów w rejonie pętli D mtDNA w nowotworach u zwierząt jest bardzo uboga. Do chwili obecnej udokumentowano obecność mutacji i polimorfizmów w guzach sutka oraz nowotworach głowy i kończyn u psów (5, 63, 66, 67). U podstaw chorób mitochondrialnych leżą zaburzenia funkcjonowania i biogenezy składników łańcucha oddechowego. Jednym z białek łańcucha oddechowego jest cytochrom b. Jest to integralne białko błonowe będące podjednostką kompleksu III. Bierze on udział w regulacji aktywności oksyreduktazy, przenoszeniu jonów metalu oraz transporcie elektronowym łańcucha oddechowego (80). Odnotowano związek mutacji w genie kodującym cytochrom b (*CYB*) z niektórymi nowotworami występującymi u człowieka tj.: czerniakach, guzach sutka i rakach pęcherza moczowego (12, 51, 72) oraz psa (68). U psów badania takie wykonano na nowotworach głowy szyi i kończyn (68). Stan wiedzy dotyczący onkogenomiki mitochondralnej u ludzi jest stosunkowo dobrze udokumentowany (23, 24, 27, 32, 41,44, 46, 55, 69, 70, 71, 72). Niestety nie można tego potwierdzić w odniesieniu do medycyny weterynaryjnej, a głównie chorób nowotworowych diagnozowanych u psów. Do chwili obecnej brak w piśmiennictwie światowym jakichkolwiek raportów

opisujących występowanie mutacji i polimorfizmów w przedstawionych dwóch fragmentach mtDNA tj.: genie cytochromu b oraz w rejonie pętli D w nowotworach z komórek tucznych psów. Fakt ten stanowił zachętę do podjęcia tego rodzaju badań. Niewyjaśniona etiologia oraz różnorodny obraz kliniczny guzów z komórek tucznych wpłynęły na moje zainteresowania naukowe tym rodzajem nowotworu. Należy dodać, że badania podłoża genetycznego guzów komórek tucznych mogą mieć istotne znaczenie w diagnostyce oraz opracowaniu strategii terapeutycznych.

3.3. Cel naukowy osiągnięcia badawczego:

Tematyka cyklu publikacji wchodzących w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego dotyczy badań epidemiologicznych oraz molekularnych nowotworów komórek tucznych u psów. Jednym z głównych celów mojej pracy była analiza epidemiologiczna populacji psów zamieszkujących Polskę, u których wystąpiły guzy z komórek tucznych oraz ocena ryzyka rozwoju mastocytom u psów pod kątem wykorzystania danych w prognozowaniu choroby nowotworowej. Zostały określone zależności pomiędzy rasą, wiekiem, płcią, wielkością psa, lokalizacją anatomiczną guza a stopniem złośliwości wg dwustopniowej skali Kiupela (35) i Patnaika (52). Kolejnym celem badań było wskazanie ras predysponowanych do rozwoju tego nowotworu oraz ocena w obrębie samej rasy współistniejących czynników w oparciu wiek, płeć lokalizację guza oraz stopnień histologicznej złośliwości wg skali Kiupela (35). Z kolei głównym celem badań molekularnych była identyfikacja mutacji i polimorfizmów w dwóch fragmentach mitochondrialnego DNA tj. genie cytochromu b oraz rejonie pętli D oraz określenie związku z procesem transformacji nowotworowej w nowotworach komórek tucznych u psów.

3.3.1. Opis poszczególnych prac wchodzących w skład osiągniecia naukowego wraz z omówieniem wyników:

Praca **3.1.1.** Śmiech A. i wsp.: "Canine mast cell tumours – an epidemiological study according to the histological malignancy grade". Polish Journal of Veterinary Sciences 2017,20,455–465.

Celem pracy było określenie zależności miedzy stopniem złośliwości guza wg. trójstopniowej skali Patnaika (52), a wiekiem, płcią, rasą i wielkością psa oraz lokalizacją zmiany nowotworowej. Badaniem objęto 263 psy różnych ras oraz mieszańców ze stwierdzoną mastocytomą. Preparaty do oceny mikroskopowej zabarwiono rutynowo hematoksyliną i

eozyną oraz błękitem toluidyny. Analiza histopatologiczna została dokonana w oparciu o klasyfikację WHO z uwzględnieniem 3 stopniowej skali złośliwości wg. Patnaika (25,52). Prawdopodobieństwo wystąpienia poszczególnych stopni złośliwości GI, GII, GIII ustalono posługując się metodą najmniejszych kwadratów (ang. least-squares means, lsm±se (standard error)). Przeprowadzone analizy wykazały większe prawdopodobieństwo pojawienia się guzów z komórek tucznych w stopniu GI u psów rasy buldog francuski, w młodym wieku 2-6 lat, w okolicy głowy, szyi, tułowia oraz kończyn. Mastocytomy o pośrednim zróżnicowaniu GII wykazały większą tendencję do wystąpienia u takich ras jak boksery, dobermany, jamniki, owczarki i setery, u psów starszych wieku 7-16 lat i lokalizacją w okolicy moszny. Z kolei guzy niskozróżnicowane GIII przedstawiają większe prawdopodobieństwo wystąpienia u psów najstarszych w wieku 11-16 lat, w okolicy pachowej, oraz u shar–pei. Nie stwierdzono zależności między stopniem złośliwości guza a płcią oraz wielkością psów. Badania potwierdziły ze stopień zróżnicowania oparty na klasyfikacji Patnaikajest ściśle związany z rasą, wiekiem oraz lokalizacją.

Praca **3.1.2.** Śmiech A i wsp.: "Epidemiological assessment of the risk of canine mast cell tumours based on the Kiupel two-grade malignancy classification". Acta Veterinaria Scandinavica 2018, 60:70.

W kolejnej pracy przeprowadzono analizę epidemiologiczną ryzyka rozwoju guzów komórek tucznych u psów w odniesieniu do innych nowotworów skóry w oparciu o nową dwustopniową skalę Kiupela (35). Ocenie poddane zostały takie parametry jak rasa, wiek, płeć, wielkość oraz lokalizacja anatomiczna guza. Analizą objęto 492 psy 77 różnych ras oraz psów nierasowych ze stwierdzoną mastocytomą skórną, wyselekcjonowane na podstawie oceny histopatologicznej z 2763 przypadków nowotworów skóry psów, zdiagnozowanych w latach 2003 – 2016 w Katedrze Anatomii Patologicznej UP w Lublinie. Ocena histopatologiczna guzów z komórek tucznych została dokonana w oparciu o klasyfikację WHO (25) z uwzględnieniem dwustopniowej skali złośliwości wg. Kiupela (35). Guzy zgromadzone przed rokiem 2011 ocenione wg skali trójstopniowej Patnaika (52) zostały poddane reklasyfikacji. Ryzyko wystąpienia nowotworu z komórek tucznych dla poszczególnych ras, płci, wielkości, lokalizacji oraz przedziałów wiekowych zostało określone na podstawie oceny ilorazu szans (ang. odds ratio, OR), a grupę kontrolną stanowiły psy z nowotworami skóry. W celu oznaczenia OR i jego 95% przedziału ufności została wykonana analiza regresji logistycznej. Przeprowadzone badania wykazały największe ryzyko wystąpienia mastocytomy o wysokim stopniu złośliwości u shar-pei (OR:28,18), american staffordshire terrierów (OR:3,016) oraz

wyżłów weimarskich (OR:6,453). Z kolei ryzyko pojawienia się guzów o niskim stopniu złośliwości stwierdzono u pięciu ras tj.: bokserów (OR:6,724), mopsów (OR:6,130), labradorów (OR:2,721), buldogów francuskich (OR:1,999), a także u american staffordshire terrierów (OR:2,623). Zaobserwowano związek wystąpienia poszczególnych stopni zróżnicowania z wiekiem oraz lokalizacją anatomiczną nowotworu. W okolicy pachwiny (OR :17,691) i pachy (OR:6,309) uzyskano większy współczynnik OR dla guzów bardziej złośliwych. Z kolei na tułowiu stwierdzono większe ryzyko pojawienia się guzów o bardziej łagodnym charakterze (OR:1,744). Ryzyko pojawienia się mastocytomy wysoce złośliwej w porównaniu do psów najmłodszych wzrastało z wiekiem osiągając maksimum u psów najstarszych w wieku 11-16 lat (OR:9,555). W przypadku guzów o niskim stopniu większe ryzyko zachorowań wystąpiło u młodszych psów w wieku 4-6 lat (OR:8,541). U samic (OR:1,389) odnotowano większe ryzyko wystąpienia mastocytomy o niskim stopniu złośliwości (OR:1,431) w porównaniu z samcami. Udowodniono że, średnie rasy są bardziej narażone na wystąpienie guzów z komórek tucznych zarówno o niskim (OR:3,475) jaki i wysokim stopniu złośliwości (OR:1,712) niż małe psy. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała zależności między rasą, wiekiem, anatomiczną lokalizacją, płcią, wielkością i stopniem złośliwości mastocytów wg dwustopniowej skali Kiupela oraz potwierdziła złożony biologiczny charakter tego nowotworu. Dzięki niej uzyskano nowe wyniki badań dotychczas nie opisane w piśmiennictwie weterynaryjnym.

Praca **3.1.3.** Śmiech A. i wsp.: "Occurrence and distribution of canine cutaneous mast cell tumour characteristics among predisposed breeds". Journal of Veterinary Research 2019, 63, DOI:10.2478/jvetres-2019-0002.

Kolejna praca stanowi rozszerzenie i kontynuację poprzednich analiz, a główny jej temat badań koncentruje w obrębie samych ras. Celem niniejszej pracy było uzyskanie informacji dotyczących powiązania badanej rasy z klinicznym przebiegiem nowotworu. W pierwszym etapie badań wskazano rasy predysponowane do rozwoju MCT, a następnie oceniono współistniejące czynniki ryzyka w oparciu o stopnień histologicznej złośliwości wg skali Kiupela, wiek, płeć oraz lokalizację guza. Badania przeprowadzono na 550 psach ze zdiagnozowaną mastocytomą wyselekcjonowanych 3107 osobników z nowotworami skóry w oparciu o jednoczynnikową analizę regresji logistycznej. Wyodrębniono sześć ras zamieszkujących Polskę o zwiększonym ryzyku wystąpienia mastocytomy tj.: shar–pei (OR: 6,045), bokser (OR: 5,004), american staffordshire terrier (OR: 2,662), labrador retriever (OR: 2,433), buldog francuski (OR: 2,026) oraz golden retriever (OR:1,692), które

następnie poddano kolejnym analizom. Ryzyko wystąpienia stopni złośliwości u poszczególnych ras kształtowało się podobnie jak w pracy 3.1.2. Dodatkowo odnotowano u psów rasy golden retriever tendencję do wystąpienia guzów o niskim stopniu złośliwości (OR: 1,949). Labradory wykazały większe ryzyko do rozwoju MCT w młodszym wieku 4-6 lat (OR: 2,686), z kolei boksery (OR: 2,956) i buldogi francuskie (OR: 9,429) w starszym wieku 7-10 lat. U buldogów francuskich (OR: 4,680), american staffordshire terrierów (OR: 2,520) oraz labradorów (OR: 1,948) odnotowano zwiększone wystąpienia nowotworu na tułowiu. U żadnej zbadanych sześciu ras nie stwierdzono predylekcji do rozwoju guza w odniesieniu do płci. Przeprowadzone analizy wykazały, że w niektórych rasach oprócz stopnia zróżnicowania guza istotną rolę odgrywają takie czynniki jak wiek oraz lokalizacja nowotworu. Zaobserwowane różnice w przebiegu klinicznym w obrębie ras sugerują obecność czynników genetycznych w etiologii guza. Z tym zagadnieniem związany jest drugi etap mojej pracy poświęcony analizom molekularnym w nowotworach komórek tucznych u psów. Obecność mutacji somatycznych i polimorfizów w mitochondrialnym DNA udokumentowana w licznych nowotworach u ludzi a tylko w pojedynczych doniesieniach u psów skłoniła mnie do podjęcia tej tematyki. Ocena defektu genomu mitochondrialnego w obrębie pętli D oraz genu cytochromu b w guzach komórek tucznych u psów stanowił przedmiot moich kolejnych badań.

Praca **3.1.4.** Śmiech A. i wsp.: "Identification of additional mitochondrial DNA mutations in canine mast cell tumours". Acta Veterinaria Scandinavica 2016, 58:28.

Pętla D jest regionem mtDNA odpowiedzialnym za transkrypcję, replikację oraz cała organizację genomu mitochondrialnego. Jest uznawana za najbardziej wysoce polimorficzny obszar mitochondrialnego DNA (9,10,22,65). Celem pracy było identyfikacja mutacji, polimorfizmów oraz haplotypów w rejonie pętli D w guzach komórek tucznych oraz określenie związku z procesem transformacji nowotworowej. Badaniem objęto 17 psów ze stwierdzoną mastocytomą. W analizach porównawczych uwzględnione zostały sekwencje mtDNA wyizolowanego z tkanki chorobowo zmienionej, tkanki zdrowej (skóra bez zmian nowotworowych) oraz krwi, jako tkanki kontrolnej, który został podany ocenie jakościowo – ilościowej. Materiał genetyczny posłużył do amplifikacji wybranych fragmentów mtDNA techniką PCR. Amplikony zostały zsekwencjonowane. Otrzymane sekwencje nukleotydowe badanych fragmentów mtDNA poddano analizie z wykorzystaniem programów bioinformatycznych. Ocena histopatologiczna została dokonana w oparciu o klasyfikację WHO z uwzględnieniem trójstopniowej skali złośliwości wg. Patnaika (52) oraz dwustopniowej skali Kiupela (35). Uzyskane wyniki wykazały występowanie mutacji somatycznych w siedmiu

pozycjach pętli D u 47 % badanych psów. Większość zmian była homoplazmatyczna. Tylko u 2 osobników zaobserwowano występowanie heteroplazmii. U jednego osobnika odnotowano wystąpienie heteroplazmii we krwi i guzie w pozycji m.C15815C/T u drugiego – tylko w guzie w pozycji m.C15912T/C oraz m.C16025T/C. Mutacje w pozycjach m.16003 i m.15912 mtDNA występowały z największą częstością (odpowiednio u około 35% i 24% psów). Zaobserwowano występowania mutacji w loci: m.15912 i m.16003 mtDNA u psów sześcioletnich i starszych w porównaniu z psami najmłodszymi. Najczęściej występującym haplotypem w każdej z badanych tkanek był haplotyp A18 i stanowił 41.7% w tkance zdrowej i krwi. W tkance nowotworowej występował w przypadku 41.2% guzów. W przypadku wszystkich psów, u których wystąpiły mutacje, nastąpiła zmiana haplotypu mtDNA. Występowanie polimorfizmów w stosunku do sekwencji referencyjnej psa odnotowano w siedmiu pozycjach sekwencji pętli D u 94% psów z MCT (m.T15800C, m.C15814T, m.T15815C, m.C15912T, m.C15955T, m.A16003G, m.T16025C). Polimorfizm w pozycji m.C15955T pętli D wystąpił u 35% osobników. Nie stwierdzono związku między wystąpieniem mutacji a płcią i stopniem złośliwości nowotworów. Wykonane oznaczenia wykazały wysoką frekwencję wystąpienia mutacji i polimorfizmów w rejonie pętli D w guzach komórek tucznych, co może wskazywać na niestabilność genetyczną mtDNa w tym rejonie i związek z procesem nowotoworzenia. Przeprowadzone analizy należą do badań pionierskich, dlatego też wyjaśnienie dokładnej roli i znaczenia funkcjonalnego mutacji i polimorfizmów w rejonie pętli D nowotworach komórek tucznych wymaga kolejnych obserwacji.

Celem badań, których wyniki zostały przedstawione w pracy **4.1.5.** (Śmiech A. i wsp.: "Heteroplasmic mutations and polymorphism in the *CYB* gene of mitochondrial DNA in canine mast cel tumours" była identyfikacja mutacji i polimorfizmów w genie cytochromu b w guzach komórek tucznych oraz określenie związku z procesem transformacji nowotworowej. Cytochrom b jest jednym z białek łańcucha oddechowego podjednostką kompleksu III (80). Mutacje i polimorfizmy w genach kodujących białka podjednostki łańcucha oddechowego wpływają na zmianę metabolizmu komórki i w konsekwencji mogą powodować transformację nowotworową (9,10,22,65). Badaniem objęto 34 psy różnych ras i psy nierasowe, u których zdiagnozowano mastocytomę. W analizach porównawczych uwzględnione zostały sekwencje mtDNA wyizolowanego z tkanki nowotworowej oraz krwi. Ocena histopatologiczna została dokonana w oparciu o klasyfikację WHO z uwzględnieniem trójstopniowej skali złośliwości wg. Patnaika oraz dwustopniowej skali Kiupela (25,35,52). Odnotowano występowanie mutacji w dwunastu pozycjach nukleotydowych we krwi i/lub tkance guza badanych osobników.

Heteroplazmiczne mutacje odnotowano w siedmiu z dwunastu pozycji nukleotydowych (m.14527T/C, m.14634C/T, m.14674C/T, m.14780C/T, m.14972A/C, m.15010C/T, m.15032A/C) u 86% osobników. Zaobserwowano odwrotną zależność liczby mutacji ze stopniem złośliwości guza wg skali Kiupela, więcej mutacji wystąpiło w guzach o niskim stopniu. Występowanie polimorfizmów we krwi psów z mastocytomą w stosunku do sekwencji referencyjnej psa, odnotowano w 14 pozycjach *CYB* genu u 91% badanych psów. Z największą częstością pojawiły się polimorfizmy w dwóch pozycjach m. C14634C/T oraz m.C14674C/T. Zaobserwowano polimorfizmy specyficzne dla płci. Polimorfizmy w pozycjach m.14474 oraz w pozycji m.15010 wystąpiły tylko u samic, z kolei polimorfizm m.14972 pojawił się wyłącznie u psów. Ponadto polimorfizmy w pozycjim.15010C/T m.15032A pojawiły się tylko w guzach o niskim stopniu złośliwości. Występowanie heteroplazmii odnotowano w przypadku 91% psów w jednej do czterech pozycji nukleotydowych w sekwencji genu cytochromu b. Wysoka frekwencja mutacji, polimorfizmów i heteroplazmii w opisanym fragmencie mtDNA wskazuje na jego znaczącą rolę w procesie nowotworzenia. Najbardziej zakasująca jest wysoka częstotliwość heteroplazmii, do tej pory nie odnotowana w piśmiennictwie. Heteroplazmatyczne mutacje i polimorfizmy wystąpiły u większości badanych psów. Być może ma to związek z początkiem procesu nowotworowego. Przemawia za tym również fakt, że więcej mutacji wystąpiło w guzach o niskim stopniu złośliwości. Wzajemne proporcje między zmutowanym, a dzikim mtDNA mogą ulegać różnym nasileniom podczas podziałów prowadząc do zmian fenotypu komórkowego. Ekspresja fenotypowa ma znaczenie kliniczne i wpływa na wystąpienie objawów chorobowych (8). Czy różnorodny obraz kliniczny guzów z komórek tucznych ma związek z heteroplazmią nie można jednoznacznie odpowiedzieć. Konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań z uwzględnieniem przebiegu klinicznego guza. Oprócz zjawiska heteroplazmii uzyskano bardzo interesujące wyniki dotyczące sekwencji genu cytochromu b. Występowanie większej liczy mutacji w guzach o niskim stopniu złośliwości, polimorfizmów związanych z płcią czy niskim stopniem złośliwości. Znaczenie ich nie jest do tej pory wyjaśnione i stanowi inspirację do kolejnych obserwacji.

Wnioski z przeprowadzonych badań

1. Występowanie guzów z komórek tucznych o stopniu zróżnicowania wg trójstopniowej skali Patnaika jest ściśle związane z rasą, wiekiem oraz lokalizacją.
2. Ryzyko rozwoju guzów z komórek tucznych w oparciu o skalę dwustopniową Kiupela zależy od rasy, wieku, lokalizacji oraz płci i wielkości.
3. Zwiększone ryzyko wystąpienia mastocytomy o niskim stopniu złośliwości zaobserwowano u labradorów i golden retrieverów, a także bokserów i ras nim spokrewnionych tj.: mopsów, buldogów francuskich, american staffordshire terrierów.
4. Shar-pei to rasa obarczona największym ryzykiem wystąpienia guzów o wysokim stopniu złośliwości. Do tej grupy należą także wyżły weimarskie oraz american staffordshire terriery. Występowanie zarówno guzów o niskim i wysokim stopniu złośliwości u american staffordshire terrierów może mieć związek z pochodzeniem filogentyczym.
5. Okolice pachy, pachwiny są bardziej narażone na wystąpienie mastocytomy o wyższym stopniu złośliwości. Z kolei tułów jest miejscem gdzie lokalizują guzy o bardziej łagodnym przebiegu.
6. Ryzyko pojawienia się mastocytomy o wysokim stopniu złośliwości w porównaniu do psów najmłodszych wzrasta wraz z wiekiem osiągając maksimum u osobników najstarszych w wieku 11-16 lat. W przypadku guzów o niskim stopniu większe ryzyko zachorowań występuje u młodszych psów w wieku 4-6 lat.
7. U suk w porównaniu z samcami istnieje większe ryzyko rozwoju mastocytomy o niskim stopniu złośliwości wg skali Kiupela.
8. Psy średnich ras są bardziej narażone na wystąpienie zarówno guzów o niskim jak i wysokim stopniu złośliwości w porównaniu do małych ras.
9. Wyodrębniono 6 ras predysponowanych do rozwoju guzów z komórek tucznych zamieszkujących obszar Polski tj. shar –pei, bokser, american staffordshire terrier, labrador retriever, buldog francuski oraz golden retriever. Przebieg kliniczny tego nowotworu w wszystkich sześciu ras związany jest ze stopniem zróżnicowania. U niektórych z nich zależy również od wieku i lokalizacji.
10. Wysoka zmienność genetyczna sekwencji genu cytochromu b i pętli D w guzach komórek tucznych wskazuje na niestabilność genetyczną mitochondrialnego DNA w tych rejonach i związek z procesem nowotworzenia.

11. Odnotowane po raz pierwszy homoplazmiczne i heteroplazmiczne mutacje i polimorfizmy w sekwencji genu cytochromu b są związane z występowaniem nowotworów komórek tucznych psów.
12. Stwierdzone mutacje i polimorfizmy występujące z dużą częstością w badanych fragmentach mitochondrialnego DNA w przyszłości mogą być czynnikami prognostycznymi tego typu nowotworów u psów.

4. Charakter aplikacyjny przeprowadzonych badań/wykorzystanie wyników prac

Wykonane analizy epidemiologiczne pozwoliły dokładniej poznać biologiczny charakter guzów z komórek tucznych u psów. Uzyskano nowe informacje o złożonej naturze tego nowotworu, które nie były publikowane w piśmiennictwie. Dzięki tym badaniom możemy oszacować występowanie mastocytomy o różnym stopniu zróżnicowania histologicznego w zależności od rasy, wieku czy lokalizacji co ma również istotne znaczenie dla lekarzy klinicystów. W przyszłości uzyskane dane mogą stanowić podstawę do wykonywania badań przesiewowych w kierunku wykrywania tego nowotworu. Badania molekularne pokazały nowe spojrzenie na etiologię tego guza, która to chwili obecnej skupiała się wokół genomu jądrowego. Są to jedyne badania dotyczące genomiki mitochondrialnej w guzach komórek tucznych u psów opisane w piśmiennictwie światowym. Analiza podłoża molekularnego szczególnie z udziałem mitochondrialnego DNA może przyczynić się do pełnego zrozumienia mechanizmów onkogenezy i w konsekwencji opracowania skutecznych metod diagnostycznych i terapeutycznych. Polimorfzmy i mutacje występujące z dużą częstością mogą zostać wykorzystane w przyszłości jako czynniki prognostyczne służące do przewidywania choroby nowotworowej u psów.

Piśmiennictwo:

1. Adams VJ, Evans KM, Sampson J, Wood J.L.: Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. J Small Anim Pract 2010, 51, 512–524.
2. Arendt ML, Melin M, Tonomura N, Koltookian M, Courtay-Cahen C, Flindall N, Bass J, Boerkamp K, Megquir K, Youell L, Murphy S, McCarthy C, London Ch, Rutteman GR, Starkey M, Linbald-Toh K: Genome-Wide Association Study of Golden Retrievers Identifies Germ-Line Risk Factors Predisposing to Mast Cell Tumours. PLoS Genet 2015, 11: e1005647.
3. Artuković B, Medven L, Hohšteter M, Šoštarić-Zuckermann I-C, Kurilj AG, Beck A, et al. Prevalence of cutaneous mast cell sarcoma in dogs in Croatia. Vet Arhiv. 2014, 84, 601-614.
4. Berlato D, Stewart J, Newton R, Maglennon GA, Monti P, Flindall A, et al. Evaluation of minichromosome maintenance protein 7 as a prognostic marker in canine cutaneous mast cell tumours. Vet Comp Oncol. 2012, 10, 135-142.
5. Bertagnolli AC, Sores P, Van Asch B, Amorim A, Cirnes L, Maximo V, et al. An assessement of the clonality of the components of canine mixed mammary tumours by mitochondrial DNA analysis. Vet J. 2009, 182, 269-274.
6. Blackwood L, Murphy S, Buracco P, De Vos JP, De Fornel-Thibaud P, Hirschberger J, Kessler M, Pastor J, Savary-Bataille K, Argyle DJ. European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. Vet Comp Oncol. 2012, 10:e1-e29.
7. Brønden LB, Eriksen T, Kristensen AT. Mast cell tumours and other skin neoplasia in Danish dogs - data from the Danish veterinary cancer registry. Acta Vet Scand. 2010, 52, 6.

8. Coller HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E, Herrero-Jimenez P, Thilly WG: High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumours can be explained without selection. Nat Genet. 2001, 28, 147-150.
9. Czarnecka AM, Kukwa W, Krawczyk T, Scinska A, Kukwa A. Zaburzenia mitochondrialne w procesie nowotworzenia. Postępy Biologii Komórki. 2011, 38, 85-110.
10. Czarnecka AM, Golik P, Bartnik E. Mitochondrial DNA mutations in human neoplasia. J Appl Genet. 2006, 47, 67-78.
11. Czarnecka AM, Krawczyk T, Zdrozny M, Lubiński J, Arnold RS, Kukwa W, Scińska A, Golik P, Bartnik E, Petros JA: Mitochondrial NADH-dehydrogenase subunit 3 (ND3) polymorphism (A10398G) and sporadic breast cancer in Poland. Breast Cancer Res Treat. 2010, 121, 511-518.
12. Dasgupta S, Hoque MO, Upadhyay S, Sidransky D. Mitochondrial cytochrome B gene mutation promotes tumor growth in bladder cancer. Cancer Res 2008, 3, 700-706.
13. Dobson JM, Samuel S, Milstein H, Rogers K, Wood JL. Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. J Small Anim Pract. 2002,43, 240-246.
14. Dobson JM, Scase TJ. Advances in the diagnosis and management of cutaneous mast cell tumours in dogs. J Small Anim Pract. 2007, 48, 424-431.
15. Dobson JM. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. ISRN Vet Sci. 2013.doi:10.1155/2013/941275
16. Downing S, Chien MB, Kaas PH, Moore PE, London CA. Prevalence and importance of internal tandem duplications in exons 11 and 12 of *c-KIT* in mast cell tumors of dogs. Am J Vet Res. 2002, 63, 1718–1723.

17. Filosto M, Mancuso M: Mitochondrial diseases: a nosological update. Acta Neurol Scand. 2007, 115: 211-221.
18. Froberg GK, Lindberg R, Ritter M, Nordlind K. Expression of serotonin and its 5-HT1A receptor in canine cutaneous mast cell tumours. J Comp Pathol. 2009, 141, 89-97.
19. Govier SM. Principles of treatment for mast cell tumors. Clin Tech Small Anim Pract. 2003, 18, 103-106.
20. Grüntzig K, Graf R, Boo G, Guscetti F, Hässig M, Axhausen KW, Fabrikant S, Welle M, Meier D, Folkers G, Pospischil A. Swiss Canine Cancer Registry 1955–2008: occurrence of the most common tumour diagnoses and influence of age, breed, body size, sex, and neutering status on tumour development. J Comp Pathol. 2016, 155, 156–170.
21. Grüntzig K, Graf R, Hassig M, Welle M, Meier D, Lott G, Erni D, Schenker NS, Guscetti F, Boo G, Axhausen K, Fabrikant S, Folkers G, Pospischil A. The Swiss Canine Cancer Registry: a retrospective study on the occurrence of tumours in dogs in Switzerland from 1955 to 2008. J Comp Pathol. 2015, 152, 161–171.
22. Grzybowska-Szatkowska L, Ślaska B. Mitochondrial DNA and carcinogenesis (Review). Mol Med Rep. 2012, 6, 923-930.
23. Grzybowska-Szatkowska L, Ślaska B. Mitochondrial NADH-dehydrogenase polymorphisms are associated with breast cancer in Poland. J Appl Genet. 2014, 55, 173-181.
24. Grzybowska-Szatkowska L, Slaska B, Rzymowska J, Brzozowska A, Floriańczyk B:Novel mitochondrial mutations in the ATP6 and ATP8 genes in patients with breast cancer. Mol Med Rep. 2014, 4, 1772-1778.
25. Hendrick MJ, Mahaffey EA, Moore JH, Walder EJ. Histological Classification of Mesenchymal Tumors of Skin and Soft Tissues of Domestic Animals. In WHO

International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second Series. Volume 2. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C, pp.28-29, 1998.

26. Ingman M, Gyllensten U: mtDB: Human Mitochondrial Genome Database, a resource for population genetics and medical sciences.Nucleic Acids Res. 34 (Database issue): 2006, D749-751.
27. Jerónimo C, Nomoto S, Caballero OL, Usadel H, Henrique R, Varzim G, Oliveira J, Lopes C, Fliss MS, Sidransky D. Mitochondrial mutations in early stage prostate cancer and bodily fluids. Oncogene. 2001, 20, 5195-5198.
28. Kandefer-Gola M, Nowak M, Madej JA, Dzimira S, Ciaputa R, Janus I. Useful immunohistochemical indicators in canine mast cell tumours Act Vet Hung 2.015, 63, 49–59.
29. Kandefer-Gola M, Nowak M, Dzimira S, Janus I, Ciaputa R, Madej JA. COX-2 and mPGES-1 expression in canine mast cell tumour. Med Weter. 2015 71, 345–348.
30. Kandefer-Gola M, Madej JA, Dzimira S, Nowak M, Janus I, Ciaputa R. Comparative analysis of markers of cell proliferation in canine mast cell tumour according to current classifications. Pol J Vet Sci. 2015, 18, 241–247.
31. Kandefer-Gola M, Madej JA, Dzimira S, Janus I, Nowak M, Ciaputa R. Immunohistochemical evaluation of neoangiogenesis in canine mast cell tumours. Bull Vet Inst Pulawy 2015, 59, 247–253.
32. Kirches E, Krause G, Warich-Kirches M, Weis S, Schneider T, Meyer-Puttlitz B, Mawrin C, Dietzmann K. High frequency of mitochondrial DNA mutations in glioblastoma multiforme identified by direct sequence comparison to blood samples. Int J Cancer. 2001, 93, 534-538.

33. Kiupel M, Webster J.D, Kaneene J.B, Miller R, Yuzbasiyan-Gurkan V. The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. Vet Pathol. 2004, 41, 371–377.
34. Kiupel M, Webster JD, Miller RA, Kaneene JB. Impact of tumour depth, tumour location and multiple synchronous masses on the prognosis of canine cutaneous mast cell tumours. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2005, 52, 280-286.
35. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, Best S, Delay J, Detrisac CJ, Fitzgerald SD, Gamble D, Ginn PE, Goldschmidt MH, Hendrick MJ, Howerth EW, Janovitz EB, Langohr I, Lenz SD, Lipscomb TP, Miller MA, Misdorp W, Moroff S, Mullaney TP, Neyens I, O'Tolle D, Ramos-Vara J, Scase TJ, Schulman FY, Sledge D, Smedley RC, Smith K, Snyder P, Southorn E, Stedman NL, Steficek BA, Stromberg PC, Valli VE, Weisbrode SE, Yager J, Heller J, Miller R: Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. Vet Pathol. 2011, 48, 147-155.
36. Krupa A, Hildebrand W, Kandefer-Gola M, Nowak M, Nicpoń J. Mast cell tumor. Med Weter 2013, 69, 102–108.
37. Kuo SJ, Chen M, Ma GC, Chen ST, Chang SP, Lin WY, Chen YC, Lee TH, Lin TT, Liu CS. Number of somatic mutations in the mitochondrial D-loop region indicates poor prognosis in breast cancer, independent of TP53 mutation. Cancer Genet and Cytogenet. 2010; 201: 94–101.
38. Leidinger EF, Freeman K, Kirtz G, Hooijberg EH, Sick K. Breed related odds ratio and anatomic distribution of canine mast cell tumours in Austria. Retrospective study of cases in the years 2000-2010. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 2014, 42, 367-373.

39. Letard S, Yang Y, Hanssens K, Palmérini F, Leventhal PS, Guéry S, Moussy A, Kinet JP, Hermine O, Dubreuil P. Gain-of-function mutations in the extracellular domain of KIT are common in canine mast cell tumors. Mol Cancer Res. 2008, 6, 1137-1145.
40. London CA, Galli SJ, Yuuki T, Hu ZQ, Helfand SC, Geissler EN. Spontaneous canine mast cell tumors express tandem duplications in the proto-oncogene c-KIT Exp Hematol.1999, 27, 689-697.
41. Lim SW, Kim HR, Kim HY, Huh JW, Kim YJ, Shin JH, Suh SP, Ryang DW, Kim HR, Shin MG. Int J Cancer. 2012, 131, 1332–1341.
42. Maglennon G.A, Murphy S, Adams V, Miller J, Smith K, Bluden A, Scase T.J. Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. Vet. Comp Oncol. 2008, 6, 268–274.
43. McNiel EA, Prink AL, O'Brien TD. Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs. Vet Comp Oncol. 2006, 4, 2-8.
44. Meierhofer D, Mayr JA, Fink K, Schmeller N, Kofler B, Sperl W. Mitochondrial DNA mutations in renal cell carcinomas revealed no general impact on energy metabolism. Br J Cancer. 2006, 94, 268-274.
45. Miller DM. The occurrence of mast cell tumors in young Shar-Peis. J Vet Diagn Invest. 1995, 7, 360-363.
46. Mims MP, Hayes TG, Zheng S, Leal SM, Frolov A, Ittmann MM, Wheeler TM, Prchal JT. Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women. Cancer Res. 2006, 66, 1880-1881.
47. Misdorp W. Mast cells and canine mast cell tumours. A review. Vet Q. 2004,26, 156-169.

48. Mochizuki H, Motsinger-Reif A, Bettini C, Moroff S, Breen M. Association of breed and histopathological grade in canine mast cell tumours. Vet Comp Oncol. 2017, 15, 829-839.
49. Murphy S, Sparkes AH, Smith KC, Blunden AS, Brearley M. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. Vet Rec. 2004, 154, 743-746.
50. O'Connell K, Thomson M. Evaluation of prognostic indicators in dogs with multiple, simultaneously occurring cutaneous mast cell tumours: 63 cases. Vet Comp Oncol. 2011,11, 51-62.
51. Parrella P, Yan Xiao Y, Fliss M, Sanchez-Cespedes M, Mazzarelli P, Rinaldi M, Nicol T, Gabrielson E, Cuomo C, Cohen C, Pandit S, Spencer M, Rabitti C, Fazio VM, Sidransky D. Detection of Mitochondrial DNA Mutations in Primary Breast Cancer and Fine-Needle Aspirates. Cancer Res. 2001, 61, 7623-7626.
52. Patnaik AK, Ehler WJ, Macewen EG. Canine cutaneous mast cell tumour: morphologic grading and survival time in 83 dogs. Vet Pathol. 1984, 21,469-474.
53. Pizzoni S, Sabattini S, Stefanello D, Dentini A, Ferrari R, Dacasto M, Giantin M, Laganga P, Amati M, Tortorella G, Marconato L. Features and prognostic impact of distant metastases in 45 dogs with de novo stage IV cutaneous mast cell tumours: A prospective study. Vet Comp Oncol. 2017,16, 28-36.
54. Poggiani SSC, Terra EM, Neto RT, Costa MT, Amorim RL. Canine cutaneous mast cell tumor: biologic behavior and its correlation with prognostic indicators. Open J Vet Med. 2012, 2, 255-261.
55. Richard SM, Bailliet G, Páez GL, Bianchi MS, Peltomäki P, Bianchi NO. Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. Cancer Res. 2000,60,4231-4237

56. Romansik EM, Reilly CM, Kass PH, Moore PF, London CA. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. Vet Pathol. 2007, 44, 335-341.
57. Sabattini S, Scarpa F, Berlato D, Bettini G.: Histologic grade of canine mast cell tumor: Is 2 better than 3? Vet. Pathol. 2015, 52, 70–73.
58. Sapierzyński R. Badanie histopatologiczne w onkologii weterynaryjnej. Życie Wet. 2018, 93,169-174.
59. Sfiligoi G, Rassnick KM, Scarlett JM, Northrup NC, Gieger TL. Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990–2001). J Am Vet Med Assoc. 2005, 226, 1368-1374.
60. Shoop SJW, Marlow S, Church DB, English K, McGreevy PD, Stell AJ, et al. Prevalence and risk factors for mast cell tumours in dogs in England. Canine Genet Epidemiol 2015, 2, 1.
61. Smith J, Kiupel M, Farrelly J, Cohen R, Olmsted G, Kirpensteijn J, Brocks B, Post G. Recurrence rates and clinical outcome for dogs with grade II mast cell tumors with low AgNOR count and Ki67 index treated with surgery alone. Vet. Comp Oncol. 2015, 15, 36–45
62. Stefanello D, Buracco P, Sabattini S, Finotello R, Giudice C, Grieco V, Iussich S, Tursi M, Scase T, Di Palma S, Bettini G, Ferrari R, Martano M, Gattino F, Marrington M, Mazzola M, Vasconi M.E, Annoni M, Marconato L.: Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014). J Am Vet Med Assoc. 2015, 246, 765–769
63. Surdyka M, Ślaska B. Defect of the mitochondrial DNA hypervariable region as a risk factor for canine mammary tumour. Vet Comp Oncol. 2017, 15, 820-828.

64. Surdyka M, Ślaska B. Defect in ND2, COX2, ATP6, and COX3 mitochondrial genes as a risk factor for canine mammary tumour. Vet Comp Oncol. 2017, 15, 1062-1072.
65. Ślaska B, Grzybowska-Szatkowska L, Bugno-Poniewierska M, Surdyka M, Śmiech A. Nuclear and mitochondrial DNA mutation in human and canine tumors. Med Weter. 2013, 69, 195–202.
66. Ślaska B, Grzybowska-Szatkowska L, Surdyka M, Nisztuk S, Rozanska D, Rozanski P, Smiech A, Orzelski M. Mitochondrial D-loop mutations and polymorphisms are connected with canine malignant cancers. Mitochondr DNA. 2014, 25, 238-243.
67. Ślaska B, Surdyka M, Brodzki A, Nisztuk S, Gurgul A, Bugno-Poniewierska M, Śmiech A, Różńska D, Orzelski M. Mitochondrial D-loop mutations can be detected in sporadic malignant tumours in dogs. Bull Vet Inst Pulawy 2014, 58, 631-637.
68. Ślaska B, Grzybowska-Szatkowska L, Nisztuk S, Surdyka M, Rozanska D. Mitochondrial DNA polymorphism in genes encoding ND1, COI and CYTB in canine malignant cancers. Mitochondr DNA *2015,* 26, 452-458.
69. Tamura G, Nishizuka S, Maesawa C, Suzuki Y, Iwaya T, Sakata K, Endoh Y, Motoyama T. Mutations in mitochondrial control region DNA in gastric tumours of Japanese patients. Eur J Cancer. 1999, 35, 316-319.
70. Tong BC, Ha PK, Dhir K, Xing M, Westra WH, Sidransky D, Califano JA. Mitochondrial DNA alterations in thyroid cancer. J Surg Oncol. 2003,82, 170-173
71. Tseng LM, Yin PH, Yang CW, Tsai YF, Hsu CY, Chi CW, Lee HC. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human breast cancers. Gene Chromosome Canc. 2011, 50, 800–811.
72. Voo KS, Zeng G, Mu JB, Zhou J, Su XZ, Wang RF. CD4+ T-cell response to mitochondrial Cytochrome b in human melanoma. Cancer Res. 2006, 66, 5919-5926.

73. Warland J, Dobson J. Breed predispositions in canine mast cell tumour: a single centre experience in the United Kingdom. Vet J. 2013;197: 496-498.
74. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, Miller R, Resau JH, Kiupel M. The role of c-KIT in tumorigenesis:evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. Neoplasia. 2006, 8, 104-11.
75. Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. Vet Pathol. 2007, 44, 298-308.
76. Welle MM, Bley CR, Howard J, Rüfenacht S. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. Vet Dermatol. 2008, 19, 321-339.
77. White CR, Hohenhaus AE, Kelsey J, Procter-Gray E. Cutaneous MCTs: associations with spay/neuter status, breed, body size, and phylogenetic cluster. J Am Anim Hosp Assoc. 2011, 47, 210-216.
78. Wu H, Hayashi T, Inoue M. Immunohistochemical expression of Mdm2 and p53 in canine cutaneous mast cell tumours. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2006, 53, 65-68.
79. Villamil JA, Henry CJ, Bryan JN, Ellersieck M, Schultz L, Tyler JW, et al. Identification of the most common cutaneous neoplasms in dogs and evaluation of breed and age distributions for selected neoplasms. J Am Vet Med Assoc. 2011, 239, 960-965.
80. Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J: Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. Science. 1997, 277, 60-66.

81. Zemke D, Yamini B, Yuzbasiyan-Gurkan V. Mutations in the juxtamembrane domain of c-KIT are associated with higher grade mast cell tumors in dogs. Vet Pathol. 2002, 39, 529-535.
82. Zink MC, Farhoody P, Elser SE, Ruffini LD, Gibbons TA, Rieger RH. Evaluation of the risk and age of onset of cancer and behavioral disorders in gonadectomised Vizslas. J Am Vet Med Assoc. 2014, 244, 309-319.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Od początku pracy uczestniczyłam aktywnie w działalności dydaktyczno-klinicznej, co po pewnym czasie umożliwiło mi sprecyzowanie swojego profilu naukowo-badawczego. Stale wzrastająca liczba diagnozowanych nowotworów sprawiła, że onkologia weterynaryjna stanowi obecnie główny przedmiot moich zainteresowań. Badania moje skupiają się wokół diagnostyki patomorfologicznej oraz oceny wskaźników prognostycznych w nowotworach u zwierząt. Z kolei drugi temat z tego zakresu obejmuje genomikę mitochondrialną i jądrową w nowotworach u psów. Inne moje prace badawcze związane są z diagnostyką anatomopatologiczną chorób zakaźnych i chorób skóry u zwierząt oraz patologią układu rozrodczego. Wykorzystanie kapsaicyny w alternatywnej terapii przeciwnowotworowej w weterynarii oraz prace doświadczalne o różnorodnym profilu to następne zagadnienia które odnoszą się mojej działalności naukowej.

5.1. Dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych

Badanie histopatologiczne nowotworów stanowi podstawowy element postępowania diagnostycznego. Postęp jaki dokonano w ostatnich latach dzięki wprowadzeniu metod immunohistochemicznych umożliwia nie tylko dokładne rozpoznanie danego guza, ale również zastosowanie odpowiedniej strategii terapeutycznej. W celu pogłębienia wiedzy dotyczących metod immunohistochemicznych, które w medycynie człowieka w latach 90-tych były już powszechnie stosowane nawiązałam współpracę z Uniwersytetem Medycznym w Lublinie, gdzie odbyłam staż w Katedrze Patomorfologii Klinicznej z zakresu technik immunohistochemicznych. Wiedzę jaką zdobyłam na stażu oraz szkoleniach z zakresu immunohistochemii wykorzystałam w swojej pracy badawczej. Różnice w poglądach autorów

odnośnie histogenezy guzów gruczołu sutkowego u suk skłoniły mnie do podjęcia badań, których celem było immunohistochemiczna ocena reaktywności tych guzów ze szczególnym uwzględnieniem komórek miopeitelialnych. Pierwsze pilotażowe wyniki swoich badań przedstawiłam w formie autoreferatu na konferencji naukowej w Olszynie w 1997 pt.: Onkologia weterynaryjna postępy w diagnostyce i terapii oraz XI Kongresie PTNW w Lublinie w 2000 roku. Zakończeniem powyższego etapu badań było uzyskanie w 2001 na Wydziale Medycyny Weterynaryjnej AR (obecnie UP) tytułu doktora nauk weterynaryjnych na podstawie dysertacji doktorskiej pt. „*Zastosowanie metod immunohistochemicznych w diagnostyce różnicowej i histogenezie nowotworów gruczołu mlekowego u suk*", która została opublikowana w Polish Journal of Veterinary Sciences w 2002 roku. W tym okresie nawiązałam również współpracę z Katedrą i Kliniką Rozrodu Zwierząt UP w Lublinie z którą opublikowaliśmy wspólne prace dotyczące patologii układu rozrodczego u suk.

Wyniki badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

1. Krakowski L, Łopuszyński W, Śmiech A. Przypadek zaśniadu groniastego u suki. Medycyna Weterynaryjna 1996, 52, 125 – 126.
2. Wawron W, Piech T, Wierzchowski P, Śmiech A. Przypadek mięśniaka gładkokomórkowego trzonu szyjki macicznej u suki. Magazyn Weterynaryjny1998, 7, 326 – 328.
3. Kusy R, Śmiech A, Wrona Z. Współistnienie błoniaka ziarnistego jajnika i ropomacicza u suki. Życie Weterynaryjne1999,74, 437 – 439.
4. Śmiech A, Łopuszyński W, Nozdryn–Płotnicki Z. Studies on histogenesis of mixed tumours of the mammary gland in bitches. Polish Journal of Veterinary Sciences 2002, 5, 217-222.

Wyniki badań z tego okresu były prezentowane również na konferencjach w formie referatów i posterów:

1. Gładysz – Gacek K, Taszkun I, Śmiech A. Chłoniak złośliwy u psa – opis przypadku. Materiały X Kongresu PTNW Wrocław, 156, 1996.
2. Śmiech A, Nozdryn – Płotnicki Z, Łopuszyński W. Diagnostyka guzów gruczołu mlekowego u suk z zastosowaniem metod immunohistochemicznych. Materiały I Konferencji Naukowej pt.: Onkologia weterynaryjna postępy w diagnostyce i terapii. Olsztyn, 94-99, 1997.

3. Śmiech A. Identyfikacja komórek mioepitelialnych w guzach mieszanych gruczołu mlekowego u suk w oparciu o zastosowanie techniki immunohistochemicznej. Materiały XI Kongresu PTNW Lublin. Annales UMCS, 200, 2000.

4. Nozdryn – Płotnicki Z, Łopuszyński W, Śmiech A. Nowotwory zwierząt domowych w materiale badań Katedry Anatomii Patologicznej AR w Lublinie w latach 1960 – 1999. Materiały XI Kongresu PTNW Lublin. Annales UMCS, 170, 2000.

5.2. Dorobek naukowy po uzyskaniu tytułu doktora nauk weterynaryjnych

5.2.1. Diagnostyka patomorfologiczna i ocena wskaźników prognostycznych nowotworów u zwierząt

W kolejnych latach nadal kontynuowałam badania oparte na wykorzystaniu technik immunohistochemicznych w rozpoznawaniu nowotworów u psów. Swoją wiedzę ugruntowałam podczas pobytu na miesięcznym stażu w Instytucie Patologii Weterynaryjnej na Uniwersytecie w Giessen (Niemcy). Techniki immunohistochemiczne wykorzystałam w diagnostyce różnych nowotworów u psów między innymi guzów żołądka, mięśniakomięsaka pęcherza moczowego, chłoniaka jelita biodrowego oraz guzów histiocytarnych. Dzięki przeprowadzonym analizom, dokładnie zróżnicowano rozrosty nowotworowe oraz postawiono jednoznaczne rozpoznanie z uwzględnieniem histogenezy. Czynniki prognostyczne w nowotworach gruczołu sutkowego suk, określające rokowanie i przebieg choroby nowotworowej należą do kolejnego kręgu moich zainteresowań naukowych. Część prac została wykonana w ramach projektu badawczego finansowanego ze środków MNiSW nr N308 004 31/0655 pt. „Ocena złośliwości i biologicznej agresywności nowotworów gruczołu sutkowego u suk", którego byłam wykonawcą. Wykorzystując możliwości jakie dają techniki immunohistochemiczne i histochemiczne dokonano oceny ekspresji proliferacyjnego antygenu jądrowego (PCNA) oraz parametrów regionów organizatorów jąderkowych (AgNORs) w nowotworach gruczołu sutkowego u suk. Badania udokumentowały, że średnia wartość indeksu PCNA była wyższa w grupie nowotworów złośliwych w porównaniu ze zmianami dysplastycznymi i niezłośliwymi, natomiast wartości parametrów AgNORs były niższe w guzach niezłośliwych w stosunku do nowotworów złośliwych. Z kolei w innej pracy za pomocą badań immunohistochemicznych udokumentowano obniżenie ekspresji E-kadheryny w złośliwych guzach sutka w porównaniu do tkanki prawidłowej i nowotworów łagodnych. Oznaczanie wartości indeksu PCNA, wartości parametrów AgNORs oraz E-kadheryny w

nowotworach gruczołu sutkowego mogą być przydatne w prognozowaniu przebiegu nowotworu oraz stanowią cenne uzupełnienie badania histopatologicznego. Kolejną pracę wykonano z Katedrą i Kliniką Rozrodu Zwierząt UP w Lublinie. Na podstawie dwuletniego okresu obserwacji po zabiegu operacyjnym mastektomii ustalono że wartościowymi czynnikami prognostycznymi jest średnica guza oraz typ histologiczny. Wczesne wykrycie i usuniecie guza, kiedy jego rozmiary nie przekraczają 3 cm istotnie zmniejsza ryzyko dalszego rozwoju choroby. Z kolei w kooperacji z Katedrą Anatomii i Patologii Porównawczej Uniwersytetu w Cordobie (Hiszpania) dokonano analizy porównawczej ekspresji kalponiny i białka p63 jako markera komórek mioepitelialnych guzów gruczołu sutkowego u suk. Uzyskane wyniki badań potwierdziły, że p63 jest bardziej swoistym markerem tych komórek w porównaniu z kalponiną. Odkrycia te sugerują, że analiza immunohistochemiczna przeprowadzona za pomocą p63 może być cennym dopełnieniem rutynowych badań histologicznych nowotworów sutka z komponentą mioepitelialną. Kontynuującą zainteresowań nad czynnikami prognostycznymi jest kolejna publikacja dotycząca angiogenezy w nowotworach jamy ustnej u psów. Wśród badanych guzów największe nasilenie procesu angiogenezy zaobserwowano w raku płaskonabłonkowym, co może wiązać się z szybkim ryzkiem rozwoju ognisk przerzutowych. W dwóch innych pracach udokumentowano po raz pierwszy przypadek mięśniakomięsaka jelit u jaszczurki agamy brodatej oraz opisano zastosowanie rynoskopii jak cennej metody diagnostycznej w rozpoznawaniu nowotworów jamy nosowej u psów. W kolejnej pracy opartej na współpracy międzywydziałowej uniwersyteckich jednostek weterynaryjnych o profilu anatomo–patologicznym przeprowadzono epidemiologiczną oraz histologiczną analizę nowotworów gruczołów potowych-apokrynowych u psów z terenu Polski. Badania wykazały największą zachorowalność u psów rasy mieszanej oraz owczarków niemieckich, w wieku między 8. a 14. rokiem życia, a miejscem najczęstszej lokalizacji była klatka piersiowa oraz kończyny przednie.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w następujących publikacjach:

1. Łopuszyński W, Szczubiał M, Nozdryn-Płotnicki Z, Śmiech A. Ocena aktywności proliferacyjnej nowotworów gruczołu mlekowego u suk na podstawie ekspresji proliferacyjnego antygenu jądrowego (PCNA) Medycyna Weterynaryjna 2002, 58, 275-280.
2. Łopuszyński W, Szczubiał M, Śmiech A. Ocena parametrów regionów organizatorów jąderkowych (NORs) w nowotworach gruczołu mlekowego u suk. Medycyna Weterynaryjna 2003, 59, 416-420.

3. Szczubiał M, Dąbrowski R, Śmiech A, Łopuszyński W, Wawron W, Kusy R, Iwanicki R. Przydatność wybranych czynników klinicznych w prognozowaniu przebiegu nowotworów złośliwych gruczołu sutkowego u suk. Medycyna Weterynaryjna 2004, 60, 160-164.

4. Balicki I, Śmiech A, Komsta R, Brodzki A, Łopuszyński W. Nowotwory żołądka psóww świetle badań klinicznych, histologicznych i immunohistochemicznych. Medycyna Weterynaryjna 2004, 60, 602-606.

5. Sobczyńska –Rak A, Polkowska I, Śmiech A, Silmanowicz P. Przypadek chłoniaka złośliwego jelita biodrowego u psa. Medycyna Weterynaryjna 2008, 64, 889-892.

6. Sobczyńska–Rak A, Polkowska I, Śmiech A, Sobolewska E. Angiogenesis in malignat oral-cavity tumours in dogs. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulavy 2009, 53, 463-466.

7. Adaszek Ł, Staniec M, Buczek K, Łopuszyński W, Śmiech A, Milczak A, Dębiak P, Klimiuk P, Wyłupek D, Winiarczyk S. Application of rhinoscopy in the diagnosis of nasaltumors in dogs. Medycyna Weterynaryjna 2014, 70, 54-59.

8. Paździor-Czapula K, Rotkiewicz T, Otrocka-Domagała I, Gesek M, Śmiech A. Morphology and immunophenotype of canine cutaneous histiocytic tumours with particular emphasis on diagnostic application. Veterinary Research Communication 2015, 39, 7-17.

9. Łopuszyński W, Szczubiał M, Klimiuk P, Śmiech A, Dąbrowski R, Bochniarz M. Immonohistochemical evaluation of E-cadherin expression in normal and neoplastic canine mammary glands. MedycynaWeterynaryjna 2015, 71, 152-157.

10. Łojszczyk-Szczepaniak A, Śmiech A, Chlebicka N, Szczepaniak K, Klimiuk P. First case of intestinal leiomyosarcoma in a bearded dragon: ultrasonographic findings. Medycyna Weterynaryjna. 2016, 72, 303-306.

11. Kycko A, Jasik A, Bocian Ł, Otrocka-Domagała I, Mikiewicz M, Śmiech A, Łopuszyński W, Dolka I, Nowak M, Madej A. J. Epidemiological and histopathological analysis of 40 apocrine sweat gland carcinomas in dogs: a retrospective study. Journal of Veterinary Research 2016, 60, 3, 331-337.

12. Sobczyńska-Rak A, Polkowska I, Żylińska B, Śmiech A, Łojszczyk –Szczepaniak A. A case report of leiomyosarcoma, a very rare type of urinary bladder tumor. Medycyna Weterynaryjna 2017, 73, 439-444.

13. Łopuszyński W, Szczubiał M, Millan Y, Guil-Luna S, Sanchez-Céspedes R, Martin De Las Mulas J, Śmiech A, Bulak K. Immunohistochemical expression of p63 protein and calponin in canine mammary tumours. Research of Veterinary Science 2019, 123, 20-25.

5.2.2. Genomika jądrowa i mitochondrialna w nowotworach u psów

U podstaw kancerogenezy leżą nieprawidłowości w strukturze i ekspresji materiału genetycznego**,** dlatego też wyjaśnienie podłoża molekularnego rozwoju nowotworów może przyczynić się do pełnego zrozumienia mechanizmów, które sterują procesem transformacji nowotworowej i skutkują rozwojem guza. Najnowsze doniesienia naukowe potwierdzają powiązanie mutacji stwierdzanych w genomie jądrowym jak również mitochondrialnym z procesem onkogenezy. Z związku z tym wspólnie z prof. dr hab. Brygidą Ślaską kierownikiem Pracowni Genetyki Ogólnej i Molekularnej UP w Lublinie podjęłam nowatorskie badania molekularne majce na celu identyfikację zaburzeń w genomie mitochondrialnym i jądrowym w różnych nowotworach u psów. W pierwszej wspólnej pracy dokładnie prześledzono oraz porównano mutacje występujące w jądrowym i mitochondrialnym DNA u nowotworach u ludzi i psów. Stwierdzono, że z medycznego punktu widzenia choroby genetyczne u ludzi i psów są podobne co umożliwia testowanie nowych podejść terapeutycznych, szczególnie w przypadku mutacji dotyczących genów ortologicznych. Pragnę nadmienić, że praca ta została przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych uznana za wybitną monografię z zakresu nauk weterynaryjnych ogłoszoną w czasopiśmie Medycyna Weterynaryjna w roku 2013. Pojedyncze reporty dotyczące genomiki mitochondrialnej u psów stanowiły inspirację do podjęcia badań z zakresu tej tematyki. Dwie publikacje obejmowały tematykę poświęconą pętli D. Jest to jedyny niekodujący region mitochondrialnego DNA, w którym zachodzi inicjacja transkrypcji i replikacji. Celem pierwszych badań była identyfikacja różnic w sekwencji nukleotydowej w guzie, tkance prawidłowej oraz krwi i określenie związku z różnymi typami nowotworów występującymi u psów. Odnotowano mutację typu substytucja w sekwencji pętli D w 62,5% analizowanych nowotworów pochodzenia nabłonkowego oraz w 25% guzach mezenchymalnych. Heteroplazmię we krwi oraz tkance guza zaobserwowano w przypadku raka płaskonabłonkowego oraz raka typu „comedo". Jednocześnie stwierdzono, że transwersje w pozycji A15586GI G15627A w nowotworach nabłonkowych oraz A15643GI A15639G w guzach mezenchymalnych mogą stanowić polimorfizmy przyczyniające się do rozwoju guza. Drugie badania dotyczyły nowotworów u psów występujące w różnych lokalizacjach. Najwięcej mutacji w rejonie pętli D mtDNA odnotowano w nowotworach z ok. głowy i szyi (28,57%), natomiast najwięcej polimorfizmów w guzach z ok. kończyn (58,33%). Heteroplazmię zaobserwowano w przypadku raka gruczołów potowych zlokalizowanego na kończynach. Powyższe analizy molekularne potwierdziły, wysoką zmienność genetyczną w obszarze pętli D w komórkach nowotworowych, co wskazuje na niestabilność genetyczną

mitochondrialnego DNA w tym rejonie i związek z procesem nowotworzenia. Celem kolejnych badań była identyfikacja polimorfizmów i mutacji mitochondrialnego genu ND4 oraz określenie związków pomiędzy występowaniem zmian molekularnych w mtDNA oraz cech fenotypowych owczarków niemieckich ze zdiagnozowanymi nowotworami. Gen ND4 (NADH dehydrogenase subunit 4) koduje podjednostkę 4 kompleksu dehydrogenazy NADH (ang. Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen) wchodzącej w skład łańcucha oddechowego. Analizą objęto 25 psów rasy owczarek niemiecki. Mutacje i polimorfizmy ND4 odnotowano w jedenastu pozycjach nukleotydowych u połowy badanych owczarków niemieckich. W jednym przypadku u psa ze stwierdzonym kostniakomięsakiem wykryto heteroplazmię we krwi. Odnotowano wyższe prawdopodobieństwo wystąpienia mutacji w guzach narządów wewnętrznych i płciowych niż guzach sutka. Przeprowadzone analizy wykazały, że identyfikowane mutacje i polimorfizmy mogą być wynikiem adaptacji komórki do zmian zachodzących w środowisku podczas kancerogenezy.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w następujących publikacjach:

1. Ślaska B, Grzybowska-Szatkowska L, Surdyka M, Bugno-Poniewierska M, Śmiech A. Nuclear and mitochondrialna mutation in human and canine tumours. Medycyna Weterynaryjna 2013, 69, 195-202.
2. Ślaska B, Grzybowska-Szatkowska L, Surdyka M, Nisztuk S, Różańska D, Różański P, Śmiech A, Orzelski M. Mitochondrial D-loop mutations and polymorphisms are connected with canine malignant cancers. Mitochondrial DNA,2014,18, 238-243
3. Ślaska B, Surdyka M, Brodzki A, Nisztuk S, Gurgul A, Bugno-Poniewierska M, Śmiech A Różańska D, Orzelski M. Mitochondrial D-loopmutationcan be deteced in sporadic malignat tumours in dog. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulavy 2014, 58, 631-637.
4. Ślaska B, Grzybowska-Szadkowska L, Bugno-Poniewierska M, Gurgul A, Śmiech A, Różańska D, Dudka J. Relevance of molecular changes in the ND4 gene in German Shepherd dog tumours. Polish Journal of Veterinary Sciences2016, 19, 461-469.

5.2.3. Diagnostyka patomorfologiczna chorób zakaźnych zwierząt i chorób skóry

Choroby skóry podobnie jak nowotwory stanowią ważny kierunek moich zainteresowań naukowych. Aby udoskonalić swoją widzę z dermatopatologii odbyłam tygodniowy staż w Wyższej Szkole Weterynaryjnej w Lyonie, gdzie zapoznałam się ze diagnostyką histologiczną chorób skóry. Od początku swojej działalności intensywnie współpracuję z Zakładem Diagnostyki i Dermatologii Weterynaryjnej UP w Lublinie. Efektem naszej wspólnej pracy jest

6 monografii dotyczących chorób skóry psów i kotów. Ponadto jestem współautorem 40 prac w czasopismach z listy B (wykaz w załączniku nr 4). Najbardziej interesujące prace z tej tematyki dotyczą syndromu Ehlers-Danlosa u kotów, rozsianych cyst mieszka włosowego u american staffordshire terriera oraz wapnicy miejscowej u psów. Syndrom Ehlers-Danlosa jest rzadko występująca chorobą genetyczną, związaną z zaburzeniami w syntezie kolagenu. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono ze pomocnym narzędziem w postawieniu pełnego rozpoznania oprócz badań klinicznych jest obliczanie wskaźnika rozciągalności skóry, badanie histologiczne oraz mikroskopia eletronowa. Kolejna praca poświęcona rzadkiej chorobie skóry o podłożu genetycznym dotyczyła mieszków włosowych. Rozsiane torbiele mieszków włosowych zdiagnozowano u 7 letniego american staffordshire terriera. Wprowadzona metoda terapeutyczna w postaci niskich dawek isotretinoiny przyczyniła się do zmniejszenia nasilenia objawów klinicznych aż do całkowitego zatrzymania choroby. Temat następnych badań dotyczył miejscowej wapnicy u psów. Opisano 16 przypadków wapnicy skóry i 2 z okolicy języka. Najwięcej zmian zdiagnozowano u owczarków niemieckich. Występowały głównie w wieku 2-5 lat, a lokalizacja dotyczyła przede wszystkim kończyn. W kolejnych pracach udokumentowano rzadko występujące choroby zakaźne występujące u różnych gatunków zwierząt. Przedstawiono sporadycznie występujący w Polsce przypadek dermatofilozy wywoływanej przez *Dermatophilus congolensis.* Choroba ta pojawia się głównie w ciepłym klimacie, a za jej rozprzestrzenianie odpowiedzialne są stawonogi. Opisane w pracy przypadki dotyczą 8 sztuk bydła mlecznego z rejonu Lubelszczyzny. W przeprowadzonych badaniach opisano procedury diagnostyczne oraz postępowanie lecznicze, które nie wpływają na zaburzenia produkcji mlecznej. W terapii miejscowej pozytywne rezultaty uzyskano po zastosowaniu preparatów jodowych. Celem następnego badania było wyizolowanie, zidentyfikowanie i scharakteryzowanie beztlenowych bakterii z ogniska naturalnego zakażenia u lisów srebrzystych, charakteryzującego się objawami sepsy i enteropatii krwotocznej. U wszystkich martwych lisów stwierdzono zmiany w jelicie cienkim w postaci martwicowego zapalenia oraz zwyrodnienie narządów miąższowych. Przeprowadzone analizy potwierdziły, że bakterie wyizolowane z narządów należały do gatunków typu C i typu *A Clostridium perfringens* wytwarzających toksyny alfa i beta. W innej pracy po raz pierwszy udokumentowano zapalenie wsierdzia u kurcząt brojlerów wywołane koagulazododatnim gronkowcem *Staphylococcus simulans.* Widoczne w badaniu histopatologicznym konglomeraty bakterii przylegające do płata zastawki mitralnej zostały dokładnie zdiagnozowane za pomocą analiz molekularnych oraz badań bakteriologicznych.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w następujących publikacjach:

1. Szczepanik M, Gołyński M, Wilkołek P, Popiel J, Śmiech A, Pomorska D, Nowakowski H.: Ehlers-Danlos Syndrome (Cutaneus Astenia) –Report of three cases in cats. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulavy 2006, 50, 609-612.

2. Szczepanik M, Wilkołek P, Adamek Ł, Śmiech A, Taszkun I, Kalisz G. Successful control of disseminated follicular cysts in a dog with low dose isotretinoin. Canadian Veterinary Journal 2018, 59, 1213-1215.

3. Stec A, Szczepanik M, Gołyński M, Kurek Ł, Mochol J, Śmiech. Dermatofiloza w hodowli bydła mlecznego na terenie Lubelszczyzny. Medycyna Weterynaryjna 2005,61, 290-292.

4. Łojszczyk –Szczepaniak A, Orzelski M Śmiech A. Canine calcinosis circumscripta. Medycyna Weterynaryjna 2008, 64, 1377-1400.

5. Jarosz L, Grądzki Z, Śmiech A, Kalinowski M. Haemorhagic enterotoxemia by *Clostridium perfringens* type C and typ A in silver foxes. Polish Journal of Veterinary Sciences 2014, 17, 185-186.

6. Stępień-Pyśniak D, Wilczyński J, Marek A, Śmiech A, Kosikowska U, Hauschild T.Staphylococcus simulans associated with endocarditis in broiler chickens. Avian Patholology 2017, 46, 44-51.

5.2.4. Patologia układu rozrodczego zwierząt

Wzrost zainteresowania hodowlą koni sprawia, że szczególnie znaczenia nabierają problemy związane z reprodukcją. Mając ten temat na uwadze wykonano badania, których celem było ustalenie przyczyn uniemożliwiających uzyskanie potomstwa od klaczy w sezonie hodowlanym. Przeprowadzone analizy wykazały, że częstotliwość występowania wczesnego zamierania zarodków oraz ronień u klaczy jest dodatnio skorelowana z nasileniem zmian patologicznych wykrytych badaniem cytologicznym, bakteriologicznym i histologicznym macicy. Kolejne prace z tej dziedziny koncentrowały się w obrębie układu rozrodczego suk. W jednej z nich dokonano oceny klinicznej i histologicznej nowotworów jajnika oraz wykazano, że pomimo niskiej zachorowalności nowotwory te stanowią ciekawą grupę ze względu na różnorodność form histologicznych oraz przebieg kliniczny. Najczęściej diagnozowanym typem nowotworu okazał się błoniak ziarnisty (62,5%) w dalszej kolejności występował

gruczolakotorbielak (18,7%), gruczolak brodawkowaty (12,5%) oraz potworniak (6,25%). Badania potwierdziły, że wczesne rozpoznanie guza umożliwia skuteczną interwencję chirurgiczną, która w 80% skutkuje pomyślnym rokowaniem. Kolejne badania dotyczyły oceny przydatności pomiaru białka c-reaktywnego jako wskaźnika natężenia procesu zapalnego w przypadku torbielowatości jajników u suk. Przeprowadzone analizy wykazały, że oznaczanie poziomu białka CRP jest wiarygodnym elementem laboratoryjnej diagnostyki klinicznej umożliwiającym określenia natężenia procesu zapalnego. Ostatnia praca z tej grupy dotyczyła osobnika męskiego posiadającego niedorozwinięte prącie oraz szczątkowy napletek. Badania cytogenetyczne i analizy molekularne wykazały prawidłowy zestaw chromosomów, typowy dla płci męskiej – 78, XY obecność genów ZFY (w chromosomie Y) i ZFX w chromosomie X oraz prawidłową sekwencję genu SRY. Przedstawiony przypadek zaliczony został do grupy zaburzeń rozwoju płci (DSD) na poziomie zaburzeń płci fenotypowej niezwiązany z aberracjami chromosomów płciowych ani mutacjami genu SRY.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w następujących publikacjach:

1. Kusy R, Bochniarz M, Śmiech A, Wawron W. Próba określenia przyczyn zaburzeń płodności u klaczy. Medycyna Weterynaryjna. 2001, 57 562-566.
2. Kusy R, Śmiech A, Łopuszyński W, Szczubiał M, Dąbrowski R, Krasucki J, Wawron W. Kliniczna i histologiczna charakterystyka nowotworów jajników u suk. Medycyna Weterynaryjna 2005, 6, 775-780.
3. Wdowiak A, Dudziak A, Szczubiał M, Kusy R, Bochniarz, Śmiech A, Tvarijonaviciute A, Dąbrowski R. Przydatność pomiaru białka C-reaktywnego w ocenie natężenia procesu zapalnego w przebiegu torbielowatości jajnika u suki (Role of C-reactive protein determination to assay the inflammatory process in the course of ovarian cysts in female dogs). Medycyna Weterynaryjna 2018, 74, 731-735.
4. Różańska D, Szczerbal I, Stachowiak M, Dębiak P, Śmiech A, RóżańskiP, Orzelski M, Żylińska B, Świtoński M, Ślaska B. Penile hypoplasia and rudimentary prepuce in a dog (78, XY; SRY-positive): a case report. VeterinarniMedicina2016, 61,279-287.

5.2.5. Wykorzystanie kapsaicyny w terapii przeciwnowotworowej u psów

W ostatnim czasie w medycynie ludzkiej wiele uwagi poświęca się zastosowaniu kapsaicny w leczeniu nowotworów. Kapsaicyna (trans-8-metylo-N-wanilino-6-nonenamid)

jest organicznym związkiem z grupy alkaloidów, uzyskiwanym z roślin z rodziny Capsicum. Stosunkowo duże jej ilości znajdują się w owocach różnych odmian papryk, a sam związek odpowiedzialny jest za pikantny smak tego warzywa. W ostatnim okresie wzrosło również zainteresowanie wykorzystaniem tej substancji w leczeniu alternatywnym - nowotworów u zwierząt. Będąc członkiem zespołu badawczego zajmującego się kaspaicyną uczestniczyłam w badaniach dotyczących wpływu podawania wyciągu habanero *(Capsicum chinense Jacquin)* na przewód pokarmowy i stan narządów miąższowych u szczurów. Uzyskane wyniki potwierdziły wysoki stopień bezpieczeństwa badanej substancji niewykazującej szkodliwego wpływu na oceniane narządy tj. żołądek, jelita wątrobę i nerki. Z kolei wstępne obserwacje kliniczne przeprowadzone na 50 psach z różnymi nowotworami potwierdziły, że ekstrakt z papryki habanero zawierającej kapsaicynę wykazuje korzystne działanie na różne nowotwory u psów zwłaszcza raki gruczołu sutkowego o niskim stopniu złośliwości G1 oraz jest dobrze tolerowany przez zwierzęta. Badania in vitro na liniach nowotworowych, DAN (fibroblasty izolowane z kostniakomięsaka) i D-17 (komórki nabłonkowe) wykazały większość skuteczność ekstraktu z papryczek na komórki nowotworowe niż czystej kapsaicyny. Istotnie statystycznie silniejsze działanie przeciwnowotworowe obserwowano po wprowadzeniu do hodowli ekstraktu w stężeniu 50 μM i wyższym. W innej pracy potwierdzono korzystne działanie ekstraktu z papryczek habanero na pierwotne nowotwory wątroby zdiagnozowane u starszych psów. Stwierdzono, że podawanie tego preparatu u psów z pierwotnymi guzami wątroby istotnie wydłuża czas życia zwierząt w porównaniu do zwierząt grupy kontrolnej nie otrzymujących żadnego leczenia (178,6 dni vs 76,5 dni). „Badania nad aktywnością przeciwnowotworową suszu z papryczek habanero, zawierającego kapsaicynę w warunkach in vitro oraz in vivo u psów" stanowiły przedmiot rozprawy doktorskiej lek. wet. Dagmary Gadomskiej, w której sprawowałam funkcje promotora pomocniczego.

Wyniki badań zostały opublikowane w następujących publikacjach:

1. Gołynski M, Balicki I, Lutnicki K, Smiech A, Adamek L, Szczepanik M, Wilkolek P, Brodzki A, Adaszek L. Systemic and local effects of intragastric administration of the habanero fruit (Capsicum chinense Jacquin c.v.) in rats. Journal of Physiology and Pharmacology 2015, 66, 259-265.

2. Adaszek Ł, Słabczyńska O, Łyp P, Gadomska D, Ziętek J, Różańska D, Orzelski, Śmiech A, Staniec M, Krasucka D, Winiarczyk S. Comparison of the in vitro anticancer effect

of habanero pepper extract containing capsaicin with that of pure capsaicin in selected dog neoplastic cell lines. Turkish Journal of Veterinary Animal 2018,42, 243-250.

3. Dębiak P, Gadomska D, Śmiech A, Ziętek J, Łyp P, Łojszczyk-Szczepaniak A, Winiarczyk S. Adaszek Ł. Effectiveness of capsaicin containing dried habanero pepper extract in the treatment of primary hepatic cancer in geriatric dogs. Medycyna Weterynaryjna 2018, 74, 765-771.

5.2.6. Badania doświadczalne z wykorzystaniem diagnostyki histo-anatomopatologicznej

Jedna z wykonanych prac doświadczalnych przeprowadzona została na fermie norek, w celu określenia wpływu dodatku plazmy w okresie przygotowania do rozrodu na zmiany anatomo- i histopatologiczne oraz immunohistochemiczne narządów wewnętrznych. Badaniami objęto cztery grupy zwierząt wśród których jedna grupa stanowiła kontrolę. Grupy doświadczalne otrzymywały wraz z karmą dodatek 0,5%, 1,5%, 2,5% plazmy wołowo-wieprzowej w dziennej dawce karmy. Badaniom histo-anatomopatologicznym oraz immunohistochemicznym poddano wycinki wątroby, nerek, węzła chłonnego, śledziony, jelita wszystkich grup. Zmiany morfologiczne o różnym stopniu nasilenia zaobserwowano w narządach wszystkich grup doświadczalnych. Najbardziej zawansowane zmiany histopatologiczne i immunohistochemiczne obserwowano w grupie pobierającej 1,5% plazmy co może mieć związek z reakcją immunologiczną organizmu. Celem kolejnego badania była ocena wpływu niedoczynności tarczycy indukowanej metizolem u szczurów na parametry elastograficzne i morfologiczne jąder. Przeprowadzone analizy wykazały, ze stosunek elastyczności napiętej ściany moszny badanej okolicy do tkanki jądra (ELX-T-RAT) oraz wyrażona w procentach sztywność napiętych tkanek w określonym obszarze jądra (ELX-T% HRD) były statystycznie niższe u szczurów doświadczalnych w porównaniu z grupą kontrolą. Z kolei stopień spermatogenezy, średnica kanalików, masa ciała i jąder przedstawiały wyższe statystycznie istotne wartości w grupie doświadczalnej. Przeprowadzone analizy wykazały, że zmiany parametrów elastograficznych jąder mogą wynikać z zaburzeń wtórnych spowodowanych niedoczynnością tarczycy. Przydatność elastografii jest godna uwagi szczególnie w przypadku oceny funkcji jąder u pacjentów z niektórymi zaburzeniami metabolicznymi. W kolejnej pracy podjęto próbę analizy ekspresji kinaz RIPK-1 i RIPK-3, cząsteczek włączonych w szlak nekroptozy, a następnie porównania procesu obu rodzajów programowanej śmierci, apoptozy i nekroptozy, w nowotworowych i nienowotworowych komórkach owalnych (KO) izolowanych z doświadczalnie indukowanego HCC u szczurów. W porównaniu do nienowotworowych KO, ekspresja RIP-1 i RIP-3 w komórkach

nowotworowych nasilała się już od 72 godziny inkubacji, a w ostatnich dwóch tygodniach inkubacji była najsilniejsza. Zmianom tym towarzyszył niski procent komórek apoptotycznych. Uzyskane w pracy wyniki wskazują, że nekroptoza może być alternatywną drogą programowanej śmierci „apoptotycznie" opornych komórek owalnych izolowanych od szczurów z HCC.

Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w następujących publikacjach:

1. Nowakowicz-Dębek B, Śmiech A, Zoń A, Bis-Wencel H, Ondrasovicova O, Wlazło Ł, Wnuk W. Tissue pathomorphology and immunohistochemistry in mink (Neovision vison) fed blood plasma supplemented diet in the period of preparation for breeding. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulavy2012,56, 393-39.
2. Gołyński M, Dębiak P, Gołyńska M, Myśliwiec E, Szkodziak P, Kalisz G, Śmiech A, Lutnicki K. Elastographic and morphological testicular changes in hypothyroidism- an experimental study. Journal of Veterinary Research, 2018, 62, 347-352.
3. Wójcik M, Bobowiec R, Lisiecka U, Śmiech A.Expression of receptor interacting protein 1 and receptor interacting protein 3 oval cells in a rat model of hepatocarcinogenesis. Experimental and Therapeutic Medicine 2018, 15, 4448-4456.

5.3.Bibliometryczne podsumowanie osiągnięć naukowych

Lp.		Rodzaj pracy	Liczba	IF	Pkt. MNiSW
1	**Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego**	Publikacje w czasopismach naukowych posiadających Impact Factor IF (część A wykazu MNiSW)	**5**	**5, 735**	**125**
2		Doniesienia konferencyjne	**1**	-	-
1	**Pozostałe osiągnięcia naukowe**	Publikacje w czasopismach naukowych posiadających Impact Factor IF (część A wykazu MNiSW)	**32**	**18, 920**	**562**
2		Publikacje w czasopismach naukowych nieposiadającym IF (część B wykazu MNiSW)	**46**	**-**	**169**
3		Monografie	**6**	-	-
4		Artykuły popularnonaukowe i pozostałe	**18**	-	-
5		Doniesienia konferencyjne	**22**	-	-
RAZEM:			**130**	**24, 655**	**856**

Publikacje będące wynikiem realizacji powyższych tematów wraz z pełnym wykazem opublikowanych przeze mnie prac naukowych, dokładnymi informacjami o osiągnięciach dydaktycznych oraz działalności popularyzującej naukę znajdują się w załączniku nr 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

Anna Śmiech