

Prof. dr hab. Wojciech Niżański
Katedra Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
UP we Wrocławiu

Wrocław, 28.04.2019 r.

Ocena

pracy doktorskiej lek. wet Anny Wdowiak pt. „Przydatność oznaczenia wybranych hormonów, wskaźników immunologicznych, żelazo-zależnych oraz stresu oksydacyjnego w przebiegu i zejścia ropomacicza u suk”

wykonanej w Katedrze i Klinice Rozrodu Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

pod kierunkiem: dr hab. Romana Dąbrowskiego, prof. nadzw.

promotor pomocniczy dr Asta Tvariionaviciute (University of Murcia, Hiszpania)

Ropomacicza jest jedną z najważniejszych chorób układu rozrodczego suk. Wg. różnych szacunków dotyczy niemal 1/3 populacji starszych niekastrowanych samic. Jest to choroba poważna, bowiem bez podjęcia terapii kończy się śmiercią zwierzęcia. Od wielu lat doskonalone są metody jej diagnozowania oraz terapii. Postępowaniem z wyboru w większości przypadków ropomacicza jest chirurgiczny zabieg usunięcia macicy i jajników (owariohisterektomia). W ostatnich latach, wraz z wdrażaniem nowoczesnych i efektywnych środków farmakologicznych, coraz popularniejsza staje się zachowawcza metoda leczenia ropomacicza. Jej skuteczność jest wysoka, umożliwia utrzymanie płodności samicy i w wielu przypadkach pozwala uzyskiwać kolejne zdrowe mioty od suk wyleczonych. W ostatnich dekadach podjęto również intensywne badania nad możliwościami oceny stopnia narażenia samicy na rozwój ropomacicza, nad opisem patologii i etiopatogenezy tej choroby, wreszcie nad metodami oceny efektów jej leczenia i monitorowania przebiegu za pomocą czułych markerów oceny nasilenia reakcji zapalnej i odpowiedzi ogólnoustrojowej. Właśnie w ten ciekawy i nowoczesny nurt wpisuje się praca Doktorantki. Należy dodać, że praca ta to swoista kontynuacja bardzo interesujących i szeroko rozpoznawalnych na świecie badań prowadzonych w ostatnich latach przez promotora dr hab. R. Dąbrowskiego, prof. nadzw. Niezwykle cieszy i zasługuje na uznanie międzynarodowy, multicentryczny charakter doktoratu m.in. poprzez udział promotora pomocniczego – znanego badacza z ośrodka zagranicznego o uznanej reputacji naukowej.

Podjęcie badań nad możliwościami zastosowania markerów służących monitorowaniu przebiegu ropomacicza i efektów jego terapii jest uzasadnione. Istnieje w tym zakresie wyraźne zainteresowanie środowiska naukowego i praktyków weterynaryjnych. Zatem praca, oprócz oczywistej wartości poznawczej, posiada niezwykle duży potencjał aplikacyjny. Z

uwagi na duże zapotrzebowanie na tego rodzaju badania, jej potencjał publikacyjny jest również duży.

Podstawą formalną do wykonania recenzji pracy doktorskiej lek. wet. Anny Wdowiak jest uchwała Rady Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 28 lutego 2019

Przedstawiona rozprawa doktorska jest monografią i liczy 86 stron. Została zrealizowana w Katedrze i Klinice Rozrodu Zwierząt, Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie pod kierunkiem dr hab. Romana Dąbrowskiego, prof. nadzw. Promotorem pomocniczym jest dr Asta Tvarijonaviciute z University of Murcia, Hiszpania.

Praca składa się ze spisu treści, wykazu skrótów, wstępu, celu badań, materiału i metod, omówienia uzyskanych wyników, dyskusji, wniosków, wykazu piśmiennictwa, streszczenia w języku polskim, rycin i streszczenia w języku angielskim.

Znajdujące się na końcu pracy streszczenia są szerokim opisem pracy. W obu przypadkach streszczenia napisane są poprawnym językiem. Zwraca uwagę dojrzały, profesjonalny język angielski wersji obcojęzycznej streszczenia. Należy zauważyć, że prawdopodobnie wyjątkowa długość streszczeń (8 stron) wynika z udziału w przewodzie doktorskim władającego językiem angielskim promotora pomocniczego.

We wstępie pracy Doktorantka przedstawia stan wiedzy dotyczący patogeny ropomacicza suk. Opisuje też bardzo ciekawie współczesne kierunki w leczeniu choroby. Zwraca uwagę na możliwość terapii zachowawczej ropomacicza przy użyciu antygestagenów. Następnie skupia się nad biomarkerami diagnostycznymi tej jednostki chorobowej. Opisuje fizjologiczną rolę białek ostrej fazy zapalnej, w tym CRP, Haptoglobiny, Neopteryny, Interferonu gamma. Przytacza również wiele danych dotyczących znaczenia Ferrytyny, Adiponektyny, żelaza i ILBC. Opis pozytywnych i negatywnych elementów BOF i biomarkerów Autorka uzupełnia o wskaźniki stresu oksydacyjnego, w tym TAC-całkowitą zdolność antyoksydacyjną oraz TEA-całkowitą aktywność esteraz. Zwraca uwagę, iż opisywane biomarkery natężenia reakcji zapalnej można oceniać nie tylko we krwi, ale również w ślinie, co jest jednym z przedmiotów pracy i jest równocześnie swoistą nowością w medycynie weterynaryjnej małych zwierząt.

Wstęp jest niezwykle ciekawym opracowaniem przedstawiającym najważniejsze dane dotyczące patogeny i terapii ropomacicza oraz potencjalnych możliwości wykorzystania wielu biomarkerów reakcji zapalnej w monitorowaniu stanu zdrowia pacjenta leczonego chirurgicznie. Jest też doskonałym opisem wspomnianych

biomarkerów. Napisany jest ze znajomością tematu dobrym językiem naukowym.

Wstęp pracy jest na tyle całościowym opracowaniem stanu wiedzy na temat ropomacicza i znaczenia biomarkerów w diagnostyce tej choroby oraz monitorowaniu postępów jej leczenia, że bezwzględnie jest warty opublikowania w formie pracy przeglądowej w renomowanym czasopiśmie naukowym. Sugeruję kilka poprawek edytorskich tekstu, np. zmianę określenia "schorzenie" na poprawne "choroba"; "metestrus" na "diestrus", "ilość" na "liczba" jeśli wartości są policzalne, "luteoliza ciała żółtego" na "liza ciała żółtego".

Celem pracy była ocena: 1) przydatności oznaczania Adp, Np, IFN- γ oraz wskaźników żelazo-zależnych w surowicy krwi jako markerów prognostycznych do oceny przebiegu ropomacicza i okresu pooperacyjnego u suk; 2) przydatności oznaczania Adp oraz wybranych wskaźników stresu oksydacyjnego (TAC i TEA) w ślinie do określenia wiarygodnej oceny natężenia reakcji zapalnej w przebiegu ropomacicza u suk i okresu pooperacyjnego; 3) porównawczą nowych biomarkerów (Adp, Np, IFN- γ , Fe, ferrytyny, UIBC) z biomarkerami "tradycyjnymi" – wcześniej opisanymi przez dane literaturowe (P4, E2, CRP i Hp) w ocenie przebiegu ropomacicza i okresu pooperacyjnego u suk; 4) miarodajnej metody oceny stanu faktycznego zwierzęcia na podstawie oznaczanie wybranych biomarkerów w ślinie i surowicy w przebiegu ropomacicza u suk.

Badania przeprowadzono na 40 sukach różnych ras i mieszańcach. Kontrolnie 10 suk zdrowych oraz doświadczalnie 30 chorych z ropomaciczem poddano owariohisterektomii w fazie diestrus. Próbkę do badań laboratoryjnych pobierano bezpośrednio przed zabiegiem oraz 3 i 10 dni po zabiegu. Oznaczano we krwi parametry hematologiczne, biochemiczne, Adiponektynę, CRP, Hp, Neopterynę, Interferon gamma, żelazo, progestron i estradiol, całkowitą pojemność antyoksydacyjną TAC oraz całkowitą aktywność esteraz TEA. Wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu analizy wariancji ANOVA w tym porównań Tukeya oraz uwzględniono współczynniki korelacji Pearsona.

Wykorzystany materiał i zastosowane metody badawcze uznaję za trafne. Badania są bardzo szerokie. Podziw budzi ogromna liczba ocenianych parametrów, co zresztą jest atutem pracy. To bardzo ambitny projekt, dobrze zaprojektowany i rzetelnie zrealizowany. Metodyka jest zatem adekwatna do prowadzonych badań. W dobrze dobranej metodyce widać też rękę promotorów prowadzących Doktorantkę. Sugeruje aby w przyszłych publikacjach dodać do opisu materiału i metod graficzny schemat doświadczenia. Wydaje

mi się również, że należy przemyśleć, czy nie należy dodać komentarza do nietypowego okresu kastracji suk zdrowych w fazie diestrus-w tym rozdziale lub w dyskusji. Należy też uzupełnić tekst o informację, iż diestrus oceniano na podstawie stężenia progesteronu. Wg mnie Autorka powinna też dodać pozycje piśmiennictwa opisujące metodykę i wcześniejsze zastosowanie metod oznaczeń badanych markerów.

Omówienie wyników zostało przeprowadzone przez Autorkę bardzo skrupulatnie. Na początku rozdziału „Wyniki” znajdujemy opis zmian klinicznych obserwowanych u zwierząt. Później bardzo dokładny opis zmian wartości ocenianych parametrów w dniu zerowym, trzecim i dziesiątym po owariohisterektomii. Rozdział napisany jest czytelnie i jasno. Wyniki zilustrowane są 27 rycinami przedstawiającymi 81 wykresów opisujących wyniki oznaczeń wszystkich ocenianych parametrów w układzie porównania: zdrowe-chore oraz osobno zdrowe i chore w sekwencji trzech pomiarów w dniu 0, 3 i 10. Przedstawione są ponadto oznaczenia adiponektyny, TEA i TAC w ślinie. Graficzny opis wyników uzupełniono o analizę regresji adiponektyna/TEA i adiponektyna/TAC. Rozdział ten napisany jest bardzo poprawnym naukowo językiem. Został starannie podzielony na podrozdziały i logicznie posegregowany, a kolejność prezentowanych wyników jest przejrzysta i zrozumiała. Wykresy są dobrze opracowane. Różnice statystyczne przedstawiono jasno i czytelnie. Sugeruje jedynie poprawić błąd literowy w nazwie „test Tukaya” i poprawić na „test Tukeya”. Należy też skorygować skalę na osi rzędnych na rycinie 11 a i b.

W rozdziale „Dyskusja” Doktorantka pogłębia opis wyników oraz komentuje je. Tłumaczy uzyskane wyniki, zależności i konfrontuje z rezultatami uzyskanymi przez innych autorów. Również ten rozdział oceniam bardzo pozytywnie. Jest napisany w taki sposób, że widoczne jest, że Autorka porusza się swobodnie w omawianych zagadnieniach i posiada na tym polu dużą wiedzę. Niewykle interesujące są rozważania dotyczące stężenia żelaza oraz białek zaangażowanych w gospodarkę żelaza, które są kolejnym głosem w dyskusji nad zagadnieniami związanymi z anemią, notowaną niejednokrotnie przy metropatiach.

Po rozdziale „Dyskusja” Autorka formułuje syntetycznie ciekawe wnioski, które brzmią: 1) Ropomacicze jest chorobą, podczas której dochodzi do supresji surowiczych komórkowych (Np, INF γ) i humoralnych (CRP, Hp) mechanizmów odporności nieswoistej u suk. Zabieg ovariectomii i prawidłowy przebieg okresu pooperacyjnego powoduje przywrócenie tych wskaźników do wartości fizjologicznych; 2) W przebiegu ropomacicza dochodzi do spadku surowiczych stężeń negatywnych białek ostrej fazy takich jak Adp, Fe i wzrostu wskaźników żelazo-zależnych takich jak Ferrytyna. 3) Zabieg usunięcia macicy i

jajników jako chirurgiczna metoda antykoncepcji u suk powoduje wzrost stężenia głównych białek ostrej fazy (CRP i Hp), których najwyższy poziom w surowicy stwierdza się w 3 dobie po operacji. 4) Miejscowy proces zapalny wynikający z przerwania ciągłości tkanek na skutek sterylizacji chirurgicznej powoduje spadek surowiczych stężeń Adp i Fe. Ich najniższy poziom w surowicy stwierdza się w 3 dobie po operacji; 5) W przebiegu ropomacicza oraz okresu pooperacyjnego przydatnymi w ocenie natężenia reakcji zapalnej surowiczymi biomarkerami oprócz CRP, Hp są również Np, IFN- γ , Adp, Fe oraz ferrytyna. 6) Uzyskane wyniki badań własnych dotyczące średnich wartości Fe, Ferrytyny oraz UIBC jednoznacznie wskazują, że podjęcie szybkiej i skutecznej terapii ropomacicza u suk oraz prawidłowy przebieg okresu pooperacyjnego jest kluczowym aspektem mającym na celu przywrócenie zaburzonej gospodarki żelaza w organizmie. 7) W przebiegu stanu zapalnego jakim jest ropomacicze u suk, w ślinie dochodzi do istotnego spadku wartości Adp. Na tej podstawie można sądzić, że ślina pobierana od psów może być przydatnym do oceny natężenia reakcji zapalnej w organizmie płynem ustrojowym. 8) Po operacji ovariohysterectomii jako metody sterylizacji chirurgicznej (3 dzień obserwacji) zanotowano wysoką korelację dodatnią pomiędzy Fe/Ferrytyną oraz negatywną pomiędzy Adp/Hp. Natomiast w ślinie, przed zabiegiem zanotowano silną dodatnią korelację w grupie suk chorych pomiędzy Adp/TEA oraz Adp/TAC. 9) Białka ostrej fazy, wybrane parametry nieswoistej odporności komórkowej (Np i INF γ) oraz wskaźniki żelazo-zależne mogą być przydatne w monitorowaniu okresu pooperacyjnego u suk.

Spis piśmiennictwa zawiera 204 pozycje, głównie opublikowane w liczących się czasopismach z listy JCR. Jak wcześniej wspomniano, praca uzupełniona jest wieloma rycinami oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Do szczególnych walorów przedłożonej pracy zaliczam:

1. Ciekawą tematykę badań, aktualną, z dużym potencjałem publikacyjnym
2. Możliwości aplikacji wyników badań, wzbogacających nie tylko wiedzę podstawową, ale posiadających perspektywę wdrożenia w praktyce klinicznej.
3. Bogatą, zaawansowaną metodykę dopełniających się wzajemnie badań laboratoryjnych
4. Ogrom pracy, którą należało wykonać dla realizacji tak ambitnego i kompleksowego planu oznaczeń dużej liczby paramerów
5. Ciekawą i łatwą do zastosowania w praktyce klinicznej ideę oznaczeń markerów nie we krwi, ale w ślinie zwierząt

6. Dobrze napisany tekst pracy i szerokie piśmiennictwo. Bardzo ciekawie napisany rozdział „Wstęp” i „Dyskusja”. Umiejętność prowadzenia głębokiej i syntetycznej dyskusji naukowej.

Na rozważenie natomiast zasługują następujące zagadnienia:

1. Brak pozycji piśmiennictwa przy opisie metodyki oznaczeń laboratoryjnych.
2. Drobne błędy edycyjne tekstu wspomniane wcześniej w recenzji.
3. W pracy należy wspomnieć o nieoptymalnej fazie cyklu, w której przeprowadzono zabieg owariohisterektomii suk zdrowych
4. Sugeruję również, aby podczas przygotowywania publikacji zastanowić się nad podzieleniem samic badanych na osobniki cierpiące na ropomacicze z otwartą szyjką macicy i z szyjką zamkniętą. Obraz kliniczny i przebieg reakcji zapalnej w tych dwóch przypadkach jest inny.

Powyższe uwagi są formą konstruktywnych sugestii wyrażonych z obowiązku recenzenta. Całość pracy oceniam bardzo dobrze. Jest to doktorat dopracowany i rzetelny. Wyrażone drobne uwagi i sugestie nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, są formą konstruktywnych uwag i komentarzy przy dostrzeganiu ogromnej wartości pracy.

Podsumowując, pracę doktorską lek. wet. Anny Wdowiak oceniam bardzo pozytywnie. Praca została dobrze zaplanowana, rzetelnie zrealizowana i wnosi nowe dane w dyscyplinie ‘weterynaria’. Praca posiada nie tylko wartość poznawczą, ale i duży potencjał aplikacyjny. Doktorantka posiada duże umiejętności w posługiwaniu się warsztatem naukowym.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. wet. Anny Wdowiak odpowiada w pełni wymogom stawianym dysertacjom na stopień naukowy doktora, określonym w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn zm.).

W oparciu o przedłożoną ocenę przedkładaam wniosek Radzie Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie o dopuszczenie lek. wet. Anny Wdowiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie biorąc pod uwagę nowatorstwo pracy, jej potencjał aplikacyjny oraz wkład przedstawionych badań w rozwój reprezentowanej dyscypliny składam wniosek o wyróżnienie pracy stosowną nagrodą.

KIEROWNIK
Katedry Pozytywnej
Medycyny Weterynaryjnej
Prof. dr hab. Wojciech Nizański
prof. dr hab. Wojciech Nizański