



KATEDRA PATOLOGII
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII I WETERYNARII SĄDOWEJ
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

dr hab. n. wet. Stanisław Dzimira, prof. uczelni

Wrocław, 6 września 2021 r.

Zakład Patomorfologii i Weterynarii Sądowej

Katedra Patologii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Greli

pt. „Wykorzystanie technik biologii molekularnej i nowoczesnych metod obrazowania radiologicznego na potrzeby opiniowania sądowo-weterynaryjnego”

(„The use of molecular biology techniques and modern radiological imaging methods for forensic veterinary assessment”)

W wykonaniu uchwały Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 24 czerwca 2021 r., przedkładam recenzję rozprawy doktorskiej mgr inż. Małgorzaty Greli pt. „Wykorzystanie technik biologii molekularnej i nowoczesnych metod obrazowania radiologicznego na potrzeby opiniowania sądowo-weterynaryjnego”, przygotowanej pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Magdaleny Gryzińskiej oraz dr. hab. Piotra Listosa, prof. uczelni.

Weterynaria sądowa jest stosowaną nauką medyczno-weterynaryjną opartą w dużej mierze o patomorfologię i nauki kliniczne. Lekarze weterynarii są powoływani przez policję, prokuraturę i/lub sądy powszechne do wydawania opinii. Coraz większa różnorodność czynów łamiących przepisy wynikające m.in. z ustawy o ochronie zwierząt zmusza biegłych lekarzy weterynarii do stosowania różnych, coraz nowocześniejszych, nierzadko wysoce



KATEDRA PATOLOGII
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII I WETERYNARII SĄDOWEJ
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

specjalistycznych technik badawczych. W wielu przypadkach stosowane zazwyczaj badanie sekcyjne poparte badaniem histopatologicznym i np. toksykologicznym nie jest wystarczające do odpowiedzi na pytania zawarte w *Postanowieniu o dopuszczeniu dowodu z opinii biegłego*, kierowane przez ww. jednostki. Z kolei wzrost przestępczości, nierzadko skrajne, obarczone dużym okrucieństwem, zachowania ludzi względem zwierząt, czy też np. próby oszustw wynikające z dużej wartości zwierząt hodowlanych lub produktów pochodzenia zwierzęcego obligują organy ścigania do uzyskania od biegłych sądowych lekarzy weterynarii rzetelnych, niepodważalnych argumentów i końcowych, jednoznacznych wniosków ekspertyz sądowo-weterynaryjnych.

Problematyka podjęta przez Doktorantkę jest tematem istotnym, zarówno z teoretycznego, jak i praktycznego punktu widzenia. Na doniosłość omawianego zagadnienia oraz zasadność zainteresowania się problemem wskazuje wpasowanie podjętej problematyki badawczej w ramy szeroko rozumianej diagnostyki pośmiertnej oraz identyfikacji zwłok zwierzęcych, do których to czynności coraz częściej są powoływani lekarze weterynarii przez odpowiednie służby i organy administracji.

Ocenianą pracę doktorską stanowi liczący 95 stron maszynopis, składający się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wstępu, celu pracy oraz większych części zatytułowanych: materiał i metody, wyniki, podsumowanie i wnioski, piśmiennictwo. Piśmiennictwo dołączone do opracowania zawiera 43 pozycje z lat 1997 oraz 2004-2021. Pozycje cytowane w opracowaniu są wybranymi z liczniejszej grupy artykułów cytowanych w składowych omawianego opracowania. Na końcu manuskryptu załączono publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz dwa załączniki: Oświadczenia Współautorów publikacji naukowych wchodzących w skład pracy doktorskiej oraz Wykaz dorobku naukowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska składa się z cyklu 4 publikacji, które ukazały się w 3 czasopismach anglojęzycznych i jednym czasopiśmie polskim, publikującym także w języku angielskim. Czasopisma te znajdują się na liście JCR i posiadają tzw. czynnik wpływu (impact factor, IF), który łącznie wynosił 3,446.



KATEDRA PATOLOGII
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII I WETERYNARII SĄDOWEJ
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

Prace te ukazały się w latach 2018 (1 praca) i 2021 (3 prace):

- „Imaging techniques as a method of sectional examination in forensic veterinary medicines” ukazała się w czasopiśmie *Medycyna Weterynaryjna* w 2018 roku (74:751-758),
- „Post-mortem analysis of gunshot wounds to the head and thorax in dogs by computed tomography, radiography and forensic necropsy” opublikowano w czasopiśmie *Medicine, Sciences and the Law*, w 2021 roku (61:105-113),
- „Development of an STR panel for individual identification and determination of the degree of relationship between American mink (*Neovision Vision*)” opublikowano w *Australian Journal of Forensic Sciences* w roku 2021 (53: 128-137),
- „Effectiveness of various methods of DNA isolation from bones and teeth of animals exposed to high temperature” ukazała się w *Journal of Forensic and Legal Medicine* w 2021 r. (78:102131).

Jak wspomniano wyżej łączny IF ww. prac stanowiących cykl wynosi 3,446, zaś punktacja wg listy MNiSW 225. We wszystkich pracach z cyklu Doktorantka jest pierwszym autorem, a w dwóch także autorem korespondencyjnym. Wkład pracy własnej w powstanie powyższego cyklu określa Doktorantka na poziomie 65 %, co stanowi dobrą, świadczącą o Jej istotnym wkładzie wartość. W odpowiednich oświadczeniach Współautorzy potwierdzili swój i Doktorantki wkład w powstanie ww. publikacji.

W ww. powiązanych tematycznie publikacjach Doktorantka starała się wykazać użyteczność nowoczesnych technik obrazowania radiologicznego dla potrzeb opiniowania sądowo-weterynaryjnego na przykładzie pośmiertnej diagnostyki ran postrzałowych oraz opracować procedury identyfikacji genetycznej zwierząt w aspekcie opiniowania sądowo-weterynaryjnego, w tym zaprojektować panel markerów mikrosatelitarnych do identyfikacji osobniczej i ustalenia pokrewieństwa nerek amerykańskich oraz opracować metody umożliwiające identyfikację gatunkową psa na podstawie szczątków kostnych poddanych działaniu wysokiej temperatury.



KATEDRA PATOLOGII
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII I WETERYNARII SĄDOWEJ
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

Materiał badawczy do analiz radiologicznych obejmował zwłoki 13 psów domowych, mieszańców, które z racji zmian starczych, wskazań lekarskich oraz woli właścicieli poddano eutanazji. Badania wykonano ostrzeliwując zwłoki psów, tj. ich głowy oraz klatki piersiowe z różnych odległości i przy użyciu różnego rodzaju amunicji. Następnie zwłoki psów poddano badaniom radiograficznym i tomograficznym, a po nich wykonano sekcyjne badanie sądowo-weterynaryjne.

Diagnostyka RTG i TK powstałych obrażeń głowy pozwoliła na otrzymanie obrazów i danych, na podstawie których opracowano trójwymiarowe modele pozwalające precyzyjnie określić przestrzenną lokalizację ciał obcych i tor pocisku. Szczególnie istotna wg Doktorantki była diagnostyka wieloodłamowych złamań kości czaszki na podstawie otrzymanych rekonstrukcji 3-D oraz możliwość zobrazowania obrażeń postrzałowych w wyniku działania pocisków śrutowych. Badania sekcyjne w przypadkach analizy obrażeń postrzałowych głowy pozwoliły określić charakter i zakres uszkodzeń tkanek miękkich i kości w zależności od rodzaju pocisku i odległości z jakiej oddano strzały.

W zakresie obrażeń postrzałowych klatki piersiowej diagnostyka RTG i TK pozwoliły na dokładne zobrazowanie powstałych uszkodzeń tkanki kostnej, umożliwiły identyfikację i lokalizację metalicznych ciał obcych – pocisków lub ich fragmentów, co ułatwiło, jak pisze Doktorantka, zebranie „dowodów rzeczowych” oraz stanowiło cenne wskazówki do zaplanowania i wykonania obdukcji sądowo-weterynaryjnej. Badanie sekcyjne uwidocznilo różnice w rozległości uszkodzeń kości (żeber) i tkanek miękkich w zależności od rodzaju, kalibru i typu użytej amunicji oraz odległości z jakiej oddano strzały.

Zdaniem Doktorantki analiza przy użyciu tomografu komputerowego była w obu przypadkach, tj. oceny uszkodzeń ran postrzałowych głowy oraz oceny uszkodzeń ran postrzałowych klatki piersiowej, dokładniejsza i bardziej użyteczna aniżeli klasyczne radiogramy, co wydaje się być zrozumiałe chociażby ze względu na jakość obrazowania.

Wyniki tych analiz zostały opublikowane w jednym z wymienionych wyżej artykułów w czasopiśmie *Medicine, Sciences and the Law*.



KATEDRA PATOLOGII
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII I WETERYNARII SĄDOWEJ
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

Przed opisaniem ww. wyników Doktoranta opublikowała w Medycynie Weterynaryjnej (2018) obszerny artykuł przeglądowy szeroko opisujący techniki obrazowania wykorzystywane w weterynarii sądowej: klasyczną radiologię, tomografię komputerową, rezonans magnetyczny, fotogrametrię ze skanowaniem powierzchni ciała oraz nowatorski projekt pod nazwą Virtopsy®. W omawianym artykule szeroko opisano zalety i ograniczenia ww. metod i technik badawczych.

Drugim aspektem badawczym podjętym przez Doktorantkę były badania molekularne dotyczące identyfikacji osobniczej nerek amerykańskich oraz identyfikacja gatunkowa spalonych szczątków zwierzęcych (psich). Do wykonania pierwszego z wymienionych oznaczeń pobrano tkanki od nerek hodowlanych i wolnożyjących, po 40 sztuk z każdej populacji, a badania te wykonano na podstawie zgody Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Lublinie. Badania wykonano po izolacji DNA z wykorzystaniem metod PCR, a następnie po odpowiedniej analizie przy użyciu programów Cervus 3.0.3 oraz Powerstats. W wyniku przeprowadzonych badań genetycznych opracowano panel mikrosatelitarny złożony z 13 polimorficznych *loci* STR, który może stanowić przydatne narzędzie w praktyce sądowo weterynaryjnej, w sprawach cywilnych i/lub karnych z zakresu identyfikacji zwierząt żywych, martwych czy też produktów przemysłu futrzarskiego.

Natomiast do badań identyfikacji spalonych szczątków zwierzęcych materiał pozyskano w trakcie nekropsji zwłok psów (14 osobników, mieszańców o masie ok 30 kg) stanowiących materiał naukowo-dydaktyczny Zakładu Patomorfologii i Weterynarii Sądowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Ze zwłok psów pobrano fragmenty kości udowych oraz zdrowe zęby - kły, które spalano w różnym czasie (5, 10, 15, 30, 45 i 60 minut) w temperaturze 400°C, a następnie po odwapnieniu otrzymanego materiału izolowano DNA przy użyciu trzech różnych testów komercyjnych oraz metodą organiczną (fenolowo-chloroformową). Wykazano, że wszystkie techniki za wyjątkiem metody organicznej pozwalały na skuteczną ekstrakcję materiału genetycznego z kości i zębów spalanych w czasie od 5 do 15 minut. Metoda organiczna była skuteczna tylko dla materiału spalanego w czasie 5 i 10 minut. Bez względu na zastosowaną metodę wykazano możliwość większego pozyskania DNA z kości niż z zębów, a mitochondrialny DNA dominował w wyizolowanym materiale



KATEDRA PATOLOGII
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII I WETERYNARII SĄDOWEJ
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

genetycznym. Na podstawie wykonanych oznaczeń i porównań stwierdzono, że wykonanie identyfikacji gatunkowej szczątków psa, tj. kości i zębów spalanych w temp 400 °C przez 5, 10, 15 minut jest możliwa przy przeprowadzaniu izolacji DNA zestawem QIAmp® DNA Investigator Kit.

Wyniki opisanych wyżej badań molekularnych dotyczących możliwości identyfikacji osobniczej nerek amerykańskich oraz identyfikacji gatunkowej spalonych szczątków zwierzęcych (psich) opublikowano w dwóch kolejnych pracach z ocenianego cyklu, w czasopismach Australian Journal of Forensic Sciences oraz w Journal of Forensic and Legal Medicine.

Na podstawie przeprowadzonych badań i oznaczeń Doktorantka, Pani mgr inż. Małgorzata Grela, sformułowała osiem logicznych i wynikających z otrzymanych wyników wniosków. Poprzedziła je trafnymi sformułowaniami, cyt. „Nowoczesne metody obrazowania radiologicznego (np. tomografia komputerowa) mimo wysokiej wartości diagnostycznej i dowodowej, wciąż stanowią *novum* w obszarze pośmiertnej diagnostyki sądowo-weterynaryjnej (...). Istotną rolę w ujawnieniu prawdy materialnej przez biegłego lekarza weterynarii odgrywają także techniki biologii molekularnej, zwłaszcza te związane z analizą materiału genetycznego”.

Uwagi jakie mam do Doktorantki dotyczą głównie otrzymanej rozprawy doktorskiej jak o całości, a nie opublikowanych artykułów, są następujące:

- na stronie 20 opracowania Doktorantka pisze o kłach w języku polskim w liczbie mnogiej, zaś łacińskie tłumaczenie odnosi się do liczby pojedynczej;
- na stronach 18, 22 i 24 w rozdziałach Materiał i metody oraz Wyniki jest inna kolejność zdarzeń w odniesieniu do badań sekcyjnych i radiologicznych. Wg opisu w ustępie Materiał i metody najpierw wykonano badania radiologiczne, a dopiero po nich sekcyjne, zaś wg Wyników pierwsza była sekcja sądowo-weterynaryjna, a po niej pośmiertne badania obrazowe (RTG i TK). Ta druga kolejność wydaje się nielogiczna i jest niespójna z pierwszym z wyciągniętych wniosków;



KATEDRA PATOLOGII
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII I WETERYNARII SĄDOWEJ
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

- z ośmiu wniosków, ostatni, który brzmi cyt. „Kluczowe znaczenie dla uzyskania wiarygodnych wyników identyfikacji genetycznej spalonych szczątków kostnych ma odpowiednie przygotowanie próbek oraz zastosowanie właściwej metody izolacji” nie odnosi się jedynie do przeprowadzonego doświadczenia, jest zbyt ogólny i w mojej ocenie zbędny. W przypadku jakiegokolwiek oznaczenia laboratoryjnego cyt.: „odpowiednie przygotowanie próbek oraz zastosowanie właściwej metody izolacji” jest zasadą *sine qua non* do otrzymania wiarygodnych, uczciwych wyników.

Powyższe uwagi w żadnym stopniu nie umniejszają wartości naukowej pracy, którą oceniam wysoko. Stanowi ona wartościowy dorobek naukowy, a jej składowe będą liczącą się pozycją w piśmiennictwie dotyczącym możliwości identyfikacyjnych zwierząt w aspekcie opiniowania sądowo-weterynaryjnego. Opracowanie napisane jest starannie, czyta się je z przyjemnością i ciekawością.

Reasumując, stwierdzam, że Przedstawiona do recenzji praca doktorska w postaci cyklu czterech artykułów naukowych jest spójnym, w zakresie bardzo szeroko rozumianej tematyki weterynaryjno-sądowej, materiałem naukowym. Opublikowane w czasopismach z listy JCR prace były recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów wybranych przez wydawców, co w znacznej mierze ogranicza dalszą dyskusję, bowiem jest dowodem na usunięcie ewentualnych usterek i niedoskonałości przed ich publikacją. Istotną wartością przedstawionej pracy jest to, że mimo teoretycznie różnych analiz (sekcyjne i radiologiczne oraz genetyczne), opisane na określonym gatunku zwierząt schematy badań mogą być zastosowane u innych gatunków, co jest ważne w aspekcie opiniowania sądowo-weterynaryjnego.

Uważam, że przedłożona mi rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie przez Doktorantkę mgr inż. Małgorzatę Grełę zagadnienia naukowego, wykazując Jej ogólną wiedzę teoretyczną oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Praca odpowiada wymaganiom określonym w art. 13. ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 r., Nr 65 poz. 595 z późn.



UNIwersytet
Przyrodniczy
we Wrocławiu

KATEDRA PATOLOGII
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII I WETERYNARII SĄDOWEJ
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

zm.) w zw. Z art. 179 ust 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 30 sierpnia 2018r. poz. 1669).

Na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Małgorzaty Greli do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej z racji jej wysokiej jakości i wartości merytorycznej.

Z poważaniem