

Olsztyn, dn. 29.09.2022 r.

dr hab. Iwona Otrocka-Domagala, prof. uczelni

Katedra Anatomii Patologicznej

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Pawła Klimiuka

pt. „Ocena wartości prognostycznej i predykcyjnej ekspresji

***topoizomerazy IIa i wybranych wskaźników proliferacji w rozlanych chłoniakach z dużych limfocytów B u psów*”**

wykonanej w Katedrze Patomorfologii i Weterynarii Sądowej

Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie

pod kierunkiem promotora dr hab. Wojciecha Łopuszyńskiego, prof. uczelni

Podstawę formalną do wykonania recenzji rozprawy doktorskiej lek. wet. Pawła Klimiuka stanowi pismo Przewodniczącej Rady Dyscypliny Weterynarii, prof. dr hab. Marty Kankofer, z dnia 12 lipca 2022 r. (RD/Wet./531-9/12-13) zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 30 czerwca 2022 r.

Przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską stanowi spójny tematycznie cykl trzech prac oryginalnych opatrzonych wspólnym tytułem „Ocena wartości prognostycznej i predykcyjnej ekspresji topoizomerazy IIa i wybranych wskaźników proliferacji w rozlanych chłoniakach z dużych limfocytów B u psów”, opublikowanych w czasopiśmie naukowym o zasięgu międzynarodowym, który to cykl zgodnie z Ustawą 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. zm.) w zw. z art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz.U. z dnia 30 sierpnia 2018r. poz. 1669) może stanowić podstawę do uzyskania stopnia naukowego doktora przez lekarza weterynarii Pawła Klimiuka.

Łączna wartość punktowa cyklu publikacji stanowiących rozprawę doktorską wynosi 240 zgodnie z punktacją MNiSW, zaś sumaryczny współczynnik wpływu (Impact Factor; IF) według bazy JCR wynosi 4,833. Wykaz publikacji stanowiących ocenianą rozprawę doktorską:

1. **Klimiuk P.**, Łopuszyński W., Bulak K., Śmiech A., Brzana A.: Study of DNA topoisomerase IIa expression in canine lymphomas and its potential role as a marker of sensitivity to anthracycline-based chemotherapy in dogs. *Folia Histochem Cytobiol.* 2020; 58(1): 46 – 53 . DOI: 10.5603/FHC.a2020.0004

IF:1,698; Pkt MNiSW: 70

2. **Klimiuk P.**, Łopuszyński W., Bulak K., Brzana A.: Evaluation of the Proliferative Activity of Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) in Dogs with Respect to Patient Eligibility for Anthracycline-Based Chemotherapy. *Animals (Basel).* 2021; 11(4): 1183. DOI: 10.3390/ani11041183

IF:2,752; Pkt MNiSW: 100

3. **Klimiuk P.**, Łopuszyński W., Bulak K.: Predictive value of topoisomerase IIa immunoreactivity in canine diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and peripheral T-cell lymphoma (PTCL) treated with a doxorubicin-based chemotherapy protocol. *Med. Weter.* 2022; 78(6): 297 – 303. DOI: 10.21521/mw.6654

IF:0,383; Pkt MNiSW: 70

Do kserokopii poszczególnych publikacji dołączono oświadczenia współautorów, uwzględniające opisowy udział poszczególnych osób w przygotowaniu manuskryptów i wykonanych badaniach. We wszystkich trzech publikacjach lek. wet Paweł Klimiuk jest pierwszym autorem, a Jego udział procentowy został określony na poziomie 70% w dwóch pierwszych publikacjach oraz 75 % w trzeciej publikacji. Dołączono również oświadczenie promotora pracy dr hab. Wojciecha Łopuszyńskiego, prof. uczelni potwierdzające Jego nadzór nad przygotowaniem pracy i potwierdzenie, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego. Doktorant, jako autor pracy doktorskiej potwierdził w stosownym oświadczeniu samodzielność jej napisania, a treści w niej zawarte nie zostały uzyskane w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami. Potwierdził ponadto, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego na uczelni wyższej, a prezentowana wersja pracy jest zgodna z załączoną wersją elektroniczną.

Integralną część rozprawy doktorskiej stanowią oświadczenia promotora pracy, oświadczenia autora pracy, uchwała lokalnej komisji etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach wyrażająca zgodę na przeprowadzenie doświadczenia na tkankach, narządach zwierzęcych, spis treści, streszczenie, abstract, kserokopia dyplomu ukończenia studiów oraz starannie opracowany autoreferat. Autoreferat zawiera: wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wstęp, cele pracy, materiał i metody, szczegółowe przedstawienie zagadnień omawianych w pracach wchodzących w skład ocenianego osiągnięcia, wnioski, piśmiennictwo, kserokopie publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, oraz oświadczenia współautorów. Całość liczy 94 strony, cytowane piśmiennictwo stanowią 84 pozycje. Całość napisana jest w sposób klarowny, również formalna strona pracy nie budzi zastrzeżeń.

Doktorant podjął się bardzo ciekawej i ważnej pod względem klinicznym analizy wartości prognostycznej i predykcyjnej ekspresji topoizomerazy II α (TOPII α) oraz zależności pomiędzy ekspresją TOPII α , a liczbą komórek mitotycznych (MC) oraz ekspresją antygenu Ki67 w chłoniakach nieziarniczych u psów, w kontekście określenia przydatności tych markerów w opracowaniu schematu zindywidualizowanej terapii onkologicznej opartej na lekach z grupy antracyklin. Leczenie celowane jest nowym podejściem terapeutycznym w onkologii, umożliwiającym dostosowanie schematu leczenia dla indywidulanego pacjenta w oparciu o charakterystykę genetyczną nowotworu. Opracowanie takiej terapii wymaga wcześniejszej analizy komórek nowotworowych, oceny ekspresji markerów o największych wartościach prognostycznych i predykcyjnych, a celem działania jest uzyskanie najlepszego efektu terapeutycznego i zminimalizowanie efektów ubocznych terapii. Zasadne i pożądane jest zatem poszukiwanie i analiza ekspresji nowych markerów prognostycznych i predykcyjnych w różnych nowotworach u ludzi i zwierząt. Jednym z takich markerów jest TOPII α , kluczowy enzym w procesie replikacji DNA która jest celem molekularnym jej inhibitorów, w tym antracyklin. Silna ekspresja TOPII α jest charakterystyczna dla komórek nowotworowych o dużej aktywności proliferacyjnej. Inhibicja funkcji TOPII α skutkuje powstaniem licznych wiązań wewnątrz nici DNA, co doprowadza do zablokowania transkrypcji i replikacji, a komórki z tak uszkodzonym DNA eliminowane są następnie na drodze apoptozy. Doksorubicyna (DOX), należąca do grupy antracyklin i będąca inhibitorem TOPII α jest jednym z leków wchodzących w skład monoterapii oraz terapii wielolekowej chłoniaków nieziarniczych u psów. Doksorubicyna pomimo szerokiego spektrum działania przeciwnowotworowego, cechuje się dużą toksycznością, a zatem możliwość określenia u

których osobników stosowanie tego leku byłoby korzystne z punktu widzenia planowania terapii, a u których jej zastosowanie nie przyniosłoby zadowalających efektów wydaje się kluczowe w doborze optymalnego schematu leczenia oraz zminimalizowania działań niepożądanych. Badania nad ekspresją TOPII α u ludzi wykazały zależność pomiędzy poziomem jej ekspresji, a skutecznością terapii raka piersi i rozlanego chłoniaka z dużych limfocytów B (DLBCL) u ludzi. U zwierząt, do tej pory nie przeprowadzono żadnych badań w kierunku oceny wrażliwości poszczególnych typów nowotworów na DOX, brak jest również publikacji opisujących poziom ekspresji TOPII α w nowotworach u psów. Podjęte przez Doktoranta badania mają zatem charakter nowatorski i bardzo duże znaczenie kliniczne.

We wstępie autoreferatu Doktorant w bardzo przejrzysty, dojrzały i rzeczowy sposób wprowadza czytelnika w problematykę poruszaną w dysertacji, wykazując się też bardzo dobrą znajomością literatury. Prawidłowo formułuje problem badawczy zwracając uwagę na wzrost częstotliwości występowania chłoniaków u psów, ewolucję klasyfikacji chłoniaków w onkologii weterynaryjnej, rodzaje diagnostyki, ocenę stopnia złośliwości chłoniaków oraz rodzaje i problemy chemioterapii chłoniaków u psów. W zwięzły i rzeczowy sposób argumentuje wybór analizowanych markerów proliferacji komórek nowotworowych tj. TOPII α , Ki67 i MC.

Analizowane przez Doktoranta we wstępie zagadnienia, odnoszące się do obszaru rozprawy pozwoliły na bardzo precyzyjne sformułowanie głównego celu badań, jakim było:

1. Określenie immunohistochemicznej ekspresji topoizomerazy II α w chłoniakach nieziarniczych u psów, ze szczególnym uwzględnieniem rozlanych chłoniaków z dużych limfocytów B (DLBCL).
2. Określenie zależności pomiędzy ocenianymi dotychczas w chłoniakach u psów i uznawanymi za wartościowe wskaźnikami proliferacji komórkowej, a immunohistochemiczną ekspresją TOPII α .
3. Ocena możliwości wykorzystania immunohistochemicznej ekspresji topoizomerazy II α u psów z DLBCL leczonych z zastosowaniem protokołu CHOP do prognozowania przebiegu choroby nowotworowej i kwalifikacji pacjentów do terapii.

Materiał do badań stanowiły węzły chłonne podkolanowe pobrane od 47 psów różnych ras i płci w wieku od 2,5 roku do 13 lat, u których na podstawie badania klinicznego (stwierdzona limfadenomegalia) i badań dodatkowych (badania morfologiczne i biochemiczne krwi, ocena radiologiczna i ultrasonograficzna stopnia zaawansowania klinicznego choroby, badanie cytologiczne) rozpoznano chłoniaka złośliwego. Psy były diagnozowane i leczone w Klinikach Weterynaryjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Węzły chłonne pobrano operacyjnie od zwierząt niepoddanych wcześniej terapii, u których nie stwierdzono przeciwwskazań medycznych do zabiegu operacyjnego. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Lublinie (uchwała nr 17/2013 z dnia 12 lutego 2013 roku). W każdym przypadku uzyskano również zgodę opiekuna pacjenta na przeprowadzenie procedury chirurgicznej. Materiał do badania histopatologicznego stanowiły wycinki węzłów chłonnych podkolanowych pochodzące od psów, u których badaniem cytologicznym postawiono wstępne rozpoznanie chłoniaka. Pobrane tkanki, przygotowane techniką parafinową, barwione rutynowo hematoksyliną i eozyną (H&E), zostały dalej poddane ocenie morfologicznej i histologicznej klasyfikacji chłoniaków opracowanej przez Valli i wsp. [2011], uwzględniającej kryteria WHO. Wykonano również badania immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko białkom: CD3, CD79α, TOP11α, Ki-67. We wszystkich reakcjach immunohistochemicznych stosowano podwójny układ kontroli tj. kontrolę ujemną i dodatnią. Na podstawie oceny ekspresji cząstek CD3 oraz CD79α w komórkach nowotworowych chłoniaki sklasyfikowano jako T i B komórkowe. Do ilościowej oceny immunohistochemicznej ekspresji antygenu Ki-67 wykorzystano system komputerowo wspomaganą analizę obrazu mikroskopowego. Przy powiększeniu obiektywu 40x obliczono indeks będący odsetkiem komórek dodatnich w 500 komórkach nowotworowych. Do oceny immunohistochemicznej ekspresji TOP11α zastosowano bardzo ciekawy, autorski, dwuetapowy schemat umożliwiający wykazanie obecności białka i jego stężenia w komórce. W każdym z etapów oceny preparatów histologicznych dokonywało dwóch niezależnych patomorfologów. W pierwszym etapie zastosowano pięciopunktową, ilościową ocenę jądrowej ekspresji TOP11α w komórkach nowotworowych zaproponowaną przez Remmele i wsp. [1987] dla oceny ekspresji receptorów estrogenowych. W drugim etapie w oparciu o uzyskaną w etapie pierwszym liczbę punktów oraz podział zaproponowany przez Hajduk [2009] określano stopień immunohistochemicznej ekspresji TOP11α. Szczegółowy opis obu etapów oceny immunohistochemicznej ekspresji TOP11α umieszczono w rozdziale *Ocena ilościowa badanych parametrów/Zastosowane metody badawcze/Materiał i metody* autoreferatu oraz w

Materialach i Metodach publikacji stanowiących rozprawę doktorską. Liczbę komórek z figurami mitotycznymi oceniano w preparatach barwionych hematoksyliną i eozyną w 10 losowo wybranych polach widzenia z użyciem okularu 10x o średnicy pola widzenia (FN) 22 mm i powiększeniu obiektywu 40x (oceniana powierzchnia wynosiła 2,37 mm²). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu StatisticaPL 9.1 (StatSoft, Polska) oraz odpowiednich testów statystycznych.

Materiał i metody zostały szczegółowo opisane w publikacjach stanowiących rozprawę doktorską, jak również w rozdziale *Materiał i metody* autoreferatu. Metodyka badań została bardzo dobrze dobrana, co umożliwiło osiągnięcie celów wyznaczonych w pracy. Na podkreślenie zasługuje również rozległość przeprowadzonych badań, ich pracochłonność, a w związku z tym duża liczba otrzymanych wyników.

Wyniki badań nad immunohistochemiczną ekspresją TOP2α w chłoniakach u psów, ze szczególnym uwzględnieniem rozlanych chłoniaków z dużych limfocytów B (DLBCL), jako potencjalnego wskaźnika mogącego mieć zastosowanie do określenia wrażliwości na chemioterapię z zastosowaniem leków z grupy antracyklin zostały szczegółowo opisane i przeanalizowane w pierwszej, prezentowanej w cyklu publikacji oraz w rozdziale V autoreferatu. Uzyskane wyniki wykazały, że wśród chłoniaków nieziarniczych u psów większość stanowią chłoniaki z limfocytów B. Najczęściej diagnozowanym chłoniakiem był chłoniak DLBCL, w dalszej kolejności, chłoniak z obwodowych komórek T bliżej nieokreślony (PTCL-NOS), chłoniak typu Burkitta, chłoniak strefy brzeżnej (MZL), chłoniak limfoblastyczny T-komórkowy (T-LBL) oraz chłoniak strefy T (TZL). Średnia wieku psów wyniosła 7 lat (od 4 do 14 lat). Dominowały psy rasowe, z czego największą grupę stanowiły owczarki niemieckie i bokserzy. Nie stwierdzono predylekcji płciowej. Wśród chłoniaków B-komórkowych dominowały te ze średnią ekspresją TOP2α (41,18%), natomiast w grupie chłoniaków T-komórkowych 46,15% stanowiły chłoniaki z niską ekspresją TOP2α. Wśród chłoniaków T-komórkowych nie odnotowano przypadków z wysoką immunohistochemiczną ekspresją tego białka. W najliczniej reprezentowanej grupie chłoniaków DLBCL przeważały chłoniaki o średnim i wysokim poziomie ekspresji TOP2α. Zróżnicowana ekspresja TOP2α stwierdzona w przeprowadzonych badaniach w różnych rodzajach chłoniaka u psów, pomimo dominacji chłoniaków B-komórkowych ze średnim i wysokim poziomem, nie upoważnia jednak do stwierdzenia, że typ histologiczny i fenotyp chłoniaka determinują poziom ekspresji TOP2α. W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań należy uznać, że w przypadku chłoniaków z niską ekspresją TOP2α bezzasadne jest stosowanie leków z grupy antracyklin.

Przeprowadzone badania wskazują natomiast, że ocena ekspresji TOP2 α może stać się ważnym wskaźnikiem predykcyjnym w doborze optymalnego schematu terapii w przypadku chłoniaków nieziarniczych u psów.

W drugiej pracy stanowiącej część rozprawy doktorskiej oraz w rozdziale VI autoreferatu przedstawiono wyniki badań nad oceną aktywności proliferacyjnej DLBCL u psów w aspekcie kwalifikacji pacjentów do terapii z zastosowaniem leków cytostatycznych z grupy antracyklin. Określano typ chłoniaka, poziom ekspresji TOP2 α , Ki67 oraz MC. Wykazano, że w grupie chłoniaków rozlanych z dużych limfocytów typem najczęściej występującym jest typ centroblastyczny (DLBCL-CB). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w ekspresji Ki67 w obu podtypach DLBCL tj. w centroblastycznym (CB) i immunoblastycznym (IB). Wśród chłoniaków DLBCL dominowały te o umiarkowanej i wysokiej ekspresji TOP2 α , nie zaobserwowano natomiast istotnej statystycznie różnicy w ekspresji TOP2 α pomiędzy typem centroblastycznym i immunoblastycznym. Wartość MC była istotnie statystycznie wyższa w typie DLBCL-CB w porównaniu z typem DLBCL-IB. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono, że większym wartościom MC odpowiadały większe wartości indeksu antygenu Ki67. Podobnie większemu poziomowi ekspresji TOP2 α odpowiadały większe wartości MC. Uzyskane w tym badaniu wyniki wskazują, że ocena aktywności proliferacyjnej komórek chłoniaka DLBCL, a w szczególności poziomu ekspresji TOP2 α mogłaby znaleźć zastosowanie w diagnostyce jako wskaźnik doboru psów do terapii z zastosowaniem schematów zawierających antracykliny.

W trzeciej pracy stanowiącej część rozprawy doktorskiej oraz w rozdziale VII autoreferatu przedstawiono wyniki badań nad oceną wartości prognostycznej i predykcyjnej oznaczania immunohistochemicznej ekspresji TOP2 α w DLBCL i PTCL u psów leczonych protokołem chemioterapii zawierającym doksorubicynę. Materiał do badań stanowiły wycinki węzłów chłonnych podkolanowych pobrane przed zastosowaniem terapii, określano dalej typ chłoniaka i poziom ekspresji TOP2 α . Psy objęte badaniem obserwowano od momentu rozpoczęcia terapii do śmierci lub przez co najmniej 12 miesięcy. Pierwszej oceny skuteczności terapii dokonywano 7 dni od rozpoczęcia leczenia, a następnie co 3 miesiące lub przed podaniem kolejnej dawki leków cytostatycznych. Określano czas przeżycia wolny od wznowy (ang. progression-free survival, PFS), całkowity czas przeżycia (ang. overall survival, OS), odpowiedź na leczenie którą definiowano jako całkowitą odpowiedź na leczenie (ang. complete remission, CR - zmniejszenie do rozmiarów fizjologicznych wszystkich dostępnych do badania fizykalnego obwodowych węzłów chłonnych) lub częściową odpowiedź na leczenie (ang. partial remission, PR - przynajmniej 30% zmniejszenie się rozmiarów węzłów chłonnych w

porównaniu do ich wielkości przed rozpoczęciem terapii). Oceniano również progresję choroby (ang. progression disease, PD) w przypadku powiększenia się o przynajmniej 30% dostępnych do badania węzłów chłonnych w porównaniu do ich wielkości z poprzedniego badania klinicznego lub pojawienia się nowych zmian. U wszystkich psów z grupy badawczej uzyskano odpowiedź na leczenie, jednak była ona najlepsza u psów z DLBCL u których całkowitą remisję osiągnięto u 57,14% osobników. W grupie psów z PTCL u żadnego zwierzęcia nie uzyskano całkowitej remisji, w grupie tej zarówno czas przeżycia wolny od progresji, jak i średnia czasu przeżycia były niższe w porównaniu do psów z DLBCL. Immunohistochemiczną ekspresję TOP2 α stwierdzono we wszystkich przypadkach z grupy badawczej. W grupie chłoniaków DLBCL najliczniejsze były przypadki z wysoką, a następnie z umiarkowaną ekspresją TOP2 α . W grupie psów z PTCL dominowały osobniki z umiarkowaną ekspresją TOP2 α . W grupie psów z DLBCL z wysoką ekspresją TOP2 α u 87,50% zwierząt uzyskano całkowitą odpowiedź na leczenie, natomiast w grupie ze słabą i umiarkowaną ekspresją TOP2 α u 83,33% psów uzyskano odpowiedź częściową i tylko u jednego psa odpowiedź całkowitą na zastosowaną chemioterapię. Średni czas przeżycia wolny od progresji oraz średnia czasu przeżycia w przypadku chłoniaka DLBCL były wyższe przy wysokiej ekspresji TOP2 α w porównaniu z przypadkami ze słabą i umiarkowaną ekspresją tego białka. Uzyskane w tym badaniu wyniki wskazują, że immunohistochemiczna ocena ekspresji TOP2 α w chłoniakach DLBCL u psów może być pomocna w doborze optymalnej metody chemioterapii, a tym samym może stanowić czynnik predykcyjny w przypadku zastosowania schematów terapeutycznych zawierających leki z grupy antracyklin.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań Doktorant w rozdziale *Wnioski* autoreferatu oraz w konkluzjach publikacji, formułuje uzasadnione i trafne najważniejsze wnioski. Sformułowane wnioski mają istotne znaczenie poznawcze oraz ważny aspekt kliniczny, ponieważ ukazują związek pomiędzy ekspresją TOP2 α , typem histologicznym i fenotypem chłoniaków nieziarniczych, a skutecznością terapii onkologicznej opartej na lekach z grupy antracyklin. Mianują zatem poziom ekspresji TOP2 α nowym czynnikiem prognostycznym i predykcyjnym terapii onkologicznej chłoniaków nieziarniczych u psów, co może być istotne w opracowaniu schematu terapii zindywidualizowanej dającej najlepszy efekt terapeutyczny i minimalne efekty uboczne. Podkreślić należy zatem nowatorski charakter przeprowadzonych badań.

Reasumując, należy stwierdzić, że przedstawione cele pracy zostały osiągnięte, a opublikowanie prac oryginalnych w czasopiśmie o stosunkowo wysokim współczynniku

wplywu świadczy o ich znacznej wartości naukowej i wysokim poziomie merytorycznym. Ze względu na to, że przedstawiona do recenzji praca doktorska jest dobrze opracowana, a wyniki badań zostały opublikowane, podlegały więc merytorycznym recenzjom, po zapoznaniu się z niniejszym autoreferatem przedstawiam jedynie kilka komentarzy:

1. W rozdziale *Wstęp* autoreferatu na stronie 15, w ostatnim zdaniu drugiego akapitu, Doktorant użył sformułowania „chłoniako-białaczka” odnosząc się do stanu w którym w przebiegu chłoniaka dochodzi do zajęcia szpiku kostnego i pojawienia się komórek nowotworowych we krwi obwodowej. W tym przypadku bardziej właściwe jest użycie określenia faza leukemiczna/białaczkowa chłoniaka.

2. W rozdziale *Wstęp* autoreferatu na stronie 17, w pierwszym akapicie, Doktorant popełnił błąd podczas cytowania publikacji Valli i wsp. [2011] odnoszącej się do najnowszej klasyfikacji chłoniaków opartej o wytyczne Światowej Organizacji Zdrowia. Klasyfikacja ta wyróżnia wiele typów i podtypów chłoniaków i białaczek u psów, a nie jak to Doktorant napisał „6 głównych typów chłoniaka”. Autorzy cytowanej publikacji w swoich badaniach opisali natomiast szczegółowo 6 najczęściej występujących podtypów chłoniaków u psów. Myślę jednak, że popełniony przez Doktoranta błąd mógł być wynikiem nieprawidłowego przetłumaczenia oryginalnego tekstu i nie był on zamierzony.

3. W rozdziale *Wstęp* autoreferatu na stronie 20, w pierwszym akapicie, Doktorant opisał sposób oceny aktywności mitotycznej komórek w chłoniakach, jako „liczbę komórek z widocznymi figurami podziału mitotycznego, która oceniana jest najczęściej w 10 losowo wybranych polach widzenia z użyciem obiektywu 40x”. Podobną informację można znaleźć w rozdziale *Materiał i metody/Zastosowane metody badawcze/Ocena ilościowa badanych parametrów* na stronie 28, w rozdziale *VI* autoreferatu na stronie 36, oraz w drugiej publikacji wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej, na stronie 69 (*Material and Methods*), gdzie „Liczbę komórek z figurami mitotycznymi oceniano w preparatach barwionych hematoksyliną i eozyną w 10 losowo wybranych polach widzenia z użyciem okularu 10x o średnicy pola widzenia (FN) 22 mm i powiększeniu obiektywu 40x (oceniana powierzchnia wynosiła 2,37 mm²)”. Chociaż w tej samej publikacji podana jest też średnia wartość figur podziału mitotycznego z 10 pól widzenia. Tymczasem według obowiązującej klasyfikacji chłoniaków i białaczek u psów, na którą zresztą również powołuje się Doktorant, aktywność mitotyczną komórek nowotworowych oceniamy w jednym polu widzenia przy powiększeniu obiektywu 40x, wybierając pole o najwyższej aktywności podziałowej. Można również podać wartość średnią, wyliczoną np. z 10 pól widzenia (w przypadku gdy średnica jednego pola widzenia wynosi

0,237 mm² przy powiększeniu 40x). Taki sposób liczenia figur podziału mitotycznego jest ważny, ponieważ na nim min. opiera się klasyfikacja stopnia złośliwości chłoniaków. Stosując inną metodykę oceny aktywności mitotycznej komórek chłoniaka, można błędnie sklasyfikować stopień jego złośliwości. Doktorant powinien zatem doprecyzować zastosowany sposób oceny aktywności mitotycznej komórek nowotworowych i ewentualnie dokonać reklasyfikacji stopnia złośliwości badanych chłoniaków.

4. W rozdziale *Wstęp* autoreferatu na stronie 20, w pierwszym akapicie, Doktorant sformułował zdanie: „W badaniach immunohistochemicznych komórki nowotworowe DLBCL wykazują silną dodatnią reakcję z przeciwciałem CD79a, oraz nieznaczną reakcję z przeciwciałem CD3”. Tymczasem w przypadku chłoniaków komórki nowotworowe wykazują ekspresję markerów dla limfocytów B lub T, lub nie wykazują ekspresji żadnego z tych markerów. Stwierdzenie zatem, że komórki nowotworowe DLBCL wykazują nieznaczną reakcję z przeciwciałem CD3 jest stwierdzeniem błędnym, ponieważ mowa jest tu najprawdopodobniej o CD3 dodatnich nienowotworowych, towarzyszących limfocytach T. Natomiast jeśli Doktorant rzeczywiście uzyskał ekspresję obu tych markerów w komórkach chłoniaka DLBCL, to może być to wynik nieprawidłowych procedur barwień immunohistochemicznych.

5. W autoreferacie występują również nieliczne, drobne uchybienia gramatyczne i stylistyczne, które jednak nie mają wpływu na wartość merytoryczną pracy.

Podsumowując, lek. wet. Paweł Klimiuk wykonał bardzo interesującą pracę badawczą, o dużej wartości merytorycznej, a najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań mają istotne znaczenie zarówno poznawcze, jak i kliniczne. Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza bardzo dobrą wiedzę w zakresie poruszanej problematyki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska Pana lek. wet. Pawła Klimiuka pt. „*Ocena wartości prognostycznej i predykcyjnej ekspresji topoizomerazy IIa i wybranych wskaźników proliferacji w rozlanych chłoniakach z dużych limfocytów B u psów*” w pełni spełnia wymagania określone w Ustawie 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. zm.) w zw. z art. 179 ust. 3 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. (Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, Dz.U. z dnia 30 sierpnia 2018r. poz. 1669), stawiane

kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora. Przedkładam zatem Radzie Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie lek. wet. Pawła Klimiuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z uwagi na szeroki zakres przeprowadzonych badań, ich wysoką wartość merytoryczną, oraz wyróżniający się aspekt praktyczny uzyskanych wyników wnoszę o przyznanie Panu lek. wet. Pawłowi Klimiukowi stosownej nagrody/wyróżnienia.

Iwona Otrocka-Domagala

Olsztyn, dnia 29 września 2022r.

dr hab. Iwona Otrocka-Domagala, prof. uczelni