

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. wet. Adama Brzany

nt. „Zastosowanie oceny immunohistochemicznej ekspresji topoizomerazy II α i wybranych wskaźników proliferacji w diagnostyce histopatologicznej nowotworów gruczołu sutkowego kotek”

Na podstawie uchwały Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie z dnia 30 czerwca 2022 r. dokonałam recenzji rozprawy doktorskiej lek. wet. Adama Brzany pt. „Zastosowanie oceny immunohistochemicznej ekspresji topoizomerazy II α i wybranych wskaźników proliferacji w diagnostyce histopatologicznej nowotworów gruczołu sutkowego kotek”. Promotorem pracy jest dr hab. Wojciech Łopuszyński, prof. UP w Lublinie. Celem recenzji jest odpowiedź na pytanie, czy rozprawa ta odpowiada wymogom stawianym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o 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 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669).

Praca doktorska lek. wet. Adama Brzany podejmuje istotne zagadnienie dotyczące nowotworów gruczołu sutkowego kotów, które są często spotykanym problemem zdrowotnym u tego gatunku oraz stanowią częstą przyczynę śmierci tych zwierząt. Pomimo ogólnego niższego odsetka występowania guzów sutka kotów w porównaniu z psami, nowotwory te u kotów często charakteryzuje wysoki stopień złośliwości histologicznej oraz bardziej agresywne zachowanie kliniczne. Nowotwory złośliwe sutka u kotek stanowią bowiem aż blisko 90% guzów sutka u tego gatunku, u 76% kotów ze zdiagnozowanym nowotworem złośliwym sutka stwierdzano przerzuty do płuc, z kolei u 93% pacjentów stwierdzono przynajmniej jedno ognisko przerzutowe w narządach wewnętrznych (węzły chłonne, płuca, otrzewna, wątroba) i w konsekwencji skrócenie czasu przeżycia całkowitego. To z kolei stwarza potrzebę zwiększenia skuteczność terapii przeciwnowotworowych, tj. uzupełnienia

leczenia chirurgicznego o inne metody leczenia onkologicznego (chemioterapia, radioterapia). Obecnie duże nadzieje wiążą się z terapią celowaną molekularnie (ang. molecularly targeted therapy) w zakresie zwiększenia skuteczności leczenia, jak i zmniejszenia występowania działań niepożądanych oraz poprawy jakości życia pacjentów onkologicznych. Niemniej jednak w praktyce weterynaryjnej podstawą terapii farmakologicznej u pacjentów z nowotworami jest standardowa (klasyczna) chemioterapia. Dlatego też istnieje wiele przesłanek prowadzenia dalszych badań naukowych w zakresie oceny markerów dla nowotworów gruczołu sutkowego kotek. Są to z jednej strony poszukiwania wskaźników prognostycznych, na podstawie których możliwe byłoby określenie potencjalnego przebiegu i zaawansowania choroby nowotworowej, a z drugiej odkrywanie markerów predykcyjnych związanych z prawdopodobieństwem wystąpienia odpowiedzi na poszczególne schematy przeciwnowotworowej terapii celowanej molekularnie dla konkretnego pacjenta. Poszukiwanie molekularnych uwarunkowań etiopatogenezy nowotworów gruczołu sutkowego jest obecnie jednym z głównych kierunków badań w onkologii ludzkiej – ze zrozumiałych względów prowadzi się znacznie więcej badań w tym obszarze, jednakże ciągły postęp dokonujący się w dyscyplinie naukowej jaką jest weterynaria przyczynia się do zmniejszenia luki badawczej, jak również do nowego spojrzenia na leczenie zwierząt. Praca doktorska jest lek. wet. Adama Brzany jest również taką próbą poszukiwania markerów. Zatem temat rozprawy doktorskiej należy uznać za dobrze dobrany i zasadny naukowo. Ponadto jest on aktualny i niesie aspekt innowacyjności w obszarze medycyny weterynaryjnej, co wynika z rozwoju metod diagnostycznych w weterynarii, ale także wzrastającej świadomości i oczekiwań opiekunów zwierząt. Autor decyzję o realizacji badań przedstawionych w pracy podjął także z nadzieją, że ich wyniki będą mogły w przyszłości przyczynić się do opracowania efektywnej terapii celowanej u kotów z rakiem sutka. Ponadto prowadzone przez Autora w pracy rozważania wpisują się w nurt badań mających znaczenie nie tylko dla patologii i onkologii weterynaryjnej, ale również stanowią przesłankę do prowadzenia badań porównawczych, ponieważ uzyskane wyniki mogą mieć odniesienie do raka piersi u kobiet. Autor trafnie wymienia w pracy podobieństwa pomiędzy spontanicznymi nowotworami sutka kotek a rakami sutka u kobiet odnośnie do epidemiologii, etiopatogenezy, patomorfologii, zachowania biologicznego guza oraz zmian molekularnych w komórkach nowotworowych włącznie z zagadnieniami dotyczącymi leczenia.

Przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską lek. wet. Adama Brzany przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Praca jest napisana bardzo dobrym, starannym stylem naukowym. Praca liczy 126 stron (w tym spis treści, wykaz skrótów, akronimów i nazw obcojęzycznych)

i jest zredagowana w formie manuskryptu, w typowym układzie przyjętym dla prac doktorskich. Składają się na nią rozdziały w kolejności: 'Wstęp', 'Cel badań', 'Materiał i metody', 'Omówienie', 'Wnioski', 'Streszczenie w języku polskim', 'Streszczenie w języku angielskim' oraz 'Piśmiennictwo'. Układ pracy jest czytelny i logiczny, jednakże w mojej ocenie 'Streszczenie' powinno być krótsze i umieszczone na początku pracy.

We 'Wstępie' liczącym 21 stron maszynopisu Doktorant dokonał przeglądu aktualnej wiedzy na temat epidemiologii i etiologii nowotworów gruczołu sutkowego u kotów. Kolejne podrozdziały 'Wstępu' zawierają informacje dotyczące anatomii i histologii gruczołu sutkowego kotów, jak również patomorfologię i stosowaną w pracy klasyfikację nowotworów gruczołu sutkowego kotów (opublikowaną przez Davis-Thompson DVM Foundation autorstwa Zappulli i wsp. 2019). Dobrym zwieńczeniem tego rozdziału jest opis leczenia i rokowania w nowotworach gruczołu sutkowego u kotek, w tym wyczerpujący opis badanych markerów, takich jak antygen Ki-67, topoizomeraza II alfa (Topo II α) oraz białko adhezyjne E-kadheryna, których opis warto by było zacząć od nowego akapitu i wyróżnić (wytluszczyć) na początku tekstu. Jest to wartościowe autorskie zestawienie bazujące na danych z piśmiennictwa, z którego wynika, że w odniesieniu do kotów jak dotąd brak badań oceniających poziom immunohistochemicznej ekspresji TopoII α w różnych typach histologicznych nowotworów złośliwych kotów w korelacji z innymi parametrami. Ta część pracy upewnia recenzenta, że Autor rozprawy wykazuje dobrą znajomość badanej tematyki. Całość wstępu jest tak napisana, że uzasadnia celowość prowadzenia badań przez Doktoranta w tym zakresie i pozwoliła na sformułowanie celu badań.

Celem badawczym dysertacji Doktoranta była ocena immunohistochemicznej ekspresji topoizomerazy II α , antygenu Ki-67 oraz aktywności mitotycznej w złośliwych nowotworach gruczołu sutkowego u kotek w aspekcie potencjalnej możliwości wykorzystania wymienionych oznaczeń jako wskaźników prognostycznych i predykcyjnych dla systemowej chemioterapii nowotworów gruczołu sutkowego u kotek z zastosowaniem leków z grupy antracyklin. Dla realizacji celu Doktorant przeprowadził wieloetapowe i pracochłonne postępowanie badawcze. W pierwszym etapie przeprowadził ocenę patomorfologiczną, jak również ocenił parametry stosując klasyfikację patologiczną TN. W drugim etapie ocenił aktywność proliferacyjną komórek nowotworowych, a następnie porównał uzyskane wyniki z wskaźnikami prognostycznymi w nowotworach gruczołu sutkowego kotów oraz ekspresją E-kadheryny. Ostatnim etapem było przeprowadzenie kompleksowej analizy statystycznej. Sformułowane przez Doktoranta cele zostały osiągnięte dzięki zastosowaniu właściwych metod badawczych.

W rozdziale dotyczącym materiału badawczego wykorzystanego w pracy oraz zastosowanych metod lek. wet. Adama Brzana przejrzysto i szczegółowo opisał sposób pobierania i procedurę histopatologiczną materiału tkankowego, jak również jego kwalifikację do dalszych badań. Ocena mikroskopowa oraz zastosowana procedura barwienia immunohistochemicznego wskazuje na bardzo dobre opanowanie umiejętności „warsztatowych” Doktoranta. Pewien niedosyt recenzenta budzi brak dokładniejszych danych dotyczących kotów oraz guzów np. rasa kota, lokalizacja i liczba zdiagnozowanych guzów u danej kotki, występowanie przerzutów odległych. Cenne jest to, że Autor przeprowadził ocenę stopnia złośliwości histologicznej za pomocą dwóch systemów: systemu starszego opracowanego w latach 90-tych przez Elston i Ellis i zaadaptowanego dla kotów przez Castagnaro oraz nowego systemu z 2015 wg Mills i wsp. W mojej ocenie, ciekawym byłby komentarz o poziomie zgodności obu systemów w badanych rakach sutka kotek. Doceniam, że Autor przeprowadził badanie immunohistochemiczne z uwzględnieniem różnych systemów oceny dla markerów. Zwracam uwagę, że ocena liczby komórek nowotworowych wg Remmele i Stegner (1987) uwzględnia poziom 10% komórek pozytywnych, zamiast 25%. W tym przypadku należy podać właściwe źródło informacji.

Wyniki badań zostały przedstawione w 47-stronnicowym rozdziale w sposób logiczny i stanowią odpowiedź na założenia pracy. Zostały one omówione w formie opisowej oraz przedstawione w postaci przejrzystych tabel i dobrej jakości rycin. Ponadto Doktorant jasno zaprezentował wszelkie możliwe zależności uzyskanych wartości pomiędzy poszczególnymi grupami i wskaźnikami, przy których opracowaniu zastosowano właściwe metody analizy statystycznej. Na podstawie wstępnej oceny histopatologicznej zebranych nowotworów gruczołu sutkowego zdecydowano, że badane będzie 60 raków, stąd też w moim przekonaniu, w tytule pracy należałoby uściślić, że badania dotyczą raków gruczołu sutkowego kotek, ponieważ czytając tytuł pracy odnosi się wrażenie, że dotyczy ona również nowotworów niezłośliwych, czy też nowotworów o różnym pochodzeniu. Cenne jest to, że Autor przeprowadził szczegółową charakterystykę badanych raków należących do 11 różnych typów histopatologicznych o różnym stopniu złośliwości, również uwzględniając naciekanie naczyń limfatycznych, co odgrywa znaczącą rolę w progresji nowotworu.

Do walorów pracy zaliczam wnikliwą dyskusję w rozdziale ‘Omówienie’ (choć lepiej brzmiałoby ‘Dyskusja’ lub ‘Omówienie wyników i dyskusja’), gdzie Autor umiejętnie dyskutuje wyniki badań własnych na tle licznych doniesień weterynaryjnych, jak i medycznych, co wskazuje na bardzo dobrą znajomość opisanej problematyki. W tym miejscu chciałbym zwrócić szczególną uwagę na staranność w omówieniu poszczególnych

parametrów patomorfologicznych i immunohistochemicznych w stosunku do ich potencjału rokowniczego. O ile dotychczas wskaźniki proliferacji i adhezji komórek nowotworowych gruczołu sutkowego kotek doczekały się publikacji, o tyle wyniki dotyczące oceny ekspresji Topo II α i jej korelacji z w/w parametrami, jak i innymi uznanymi za prognostyczne i predykcyjne w raku sutka należy uznać za szczególnie wartościowe z powodu braku publikacji na ten temat.

Uzyskane w toku badań dane pozwoliły stwierdzić, że ekspresja Topo II α może służyć jako wskaźnik aktywności proliferacyjnej nowotworów złośliwych gruczołu sutkowego u kotek. Warto podkreślić, że system oceny Topo II α został po raz pierwszy zastosowany przez Doktoranta w nowotworach sutka kotów. Autor odważnie podjął próbę ustosunkowania się do rozbieżnych metod oceny tego parametru w nowotworach u psów (jak dotąd tylko jedna praca) czy w nowotworach u ludzi. Przedstawiona przez Autora argumentacja jest sensowna i poprawna. Ponadto w przeprowadzonych badaniach Doktorant wykazał istotne większe wartości Topo II α w guzach o większych rozmiarach oraz w guzach, w których stwierdzono obecność zatorów nowotworowych w naczyniach limfatycznych. Słusznie Autor w swoich rozważaniach odnosi się do potencjalnej możliwości zastosowania tego białka jako czynnika rokowniczego oraz pomocnego w doborze pacjentów do chemioterapii z zastosowaniem antracyklin. Pan lek. wet. Adam Brzana wykazał się umiejętnością krytycznej i wyważonej oceny uzyskanych wyników oraz formułowania wniosków końcowych, zwłaszcza w sytuacji braku możliwości skonfrontowania ich z danymi z piśmiennictwa weterynaryjnego. Wnioski końcowe pracy zostały przedstawione we właściwy sposób, to znaczy jasno i przekonująco. Dzięki pracy Doktoranta nie ma wątpliwości, że ocena ekspresji K-67 oraz liczby figur mitotycznych może być przydatna w określeniu rokowania u kotek z rakiem sutka. Rzeczywiście, jak sam Doktorant zauważa brak zależności ze stopniem złośliwości histologicznej, ekspresją E-kadheryny czy też brak kompletnych danych o losie pacjenta po operacji sprawia, że potrzebne są dalsze badania, aby uznać Topo II α za marker wiarygodny. Ważny jest też wniosek, że istnieje grupa raków, których typ histopatologiczny nie odgrywa dużej roli jako czynnik predykcyjny.

Rozdział 'Piśmiennictwo' zawiera 223 pozycji piśmiennictwa. Cytowane prace są aktualne (blisko 50% stanowią publikacje z lat 2011-2022) i wskazują na dużą znajomość tematu przez Doktoranta.

Szczegółowa analiza pracy doktorskiej ujawnia pewne niedociągnięcia, które nie umniejszają jakości przygotowanego opracowania, lecz stanowią wskazówki możliwe do wykorzystania przy przygotowywaniu publikacji:

- w podanej przez Doktoranta klasyfikacji nowotworów sutka kotek widnieje w pkt. 2.2. gruczolak złożony (str. 14), jednakże ten typ nowotworu niezłośliwego nie występuje w klasyfikacji opublikowanej przez Davis-Thompson DVM Foundation autorstwa Zappulli i wsp. 2019;
- Autor stosuje termin 'liczba komórek z figurami mitotycznymi' w mojej opinii sformułowanie to powinno brzmieć 'liczba figur mitotycznych' jako bezpośrednie tłumaczenie 'mitotic count – MC' podane m.in. w systemie Mills i wsp z 2015;
- Autor posługuje się terminem 'sterylizacja', chociaż jest on powszechnie stosowany to w opinii recenzenta bardziej poprawne jest użycie określenia 'kastracja';
- niepoprawnie użyto określenie 'dobór naturalny' (w rozdz. 'Omówienie' na stronie str. 85) w odniesieniu do wyboru materiału do badań;
- niepotrzebnie typ histopatologiczny comedocarcinoma został oznaczony cudzym słowem (w rozdziałach 'Wyniki', 'Omówienie');
- w opisie rycin histopatologicznych należy usunąć skrót 'ok.', nie został on wyjaśniony. Zdaniem recenzenta skrót 'ok.' jest niepotrzebny, a nawet może wprowadzać w błąd, gdyż może oznaczać wykaz 'około', albo, że podane powiększenie odnosi się do okularu. Obie wersje są niepoprawne;
- w wykazie piśmiennictwa publikacje tych samych autorów z tego samego roku powinny być oznaczone literami a i b w spisie piśmiennictwa (np. Castagnaro i wsp. 1998; Petrucci i wsp. 2021). Niekiedy wdarła się niewłaściwa kolejność zapisu biorąc pod uwagę porządek alfabetyczny (np. Biesaga i wsp. 2011; Cassali i wsp.; Dorn 1968; Krawczyk i wsp. 2017; Kalogeraki i wsp. 2005; Vendramini i wsp. 2020), niektóre publikacje są cytowane z drobnymi literówkami (np. Nadaf zamiast Al-Nadaf; Huges zamiast Hughes; Grogorio zamiast Gregório) oraz jedna publikacja pojawia się w spisie dwa razy (Matos i wsp. 2012 na str. 116 i str. 117);
- z pracy należy usunąć cytowaną publikację, która została wycofana przez edytora (Shafiee i wsp. 2013), natomiast należy uwzględnić publikację Ferreira i wsp. z 2019 dotyczącą m.in. oceny statusu genu Topo II α w guzach sutka kotek. Ferreira D, Soares M, Correia J, Adegas F, Ferreira F, Chaves R. Assessment of ERBB2 and TOP2 α gene status and expression profile in feline mammary tumors: findings and guidelines. Aging (Albany NY). 2019 Jul 12;11(13):4688-4705. doi: 10.18632/aging.102079. PMID: 31301170.

Podsumowując, praca doktorska zawiera wiele ciekawych i nowych wyników oraz informacje o niezaprzeczalnej wartości merytorycznej i walorach aplikacyjnych przez co stanowi wartościowy wkład w rozwój medycyny weterynaryjnej, a także patologii porównawczej. W przyszłości wiedza uzyskana w badaniach z pewnością zaowocuje nowymi

strategiami leczenia przeciwnowotworowego – najbardziej efektywnej terapii celowanej, co byłoby z korzyścią zarówno dla onkologii weterynaryjnej, jak i ludzkiej. W świetle powyższego stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska pt. „Zastosowanie oceny immunohistochemicznej ekspresji topoizomerazy II α i wybranych wskaźników proliferacji w diagnostyce histopatologicznej nowotworów gruczołu sutkowego kotek” opracowana przez lekarza weterynarii Adama Brzanę, pod kierunkiem dr hab. Wojciecha Łopuszyńskiego, prof. UP w Lublinie, odpowiada warunkom określonym w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o 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 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669). Zatem przedkładam do Rady Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie lekarza weterynarii Adama Brzanę do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Izabella Dolka