

## **Ocena rozprawy doktorskiej lek. wet. Adama Brzany**

### **„Zastosowanie oceny immunohistochemicznej ekspresji topoizimerazy II $\alpha$ i wybranych wskaźników proliferacji w diagnostyce histopatologicznej nowotworów gruczołu sutkowego kotek”**

Nowotwory gruczołu sutkowego stanowią 12–17% wszystkich nowotworów rozpoznawanych u kotów, bez względu na płeć. Wśród kotek aż 16–25% wszystkich wykrywanych nowotworów to guzy gruczołu sutkowego, zdecydowana większość z nich (85–90%) to guzy złośliwe, które często wykazują agresywne zachowanie biologiczne, z ogólnoustrojowym rozsiewem (około 50–90% przypadków) już na wczesnych etapach choroby, kiedy ognisko pierwotne pozostaje stosunkowo niewielkie.

W ocenie zaawansowania choroby nowotworowej, a także określaniu rokowania u kotek ze złośliwymi nowotworami sutka dużą rolę odgrywa stopień zaawansowania klinicznego nowotworu. Według aktualnych danych typ histologiczny nowotworu gruczołu sutkowego u kotek ma mniejsze znaczenie dla rokowania. Analiza złośliwych nowotworów sutka u kotów wykazała, że takie parametry histologiczne, jak: naciekanie naczyń chłonnych, wartość markerów proliferacji i pleomorfizm jąder komórek nowotworowych, to niezależne czynniki o znaczeniu rokowniczym. W ocenie potencjalnych czynników rokowniczych u kotów z nowotworami gruczołu sutkowego stosowano też badania immunohistochemiczne z wykorzystaniem przeciwciał znakujących: receptory dla hormonów płciowych (receptory estrogenowe), cyklooksygenazy COX-2, produkty onkogenów (HER-2) i oceniających nasilenie angiogenezy nowotworowej (receptory dla VEGF). Jednym z powszechnie stosowanych wskaźników proliferacji jest Ki67. W badaniach złośliwych nowotworów u kotek ustalono wartość graniczną indeksu Ki67 jako czynnika rokowniczego (tzw. „cutoff”  $\geq 14\%$ , czyli co najmniej 14% wykazywało jądrową immunoekspresję Ki67). Wykazano, że u kotek, u których indeks Ki67 wynosił co najmniej 14%, zdecydowanie częściej obserwowano występowanie przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych i do miejsc odległych (93,8% przypadków). Ponadto ustalono, że szansa przeżycia 2 lat od zabiegu resekcji raka sutka była zdecydowanie wyższa u kotek, u których wartość indeksu Ki67 była poniżej 14%. Leczeniem

podstawowym jest chirurgiczne usunięcie zmiany z szerokim marginesem tkankowym. Uzupełnieniem zabiegu chirurgicznego jest chemioterapia.

Topoizomeraza typu II jest jednym z enzymów regulujących zmiany topologiczne i strukturalne w jądrze, przez co ma bezpośredni lub pośredni wpływ na takie procesy jak uporządkowanie struktury chromatyny poprzez wiązanie pętli chromatyny do szkieletu jądrowego, transkrypcję i replikację DNA, reperację uszkodzeń DNA, kondensację chromatyny w chromosomy w fazie G2/M cyklu komórkowego i rozdział chromosomów podczas mitozy oraz kondensację i fragmentację DNA podczas apoptozy. Efektywność wszystkich tych procesów zależy w dużej części od topologii DNA a zmiany w stopniu superskręcenia i superzwinięcia DNA oraz kondensacji chromatyny wywołane przez hamowanie aktywności topoizomerazy II np. przez małowcząsteczkowe inhibitory tego enzymu, mogą modulować ich przebieg.

DNA topoizomerazy II jest jednym z głównych celów molekularnych dla leków stosowanych w terapii przeciwnowotworowej. Antybiotyki antracyklinowe należą do leków przeciwnowotworowych cyklozależnych, fazowo-specyficznych i mają złożony mechanizm działania, na który składają się: tworzenie nieprawidłowych wiązań pomiędzy zasadami azotowymi DNA, hamowanie kluczowych enzymów syntezy DNA — topoizomerazy I i II oraz tworzenie wolnych rodników uszkadzających DNA. W leczeniu raka piersi znajdują zastosowanie dwie z dostępnych obecnie antracyklin — doksorubicyna i epirubicyna.

Autorzy licznych prac wykazali, że leczenie doksorubicyną może wydłużać życie kotek z rakiem sutka (mediana okresu przeżycia wynosi do 448 dni, a 2 lata od zabiegu przeżywa do 37% kotek).

W świetle powyższych danych wybór tematu pracy doktorskiej lek. wet. Adama Brzany wpasowuje się w aktualne i istotne zagadnienia medycyny weterynaryjnej.

Otrzymana do oceny rozprawa liczy 126 stron, ma typowy układ przyjęty dla rozpraw doktorskich. 17 tabel oraz 21 wykresów ilustruje wyniki przeprowadzonej analizy statystycznej.

Wysokiej jakości 30 mikrofotografii poprawnie ilustruje wyniki badań mikroskopowych dla poszczególnych typów histologicznych nowotworów oraz wyniki wykonanych odczynów immunohistochemicznych.

We wstępie Autor szczegółowo przedstawia anatomię i histologię gruczołu sutkowego kota, aktualną klasyfikację zmian rozrostowych i nowotworowych (2019), epidemiologię, czynniki ryzyka, omawia najczęstsze typy histologiczne zmian łagodnych i złośliwych oraz sposób określania histologicznej złośliwości zmian. Przedstawia aktualne schematy leczenia

oraz czynniki prognostyczne i predykcyjne dla nowotworów złośliwych gruczołu sutkowego u kotek.

Cel pracy został poprawnie skonstruowany jako cztery założenia, które zostały zweryfikowane w modelu badawczym. Doktorant podjął się oceny histopatologicznej guzów nowotworowych gruczołu sutkowego u kotek z określeniem typu histologicznego, stopnia złośliwości histologicznej i stopnia zaawansowania pTN. Kolejnym założeniem pracy była ocena ekspresji immunohistochemicznej indeksu proliferacji Ki67 oraz topoizomerazy II $\alpha$ . Autor postanowił również sprawdzić związek ekspresji badanych białek z typem histologicznym i stopniem złośliwości histologicznej nowotworu, stadium zaawansowania, oraz ekspresją immunohistochemiczną e-kadheryny. Oceniane parametry poddane zostały analizie statystycznej w celu wytypowania potencjalnych wskaźników rokowniczych i predykcyjnych.

Do badania zakwalifikowano 70 złośliwych nowotworów gruczołu sutkowego u kotek w wieku 3-27 lat, 49 niesterylizowanych i 21 sterylizowanych, w grupie było 26 kotek rasowych.

Najliczniejszym typem histologicznym (60) były raki proste (rak cewkowo-brodawkowaty:21, rak lity:16, rak cewkowy:11) i raki przewodowe (4). W przypadkach z obecnymi w badaniu węzłami chłonnymi, były one zajęte w 5 z 9 przypadków, cechy angioinwazji stwierdzono w 34,28% guzów. W klasyfikacji stopnia zaawansowania 31 guzów to guzy pT1, 33-pT2 i 6-pT3.

W wynikach oceny stopnia dojrzałości nowotworu: wysoki stopień zróżnicowania histologicznego guza G1: to 5 przypadków, średni G2: 33 przypadki i niski stopień zróżnicowania G3: 22 guzy.

Materiał do badań immunohistochemicznych uzyskiwano z dostępnych bloczków parafinowych.

Poziomy ekspresji produktów białkowych genów Ki67, Topo II $\alpha$  i e-kadheryny oceniano metodami immunohistochemicznymi przy użyciu przeciwciał monoklonalnych (firmy DAKO). W celu przeprowadzenia kontroli dodatkowo wykorzystano 6 wycinków prawidłowej tkanki gruczołu sutkowego, migdałka podniebiennego i wycinki raka piersi.

W przypadku oceny ekspresji wybranych białek oceniano jej rozmieszczenie (jądrowa, cytoplazmatyczna, błonowa) oraz procentową zawartość komórek nowotworowych w dostępnym badaniu materiale, przy ocenie ekspresji Ki67 i Topo II $\alpha$  obliczano indeks będący odsetkiem komórek w 100 komórkach nowotworowych.

W badanej grupie nowotworów średnia wartość indeksu białka Topo II $\alpha$  wynosiła 26,17%, najmniejszą stwierdzano w raku przewodowym, największą (33,62%) w raku płaskonabłonkowym.

W badanej grupie nowotworów średnia wartość indeksu Ki67 wynosiła 28,30%, najmniejszą stwierdzano w raku przewodowym, największą w raku płaskonabłonkowym (48,74%).

W ocenie immunohistochemicznej ekspresji e-kadheryny za dodatnią uważano ekspresję błonową, oceniano ilość komórek dodatnich oraz natężenie ekspresji w skali numerycznej, wynik końcowy stanowił iloczyn wyników cząstkowych w skali 0-12. Największą wartość ekspresji e-kadheryny obserwowano w preparatach raka przewodowego, następnie cewkowego, najmniejszą w preparatach raka anaplastycznego i litego.

Przeprowadzona analiza zależności pomiędzy ekspresją badanych markerów wykazała dodatnią korelację między wartościami indeksu ekspresji Topo II $\alpha$  i Ki67.

W kolejnym etapie autor przeprowadził analizę pomiędzy ekspresją badanych markerów a typem histologicznym guza i stopniem jego złośliwości G, stadium zaawansowania T, stopniem zajęcia węzłów chłonnych N, obecnością angioinwazji i liczbą figur podziału.

W badanej grupie stwierdzono istotną zależność pomiędzy ekspresją indeksu mitotycznego Ki57 i liczbą figur podziału a złośliwością histologiczną guza i stadium jego zaawansowania oraz angioinwazją. Ekspresja Topo II $\alpha$  była zależna od wielkości guza i angioinwazji. Badania statystyczne nie wykazały istotnej korelacji Topo II $\alpha$  z typem histologicznym nowotworu i stopniem złośliwości (była ona na granicy istotności statystycznej). Ekspresja Topo II $\alpha$  była zróżnicowana w poszczególnych typach histologicznych.

Dla obu badanych markerów proliferacji: Ki67 i Topo II $\alpha$  stwierdzono ujemną korelację z ekspresją e-kadheryny, niemniej istotność statystyczna była tylko dla oznaczeń Ki67. W kolejnych etapach pracy analiza statystyczna przeprowadzona przez Doktoranta dotyczyła zależności badanych parametrów proliferacji pomiędzy poszczególnymi typami histologicznymi, badania te ograniczono do grup nowotworów liczących co najmniej 6 przypadków. W wydzielonej grupie nowotworów nie wykazano istotnych statystycznie różnic w wartościach ekspresji Topo II $\alpha$ , ekspresji Ki67 i w liczbie komórek z figurami mitotycznymi pomiędzy porównywanymi typami histologicznymi nowotworów, niemniej autor zwraca uwagę na odrzucenie tych podtypów histologicznych, które reprezentowane były przez niższą niż 6 grupę przypadków.

W dyskusji Doktorant wyniki swoich badań konfrontuje z danymi z piśmiennictwa. Czyni to w sposób interesujący, z dużą swobodą, co świadczy o znajomości tematu i dojrzałości

naukowej. Przy braku prac oceniających ekspresję Topo II $\alpha$  u kotów wyniki badań własnych autor dyskutuje z pracami oceniającymi ekspresję Topo II $\alpha$  w badaniach w raku gruczołu piersiowego u kobiet, w których większość autorów wykazywała prognostyczną wartość ekspresji Topo II $\alpha$ . Część uzyskanych przez Doktoranta wyników jest zbliżona do wyników prac innych autorów. Doktorant konfrontuje swoje badania także z wynikami prac przedstawiającymi się odmiennie do własnych badań. Rozbieżności pomiędzy wynikami własnymi a publikowanymi przez innych autorów wg Doktoranta mogą wynikać m.in. z liczebności grupy własnej, odmiennej metodyki badań czy ograniczeń wynikających m.in. z braku istotnych obserwacji klinicznych. Przytoczone w dyskusji przykłady prognostycznej wartości ekspresji Topo II $\alpha$  w badaniach korelacji tego białka z czasem remisji i przeżycia u kobiet wydają się być dobrą motywacją do kontynuowania przez autora podjętych badań i przeprowadzenia podobnych analiz u zwierząt (w tym przypadku u kotek).

224 pozycji bibliografii stanowi podstawę do rozważań w dyskusji. Są to pozycje głównie autorów zagranicznych z ostatnich 10 lat stanowiące przegląd prac dotyczących analizowanych parametrów w nowotworach gruczołu piersiowego u zwierząt i ludzi.

Wyniki badań, w konfrontacji z przeglądem piśmiennictwa, stanowiły podstawę do postawienia 6 wniosków:

1. Oszacowanie immunohistochemicznej ekspresji Topo II $\alpha$  może służyć jako wskaźnik aktywności proliferacyjnej złośliwych nowotworów gruczołu sutkowego u kotek.
2. Immunohistochemiczna ekspresja antygenu Ki67 oraz liczba komórek z figurami mitotycznymi są dodatnio skorelowane z wielkością nowotworu gruczołu sutkowego u kotek, jego złośliwością histologiczną oraz infiltracją naczyń limfatycznych sąsiadujących z guzem przez komórki nowotworowe (uznane wskaźniki rokownicze), co pośrednio wskazuje, że mogą one być przydatne w prognozowaniu przebiegu nowotworu złośliwego gruczołu sutkowego u kotek.
3. Zróznicowany, zależny od wielkości guza i inwazyjności komórek nowotworowych do naczyń limfatycznych, a niezależny od ekspresji e-kadheryny, histologicznego stopnia złośliwości i typu histologicznego nowotworu poziom ekspresji Topo II $\alpha$  nie pozwala na uznanie tego oznaczenia za wskaźnik prognostyczny i implikuje potrzebę dalszych badań z uwzględnieniem parametrów klinicznych.

4. Jednym z czynników mogących wpływać na odmienną odpowiedź na leczenie adjuwantowe nowotworów gruczołu sutkowego u kotek z zastosowaniem leków rozprzegających funkcje Topo II $\alpha$  może być, uwidoczony w przeprowadzonych badaniach, zróżnicowany poziom tego enzymu w poszczególnych nowotworach.

5. Immunohistochemiczne oznaczenia ekspresji Topo II $\alpha$  i antygenu Ki67 w przypadku złośliwych nowotworów gruczołu sutkowego u kotek mogą stanowić wartościowe wskaźniki predykcyjne w chemioterapii z zastosowaniem antracyklin pod warunkiem potwierdzenia zależności pomiędzy poziomami ich ekspresji, a skutecznością terapii w badaniach klinicznych.

6. Brak zależności pomiędzy immunohistochemiczną ekspresją Topo II $\alpha$ , antygenu Ki67 i liczbą komórek z widocznymi figurami mitotycznymi, a typem histologicznym nowotworu wyklucza zastosowanie typu histologicznego jako wskaźnika predykcyjnego w chemioterapii złośliwych nowotworów sutka u kotek z zastosowaniem antracyklin.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska lek. wet. Adama Brzany została wykonana z profesjonalnie i z dbałością o szatę graficzną. Napisana jest jasno i poprawnym językiem. Zastosowanie w pracy wielu metod badawczych oraz umiejętność formułowania wniosków świadczy o przygotowaniu Doktoranta do dalszej pracy naukowej.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam uwagi dotyczące pracy lek. med. Adama Brzany:

We wstępie: omawiając czynniki onkogenne Autor przedstawia prace badające rolę wirusów w raku gruczołu sutkowego u zwierząt, nie podając informacji, które wirusy były badane.

Brak jest w tym rozdziale prezentacji systemu TNM dla nowotworów gruczołu sutkowego u kotów.

Pierwsza część rozdziału wyniki: „charakterystyka badanej populacji zwierząt..” (a w zasadzie tylko jej pierwszy akapit przedstawiający liczebność grupy i jej charakterystykę) powinna być zaprezentowana na początku rozdziału: „Materiały i metody” gdzie mamy informację o tym skąd i z jakiego okresu czasowego pochodził materiał.

Wyniki badań i analiz statystycznych zostały bardzo szczegółowo opisane, niemniej (ze względu na ich ilość) brakuje skróconego podsumowania wyników.

Prezentowane mikrofotografie zawierają podwójne przedstawienie zastosowanego powiększenia. Przy pasku umieszczonym na zdjęciu nie ma konieczności prezentowania zastosowanego powiększenia w opisie (i odwrotnie).

W pracy występuje kilka błędów, które należą do błędów drukarskich wymagających korekcy, m.in.: Fot 8. W opisie-Rak cewkowaty- powinno być rak cewkowy.

Pozycja polskojęzyczna w piśmiennictwie: Sosińska-Mielarczyk powinna zostać poprawiona: nazwisko pierwszej autorki: Sosińska-Mielcarek (uwaga dotyczy wszystkich cytowań tej pracy).

Powyższe uwagi należy traktować raczej jako wskazówki. Należy docenić duży wkład pracy lek. Wet. Adama Brzany w przygotowanie i napisanie niniejszej rozprawy. Podkreślić należy aktualność wybranego przez Doktoranta tematu i możliwe implikacje kliniczno-terapeutyczne uzyskanych wyników. Na wyróżnienie zasługuje rozdział „Omówienie”, w którym Autor bardzo szczegółowo prezentuje wyniki wybranych prac i na ich tle ze znaczną swobodą dyskutuje wyniki własne, do których podchodzi krytycznie starając się racjonalnie tłumaczyć ich odmienność, jeżeli taka występuje.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca: „Zastosowanie oceny immunohistochemicznej ekspresji topoizimerazy II  $\alpha$  i wybranych wskaźników proliferacji w diagnostyce histopatologicznej nowotworów gruczołu sutkowego kotek” spełnia warunki stawiane rozprawie na stopień doktora nauk medycznych – Ustawa z dnia 14.03.2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003r. Nr 65 poz 595), w związku z artykułem 179 ust.3 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. (Przepisy wprowadzające ustawę- Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce - Dz.U. z dnia 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669) i przedkładam Wysokiej Radzie Dyscypliny Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie wniosek o dopuszczenie lek. wet. Adama Brzany do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Korolczuk