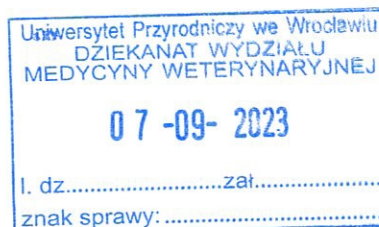


Lublin, 01.09.2023

dr hab. Anna Śmiech, prof. Uczelni
Katedra Patomorfologii i Weterynarii Sądowej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

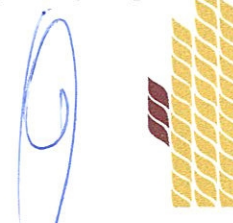


Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. wet. Joanny Bubak pt.: „Ekspresja SOX 10 i testyny w rakach i gruczolakach gruczołu sutkowego u suk” wykonanej w Zakładzie Patomorfologii i Weterynarii Sądowej Katedry Patologii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem promotorów prof. dr hab. Marcina Nowaka oraz prof. dr hab. Piotra Dziegiela.

Prezentowaną ocenę dysertacji doktorskiej lek. wet. Joanny Bubak pt. „Ekspresja SOX 10 i testyny w rakach i gruczolakach gruczołu sutkowego u suk” wydaję zgodnie z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 27 czerwca 2023 roku.

Stały wzrost zapadalności i umieralności spowodowany chorobami nowotworowymi obserwowany u ludzi jak i u zwierząt sprawia, że stają się one wiodącym zagadnieniem w patologii. Świadczą o tym dane z różnych ośrodków naukowych, z których wynika, że u zwierząt, szczególnie tych żyjących w bezpośredniej bliskości człowieka, głównie psów i kotów liczba rozpoznawanych przypadków stale wzrasta. Nowotwory gruczołu sutkowego pod względem częstości występowania zajmują drugie miejsce zaraz po nowotworach skóry, a u suk należą do najczęstszych stanowiąc 25-50% wszystkich diagnozowanych zmian nowotworowych. Z kolei rak sutka jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym w populacji żeńskiej i drugim po raku płuca nowotworem pod względem częstości zgonów. Z powodu raka sutka umiera rocznie 685tys. kobiet. Przytoczone dane świadczą o skali problemu, który nadal mimo wdrażania nowych metod diagnostycznych i terapeutycznych wymaga wciąż



nieustannego doskonalenia i rozwoju. Szczególnie poznanie mechanizmów kancerogenezy, które pozwalają lepiej zrozumieć proces transformacji nowotworowej i mechanizmy nowotworzenia u ludzi i zwierząt mogą mieć istotne znaczenia rozwoju onkologii. W ostatnich latach zaobserwowano liczne kliniczne i molekularne podobieństwa między rakiem sutka u kobiet oraz nowotworami gruczołu sutkowego u psów. Wspólne cechy zaobserwowano w patogenezie raka sutka u kobiet i raka gruczołu sutkowego u suk, szczególnie etiologię hormonalną, wiek zachorowania, przebieg choroby oraz tendencję do dawania przerzutów. Wielu badaczy sugeruje, że gruczoł sutkowy psa jest dobrym modelem badania nad rakiem sutka zwłaszcza potrójnie ujemnym. Dlatego też wybór tematu pracy dotyczącego kancerogenezy guzów sutka u psów należy uznać za bardzo trafny i aktualny. Poszukiwanie nowych markerów, odpowiedzialnych za poszczególne etapy choroby nowotworowej ma istotne znaczenie nie tylko dla rozwoju medycyny weterynaryjnej, ale także człowieka. Ponadto takie badania z wykorzystaniem modelu zwierzęcego mogą mieć znaczący wpływ na opracowanie nowych terapii celowanych.

Dysertacja doktorska lek. wet. Joanny Bubak jest monografią zawierającą 89 stron i posiada klasyczny układ. Rozpoczyna się spisem treści oraz wykazem akronimów i symboli ułatwiających poruszanie się w tekście i czytanie pracy. Kolejnym rozdziałem jest wstęp, w którym autorka w sposób usystematyzowany poprzez zamieszczenie 12 podrozdziałów obejmujących 18 stron, przedstawiła wszystkie niezbędne informacje zawierające aktualną wiedzę dotyczącą podejmowanej problematyki badawczej z uwzględnieniem aktualnego piśmiennictwa. W pierwszych podrozdziałach dysertacji Doktorantka zaprezentowała epidemiologię i dane statystyczne oraz wykazała podobieństwa między rakiem sutka i nowotworami gruczołu sutkowego u suk, opisała budowę anatomiczną i histologiczną gruczołu sutkowego. Następnie scharakteryzowała etiologię, predyspozycje rasowe, przebieg kliniczny nowotworów gruczołu sutkowego, podatność na terapię oraz ich histogenezę. W kolejnych podrozdziałach Doktorantka przedstawiła klasyfikację histologiczną wg. Goldschmidta oraz klasyfikacją kliniczną TNM wg. Owena określającą stopień zaawansowania procesu nowotworowego. Najwięcej miejsca poświęciła kancerogenezie i przemianie nabłonkowo-mezenchymalnej wyjaśniając jej biologiczne mechanizmy oraz znaczenie dwóch białek biorących udział w tym procesie tj. testyny oraz SOX10 będących wiodącym tematem badawczym. Białko SOX 10 jest czynnikiem transkrypcyjnym zlokalizowanym w chromosomie 23, który w interakcji z innymi białkami bierze udział w wielu procesach biologicznych, a także w powstawaniu i rozprzestrzenianiu nowotworów, tym rakach sutka u kobiet. Z kolei testyna (TES) jest to białkiem o masie 47kDa,



złożonym z 421 aminokwasów, kodowanym przez gen *TES* zlokalizowany w miejscu wrażliwym FRA7G w pozycji 7q31, które odgrywa znaczącą rolę w adhezji i mobilności komórek. Zmniejszoną ekspresję testyny związanej z utratą przez komórki właściwości migracyjnych i inwazyjnych zaobserwowano w wielu ludzkich nowotworach złośliwych w tym również rakach sutka. Kolejne trzy krótkie podrozdziały autorka poświęca antygenowi proliferacyjnemu Ki-67, receptorowi naskórkowego czynnika wzrostu HER oraz białku filametów pośrednich tj. wimentynie, określając ich znaczenie w onkologii. Zaproponowana forma wstępu jest jak najbardziej poprawna i wyczerpująca. Dzięki wprowadzeniu podrozdziałów jest bardzo przejrzysta, a czytelnik zostaje zaznajomiony z zagadnieniami związanymi z problematyką badawczą, stanowiącą cel i założenia pracy. Wprawdzie zmieniałabym kolejność początkowych podrozdziałów zaczynając od etiologii epidemiologii i klasyfikacji guzów gruczołu sutkowego później modelu porównawczego, ale przedstawiona przez Doktorantkę forma jest również poprawna i akceptowalna. W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawia cztery sprecyzowane cele pracy obejmujące ocenę immunoreaktywności białka SOX10 i TES w komórkach nowotworowych łagodnych i złośliwych guzów pochodzenia nabłonkowego oraz w odniesieniu do rasy, wieku pacjenta, stopnia złośliwości histologicznej guza, antygenu Ki-67, HER2 i VIM, a także analizę poziomów ekspresji SOX10 na poziomie mRNA w wybranych nowotworach złośliwych i tkance prawidłowej gruczołu sutkowego u suk. Jedynie drobne zastrzeżenie mam do pierwszego, niedokładnie sprecyzowanego celu badań, w którym Doktorantka ogólnie używa sformułowania nowotwory złośliwe i łagodne, nie zaznaczając, że przedmiot badań stanowią wyłącznie guzy pochodzenia nabłonkowego.

Rozdział „Materiał i metody” w sposób szczegółowy opisuje wszystkie procedury badawcze obejmujące badanie histopatologiczne z oceną stopnia złośliwości histologicznej raków i zajęcie naczyń krwionośnych przez komórki nowotworowe, badania immunohistochemiczne, real-time PCR w reakcje PCR oraz metody statystyczne. Analizie poddano łącznie 77 próbek tkanek gruczołu sutkowego psów, w tym 10 próbek tkanki prawidłowej stanowiła grupa kontrolna. Tutaj Doktorantka charakteryzuje grupę badaną z obecnością wszystkich ocenianych parametrów: typ histologiczny raka, stopień histologicznej złośliwości, zajęcie naczyń, ekspresja wimentyny, receptora HER2, indeks proliferacyjny (Ki-67). Moim zdaniem tabela nr V powinna być umieszczona w wynikach po opisanie metod, a nie na samym początku rozdziału. W tym podrozdziale powinna zostać charakterystyka tylko grupy badanej z uwzględnieniem wieku czy rasy psów. Przedstawienie w dysertacji opisy metodyki zostały przedstawione bardzo dokładnie



i przejrzystości, ponieważ każdy oceniany antygen i parametr został opisany oddzielnie w podrozdziałach. Szczególnie metody immunohistochemiczne oraz metoda real-time PCR zostały bardzo wnikliwie opisane. Tutaj chciałam podkreślić, że badania mają szeroki zakres, a głównym ich atutem jest liczba ocenianych parametrów. Kolejny rozdział dotyczący uzyskanych wyników. Otrzymane wyniki badań zostały poddane wnikliwej analizie statystycznej i przedstawione w formie opisów, tabeli i wykresów i mikrofotografii. Na początku rozdziału autorka przedstawia dane dotyczące rasy psów ze zdiagnozowanymi nowotworami złośliwymi i łagodnymi, a następnie w formie opisowej przedstawia typy histologiczne. W grupie nowotworów złośliwych (n=53) największy odsetek stanowił rak prosty cewkowo-brodawkowy 32,0% (n=17), następnie rak prosty cewkowy 28,3% (n=15), rak mieszany 24,6% (n=13), rak lity 7,5 % (n=4), rak złożony 5,7% (n=3) i rak brodawkowato-torbielowaty 1,9% (n=1). Wśród nowotworów łagodnych (n=14) zdiagnozowano tylko gruczolaki proste (n=14). Tutaj chciałam podkreślić, że oceny dokonano zgodnie z przyjętą przez Doktorantkę klasyfikacją wg. Goldschmidta, a nie umieszczoną w tekście WHO. Odczyny immunohistochemiczne przedstawiono w formie opisowej oraz dokumentacji fotograficznej. Doktorantka prezentuje przykładowe zdjęcia reakcji immunohistochemicznych jednak opisy przedstawia bardzo ogólnie, nie podając typu histologicznego nowotworu, co dla mnie patomorfologa ma istotne znaczenie. Samo określenie „nowotwór” czy „rak” jest niewystarczające. Moim zdaniem można by było wzbogacić pracę bogatszą dokumentacją fotograficzną obejmującą także typy histologiczne badanych nowotworów, stopnie złośliwości czy angioinwazję. Kolejny, szósty rozdział przedstawia przejrzyste podsumowanie wyników dotyczących oceny ekspresji i reaktywności białka SOX10 i testyny w badanych nowotworach. Odnotowano wyższą immunoreaktywność białka SOX10 w nowotworach złośliwych, głównie raku cewkowym prostym w porównaniu do tkanki zdrowej oraz niższą ekspresję w tkance zdrowej na poziomie mRNA. Zaobserwowano pozytywną korelację białka SOX10 z antygenem Ki67, wimentyną oraz angioinwazją i stopniem złośliwości histologicznej. Z kolei, jeśli chodzi o testynę zaobserwowano niższą immunoreaktywność w guzach złośliwych w porównaniu do zmian łagodnych, a wyższą w gruczolaku prostym. Uzyskane wyniki poddano dyskusji tematycznej obejmującej 12 stron wydruku komputerowego. Doktorantka konfrontuje wyniki własnych obserwacji z rezultatami uzyskiwanymi w różnych okolicznościach przez innych autorów. Właśnie dyskusja świadczy o nowatorskich walorach pracy w medycynie weterynaryjnej, w której autor w większości uzyskane wyniki odnosi do

ludzkiej.



A fakt, że guzy gruczołu sutkowego mogą stanowić model porównawczy do raków sutka u kobiet czyni ją bardziej wartościową.

Rozważna interpretacja poczynionych obserwacji oparta na uzyskanych wynikach oraz skonfrontowanie ich z cytowanymi rezultatami innych autorów upoważniły Doktorantkę do wysunięcia trzech sformułowanych wniosków obejmujących całokształt analizowanych badań. Wnioski są jasno sformułowane, jednak brakuje mi odniesienia do wieku i rasy psów, który stanowił cel badań punkt c. Nie zaobserwowałam rozwinięcia tego tematu w dysertacji i dlatego na tym etapie nasuwa mi się pytanie do Doktorantki: czy wiek rasa psów miały związek z poziomem immunoreaktywności i testyny i białka SOX10 ?. Następnie kolejne rozdziały przedstawiają streszczenie w języku polskim, angielskim, bibliografię, listę 14 tabel i 15 rycin. Właściwie dobrana bibliografia obejmuje 159 pozycji wyłącznie anglojęzycznych, które w ponad 80% pochodzą z ostatnich 15 lat. Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na pewne niewielkie niedociągnięcia o charakterze stylistycznym i redakcyjnym. Doktorantka często używa terminu kancyrogenza właściwe jest określenie kancerogeneza. „Guzy listwy mlecznej” raczej używamy terminu gruczołu/listwy i listewki mleczne występują w rozwoju embrionalnym. Dla określenia ekspresji białek w badaniu immunohistochemicznym można stosować zamiennie immunoreaktywność, immunoekspresja, sama ekspresja zwykle dotyczy genów, chociaż też często jest używana w immunohistochemii. Przedstawione uwagi w najmniejszym stopniu nie umniejszają jednak wartości merytorycznej pracy i mojej ogólnej pozytywnej oceny dysertacji. Do szczególnych walorów pracy interesujący, aktualny i nowatorski temat badawczy, który wpasowuje się w nowoczesne trendy medycyny weterynaryjnej, bardzo przejrzystą i czytelną formą pracy mimo licznych ocenianych parametrów. Na podstawie zaobserwowanych zależności należy podkreślić, że praca ma charakter rozwojowy i implikacyjny. Uzyskane wyniki sugerują konieczność przeprowadzenia dalszych badań z uwzględnieniem parametrów klinicznych takich jak okres przeżycia, obecność przerzutów odległych, czas wolny od choroby, które poszerzą naszą wiedzę na temat roli badanych białek w przebiegu procesu nowotworowego u psów.

Wniosek końcowy

Reasumując, pracę doktorską autorstwa lek. wet. Joanny Bubak pt. „Ekspresja SOX10 i testyny w rakach i gruczolakach gruczołu sutkowego u suk” pod kierownictwem prof. dr hab. Marcina Nowaka oraz prof. dr hab. Piotra Dziegiela oceniam pozytywnie. Przedłożona praca jest



szczególnie wartościowa ze względu na nowatorski charakter oraz aktualność tematu badawczego. Stwierdzam, że przedstawiona przez lek. wet. Joannę Bubak rozprawa doktorska spełnia wymogi i warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce ustawy (Dz.U.2023.742 t.j) i wnoszę o dopuszczenie Kandydata do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

dr hab. Anna Śmiech , prof. Uczelni

