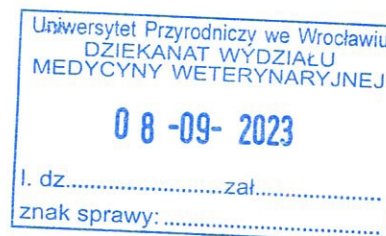


Olsztyn, 3 sierpnia 2023 roku

Prof. dr hab. Krzysztof Wąsowicz
Katedra Patofizjologii, Weterynarii Sądowej
i Administracji Weterynaryjnej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski
w Olsztynie



RECENZJA

rozprawy doktorskiej lek. wet. Joanny Bubak pt. „Ekspresja SOX-10 i testyny w rakach i gruczolakach gruczołu sutkowego u suk”.

Podstawą prawną przygotowania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 27 czerwca 2023 roku i pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria UP we Wrocławiu, prof. dr hab. Wojciecha Niżańskiego, z dn. 27 czerwca 2023 roku.

Rozprawa doktorska lek. wet. Joanny Bubak została przygotowana w Zakładzie Patomorfologii i Weterynarii Sądowej Katedry Patologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu pod kierunkiem Promotorów, prof. dr hab. Marcina Nowaka i prof. dr hab. Piotra Dzięgiela z Katedry Morfologii i Embriologii Człowieka Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Onkologia weterynaryjna jest dziedziną medycyny weterynaryjnej, która rozwija się powoli i z oporami. Pomimo tego, że zwykle medycyna weterynaryjna czerpie z rozwoju równoległej dyscypliny medycznej, to tutaj przepływ wiedzy i metodologii leczenia jest dosyć powolny. Onkologia medyczna jest dziedziną dynamicznie się rozwijającą, ale stosowane w niej metody leczenia są niezwykle drogie, obarczone licznymi skutkami ubocznymi, a efekty leczenia jeszcze często niepewne. Wzrost skuteczności leczenia w onkologii medycznej jest wynikiem stosowania leków dopasowanych do molekularnych mechanizmów ludzkich komórek nowotworowych, co utrudnia ich bezpośrednie zastosowanie u gatunków innych niż człowiek (nie mówiąc już o kosztach takiego leczenia). Z drugiej strony, onkologia medyczna rozwinęła metody diagnostyki, które pozwalają na początkowym etapie leczenia dobrać leki i metody, które niosą największą szansę na powodzenie terapii. Dlatego też onkologia weterynaryjna jest dziedziną, która, pomimo szerokiego rozpowszechnienia chorób nowotworowych u zwierząt towarzyszących, jest polem działania nielicznych lekarzy weterynarii. W większości wypadków zdiagnozowanie nowotworu u psa czy kota powoduje podjęcie decyzji o eutanazji, często prób głębszej diagnostyki. Tylko nieliczni właściciele zwierząt towarzyszących decydują się na mniej lub bardziej kosztowną diagnostykę, a jeszcze mniej na jeszcze kosztowniejszą terapię chemioterapeutykami czy promieniowaniem jonizującym. Niepośledni wpływ na podjęcie decyzji o terapii, szczególnie chemioterapeutykami, mają rokowanie i spodziewane efekty niepożądane, które mogą, z

punktu widzenia etycznego, skłaniać do podjęcia decyzji o eutanazji. Po co mamy przedłużać życie psa o 3-4 miesiące, jeśli dalej będzie dotknięty objawami rozwijającej się choroby i jednocześnie doznawać będzie skutków ubocznych chemioterapii.

Jednak, pomimo tego dosyć pesymistycznego wstępu, należy bardzo doceniać pracę naszych kolegów, którzy pomimo nie najjaśniejszych obecnie perspektyw, kontynuują pracę w dziedzinie onkologii weterynaryjnej. Jeśli oni ulegliby zniechęceniu to onkologia weterynaryjna przestałaby się rozwijać. Jedynie uporczywe prowadzenie badań w zakresie diagnostyki i terapii pozwoli zebrać wiedzę i doświadczenie, które pozwolą na szersze i skuteczniejsze wprowadzenie diagnostyki i terapii w onkologii weterynaryjnej.

I do tego nurtu należy oceniana tutaj rozprawa doktorska. Doktorantka postanowiła przeprowadzić badania nad ekspresją dwóch substancji, SOX-10 i testyny w różnego rodzaju nowotworach gruczołu sutkowego u suk, mając nadzieję na określenie wartości prognostycznej zmian ekspresji tych substancji w komórkach nowotworowych. Badania Doktorantki opierają się o klasyczne metody histopatologiczne rozszerzone o metody immunohistochemicznej oceny poziomu ekspresji SOX-10 i testyny w tkankach badanych guzów nowotworowych oraz określaniu proliferacyjnych cech guzów poprzez ocenę poziomu ekspresji substancji znanych z tego, że ich poziom ekspresji związany jest ze stopniem złośliwości, czy inwazyjności komórek nowotworowych: Ki-67, HER2 i wimentyny. Doktorantka wzbogaciła swoje wyniki o niezwykle ważne badania ilościowe poziomu ekspresji badanych immunohistochemicznie substancji na poziomie mRNA metodą PCR w czasie rzeczywistym i Western Blot.

Recenzowana praca doktorska ma klasyczny układ. Składa się ze szczegółowego spisu treści, wykazu skrótów, wstępu (19 stron), sformułowania celu pracy, opisu materiałów i metod (13 stron), opisu wyników (17 strony), podsumowania wyników, dyskusji (8 stron), opisu wyciągniętych wniosków (1 strona), streszczenia w języku polskim i angielskim i spisu piśmiennictwa liczącego 159 numerowanych pozycji. Praca zawiera bardzo liczne tabele i ryciny.

Rozprawa doktorska jest dobrze wykonana, jednak Doktorantka nie ustrzegła się błędów i potknięć, czasami większych, czasami mniejszych, które jednak nie rzutują na merytoryczną wartość dysertacji.

Na pierwsze błędy można się natknąć w Wykazie skrótów, gdzie Doktorantka niezbyt szczęśliwie przetłumaczyła na język polski niektóre nazwy angielskojęzyczne, np. BL przetłumaczono jako podtyp podstawny raka piersi, podczas gdy w nazwie angielskojęzycznej nic o raku piersi się nie mówi, czy HMG (high mobility group), którego to skrótu nie należy używać w oderwaniu od słowa protein(s), czyli białko/a. Podobnie, słowa w niektórych wyrażeniach angielskojęzycznych należałoby pisać z użyciem łącznika, jak np. epithelial-mesenchymal transition. Ale, są to błędy i potknięcia mało istotne.

W bardzo obszernym Wstępie Doktorantka omawia ogólne podłoże anatomiczno-fizjologiczne gruczołu sutkowego suk, jego nowotworzenia, klasyfikację nowotworów gruczołu sutkowego, klasyfikację stopnia zaawansowania guzów gruczołu sutkowego i jej podstawy biologiczne, jak również omawia biologię substancji, których ekspresję bada w

swojej pracy doktorskiej. Wstęp jest bogato ilustrowany tabelami (4) i rycinami (3), które ułatwiają zrozumienie tych niełatwych zagadnień. Wstęp dostarcza solidnej porcji wiedzy opartej o przegląd dobrze dobranej literatury.

Doktorantka we Wstępie nie ustrzegła się niestety pewnych błędów. Opisując sposób stopniowania nowotworów sutka twierdzi, że jego elementem jest liczenie figur mitotycznych w polu widzenia, podczas gdy figury te liczy się w kilku polach widzenia, których liczba jest uzależniona od powiększenia, obejmujących łącznie 2.37 mm kwadratowego (choć w opisie metodyki Doktorantka stosuje poprawną metodę liczenia figur mitotycznych). Doktorantka stosuje też w niektórych miejscach błędne nazewnictwo nowotworów.

Tekst mógłby być napisany z większą dbałością o stylistykę i kontrolę błędów literowych, czy interpunkcję. Doktorantka nie ustrzegła się również pewnych skrótów myślowych, jak np. na stronie 21, w wierszu 6 pisze, że „niski poziom testyny koreluje”, podczas gdy lepiej napisać „niski poziom ekspresji testyny koreluje”. Generalnie, można przypuszczać, że przygotowywanie rozprawy doktorskiej przyspieszyło w pewnym momencie, aby zdążyć z jej złożeniem przed ostatnim posiedzeniem Rady Dyscypliny przed sezonem urlopowym, co odbiło się pewnie na staranności w przygotowaniu tekstu. Z ważniejszych niedociągnięć, które zauważyłem we Wstępie, muszę wymienić jeszcze, że klasyfikacja Goldschmidta nie jest już klasyfikacją najnowszą i obowiązującą. Na stronie 24 (wiersze 3-4) Doktorantka niepotrzebnie przytacza pełne nazwy angielskojęzyczne dodając do nich jeszcze skróty objaśnione w Wykazie skrótów. Wreszcie, Doktorantka, na szczęście rzadko, stosuje wymiennie wyrażenie „rak gruczołu piersiowego” z prawidłowym wyrażeniem „rak gruczołu sutkowego”.

Doktorantka przedstawiła 4 dobrze sformułowane cele.

W rozdziale Materiały i Metody znajduje się 9 tablic ukazujących materiał badawczy, kryteria oceny barwień histologicznych i immunohistochemicznych (w części jest to autorskie opracowanie Doktorantki) oraz niektóre szczegóły metodyki reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Metodyka jest przedstawiona w sposób poprawny. Do tego rozdziału odnoszą się również, niestety, wcześniejsze uwagi dotyczące strony edytorskiej i stylistycznej. Jednak, można zauważyć w tej części istotniejsze błędy i braki. Doktorantka stwierdza, że próbki tkanek pochodzą z archiwum macierzystego Zakładu. Nie wspomina jednak jak próbki były przechowywane (jako bloczki parafinowe?) ani jak stare były próbki? O tym, że tkanki były przechowywane jako bloczki parafinowe można się dowiedzieć dopiero z dalszego opisu metodyki, gdzie w opisie barwień immunohistochemicznych opisano krok odparafinowania. Na stronie 31 (wiersze 11-12) Doktorantka wspomina, że ocena barwień immunohistochemicznych została przeprowadzona przez niezależnych patologów. Można tylko przypuszczać, że tych niezależnych patologów było dwóch, jak wspomniano na stronie 29 (wiersz 7). Trochę humorystycznie brzmi stwierdzenie Doktorantki, że próbki tkanek prawidłowych pobrano „od psów, które uległy śmierci w wyniku wypadku komunikacyjnego”. Tu mam od razu pytanie, czy te próbki też były przechowywane w

archiwum Zakładu, czy były pobrane na potrzeby pracy doktorskiej? Jako naukowiec zajmującego się biologią molekularną zaskoczył mnie brak informacji jak oznaczano stężenie RNA (jak przypuszczam całkowitego RNA, a nie mRNA) używanego w syntezie cDNA przed oznaczeniami z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym?

Podsumowując, uważam jednak, że wszystkie procedury badawcze zostały przeprowadzone i opisane poprawnie, zgodnie z obowiązującymi i szeroko stosowanymi standardami. Nawet, jeśli mam osobiste obiekcje co do niektórych metod, to nie zmienia to faktu, że są one powszechnie stosowane.

Doktorantka przedstawia wyniki jasno i zwięźle wspomagając się 18 mikrofotografiami, 4 tabelami i 5 wykresami. Przedstawiono również przykładowe fotografie prążków uzyskanych w metodzie Western Blot.

Nie mam zastrzeżeń do sposobu oceny preparatów histologicznych, barwień immunohistochemicznych i wyników ilościowych metody qPCR i Western Blot (choć tutaj mam osobiste obiekcje). Tylko Doktorantka i dwaj niezależni patolodzy widzieli preparaty immunohistochemiczne i histologiczne i należy im ufać, że dobrze wykonali swoje zadanie. Mam natomiast pewne zastrzeżenia co do strony edytorskiej. Na stronie 34 (wers 4) i w opisie tabeli VII Doktorantka wspomina o skali Remmele i Stegner, natomiast na stronie 51 i 52 omawiając ekspresję testyny wspomina o skali Remmele. Na stronie 35 w opisie tabeli VIII Doktorantka wspomina o interpretacji ekspresji SOX-10 według Ali i wsp. (157), natomiast na stronie 44 wspominając o ich klasyfikacji raz nie podaje pozycji literatury (wers 5), a w wersji 14 podaje cytowanie „Ali i wsp. (2022)” co jest niezgodne z zasadami cytowania źródeł przyjętymi w ocenianej rozprawie.

Po omówieniu uzyskanych wyników Doktorantka zamieszcza podsumowanie dotyczące ekspresji SOX-10 i testyny w badanych tkankach. Jednak podsumowanie to, w przypadku testyny, nie odnosi się do badanych poziomów ekspresji Ki-67, HER2 i wimentyny. Nie można więc z tego podsumowania wyciągnąć wniosków, czy ich poziomy ekspresji były jakoś związane (jeśli nie były, to należałoby to wyraźnie stwierdzić).

Doktorantka kończy częścią opisową swojej pracy doktorskiej stosunkowo krótką dyskusją, liczącą trochę powyżej 7 stron. Dyskusja napisana jest na wysokim poziomie dowodzącym dobrego zorientowania Doktorantki w literaturze dotyczącej tematu pracy. Jest ona treściwa i porusza wszystkie niezbędne kwestie. Doktorantka zwraca w niej również uwagę na ograniczenia swoich badań polegające na braku dostępu do dokumentacji medycznej pacjentów, od których pobrano próbki guzów, co uniemożliwia ocenę prognostyczną uzyskanych wyników. Doktorantka zwraca jednak uwagę, że wyciągnięcie właściwych wniosków wymagałoby wieloletniej obserwacji pacjentów, co w przypadku onkologii weterynaryjnej możliwe jest niezwykle rzadko.

Dyskusja jest napisana starannie pod względem stylistycznym i edytorskim, ale tu również Doktorantka nie ustrzegła się wymiennego stosowania terminu „rak gruczołu piersiowego” zamiast „rak gruczołu sutkowego”.

Tutaj pozwolę sobie nie zgodzić się ze stwierdzeniem Doktorantki, które w kilku miejscach zamieściła w swojej dysertacji. Doktorantka twierdzi, że rak gruczołu sutkowego u suki może być dobrym modelem raka sutka u kobiet. Znając jednak postawę lokalnych komisji etycznych co do wykonywania badań na psach, a tym bardziej badań eksperymentalnych z wykorzystaniem psa jako zwierzęcia modelowego, uważam, że badania takie nie mają szans na to, aby uzyskać zgodę komisji etycznej. Natomiast, badania Doktorantki stanowią ważny przyczynek do rozwoju metodologii diagnostycznej w onkologii weterynaryjnej.

W omówieniu wniosków Doktorantka troszeczkę nadinterpretuje znaczenie uzyskanych wyników twierdząc, że wskazują one na udział SOX-10 i testyny w procesie transformacji nowotworowej, co raczej trudno stwierdzić nie badając głębiej tego zagadnienia. Nie wiadomo dlaczego ekspresja SOX-10 i testyny zmienia się w guzach złośliwych i czy jest to bezpośrednio związane z onkogenezą, czy jest zjawiskiem wtórnym do transformacji nowotworowej komorek.

Lista pozycji bibliografii liczy 159 dobrze dobranych pozycji, z których większość pochodzi z ostatnich lat, a zdecydowana większość już z XXI wieku. W cytowaniu literatury Doktorantka nie ustrzegła się jednak błędów. Formatowanie Bibliografii jest niespójne, np. pozycja 5, 6 i wiele innych, mają rok publikacji wymieniony na końcu akapitu, a większość pozycji wymienia rok publikacji zaraz po tytule, z tym że czasami jest zamieszczony w nawiasach, a czasami nie. Zdarzają się również inne sposoby podawania danych bibliograficznych. Utrudnia to analizę spisu publikacji. Poza tym, Doktorantka najwyraźniej nie cytuje w tekście pozycji 45 i 122 ze spisu bibliografii, chociaż wydaje się, że pozycja 45 jest zacytowana na stronie 13 jako pozycja 44. W takim razie Doktorantka nie cytowała by w tekście pozycji 43!

Przedstawione powyżej uwagi krytycznie w niczym nie zmniejszają wysokiej merytorycznej oceny pracy doktorskiej. Uważam, że stanowi ona bardzo znaczący wkład w badania nad doskonaleniem metod diagnostyki histopatologicznej nowotworów gruczołu sutkowego psa. Podsumowując, stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia wymogi określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz. U. z 2022 r. poz. 574 ze zm.) i w pełni uzasadnia ubieganie się o stopień naukowy doktora. Przedstawiam zatem jej pozytywną ocenę i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. wet. Joanny Bubak do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

KIEROWNIK KATEDRY

prof. dr hab. Krzysztof Wąsowicz