

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu  
DZIEKANAT WYDZIAŁU  
MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ

04 -09- 2023

I. dz.....zał.....  
znak sprawy: .....

Lublin, 28.08.2023 r.

## Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. wet. Magdaleny Marzec-Owczarek  
pt.: „Ekspresja Foxp3 i endosialiny we włókniakach i włókniakomięsakach tkanek  
miękkich u psów” wykonanej w Zakładzie Patomorfologii i Weterynarii Sądowej  
Katedry Patologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego  
we Wrocławiu

pod kierunkiem promotora prof. dr. hab. Marcina Nowaka  
i promotora pomocniczego dr n. wet. Małgorzaty Kandefere-Goli

Prezentowaną ocenę dysertacji doktorskiej lek. wet. Magdaleny Marzec-Owczarek  
wydaję w związku z uchwałą Rady Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego  
we Wrocławiu podjętą w dniu 27 czerwca 2023 r.

Podstawę ocenianej pracy doktorskiej lek. wet. Magdaleny Marzec-Owczarek  
stanowi cykl dwóch oryginalnych prac naukowych o łącznym IF = 4,812 (pkt. MEiN = 80)  
opublikowanych w języku angielskim w czasopiśmie *In vivo*, znajdującym się w bazie  
Journal Citation Reports. Obydwa artykuły są oryginalnymi pracami wieloautorskimi,  
w których Doktorantka jest pierwszym autorem i dotyczą zagadnienia diagnostyki  
histologicznej i immunohistochemicznej włókniaków i włókniakomięsaków skóry i tkanki  
podskórnej u psów. Do rozprawy dołączone są oświadczenia współautorów, wskazujące  
na wydatny, indywidualny wkład Doktorantki w opracowanie koncepcji prac,  
przygotowanie i zapoznanie się z literaturą, ocenę histopatologiczną materiału, ocenę  
reakcji immunohistochemicznych, analizę uzyskanych wyników oraz przygotowanie  
manuskryptów prac i złożenie do redakcji czasopisma. Spełnione zostały zatem wymogi  
ustawowe odnośnie spójności tematycznej publikacji wchodzących w skład rozprawy  
doktorskiej oraz indywidualnego wkładu kandydata w opracowanie koncepcji, wykonanie  
części eksperymentalnej oraz opracowanie i interpretację wyników.



Rozprawa doktorska została opatrzony spisem treści, w którym uwzględniono wstęp syntetycznie omawiając w nim morfologię, epidemiologię oraz biologię włókniaków i włókniakomięsaków u psów, a także metody ich diagnostyki i oceny histopatologicznej. W dalszej części zwięźle scharakteryzowano metodykę oznaczeń immunohistochemicznych i ich zastosowanie w diagnostyce nowotworów u zwierząt, a także przedstawiono charakterystykę wskaźników immunohistochemicznych: endosialiny, Foxp3, Ki-67, COX-2 i wimentyny, które zostały użyte w przeprowadzonych badaniach. Następnie zamieszczono wykaz aktualnego piśmiennictwa tematycznie związanego z realizowanymi badaniami, oraz określeniem celu i założeń pracy. Wynika z nich, że realizowane badania poświęcone były analizie immunoekspresji endosialiny i Foxp3 we włókniakach i włókniakomięsakach u psów. Ponadto zaplanowano porównanie immunoekspresji wymienionych wskaźników z uznanymi czynnikami rokowniczymi takimi jak: stopień złośliwości histologicznej, nasilenie proliferacji komórkowej i ekspresja COX-2. Do opracowania dołączono streszczenia w języku polskim i angielskim oraz podsumowanie i wnioski.

Wybór tematu pracy doktorskiej należy uznać za trafny i aktualny, za czym przemawiają zarówno dane epidemiologiczne jak i względy praktyczne. Pomimo, że nowotwory tkanek miękkich nie należą u psów do bardzo często występujących to ich dokładna diagnostyka histopatologiczna sprawia niekiedy znaczne trudności, a przebieg kliniczny, agresywność i aktywność biologiczna są często trudne do przewidzenia. Dlatego też intensywnie poszukuje się metod umożliwiających wczesne zdiagnozowanie nowotworu i precyzyjne jego rozpoznanie. Należy podkreślić, że badanie histopatologiczne należy do najważniejszych elementów postępowania diagnostycznego w przypadku podejrzenia nowotworu. Badanie to coraz częściej uzupełniane jest o techniki immunohistochemiczne wykorzystujące przeciwciała mono- i poliklonalne w celu wykrycia i uwidocznienia w rutynowych preparatach histologicznych białek strukturalnych i regulatorowych, których analiza ekspresji dostarcza dodatkowych informacji istotnych dla uściślenia rozpoznania i planowania leczenia. Dlatego też podjęte przez Doktorantkę badania uważam za całkowicie uzasadnione i posiadające obok wartości poznawczej również aspekt praktyczny.

W zakresie pierwszej z oryginalnych publikacji pt.: " Endosialin (CD248) Expression in Fibromas and Soft-tissue Fibrosarcomas in Dogs", która ukazała się w 2021 roku





Doktorantka opisała wyniki oceny histopatologicznej 71 psich guzów skóry i tkanki podskórnej uzupełnionej o immunohistochemiczną ocenę ekspresji endosialiny, której dokonano stosując półilościowy system wg Remmele i Stegner. Wyniki te porównano następnie z ekspresją antygenu Ki-67, cyklooksygenazy 2 i wimentyny. 31 guzów zostało rozpoznanych jako włókniaki (*fibroma*), a 40 jako włókniakomięsaki (*fibrosarcoma*). Ekspresję endosialiny stwierdzono w 82,5% włókniakomięsaków i w 35% włókniaków. Stwierdzono istotną, potwierdzoną analizą statystyczną, dodatnią korelację między ekspresją endosialiny w komórkach nowotworowych włókniakomięsaka, a stopniem złośliwości histologicznej oraz ekspresją antygenu Ki-67 i cyklooksygenazy 2. Ekspresja wimentyny potwierdziła natomiast mezenchymalne pochodzenie tych guzów. Uzyskane wyniki stanowiły podstawę do stwierdzenia, że endosialina bierze udział w kancerogenezie włókniakomięsaka u psów. Ponadto zasugerowano, że ekspresja endosialiny pozostając w zależności z potencjałem proliferacyjnym komórek guzów może brać udział w progresji procesu nowotworowego.

Druga praca pt.: "Expression of Foxp3 in Fibromas and Fibrosarcomas of Skin and Subcutaneous Tissue in Dogs", opublikowana została w 2023 roku i poświęcona jest analizie ekspresji immunohistochemicznej Foxp3 we włókniakach i włókniakomięsakach skóry i tkanki podskórnej u psów. Forkhead box-p3 (Foxp3) jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiadającym za powstawanie limfocytów T regulatorowych. Ponadto jest opisywany jako supresor proliferacji w limfocytach T i komórkach nabłonkowych. Poza jego rolę fizjologiczną, obecność Foxp3 została wykazana w jądrze komórkowym oraz cytoplazmie komórek nowotworowych, a dotychczasowe badania dowodzą, że ekspresja Foxp3 może być związana zarówno z progresją jak i regresją nowotworów. W omawianej pracy Doktorantka na podstawie analizy piśmiennictwa postanowiła ocenić immunoekspresję tego markera we włókniakach i włókniakomięsakach skóry i tkanki podskórnej u psów oraz określić jej związek ze stopniem złośliwości histologicznej nowotworu. Immunoekspresję Foxp3 porównano również z immunoekspresją białka Ki-67 uznawanego za marker proliferacji komórkowej. Cytoplazmatyczną reakcję immunohistochemiczną na obecność białka Foxp3 wykazano jedynie we włókniakomięsakach, a przeprowadzona analiza statystyczna wykazała dodatnią zależność pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej badanych włókniakomięsaków, a intensywnością ekspresji badanego białka. Ponadto wykazano



dotadnią korelację pomiędzy intensywnością ekspresji Foxp3 a Ki-67. W konkluzji wskazano, że wzrastający wraz ze stopniem złośliwości histologicznej nowotworu i aktywnością proliferacyjną poziom immunosupresji Foxp3 może mieć związek z progresją nowotworu.

Przedstawiona powyżej analiza prac wskazuje, że cel postawiony na początku badań został zrealizowany przy zastosowaniu nowoczesnych i czułych technik immunohistochemicznych, właściwie dobranych metod statystycznych i właściwie przeprowadzonej interpretacji wyników. W publikacjach umieszczono czytelne tabele oraz opisane mikrofotografie obrazujące lokalizację i nasilenie reakcji immunohistochemicznych ocenianych wskaźników. W każdej z analizowanych prac cytowane są najnowsze wyniki podobnych badań uzyskane przez innych autorów, w stosunku, do których przeprowadzona została rzetelna merytoryczna dyskusja. Wskazuje to na bardzo dobrą znajomość problematyki będącej przedmiotem dysertacji doktorskiej.

Na podstawie przeprowadzonych badań wysunięto pięć związanych wniosków. Wynika z nich, możliwość zastosowania przeciwciał skierowanych przeciwko Foxp3 i endosialinie w diagnostyce histopatologicznej mięsaków tkanek miękkich u psów, co potwierdzają stwierdzone dodatnie wyniki reakcji immunohistochemicznych i korelacje z innymi uznanymi wskaźnikami diagnostycznymi i prognostycznymi. Z klinicznego i diagnostycznego punktu widzenia najbardziej obiecujący jest wniosek trzeci odnoszący się do ekspresji Foxp3 i wskazujący na potencjalną możliwość wykorzystania tego oznaczenia, jako wskaźnika prognostycznego. Wniosek pierwszy i drugi mogłyby, moim zdaniem, zostać połączone w jeden z uwagi na fakt, że odnoszą się one do stwierdzenia obecności lub braku reakcji immunohistochemicznej tego samego markera w badanym materiale.

Po zapoznaniu się z treścią pracy doktorskiej nasuwają się recenzentowi następujące uwagi.

1. Użyte w przeprowadzonych badaniach immunohistochemicznych przeciwciała są przeciwciałami komercyjnymi skierowanymi przeciwko epitopom antygenowym białek ludzkich. Powstaje zatem pytanie, w jaki sposób potwierdzono ich krosreaktywność w stosunku do wykrywanych białek psa?
2. Jako że w badaniach wykazano dodatnią korelację endosialiny i Foxp3





ze stopniem złośliwości histologicznej włókniakomięsaków nasuwa się refleksja, aby zasugerować Doktorantce podjęcie w przyszłości badań klinicznych uwzględniających np. porównanie czasu remisji i czas przeżycia psów po chirurgicznym usunięciu włókniakomięsaka z ekspresją wymienionych markerów celem oceny ich wartości prognostycznej.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiony do oceny cykl publikacji obejmuje istotne zagadnienia patomorfologii włókniaków i włókniakomięsaków skóry u psów, a uzyskane wyniki obok wartości poznawczej mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w diagnostyce histopatologicznej. Prace opublikowano w czasopiśmie o względnie istotnym wskaźniku wpływu (IF), a przeważający, indywidualny udział pierwszego autora nie budzi wątpliwości. Nie znajduję ponadto istotnych niedociągnięć, tak merytorycznych jak i formalnych w przeprowadzonych badaniach.

Uważam zatem, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska lek. wet. Magdaleny Marzec-Owczarek pod tytułem „Ekspresja Foxp3 i endosialiny we włókniakach i włókniakomięsakach tkanek miękkich u psów” spełnia wymogi i warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art.179 ust.1 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). Ponadto, doceniając nakład pracy poniesiony przy realizacji pracy doktorskiej wnioskuję o wyróżnienie jej stosowną nagrodą.

KIEROWNIK  
Katedry Patomorfologii i Weterynarii Sądowej  
  
dr hab. Wojciech Łopuszyński, prof. uczelni

