

Rada Naukowa Dyscypliny Weterynaria
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
ul. M. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

za pośrednictwem:
Rady Doskonałości Naukowej
pl. Defilad 1
00-901 Warszawa
(Pałac Kultury i Nauki, p. XXIV, pok. 2401)

Mateusz Mikiewicz
Katedra Anatomii Patologicznej,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wniosek

z dnia 14.04.2025 r.

o przeprowadzenie postępowania w sprawie nadania stopnia **doktora**
habilitowanego w dziedzinie Nauk Weterynaryjnych w dyscyplinie Weterynaria.

Określenie osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:
„Rola markerów immunohistochemicznych i mikrośrodowiska zapalnego w biologii kocich włókniakomięsaków poiniekcyjnych”

Wnoszę – na podstawie art. 221 ust. 10 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce – aby komisja habilitacyjna podejmowała uchwałę w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego w głosowaniu ~~tajnym~~/jawnym*¹

Zostałem poinformowany, że:

Administratorem w odniesieniu do danych osobowych pozyskanych w ramach postępowania w sprawie nadania stopnia doktora habilitowanego jest Przewodniczący Rady Doskonałości Naukowej z siedzibą w Warszawie (pl. Defilad 1, XXIV piętro, 00-901 Warszawa).

Kontakt za pośrednictwem e-mail: kancelaria@rdn.gov.pl, tel. 22 656 60 98 lub w siedzibie organu. Dane osobowe będą przetwarzane w oparciu o przesłankę wskazaną w art. 6 ust. 1 lit. c) Rozporządzenia UE 2016/679 z dnia 27 kwietnia 2016 r. w związku z art. 220 - 221 oraz art. 232 – 240 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w celu przeprowadzenie postępowania o nadanie stopnia doktora habilitowanego oraz realizacji praw i obowiązków oraz środków odwoławczych przewidzianych w tym postępowaniu.

Szczegółowa informacja na temat przetwarzania danych osobowych w postępowaniu dostępna jest na stronie www.rdn.gov.pl/kancelaria/ogloszenia/rdn-rada/

Mateusz Mikiewicz

(podpis wnioskodawcy)

Załączniki:

¹ * Niepotrzebne skreślić.

1. Dane wnioskodawcy
2. Kopia Dyplomu Doktorskiego
3. Autoreferat
4. Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny
5. Deklaracje współautorów wskazujące na ich wkład w cykl powiązanych tematycznie artykułów wchodzących w skład osiągnięcia naukowego będącego podstawą ubiegania się o nadanie stopnia doktora habilitowanego
6. Analiza bibliometryczna dorobku naukowego
7. Kopie dokumentów potwierdzających kierownictwo lub udział w grantach
8. Kopie dokumentów potwierdzających staże w jednostkach naukowych
9. Kopie dokumentów potwierdzających otrzymanie nagród naukowych

Autoreferat

dr wet. Mateusz Mikiewicz

Katedra Anatomii Patologicznej

Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Autoreferat

1. Imię i nazwisko

Mateusz Mikiewicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

Tytuł: lekarz weterynarii

Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,
data uzyskania: 17.04.2012 r.

Stopień naukowy: doktor nauk rolniczych w dyscyplinie Weterynaria w zakresie Anatomii Patologicznej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, data uzyskania: 26.06.2019 r.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ deksametazonu i simwastatyny na proliferację i apoptozę komórek wątrobowych u prosiąt”

Promotor: prof. dr hab. Tadeusz Rotkiewicz

Promotor pomocniczy: dr n. wet. Iwona Otrocka-Domagala

Recenzenci pracy doktorskiej: dr hab. Marcin Nowak, prof. nadzw. oraz dr hab. Wojciech Łopuszyński, prof. nadzw.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

1.11.2015 r. -31.12.2019 r.	Asystent w Katedrze Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
1.01.2020 r. - do chwili obecnej	Adiunkt w Katedrze Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1. Osiągnięcie stanowi cykl publikacji powiązanych tematycznie pod wspólnym tytułem:

„Rola markerów immunohistochemicznych i mikrośrodowiska zapalnego w biologii kocich włókniakomięsaków poiniekcyjnych”

Cykl obejmuje trzy oryginalne artykuły naukowe opublikowane w latach 2023-2025 w czasopismach indeksowanych w bazie Journal Citation Reports (JCR). Wartość ważniejszych parametrów bibliometrycznych zgłaszanego osiągnięcia wynoszą:

- Łączna liczba punktów MEiN (według wykazu listy czasopism punktowanych MEiN z dn. **05.01.2024 r.** to 380 pkt).
- Łączny współczynnik oddziaływania [Impact Factor (IF)] na dzień składania wniosku to 7.

4.2. Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu:

4.2.1. **Mateusz Mikiewicz***, Katarzyna Paździor-Czapula, Joanna Fiedorowicz, Michał Gesek, Iwona Otrocka-Domagała. *Metallothionein expression in feline injection site fibrosarcomas*. BMC Vet. Res. 2023;19: 42.

DOI: 10.1186/s12917-023-03604-5

Punktacja MNiSW₂₀₂₃ = 140; IF₂₀₂₃ = 2,3

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na stworzeniu koncepcji oraz metodyki badań, uzyskaniu finansowania z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura 5 (Nr DEC-2021/05/X/NZ4/00037), zebraniu próbek do wykonania badania, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, wykonaniu rycin, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

4.2.2. **Mateusz Mikiewicz***, Katarzyna Paździor-Czapula, Joanna Fiedorowicz, Iwona Otrocka-Domagała. *Expression of programmed cell death protein 1 and programmed cell death ligand 1 in feline injection site fibrosarcomas*. Res. Vet. Sci. 2024;176:105350.

DOI: 10.1016/j.rvsc.2024.105350

Punktacja MNiSW₂₀₂₄ = 100; IF₂₀₂₃ = 2,4

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na stworzeniu koncepcji oraz metodyki badań, uzyskaniu finansowania z Narodowego Centrum Nauki w

ramach konkursu Miniatura 5 (Nr DEC-2021/05/X/NZ4/00037), zebraniu próbek do wykonania badania, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, wykonaniu rycin, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

4.2.3. **Mateusz Mikiewicz***, Iwona Otrocka-Domagała. *Immunohistochemical analysis of smooth muscle actin and CD31 in feline post-injection site fibrosarcomas: association with tumour grade, vascular density, and multinucleated giant cells*. BMC Vet. Res. 2025;21:191.

DOI:10.1186/s12917-025-04637-8

Punktacja MNiSW₂₀₂₄ = 140; IF₂₀₂₄ = 2,3

Mój wkład w powstanie tej publikacji polegał na stworzeniu koncepcji oraz metodyki badań, uzyskaniu finansowania z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura 5 (Nr DEC-2021/05/X/NZ4/00037), zebraniu próbek do wykonania badania, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, wykonaniu rycin, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 95%.

*autor korespondencyjny

Badania w części zostały zrealizowane w ramach projektu badawczego pt. „Charakterystyka wybranych białek prognostycznych i predykcyjnych we włókniakomięsakach poiniekcyjnych u kotów” finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (**kierownik projektu** w ramach projektu Miniatura 5).

4.3. Omówienie osiągnięcia naukowego

4.3.1. Wprowadzenie i cel badań

Mięsak poiniekcyjny jest jednym z mezenchymalnych nowotworów skóry, który może występować u kotów w każdym wieku. Nowotwór ten rozwija się jako pojedynczy guz zlokalizowany w skórze w okolicy szyi, grzbietu oraz kończyn. Charakteryzuje się wzrostem naciekowym, co utrudnia jego całkowite usunięcie i zwiększa prawdopodobieństwo nawrotu w miejscu blizny chirurgicznej. Dodatkowo, mięsak poiniekcyjny wykazuje potencjał metastatyczny. Aktualnie leczeniem z wyboru jest szerokie usunięcie chirurgiczne, wspomagane agresywną chemioterapią i radioterapią.

Pierwsze przypadki mięsaków poiniekcyjnych u kotów były związane ze stosowaniem szczepionek przeciwko wściekliźnie oraz wirusowi białaczki kotów (FeLV) (Hendrick i

Dunagan 1991; Hendrick i Goldschmidt 1991; Kass i in. 1993). Późniejsze obserwacje wykazały, że ich pojawienie się może być rezultatem wcześniejszej iniekcji leków stosowanych w codziennej praktyce weterynaryjnej, reakcjami związanymi z obecnością nici chirurgicznych, implantacją mikroczipów oraz urazami w tym obszarze. Czynniki te prowadzą do indukcji przewlekłego stanu zapalnego, który odgrywa kluczową rolę w patogenezie mięsaka poiniekcyjnego (Esplin i in. 1999; Kass i in. 2003; Carminato i in. 2011; Martano i in. 2011; Munday i in. 2011; Porcellato i in. 2017), jednak mechanizm, w jaki przewlekła reakcja zapalna może prowadzić do powstania nowotworu, nie jest w pełni zrozumiany. Jedną z hipotez zakłada, że zapalenie może prowadzić do produkcji wolnych rodników i szkodliwych metabolitów. Uszkadzają one DNA i działają jako inicjatory kancerogenezy (Hartmann i in. 2023). W związku z tym przewlekły stan zapalny oraz osobnicze predyspozycje genetyczne mogą zwiększyć podatność komórki na uszkodzenie kancerogenne (O'Byrne i Dalgleish 2001). Należy jednak zauważyć, że sam przewlekły stan zapalny prawdopodobnie nie jest wystarczający do wywołania transformacji nowotworowej (Kass i in. 2003; Carminato i in. 2011).

Warto podkreślić, że znaczna część mięsaków poiniekcyjnych wykazuje morfologię włókniakomięsaków (Carneiro i in. 2019; Doddy i in. 1996), jednak opisano również inne typy histologiczne, takie jak kostniakomięsak, chrzęstniakomięsak, mięsak prążkowokomórkowy, mięsak histiocytarny oraz mięsak miofibroblastyczny (Hartmann i in. 2015). Dokładna patogeneza mięsaków poiniekcyjnych kotów pozostaje nie w pełni wyjaśniona, a przeprowadzone w niniejszym opracowaniu badania stanowią próbę pogłębienia wiedzy na temat mechanizmów leżących u podstaw ich rozwoju.

W swoich badaniach oznaczałem metodami immunohistochemicznymi następujące białka: metalotioneinę, białko Ki67, białko receptora programowej śmierci 1 (programmed cell death protein 1; PD-1) oraz jego ligand (programmed cell death ligand 1; PD-L1), CD31, aktyne mięśni gładkich (SMA). Ponadto badałem interakcje między komórkami nowotworowymi, komórkami olbrzymi wielojądrzystymi, mikrośrodowiskiem nowotworowym i procesami angiogenezy.

Metalotioneiny (z najlepiej scharakteryzowanymi izoformami I i II) to grupa małych białek bogatych w cysteinę, odgrywających ważną rolę w homeostazie metali oraz ochronie przed toksycznością metali ciężkich, uszkodzeniami DNA, stresem oksydacyjnym i apoptozą (Si i Lang 2018). Metalotioneiny mają działanie immunomodulacyjne, które polega na zmniejszeniu syntezy cytokin prozapalnych oraz zwiększeniu produkcji cytokin przeciwzapalnych (Pedersen i in. 2009). Powyższe właściwości metalotioneiny czynią ją

interesującym obiektem badań, szczególnie w przypadku nowotworów rozwijających się na tle przewlekłego stanu zapalnego, podrażnienia lub urazu. Ze względu na swoją rolę antyoksydacyjną i cytoprotekcyjną, ekspresja metalotioneiny może wpływać na oporność nowotworów na radioterapię lub chemioterapię (Pedersen i in. 2009; Lynn i in. 2003; Smith i in. 2006; Mairinger i in. 2018). Biorąc pod uwagę powyższy fakt, metalotioneina może być rozpatrywana jako potencjalny czynnik prognostyczny w kontekście leczenia mięsaków poiniekcyjnych kotów, gdzie stosuje się zarówno radioterapię, jak i – w mniejszym stopniu – chemioterapię wspomagającą obok agresywnej chirurgii (Zabielska-Koczywās i in. 2017). Ponadto przewlekły stan zapalny predysponuje do powstania mięsaka poiniekcyjnego, poprzez prawdopodobne zmniejszenie ekspresji metalotioneiny. W przypadku nowotworów gruczołu mlekowego i czerniaków skórnych u kotów, zwiększona ekspresja metalotioneiny była związana z progresją nowotworu (Dincer i in. 2001). Ekspresja metalotioneiny nie była dotychczas badana w kontekście mięsaków poiniekcyjnych kotów.

W diagnostyce i prognozowaniu nowotworów kluczowe znaczenie mają biomarkery umożliwiające ocenę dynamiki rozwoju choroby. Jednym z użytecznych wskaźników prognostycznych jest ekspresja białka Ki67, która wiąże się z proliferacją i wzrostem komórek nowotworowych. W związku z tym, obliczanie indeksu Ki67 może stanowić wartościowy wskaźnik prognostyczny i predykcyjny w ocenie biopsji u pacjentów z nowotworami (Li i in. 2015).

W przypadku mięsaków poiniekcyjnych u kotów, Porcellato i in. (2017) wykazali, że wskaźnik Ki67 nie okazał się predyktywny dla nawrotu choroby ani czasu przeżycia. Dodatkowo stwierdzono brak korelacji między indeksem Ki67 a liczbą figur podziału mitotycznego. Z drugiej strony, badanie przeprowadzone przez Partuno i in. (2021), w którym uwzględniono większą liczbę przypadków mięsaków, ujawniło, że wskaźnik Ki67 był związany ze zwiększoną złośliwością nowotworu. Ponadto we wcześniejszych badaniach zaobserwowano pozytywną, choć słabą korelację między wskaźnikiem Ki67 a ekspresją metalotioneiny w przypadkach włókniakomięsaków tkanek miękkich u psów (Nowak i in. 2007).

PD-1 odgrywa kluczową rolę w tłumieniu odpowiedzi immunologicznej i wspieraniu tolerancji autoimmunologicznej poprzez regulację aktywności limfocytów T. PD-L1 jest białkiem transbłonowym, które może wiązać się z PD-1, prowadząc do zmniejszenia proliferacji komórek PD-1 pozytywnych, co skutkuje hamowaniem wydzielania cytokin i indukcją apoptozy. PD-L1 ma również znaczenie w różnych nowotworach, gdzie osłabia odpowiedź immunologiczną gospodarza na komórki nowotworowe (Han i in. 2020). Ekspresję

PD-1 wykazują aktywowane limfocyty T i B, a także komórki nowotworowe, podczas gdy ekspresja PD-L1 obserwowana jest głównie na powierzchni komórek nowotworowych (Yao i in. 2018). Interakcja między PD-1 a PD-L1 hamuje funkcję limfocytów T i sprzyja unikaniu odpowiedzi immunologicznej przez nowotwór (Joseph i in. 2015; Samstein i in. 2019). Po związaniu z PD-L1, PD-1 hamuje zdolności przeciwnowotworowe limfocytów T i zmniejsza ich reaktywność (Yao i in. 2018). U ludzi ten mechanizm został dopiero niedawno zidentyfikowany i powiązany z rozwojem różnych typów nowotworów (Han i in. 2020). Ekspresja PD-L1 jest skorelowana z niekorzystnym rokowaniem u pacjentów z różnymi typami raka (Patel i Kurzrock 2015; Sznol i Chen 2013; Wu i in. 2006). Ponadto u ludzi udokumentowano potencjalny udział mechanizmu PD-1/PD-L1 w niezróżnicowanym mięsaku pleomorficznym, mięsaku synowialnym, naczyniakomięsaku, mięsaku gładkokomórkowym i mięsaku nabłonkowatokomórkowy (Boxberg i in. 2018; Oike i in. 2018). Należy zaznaczyć, że związek między szlakiem PD-1/PD-L1 a jego rolą w nowotworach u kotów nie jest jeszcze dobrze poznany (Maekawa i in. 2023). Zwiększoną ekspresję białek PD-1/PD-L1 obserwowano w limfocytach kotów zakażonych wirusem niedoboru immunologicznego (Folkl i in. 2010). Ponadto, ekspresję PD-L1 obserwowano w rakach sutka kotów HER2-dodatnich i potrójnie ujemnych (Nascimento i in. 2020).

W przypadku włókniakomięsaków poiniekcyjnych rola PD-1/PD-L1 pozostaje niejasna, dlatego zrozumienie wzorców ekspresji, znaczenia PD-1 oraz PD-L1 może dostarczyć informacji na temat interakcji immunologicznych zachodzących w mikrośrodowisku nowotworowym, potencjalnie umożliwiając opracowanie nowych metod leczenia.

Nowotworowe komórki olbrzymie wielojądrzaste są opisywane w różnych nowotworach, w tym w guzach komórek tucznych psów i kotów (Sabattini i Bettini 2019; de Nardi i in. 2022), mięsakach histiocytarnych (Mullin i Clifford 2019), plazmocytomach (Hughes i in. 2023), mięsakach tkanek miękkich oraz w mięsakach poiniekcyjnych u kotów (Dobromylskyj 2022). Pomimo częstego występowania w zmianach nowotworowych, ich znaczenie kliniczne i biologiczne pozostaje w dużej mierze niezbadane. Jednocześnie w mikrośrodowisku nowotworowym mogą być obecne również zapalne komórki olbrzymie wielojądrzaste. Według jednej z teorii, w warunkach *in vitro*, komórki olbrzymie wielojądrzaste powstają z makrofagów pod wpływem aktywacji przez interleukinę 4 (IL-4) (Wang i Joyce 2010). Jest to istotne, ponieważ środowisko cytokinowe typu Th2 jest często związane ze wzmożoną aktywacją makrofagów, a badania potwierdziły, że makrofagi o fenotypie M2 mogą dawać początek komórkom olbrzymim wielojądrzastym (Miron i Bosshardt 2018).

W mikrośrodowisku nowotworowym komórki olbrzymie wielojądrzaste mogą stanowić komórki senescentne (Bharadwaj i Mandal 2018) lub wykazywać niesenescentny fenotyp immunohistochemiczny CD31+ (Tan i in. 2021). Ponadto ich obecność może być wynikiem przewlekłego stanu zapalnego związanego z nowotworem, podobnie jak obserwuje się to w reakcjach na obecność ciała obcego (Al-Maawi i in. 2021). Zakłada się, że komórki olbrzymie wielojądrzaste powstają w odpowiedzi na przewlekłe działanie czynnika drażniącego (Ahmadzadeh i in. 2022). Jednak komórki olbrzymie wielojądrzaste nie są skuteczne w eliminacji komórek nowotworowych. Obecnie uważa się wręcz, że mogą one sprzyjać progresji nowotworu (Rosai 1990; Jösten i Rudolph 1997; Gulubova i Ivanova 2019). Badania nad rakiem brodawkowatym tarczycy u ludzi wykazały, że obecność komórek olbrzymich wielojądrzastych była związana z bardziej zaawansowanym stadium choroby nowotworowej, co powiązano z ich udziałem w progresji nowotworu (Gulubova i Ivanova 2019).

Komórki olbrzymie wielojądrzaste mogą być obecne również w miększu nowotworu, jednak ich obecność nie stanowi bezpośredniego mechanizmu obrony immunologicznej przeciwko nowotworowi. Zamiast tego odzwierciedlają one złożone interakcje między nowotworem a układem odpornościowym. Mogą reprezentować odpowiedź na przewlekły stan zapalny lub stanowić element mikrośrodowiska nowotworowego, a nie aktywny mechanizm przeciwnowotworowy (Gulubova i Ivanova 2019; Ahmadzadeh i in. 2022). Ostatnie badania dotyczące nowotworów u ludzi wykazały, że komórki olbrzymie wielojądrzaste są metabolicznie aktywne i mogą przyczyniać się do heterogenności nowotworu oraz oporności na terapię (Mirzayans i in. 2018).

Angiogeneza jest kluczowym procesem w regeneracji tkanek, ale może również zachodzić w warunkach patologicznych, takich jak wzrost nowotworu (Barnett i in. 2016). Proces ten jest inicjowany przez czynniki wzrostu lub niski poziom tlenu, które aktywują czynniki indukowane przez hipoksję (HIF) (Lv i in. 2017). W trakcie angiogenezy spoczynkowe komórki śródbłónka naczyń krwionośnych zostają pobudzone do proliferacji, modyfikacji macierzy zewnątrzkomórkowej, migracji oraz różnicowania w celu utworzenia nowych naczyń pod wpływem sygnałów angiogennych (Potente i in. 2011). W nowotworach litych sieć naczyniowa składa się zarówno z naczyń wyściełanych śródbłonkiem, jak i z mikrokrażenia nieendotelialnego. Ta ostatnia forma nazywana jest mimikrą naczyniową i uważa się, że wynika z różnicowania nowotworowych komórek macierzystych w komórki przypominające śródbłonek (Kim et al. 2019).

Wciąż nie jest jasne, jakie znaczenie ma ekspresja markerów immunohistochemicznych, takich jak SMA i CD31, w mięsakach poiniekcyjnych kotów. Lepsze zrozumienie ich wzorców

ekspresji oraz ich związku ze stopniem złośliwości nowotworu, gęstością naczyń krwionośnych i obecnością komórek olbrzymich wielojądrzastych może dostarczyć cennych informacji na temat mechanizmów progresji i agresywności tych nowotworów.

Włókniakomięsaki poiniekcyjne mogą stanowić istotny problem kliniczny biorąc pod uwagę fakt, że większość kotów miała wykonywane procedury medyczne sprzyjające rozwojowi tego nowotworu (iniekcje leków, szczepienia ochronne, reakcje związane z obecnością nici chirurgicznych, implantacje mikroczipów). Dodatkowo nowotwór jest inwazyjny, ma wysoką tendencję do nawrotów i dostępne metody leczenia mają ograniczoną skuteczność. Wiedza na temat jego biologii, mechanizmów progresji oraz interakcji z mikrośrodowiskiem nowotworowym pozostaje fragmentaryczna i niepełna.

W dostępnej literaturze występują skąpe doniesienia na temat ekspresji markerów takich jak metalotioneiny, PD-1, PD-L1 oraz Ki67 w odniesieniu do włókniakomięsaka poiniekcyjnego kotów. Znaczenie tych markerów w kontekście biologii nowotworu, a także ich potencjalna wartość diagnostyczna i prognostyczna, nie zostały dotychczas jednoznacznie określone. Również udział komórek olbrzymich wielojądrzastych oraz procesów angiogenezy w kształtowaniu mikrośrodowiska tych nowotworów pozostaje niewyjaśniony, pomimo przesłanek wskazujących na ich możliwy wpływ na stopień złośliwości, tempo progresji oraz oporność nowotworu na stosowane metody leczenia.

Przeprowadzone przeze mnie badania starają się wypełnić lukę w wiedzy, dostarczając nowych danych na temat ekspresji kluczowych markerów oraz cech mikrośrodowiska zapalnego i naczyniowego we włókniakomięsakach poiniekcyjnych kotów. Znaczenie moich badań ma przede wszystkim charakter poznawczy – pozwala przybliżyć się do zrozumienia mechanizmów biologicznych leżących u podstaw rozwoju i progresji tych nowotworów. Uzyskane przeze mnie wyniki prawdopodobnie mogą mieć znaczenie praktyczne, zwłaszcza w kontekście identyfikacji czynników prognostycznych, które w przyszłości mogą stanowić podstawę do bardziej precyzyjnej stratyfikacji ryzyka, personalizacji strategii terapeutycznych oraz inicjowania nowych kierunków leczenia, w tym podejść opartych na immunoterapii. Tym samym badania te odpowiadają na konkretne braki w literaturze, uzupełniają wiedzę z zakresu patologii nowotworów zwierząt towarzyszących oraz mogą mieć przełożenie na praktykę kliniczną i dalsze badania translacyjne.

Podsumowując celem niniejszych badań było:

1. Poszerzenie wiedzy na temat roli wybranych markerów immunohistochemicznych (metalotioneiny I-II, Ki67, PD-1, PD-L1, CD31, SMA) oraz komponentów mikrośrodowiska zapalnego w biologii

włókniakomięsaków poiniekcyjnych kotów, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów warunkujących ich agresywność oraz zdolność do angiogenezy.

2. Ustalenie, czy ekspresja białek PD-1 i PD-L1 oraz obecność komórek olbrzymich wielojądrzastych może być powiązana z immunosupresją i mechanizmami unikania nadzoru immunologicznego przez komórki nowotworowe, co może stanowić punkt wyjścia do rozwoju nowych strategii immunoterapeutycznych w leczeniu mięsaków poiniekcyjnych u kotów.
3. Porównanie i ocena związku ekspresji wybranych markerów immunohistochemicznych, morfologii nowotworu, stopnia złośliwości, gęstości naczyń oraz obecności komórek olbrzymich wielojądrzastych w kontekście identyfikacji cech prognostycznych i potencjalnych celów terapeutycznych w mięsakach poiniekcyjnych kotów.

Poszczególne zadania badawcze obejmowały:

1. Ocenę ekspresji wybranych markerów i białek o znaczeniu prognostycznym metodą immunohistochemiczną we włókniakomięsakach poiniekcyjnych kotów oraz określenie ich potencjalnej roli w mikrośrodowisku nowotworu i procesach angiogenezy.
 - a) Ocena ekspresji izoform metalotioneiny I-II.
 - b) Ocena ekspresji białka Ki67.
 - c) Ocena ekspresji białek PD-1 i PD-L1.
 - d) Ocena ekspresji SMA.
 - e) Ocena ekspresji CD31.
2. Analizę morfologii włókniakomięsaków poiniekcyjnych kotów.
 - a) Histologiczna ocena stopnia złośliwości nowotworu na podstawie zaproponowanych kryteriów klasyfikacji mięsaków tkanek miękkich u kotów.
 - b) Analiza związku między stopniem złośliwości nowotworu, gęstością naczyń krwionośnych a obecnością komórek olbrzymich wielojądrzastych.

Powyższe cele zostały zrealizowane za pomocą:

- ❖ analizy histologicznej i określenia stopnia złośliwości włókniakomięsaków poiniekcyjnych kotów;
- ❖ barwienia immunohistochemicznego z użyciem następujących przeciwciał: anty-metalotioneina, anty-Ki67, anty-PD-1, anty-PD-L1, anty-CD31, anty-SMA;
- ❖ analizy wzajemnych korelacji pomiędzy ekspresją wybranych białek a histologicznymi cechami złośliwości według zaproponowanych kryteriów klasyfikacji mięsaków tkanek miękkich u kotów.

4.3.2. Materiały i metody

4.3.2.1. Ocena ekspresji izoform metalotioneiny I-II, białka Ki67 w komórkach nowotworowych oraz histologiczna ocena stopnia złośliwości nowotworu na podstawie zaproponowanego kryterium klasyfikacji mięsaków tkanek miękkich u kotów.

W doświadczeniu wykorzystano 40 wycinków tkankowych kocich włókniakomięsaków poinekcyjnych zarchiwizowanych w Laboratorium Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Wszystkie wycinki tkankowe zostały utrwalone w 10% zbuforowanej formalinie, poddane standardowej obróbce histopatologicznej, zatopione w bloczki parafinowe, pocięte na skrawki grubości ok. 1 μm , zabarwione hematoksyliną i eozyną (HE). Kryterium włączenia była lokalizacja ogniska nowotworowego oraz kryteria morfologiczne nowotworów zaproponowane przez Doddy i in. (1996) oraz Dean i in. (2013). Histologicznie nowotwory zostały podzielone na pierwszy, drugi, trzeci stopień złośliwości histologicznej dzięki wykorzystaniu klasyfikacji histologicznej opracowanej przez Dobromylskij i in. (Dobromylskij i in. 2021) dla mięsaków tkanek miękkich u kotów. Zmiany nowotworowe pochodziły z następujących okolic ciała: okolicy międzyłopatkowej (50%; 20/40 przypadków), okolicy udowej (12,5%; 5/40 przypadków), okolicy boku ciała (12,5%; 5/40 przypadków), okolicy łędźwiowej (10%; 4/40 przypadków), okolicy ramiennej (10%; 4/40 przypadków) i grzbietowej okolicy szyi (5%; 2/40 przypadków). Liczbę komórek zapalnych sklasyfikowano jako 1 (brak lub nieliczne komórki zapalne, rozproszone w mięszu guza), 2 (gdy komórki zapalne były liczniejsze, tworząc wyraźne ogniska w mięszu guza), 3 (gdy komórki zapalne były liczne i tworzyły duże ogniska). Zakres martwicy sklasyfikowano jako 0 (brak martwicy w guzie), 1 (obszar martwicy do 50% mięszu guza) i 2 (obszar martwicy obejmujący ponad 50% mięszu guza). Liczbę figur podziału mitotycznego sklasyfikowano następująco: 1 (0-9 figur podziału mitotycznego w 2.37 mm^2), 2 (10-19 figur podziału mitotycznego w 2.37 mm^2), 3 (>19 figur podziału mitotycznego w 2.37 mm^2).

Barwienie immunohistochemiczne

Skrawki tkankowe do badania immunohistochemicznego zostały umieszczone na szkiełkach podstawowych o podwyższonej adhezyjności. Odzyskiwanie antygenu przeprowadzono metodą indukcji cieplnej wykonanej w buforze Tris-EDTA o pH 9,0 (EnVision™ Flex Target Retrieval Solution High pH, DAKO, Glostrup, Dania) przez 20 minut w temperaturze 96 °C, z użyciem modułu PT-Link (Dako, Glostrup, Dania). Badanie immunohistochemiczne każdego guza przeprowadzono przy użyciu przeciwciał pierwotnych:

Ki67 (przeciwciało monoklonalne mysie przeciwko ludzkiemu, klon MIB-1, rozcieńczenie 1:75, czas inkubacji: 30 minut w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej; Dako, Glostrup, Dania) oraz metalotioneina (przeciwciało monoklonalne mysie przeciwko metalotioneinom I-II, klon UC1MT, rozcieńczenie 1:1000, czas inkubacji: 60 minut w komorze wilgotnej w temperaturze 60 °C; Abcam, Cambridge, Wielka Brytania) oraz systemu wizualizacyjnego opartego na metodzie immunoperoksydazy z 3,3'-diaminobenzylanem (DAB) jako substratem (EnVision + System-HRP, Mouse, Dako, Glostrup, Dania). Szkiełka barwiono kontrastowo przy użyciu hematoksyliny Mayera. Pozytywne i negatywne próbki kontrolne były barwione jednocześnie z próbkami badanymi (kontrola pozytywna dla metalotioneiny – gruczoł sutkowy kota, kontrola pozytywna dla Ki67 – skóra kota). Ocena wybarwionych preparatów dokonywana była z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego (BX63, Olympus, Tokyo, Japonia) z użyciem oprogramowania CellSense (Olympus, Tokyo, Japonia).

Ocena ekspresji Ki67

Ekspresję Ki67 oceniano w 10 polach widzenia przy powiększeniu $\times 400$, w obszarach o największej liczbie komórek barwionych (tzw. hot-spots), z wyłączeniem obszarów objętych stanem zapalnym i martwicą. Indeks Ki67 wyrażono jako procent komórek dodatnich, obliczając stosunek liczby komórek nowotworowych wykazujących dodatnią reakcję immunohistochemiczną do ogólnej liczby komórek nowotworowych obserwowanych w analizowanych polach mikroskopowych, zgodnie z metodą opisaną przez Patruno i in. (2020). Obliczono średnie wartości (z odchyleniem standardowym) dla nowotworów o I, II oraz III stopniu złośliwości.

Ocena ekspresji metalotioneiny

Ekspresję metalotioneiny oceniano w 10 losowo wybranych polach widzenia przy powiększeniu $\times 400$, stosując skalę semikwantywną, uwzględniającą intensywność barwienia immunohistochemicznego (0: brak; 1: słabe; 2: umiarkowane; 3: silne) oraz procent komórek nowotworowych wykazujących reakcję immunopozytywną (1: $< 10\%$; 2: 10–50%; 3: 51–80%; 4: $> 80\%$). Wynik ekspresji metalotioneiny obliczono jako iloczyn punktacji przyznanej za poszczególne cechy i przyjmował wartości od 0 do 12 (Remmele i Stegner 1987; Surowiak i in. 2005; Nowak i in. 2007; Mikiewicz i in. 2016). Obliczono wartości średnie (z odchyleniem standardowym) dla nowotworów o I, II oraz III stopniu złośliwości.

Analiza statystyczna

Wszystkie zmienne poddano weryfikacji normalności rozkładu za pomocą testu Shapiro–Wilka. Różnice w indeksie Ki67 oraz ekspresji metalotioneiny pomiędzy grupami o I,

II i III stopniach złośliwości analizowano za pomocą testu Kruskala–Wallisa, a następnie przeprowadzano test post-hoc Dunn’a. Korelacje pomiędzy stopniem złośliwości guza, stopniem zapalenia, stopniem martwicy, indeksem Ki67 oraz ekspresją metalotioniny badano przy użyciu współczynnika korelacji rang Spearmana. Różnice uznawano za istotne statystycznie, gdy $p < 0,05$, natomiast wysoce istotne, gdy $p < 0,001$. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 14 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

4.3.2.2. Ocena ekspresji białek PD-1 i PD-L1 w komórkach nowotworowych, w nacieku zapalnym oraz histologiczna ocena stopnia złośliwości nowotworu na podstawie zaproponowanego kryterium klasyfikacji mięsaków tkanek miękkich u kotów.

W doświadczeniu wykorzystano 31 wycinków tkankowych kocich włókniakomięsaków poinekcyjnych zarchiwizowanych w Laboratorium Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Wszystkie wycinki tkankowe zostały utrwalone w 10% zbuforowanej formalinie, poddane standardowej obróbce histopatologicznej, zatopione w bloczki parafinowe, pocięte na skrawki grubości ok. 1 μm , zabarwione hematoksyliną i eozyną (HE). Kryterium włączenia były cechy morfologiczne opisane przez Doddy i in. (1996), Dean i in. (2013) oraz Mikiewicz i in. (2023) a także lokalizacja zmiany nowotworowej. Wycinki tkankowe pochodziły z następujących miejsc: okolica międzypłatowa (45 %; 14/31 przypadków), okolica udowa (13 %; 4/31 przypadków), okolica boku ciała (16 %; 5/31 przypadków), okolica łędzwiowa (6,5 %; 2/31 przypadków), okolica barkowa (6,5 %; 2/31 przypadków) oraz grzbietowa część karku (13 %; 4/31 przypadków). Histologicznie nowotwory zostały podzielone na I, III, III stopień złośliwości histologicznej dzięki wykorzystaniu klasyfikacji histologicznej opracowanej przez Dobromylskyj i in. (2021) dla mięsaków tkanek miękkich u kotów opisaną przez Mikiewicza i in. (2023).

Barwienie immunohistochemiczne

Skrawki tkankowe do badania immunohistochemicznego zostały umieszczone na szkiełkach podstawowych o podwyższonej adhezji. Odzyskiwanie antygenu przeprowadzono metodą indukcji cieplnej wykonanej w buforze Tris–EDTA o pH 9,0 (EnVision™ Flex Target Retrieval Solution High pH, DAKO, Glostrup, Dania) przez 20 minut w temperaturze 96 °C, z użyciem modułu PT-Link (Dako, Glostrup, Dania). Badanie immunohistochemiczne każdego guza wykonano z zastosowaniem przeciwciał pierwotnych: PD-1 (przeciwciało monoklonalne mysie przeciwko PD-1, klon J166, rozcieńczenie 1:25, czas inkubacji: cała noc w komorze wilgotnej w temperaturze 4 °C; Abcam, Cambridge, Wielka

Brytania) oraz PD-L1 (przeciwciało monoklonalne królicze przeciwko PD-L1, klon 28-8, rozcieńczenie 1:100, czas inkubacji: cała noc w komorze wilgotnej w temperaturze 4 °C; Abcam, Cambridge, Wielka Brytania) oraz systemu wizualizacyjnego opartego na metodzie immunoperoksydazy z 3,3'-diaminobenzynydanem (DAB) jako substratem (dla PD-1: EnVision + System-HRP, Anti-Mouse, Dako, Glostrup, Dania; dla PD-L1: EnVision + System-HRP, Anti-Rabbit, Dako, Glostrup, Dania). Wcześniejsze badanie wykazało, że przeciwciało monoklonalne anti-PD-1, klon J116, reaguje krzyżowo z kocim PD-1 (Nascimento i in. 2020). Ponadto zaobserwowano reaktywność krzyżową przeciwciała monoklonalnego anti-PD-L1, klon 28-8, wobec kociego PD-L1 (Nishibori i in. 2023). Szkiełka barwiono kontrastowo hematoksyliną Mayera. Pozytywne i negatywne próbki kontrolne barwiono równolegle z próbkami badanymi (kontrola pozytywna dla PD-1 i PD-L1 – migdałek kota). Ocena wybarwionych preparatów dokonywana była z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego (BX63, Olympus, Tokyo, Japonia) z użyciem oprogramowania CellSense (Olympus, Tokyo, Japonia).

Ocena ekspresji PD-1 i PD-L1 w komórkach nowotworowych oraz w komórkach nacieku zapalnego

Ekspresję PD-1 i PD-L1 oceniano w komórkach nowotworowych w 4 polach widzenia przy powiększeniu $\times 400$, z pominięciem obszarów martwicy. W przypadku PD-1 i PD-L1 zastosowano skalę semikwantywną, która uwzględniała intensywność barwienia immunohistochemicznego (0: brak; 1: słabe do umiarkowanego; 2: silne) oraz procent immunopozytywnych komórek nowotworowych (0: brak komórek dodatnich; 1: poniżej 10 %; 2: 10–50 %; 3: powyżej 50 %). Procent dodatnich komórek oraz wyniki dotyczące intensywności barwienia mnożono, uzyskując ostateczny wynik barwienia immunohistochemicznego (Kim i in. 2016). Dodatkowo, ekspresję PD-1 oceniano w limfocytach naciekających guz, które identyfikowano na podstawie oceny morfologicznej. Skala ocen obejmowała procent immunopozytywnych limfocytów (0: brak komórek dodatnich; 1: poniżej 10 %; 2: 10–50 %; 3: powyżej 50 %) (Brockhoff i in. 2018). Wskaźnik obliczono jako stosunek liczby komórek dodatnich do całkowitej liczby komórek. Komórkę uznawano za dodatnią, jeśli występowało u niej przynajmniej słabe, częściowo błonowe zabarwienie.

Analiza statystyczna

Wszystkie zmienne poddano weryfikacji normalności rozkładu za pomocą testu Shapiro–Wilka. Różnice w ekspresji PD-1 i PD-L1 pomiędzy grupami o I, II i III stopniu złośliwości oraz wynikiem oceny zapalenia analizowano przy użyciu testu Kruskala–Wallisa z zastosowaniem testu post hoc Dunn’a. Korelacje pomiędzy stopniem złośliwości guza,

stopniem zapalenia, liczbą limfocytów PD-1 dodatnich naciekających nowotwór, ekspresją PD-1 i PD-L1 oceniano za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana. Różnice uznawano za istotne statystycznie, gdy $p < 0,05$, natomiast wysoce istotne, gdy $p < 0,001$. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 14 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

4.3.2.3. Ocena ekspresji SMA, CD31, liczby naczyń krwionośnych, komórek olbrzymich wielojądrzastych oraz histologiczna ocena stopnia złośliwości nowotworu na podstawie zaproponowanego kryterium klasyfikacji mięsaków tkanek miękkich u kotów.

W doświadczeniu wykorzystano 61 wycinków tkankowych kocich włókniakomięsaków poinekcyjnych zarchiwizowanych w Laboratorium Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Wszystkie wycinki tkankowe zostały utrwalone w 10% zbuforowanej formalinie, poddane standardowej obróbce histopatologicznej, zatopione w bloczki parafinowe, pocięte na skrawki grubości ok. 1 μm , zabarwione hematoksyliną i eozyną (HE). Kryterium włączenia były cechy morfologiczne opisane przez Doddy i in. (1996), Dean i in. (2013) oraz Mikiewicz i in. (2023) a także lokalizacja zmiany nowotworowej. Wycinki tkankowe pochodziły z następujących miejsc: bok ciała (34.4%; 21/61 przypadków), okolica międzyłatkowa (26.2% 16/61 przypadków), okolica łędźwiowa (18%; 11/61 przypadków), okolica uda (11.5%; 7/61 przypadków), dobrzuszna strona szyi (8.2%; 5/61 przypadków), okolica ramienia (1.6%; 1/61 przypadek). Histologicznie nowotwory zostały podzielone na pierwszy, drugi, trzeci stopień złośliwości histologicznej dzięki wykorzystaniu klasyfikacji histologicznej opracowanej przez Dobromylskyj i in. (2021) dla mięsaków tkanek miękkich u kotów opisanej przez Mikiewicza i in. (2023).

Barwienie immunohistochemiczne

Skrawki tkankowe do badania immunohistochemicznego zostały umieszczone na szkiełkach podstawowych o podwyższonej adhezyjności. Odsłanianie antygenów indukowane ciepłem przeprowadzono w buforze Tris-EDTA o pH 9,0 (EnVision™ Flex Target Retrieval Solution High pH, DAKO, Glostrup, Dania) przez 20 minut w temperaturze 96°C, wykorzystując moduł PT-Link (Dako, Glostrup, Dania). Badanie immunohistochemiczne każdego nowotworu przeprowadzono z użyciem przeciwciał pierwszorzędowych: α -SMA (monoklonalne przeciwciało mysie anti-ludzkie, klon 1A4, rozcieńczenie 1:50, czas inkubacji: 30 minut w komorze wilgotnej w temperaturze pokojowej; Dako, Glostrup, Dania) oraz CD31 (monoklonalne przeciwciało mysie anti-ludzkie, klon JC70A, rozcieńczenie 1:20, czas

inkubacji: przez noc w komorze wilgotnej w temperaturze 4°C; Dako, Glostrup, Dania). Wykorzystano system wizualizacji oparty na metodzie immunoperoksydazowej, z 3,3-diaminobenzydyną (DAB) jako substratem (EnVision + System-HRP, Mouse, Dako, Glostrup, Dania). Preparaty zostały kontrastowo wybarwione hematoksyliną Mayera. Kontrole pozytywne i negatywne zostały barwione równocześnie z analizowanymi preparatami. W kontroli negatywnej przeciwciała pierwszorzędowe zastąpiono mysim IgG dobranym pod względem izotypu (Dako) w odpowiednim rozcieńczeniu. W kontroli pozytywnej zastosowano prawidłowe tkanki przetworzone w sposób analogiczny do badanych preparatów (dla α -SMA i CD31 – jelito kota). Brązowy osad w miejscu obecności antygeny uznawano za reakcję pozytywną. Preparaty oceniano pod mikroskopem świetlnym (BX63, Olympus, Tokio, Japonia) z wykorzystaniem oprogramowania CellSense (Olympus, Tokio, Japonia).

Ocena gęstości naczyń krwionośnych

Dla każdego nowotworu obszary o największej gęstości naczyń zostały wybrane pod małym powiększeniem ($\times 100$). Następnie liczba naczyń została określona w obszarze 2,37 mm² przy powiększeniu $\times 400$. Każda komórka śródbłonna lub skupisko komórek śródbłonna wykazujące dodatnią reakcję immunohistochemiczną (CD31+), które były wyraźnie oddzielone od sąsiednich mikronaczyń, komórek nowotworowych i otaczającej tkanki łącznej, były uznawane za pojedyncze, policzalne naczynie. Obecność światła naczynia nie była warunkiem koniecznym do identyfikacji mikronaczynia, podobnie jak obecność erytrocytów w świetle naczynia nie była uznawana za kryterium definicyjne. Obliczono wartości średnie (z odchyleniem standardowym) dla grup o I, II i III stopniu złośliwości.

Ocena liczby komórek olbrzymich wielojądrzastych

Obszary o największej gęstości komórek olbrzymich wielojądrzastych w miększu nowotworu zostały wybrane dla każdego stopnia złośliwości pod małym powiększeniem ($\times 100$). Następnie liczba tych komórek została określona w obszarze 2,37 mm² przy powiększeniu $\times 400$. Obliczono wartości średnie (z odchyleniem standardowym) dla grup o I, II i III stopniu złośliwości.

Analiza statystyczna

Różnice w gęstości naczyń krwionośnych oraz liczbie komórek olbrzymich wielojądrzastych w grupach o I, II i III stopniu złośliwości analizowano za pomocą testu Kruskala-Wallis H (jednoczynnikowa ANOVA na rangach), a następnie testu post-hoc Dunna. Korelacje między stopniem złośliwości nowotworu, liczbą komórek olbrzymich wielojądrzastych, gęstością naczyń oraz indeksem mitotycznym oceniano za pomocą współczynnika korelacji rang Spearmana (r: współczynnik korelacji rang Spearmana). Wartość

$p \leq 0,05$ uznawano za istotną statystycznie, natomiast $p \leq 0,001$ za wysoce istotną. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Statistica 14 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

4.3.3. Wyniki

4.3.3.1. Ocena ekspresji izoform metalotioneiny I-II. białka Ki67 w komórkach nowotworowych oraz histologiczna ocena stopnia złośliwości nowotworu na podstawie zaproponowanego kryterium klasyfikacji mięsaków tkanek miękkich u kotów

Na podstawie przedstawionych cech morfologicznych guzy nowotworowe sklasyfikowano jako: I stopnia (5/40; 12,5 %), II stopnia (15/40; 37,5 %), III stopnia (20/40; 50%) złośliwości histologicznej. W guzach I stopnia martwica była albo nieobecna albo obejmowała mniej niż 50 % miąższu guza. Nacieki zapalne były nieobecne lub niewielkie. W guzach II stopnia martwica występowała jedynie w 40 % przypadków, a nacieki zapalne miały charakter zmienny. W guzach III stopnia martwica występowała we wszystkich przypadkach, przy czym w większości obejmowała ponad 50 % miąższu guza. Nacieki zapalne były masywne w 75 % przypadków. Średni indeks Ki67 wynosił $6,64 \pm 3,31$ w guzach I stopnia, $15,25 \pm 5,36$ w guzach II stopnia oraz $38,4 \pm 14,4$ w guzach III stopnia. Analiza statystyczna wykazała, że indeks Ki67 był statystycznie istotnie wyższy w guzach III stopnia w porównaniu do guzów II stopnia ($p = 0,000$) oraz w porównaniu do guzów I stopnia ($p = 0,000$). Dodatkowo, indeks Ki67 był dodatnio skorelowany ze stopniem złośliwości guza ($r = 0,853$; $p = 0,000$), stanem zapalnym ($r = 0,452$; $p = 0,003$) oraz obecnością martwicy ($r = 0,37$; $p = 0,018$).

Zaobserwowano cytoplazmatyczną, a czasami także jądrową ekspresję metalotioneiny we wszystkich guzach I stopnia (100 %), w 10 guzach II stopnia (66,67 %) oraz w 11 guzach III stopnia (55 %). Średni wskaźnik ekspresji metalotioneiny wynosił odpowiednio $6,2 \pm 3,03$, $1,87 \pm 2,1$ oraz $1,65 \pm 2,18$ dla guzów I, II oraz III stopnia. Analiza statystyczna wykazała, że ekspresja metalotioneiny była statystycznie istotnie wyższa w guzach I stopnia w porównaniu do guzów II stopnia ($p = 0,04$) oraz do guzów III stopnia ($p = 0,012$). Ponadto ekspresja metalotioneiny była ujemnie skorelowana ze stopniem złośliwości guza ($r = -0,356$; $p = 0,024$) oraz nasileniem stanu zapalnego ($r = -0,713$; $p = 0,000$). Nie stwierdzono korelacji pomiędzy ekspresją metalotioneiny a obecnością martwicy ($r = 0,014$; $p = 0,9$).

Wyniki przeprowadzonych badań omówiono w publikacji 4.2.1.:

Mateusz Mikiewicz, Katarzyna Paździor-Czapula, Joanna Fiedorowicz, Michał Gesek, Iwona Otrrocka-Domagała. *Metallothionein expression in feline injection site fibrosarcomas*. BMC Veterinary Research 2023; 19: 42.

4.3.3.2. Ocena ekspresji białek PD-1 i PD-L1 w komórkach nowotworowych, w nacieku zapalnym oraz histologiczna ocena stopnia złośliwości nowotworu na podstawie zaproponowanego kryterium klasyfikacji mięsaków tkanek miękkich u kotów

Na podstawie przedstawionych cech morfologicznych guzy nowotworowe sklasyfikowano jako: I stopnia (3/31; 10%), II stopnia (13/31; 42%), III stopnia (15/31; 48%) złośliwości histologicznej. Błonową ekspresję PD-1 zaobserwowano w 84 % przypadków i obejmowała ona dwa guzy I stopnia (66,7 %), 10 guzów II stopnia (76,9 %) oraz 14 guzów III stopnia (93,3 %). Najsilniejsza ekspresja PD-1 obecna była w 5 przypadkach guzów III stopnia (16,1 %). Ekspresję PD-1 stwierdzono również w limfocytach naciekających miąższ nowotworu w 22 przypadkach (71 %) i obejmowała ona 2 guzy I stopnia (66,7 %), 7 guzów II stopnia (53,8 %) oraz 13 guzów III stopnia (86,7 %).

Analiza statystyczna wykazała, że ekspresja PD-1 w komórkach nowotworowych była wyższa w guzach III stopnia w porównaniu do guzów II stopnia ($p=0,025$) oraz była dodatnio skorelowana ze stopniem złośliwości guza ($r=0,52$; $p=0,003$). Ponadto ekspresja PD-1 w komórkach nowotworowych była dodatnio skorelowana z obecnością stanu zapalnego ($r=0,53$; $p=0,002$). Najniższy średni poziom ekspresji PD-1 w komórkach nowotworowych zaobserwowano w przypadkach o niewielkim zapaleniu (wynik 1), natomiast najwyższy poziom ekspresji stwierdzono w guzach z najbardziej nasilonym procesem zapalnym (wynik 3). Różnice te były statystycznie istotne ($p=0,047$). Dodatkowo, zaobserwowano dodatnią korelację między liczbą PD-1-dodatnich limfocytów naciekających miąższ nowotworu a stopniem złośliwości guza ($r=0,4$; $p=0,028$), stopniem nasilenia procesu zapalnego ($r=0,75$; $p=0,000$), ekspresją PD-1 w komórkach nowotworowych ($r=0,81$; $p=0,000$) oraz ekspresją PD-L1 w komórkach nowotworowych ($r=0,82$; $p=0,000$).

Błonową ekspresję PD-L1 zaobserwowano w 81 % przypadków i obejmowała ona 2 guzy I stopnia (66,7 %), 9 guzów II stopnia (69,2 %) oraz 14 guzów III stopnia (93,3 %). Najwyższy poziom ekspresji PD-L1 w komórkach nowotworowych zaobserwowano w 9 przypadkach (29 %), z czego 8 guzów było III stopnia, a 1 guz został histologicznie sklasyfikowany jako II stopień złośliwości.

Ekspresja PD-L1 w komórkach nowotworowych była wyższa w guzach III stopnia w porównaniu do guzów II stopnia ($p=0,03$) oraz była dodatnio skorelowana ze stopniem złośliwości guza ($r=0,5$; $p=0,004$). Podobnie jak w przypadku PD-1, ekspresja PD-L1 w komórkach nowotworowych była dodatnio skorelowana z nasileniem procesu zapalnego ($r=0,81$; $p=0,000$). Analiza statystyczna ponadto wykazała, że najniższy średni poziom

ekspresji PD-L1 w komórkach nowotworowych zaobserwowano w przypadkach o najniższym nasileniu procesu zapalnego (wynik 1), natomiast najwyższy poziom ekspresji stwierdzono w guzach z najbardziej nasilonym procesem zapalnym (wynik 3). Różnice te były statystycznie istotne – między przypadkami o najbardziej nasilonym procesie zapalnym (wynik 3) a najniższym nasileniu procesu zapalnego ($p=0,001$; wynik 1) oraz między przypadkami o umiarkowanym (wynik 2) a najniższym nasileniu procesu zapalnego ($p=0,002$; wynik 1).

Wyniki przeprowadzonych badań omówiono w publikacji 4.2.2.:

Mateusz Mikiewicz, Katarzyna Paździor-Czapula, Joanna Fiedorowicz, Iwona Otrocka-Domagała. *Expression of programmed cell death protein 1 and programmed cell death ligand 1 in feline injection site fibrosarcomas*. Research in Veterinary Science 2024; 176: 105350.

4.3.3.3. Ocena ekspresji SMA, CD31, liczby naczyń krwionośnych, komórek olbrzymich wielojądrzastych oraz histologiczna ocena stopnia złośliwości nowotworu na podstawie zaproponowanego kryterium klasyfikacji mięsaków tkanek miękkich u kotów

Na podstawie przedstawionych cech morfologicznych guzy nowotworowe sklasyfikowano jako: I stopnia (6/61; 9,8%), II stopnia (24/61; 39,3%), III stopnia (31/61; 50,8%) złośliwości histologicznej. We wszystkich przypadkach nowotwory były słabo odgraniczone, zlokalizowane w skórze właściwej i tkance podskórnej. Komórki nowotworowe miały wrzecionowaty lub poligonalny kształt, wykazywały wyraźną anizocytozę i anizokariozę z obecnością makronukleozy, a w mięszu nowotworu obecne były rozproszone komórki olbrzymie wielojądrzaste. Liczba figur podziału mitotycznego była zmienna. W większości przypadków w obrębie guza obserwowano obszary martwicze o różnym nasileniu. We wszystkich nowotworach stwierdzono nacieki limfocytów i plazmocytoz o różnym stopniu nasilenia, głównie w okolicy okołonaczyniowej, a także rozproszone nacieki makrofagów w mięszu guza.

Cytoplazmatyczną ekspresję SMA w komórkach nowotworowych wykryto w 93,44% przypadków. Obecność SMA stwierdzono w 6 guzach I stopnia (10,53%), 22 guzach II stopnia (38,6%) oraz 29 guzach III stopnia (50,88%). Brak ekspresji SMA odnotowano w 4 przypadkach, w tym w 2 guzach II stopnia (3,28%) oraz 2 guzach III stopnia (3,28%).

Cytoplazmatyczną ekspresję CD31 w komórkach olbrzymich wielojądrzastych wykazano w 39 guzach (63,93%). CD31-dodatnie komórki olbrzymie wielojądrzaste stwierdzono w 2 guzach I stopnia (5,13%), 14 guzach II stopnia (35,9%) oraz 23 guzach III stopnia (58,97%). Średnia liczba komórek olbrzymich wielojądrzastych różniła się w zależności od stopnia złośliwości nowotworu: w guzach I stopnia wynosiła 8 ± 5 komórek, w II

stopnia 15 ± 17 komórek, a w III stopnia 23 ± 14 komórek. Analiza statystyczna wykazała wyższą liczbę komórek olbrzymich wielojądrzastych w guzach III stopnia w porównaniu do II stopnia ($p=0,004$) i I stopnia ($p=0,017$) złośliwości histologicznej. Ponadto wykazano dodatnią korelację między obecnością komórek olbrzymich wielojądrzastych a stopniem złośliwości nowotworu ($r=0,49$; $p=0,000$). Dodatkowo liczba komórek olbrzymich wielojądrzastych różniła się między wartością indeksu mitotycznego (1 vs. 3 $p=0,022$; 2 vs. 3 $p=0,02$). Ponadto pomiędzy tymi parametrami zaobserwowano dodatnią korelację ($r=0,441$; $p=0,000$).

Średnia gęstość naczyń krwionośnych wynosiła 21 ± 7 w guzach I stopnia, 29 ± 11 w II stopnia oraz 17 ± 6 w III stopnia złośliwości. Analiza porównawcza wykazała, że gęstość naczyń była wyższa w guzach II stopnia w porównaniu do guzów III stopnia ($p=0,000$). Stwierdzono również ujemną korelację między gęstością naczyń a stopniem złośliwości nowotworu ($r=-0,444$; $p=0,000$). Liczba naczyń krwionośnych była najwyższa w guzach z nieobecną martwicą. Istotną różnicę statystyczną wykazano między brakiem martwicy a martwicą obejmującą ponad 50% miąższu guza ($p=0,005$). Ponadto stwierdzono ujemną korelację pomiędzy gęstością naczyń krwionośnych a obecnością martwicy ($r=-0,411$; $p=0,001$). Zaobserwowano również ujemną korelację między liczbą komórek olbrzymich wielojądrzastych a gęstością naczyń ($r=-0,262$; $p=0,042$).

Wyniki przeprowadzonych badań omówiono w publikacji 4.2.3.:

Mateusz Mikiewicz, Iwona Otrocka-Domagala. *Immunohistochemical analysis of smooth muscle actin and CD31 in feline post-injection site fibrosarcomas: association with tumour grade, vascular density, and multinucleated giant cells*. BMC Veterinary Research 2025; 21: 191.

4.3.4. Dyskusja

Wyniki przeprowadzonych badań na włókniakomięsakach poiniekcyjnych u kotów dowiodły, że guzy nowotworowe wykazują ekspresję metalotioneiny przy czym ekspresja ta była ujemnie skorelowana z nasileniem stanu zapalnego oraz stopniem złośliwości guza. Wcześniejsze badania wykazały, że metalotioneina posiada właściwości immunomodulacyjne, hamując odpowiedź humoralną zależną od limfocytów T (Canpolat i in. 2001) oraz hamując funkcję limfocytów T cytotoksycznych (Youn i Lynes 1999). Przewlekły stan zapalny stanowi kluczowy element patogenezы włókniakomięsaków poiniekcyjnych. Wolne rodniki powstające w wyniku utrzymującego się stanu zapalnego powodują uszkodzenia DNA (Woodward 2011). Co więcej, stopień nacieku zapalnego jest jednym z trzech parametrów niedawno zaproponowanego systemu stopniowania mięsaków tkanek miękkich kotów (Dobromylskyj i in. 2021). Dlatego ujemna korelacja pomiędzy ekspresją metalotioneiny a nasileniem nacieku

zapalnego (oraz stopniem złośliwości guza) we włókniakomięsakach poiniekcyjnych wskazuje, że obniżenie ekspresji metalotionieny może być związane z progresją nowotworu. Obniżenie ekspresji metalotionieny zaobserwowano również w kilku nowotworach u ludzi, tj. w raku wątroby, jelita grubego oraz prostaty (Datta i in. 2007; Wei i in. 2008; Yan i in. 2012). W przypadku raka jelita grubego u ludzi obniżenie ekspresji jednej z izoform metalotionieny (MT1F) było wynikiem utraty heterozygotyczności (Yan i in. 2012). Ponieważ metalotioneina chroni komórki przed stresem oksydacyjnym, obniżenie ekspresji metalotionieny może wiązać się ze zwiększonym ryzykiem uszkodzenia DNA i zmian mutagennych, odpowiedzialnych za karcynogenezę (Dincer i in. 2001; Takahashi 2015), co jest również bardzo prawdopodobne w kocich włókniakomięsakach poiniekcyjnych. Natomiast, w niektórych ludzkich mięsakach tkanek miękkich zaobserwowano dodatnią korelację między ekspresją metalotionieny a stopniem złośliwości guza (Dziegiel i in. 2005). Podwyższona ekspresja metalotionieny umożliwia komórkom nowotworowym unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza (Youn i Lynes 1999). Ponadto, jako że metalotioneina odpowiada za oporność na radioterapię (Takahashi 2015), można przypuszczać, że włókniakomięsaki poiniekcyjne u kotów o I stopniu złośliwości histologicznej mogłyby być bardziej odporne na radioterapię (w porównaniu do stopni II i III). Choć ekspresja metalotionieny była głównie cytoplazmatyczna, zaobserwowano również ekspresję jądrową w niektórych komórkach nowotworowych. Jądrowa lokalizacja metalotionieny jest tymczasowo obserwowana podczas proliferacji komórek i wczesnego różnicowania; białko to chroni DNA przed stresem oksydacyjnym i apoptozą (Cherian i Apostolova 2000). Ponadto wcześniejsze badania wykazały, że jądrowa ekspresja metalotionieny była związana z opornością na cisplatynę w leczeniu raka jajnika (Surowiak i in. 2007).

Indeks Ki67 jest związany z proliferacją, wzrostem, progresją nowotworów i jest powszechnie stosowanym markerem prognostycznym zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej jako marker prognostyczny (Inwald i in. 2013; Klöppel i La Rosa 2018; Sierra Matiz i in. 2018; Patruno i in. 2020; Travaglino i in. 2021). Wysoki indeks Ki67 wiąże się z gorszym rokowaniem w nowotworach u ludzi i zwierząt, np. w guzach sutka u ludzi i kotów oraz w ludzkich mięsakach tkanek miękkich (Sorbye i in. 2012; Inwald i in. 2013; Soares i in. 2016). W przeprowadzonej analizie stwierdzono, że indeks Ki67 był dodatnio skorelowany ze stopniem złośliwości guza. Ponadto, stwierdzono dodatnią korelację między indeksem Ki67 a stopniem nasilenia procesu zapalnego w mięszu nowotworu. We wcześniejszym badaniu raka jelita grubego u psów indeks Ki67 był dodatnio skorelowany z liczbą makrofagów i komórek tucznych związanych z guzem (Woldemeskel i in. 2017). Sugeruje się, że komórki zapalne

mają wpływ na rozwój nowotworu poprzez zwiększenie zdolności inwazyjnej, angiogenezy oraz zdolności komórek nowotworowych do migracji (Coussens i Werb 2002). W raku piersi u ludzi stan zapalny jest ściśle związany z proliferacją i progresją guza. Taka korelacja może odzwierciedlać aktywną odpowiedź immunologiczną na słabe różnicowanie komórek nowotworowych lub być konsekwencją zwiększonej sekrecji cytokin przez guzy wysokiego stopnia złośliwości (Murri i in. 2008). Związek pomiędzy naciekiem zapalnym a indeksem Ki67 (oraz stopniem złośliwości guza) we włókniakomięsach poiniekcyjnych u kotów sugeruje, że stan zapalny odgrywa istotną rolę nie tylko w patogenezie, ale także w progresji guza. Dodatkowo zaobserwowano dodatnią korelację między indeksem Ki67 a obecnością martwicy mięszu nowotworu. Nie jest to zaskakujące, ponieważ martwica mięszu nowotworu jest konsekwencją niedokrwienia spowodowanego szybkim jego wzrostem (Caruso i in. 2014). Ponadto, martwe komórki wydzielają czynniki zwiększające proliferację komórek nowotworowych (Yee i Li 2021). W raku piersi u ludzi stopień martwicy mięszu nowotworu odzwierciedla wyższą aktywność metaboliczną i szybszy wzrost, co skutkuje wyższym indeksem Ki67 w guzach z rozległymi obszarami martwicy (Bahaddin 2021).

Immunohistochemiczną ekspresję PD-1 stwierdzono w 84% przypadków, przy czym najwyższy poziom ekspresji odnotowano w nowotworach III stopnia. Ekspresja PD-1 była dodatnio skorelowana ze stopniem złośliwości nowotworu oraz stopniem nasilenia procesu zapalnego, co wskazuje na potencjalny związek z agresywnością guza. Podobnie, ekspresję PD-L1 wykrytą w 81% przypadków, również skorelowano dodatnio ze stopniem złośliwości i intensywnością nacieku zapalnego.

Wysoka częstość ekspresji błonowej PD-1 w badanych przypadkach włókniakomięsaka poiniekcyjnego wskazuje na istotną rolę szlaku PD-1 w procesie nowotworzenia. PD-1 jest kluczowym regulatorem funkcji limfocytów T i odgrywa istotną rolę w tłumieniu odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom nowotworowym. W wyniku tego procesu dochodzi do unikania odpowiedzi immunologicznej i rozwoju nowotworu u ludzi (Han i in. 2020). Zablokowanie PD-1 lub PD-L1 promuje proliferację komórek nowotworowych i ich zdolność do tworzenia kolonii in vitro oraz wzrost guza in vivo, podczas gdy nadekspresja PD-1 lub PD-L1 hamuje proliferację komórek nowotworowych. Ponadto, współdziałanie PD-1 i PD-L1 aktywuje główne szlaki sygnalizacyjne, w tym szlaki AKT i ERK1/2, co prowadzi do nasilonego wzrostu komórek nowotworowych (Wang i in. 2020). Ostatnie badania wykazały, że ekspresja PD-1 w komórkach czerniaka, raka wątrobowokomórkowego i niedrobnokomórkowego raka płuc, wpływa na wzrost guza niezależnie od odporności swoistej (Kleffel i in. 2015; Li i in. 2017; Du i in. 2018). W czerniaku i raku wątrobowokomórkowym

aktywacja PD-1 promowała wzrost guza poprzez szlak kinazy ssaczego celu rapamycyny (mammalian target of rapamycin; mTOR), a jego blokada wykazała skuteczność terapeutyczną (Kleffel i in. 2015; Li i in. 2017), natomiast w niedrobnokomórkowym raku płuc blokada PD-1 prowadziła do proliferacji nowotworu (Du i in. 2018). Powyższe wyniki sugerują, że funkcja PD-1 w komórkach nowotworowych może znacznie różnić się w zależności od typu nowotworu.

Zaobserwowana korelacja między ekspresją PD-1 a stopniem złośliwości nowotworu przyczynia się do pogłębienia wiedzy na temat biologii włókniakomięsaków poiniekcyjnych. Podwyższona ekspresja PD-1 w włókniakomięsakach poiniekcyjnych u kotów o III stopniu złośliwości jest zgodna z wcześniejszymi badaniami w różnych typach nowotworów, gdzie wysoki poziom PD-1 był związany z zaawansowanymi stadiami choroby i gorszym rokowaniem (McDermott i Atkins 2013; Oike i in. 2018; Samstein i in. 2019). W kontekście włókniakomięsaków poiniekcyjnych u kotów korelacja ta może sugerować potencjalną wartość prognostyczną PD-1 jako biomarkera agresywności guza.

Ponadto badanie wykazało dodatnią korelację między ekspresją PD-1 a nasileniem procesu zapalnego. Ta zależność sugeruje interakcję między przewlekłym stanem zapalnym a aktywacją PD-1 w rozwoju włókniakomięsaków poiniekcyjnych u kotów. Przewlekły stan zapalny od dawna jest uznawany za czynnik sprzyjający nowotworzeniu w różnych typach nowotworów (Coussens i Werb 2002; Murri i in. 2008; Sorbye i in. 2012). Powyższe wyniki dostarczają dodatkowych dowodów na już wcześniej ustalone powiązanie między przewlekłym stanem zapalnym a rozwojem włókniakomięsaków poiniekcyjnych u kotów (Hendrick i Dunagan 1991; Dean i in. 2013; Hartmann i in. 2015; Porcellato i in. 2017). Możliwe, że długotrwałe zapalenie w miejscu iniekcji sprzyja aktywacji punktów kontrolnych układu odpornościowego, potencjalnie tworząc korzystne warunki dla wzrostu nowotworu i unikania odpowiedzi immunologicznej. Mikrośrodowisko nowotworów charakteryzuje się hipoksją, niskim pH oraz wysokim ciśnieniem płynu śródmiąższowego, co może zmniejszać skuteczność terapii przeciwnowotworowych, w tym immunoterapii (Fukumura i in. 2018).

Pozytywna korelacja pomiędzy obecnością limfocytów naciekających miąższ guza wykazujących ekspresję PD-1 a różnymi badanymi parametrami podkreśla złożone interakcje między markerami odpowiedzi immunologicznej a mikrośrodowiskiem nowotworowym. Wysoka ekspresja PD-1 w limfocytach naciekających miąższ guza III stopnia może sugerować, że PD-1 jest związany z agresywnością nowotworu (Kim i in. 2013). Z kolei korelacja z nasileniem stanu zapalnego sugeruje potencjalny związek pomiędzy obecnością PD-1-dodatnich limfocytów naciekających miąższ guza a odpowiedzią immunologiczną na obecność

nowotworu. W niedawnym badaniu nad mięsakami tkanek miękkich u ludzi wykazano, że pacjenci z obecnością PD-1 pozytywnych limfocytów naciekających mięsz nowotworu mieli wydłużony czas przeżycia bez progresji choroby oraz ogólny czas przeżycia po leczeniu przeciwciałami monoklonalnymi ukierunkowanymi na oś sygnałową PD-1/PD-L1 (Bevins i in. 2022).

Ekspresję PD-1/PD-L1 w komórkach nowotworowych i limfocytach naciekających mięsz guza badano w różnych typach nowotworów (Boxberg i in. 2018; Han i in. 2020). Aktywacja PD-1 i PD-L1 prowadzi do wyczerpania limfocytów T, przyczyniając się do unikania odpowiedzi immunologicznej (Patel i Kurzrock 2015; Teng i in. 2015; Spranger 2016). Wcześniejsze badania wykazały ścisły związek między ekspresją PD-L1/PD-1 a populacjami limfocytów T. W niezróżnicowanym mięśniakomięsaku pleomorficznym ekspresja PD-L1 w komórkach nowotworowych była istotnie wyższa w przypadkach z obecnością PD-L1-pozytywnych limfocytów naciekających mięsz guza, a zarówno ekspresja PD-L1 w komórkach nowotworowych, jak i w limfocytach naciekających mięsz nowotworu, była skorelowana z intensywnością nacieku limfocytarnego (Boxberg i in. 2018).

Ponadto, badania dotyczące różnych nowotworów u ludzi podkreślają kluczową rolę ekspresji PD-L1 jako predyktora odpowiedzi na immunoterapie ukierunkowane na oś PD-1/PD-L1 (Joseph i in. 2015; Samstein i in. 2019). Ekspresję PD-L1 wykazano również w raku płaskonabłonkowym, gruczolakoraku gruczołu mlekowego, raku przejściowokomórkowym oraz naczyniakomięsaku u psów (Maekawa i in. 2014; Maekawa i in. 2016; Shosu i in. 2016; Kumar i in. 2017; Maekawa i in. 2021; Gulay i in. 2022).

W medycynie weterynaryjnej leczenie z wykorzystaniem przeciwciał anty-PD-1/PD-L1 okazało się skuteczne u bydła zakażonego wirusem białaczki bydła, mykoplazmozą oraz chorobą Johnego (Nishimori i in. 2017; Okagawa i in. 2017; Shinya i in. 2020; Sajiki i in. 2021). Ponadto u psów z rozpoznaniem czerniakiem złośliwym oraz niezróżnicowanym mięsakiem terapia oparta na przeciwciałach anty-PD-L1 wykazała skuteczność w hamowaniu progresji nowotworu (Maekawa i in. 2017; Maekawa i in. 2021).

Ze względu na podobieństwo mechanizmów nowotworzenia oraz funkcjonowania układu odpornościowego u różnych gatunków ssaków, postuluje się, że blokada punktów kontrolnych układu immunologicznego może stanowić skuteczną strategię terapeutyczną również w leczeniu nowotworów kotów, w tym włókniakomięsaka poiniekeyjnego (Maekawa i in. 2023).

Dodatnia korelacja między ekspresją PD-L1, stopniem złośliwości nowotworu oraz nasileniem stanu zapalnego sugeruje potencjalną ścieżkę interwencji immunoterapeutycznej.

Najwyższa ekspresja PD-L1 w guzach III stopnia dodatkowo wspiera hipotezę o nasilonym mechanizmie unikania odpowiedzi immunologicznej w wysoko złośliwych postaciach włókniakomięsaka poiniekcyjnego, co jest zgodne z podobnymi obserwacjami w mięsach tkanek miękkich u ludzi (Boxberg i in. 2018). Zwiększona ekspresja PD-L1 może oznaczać adaptacyjną reakcję nowotworu mającą na celu uniknięcie nadzoru immunologicznego, co sprzyja dalszemu wzrostowi i progresji choroby.

W badaniu nad złożonością włókniakomięsaków poiniekcyjnych zaobserwowano istotną korelację pomiędzy obecnością komórek olbrzymich wielojądrzastych, stopniem złośliwości nowotworu oraz indeksem mitotycznym. Ponadto, w zdecydowanej większości analizowanych przypadków stwierdzono dodatnią ekspresję SMA w komórkach nowotworowych, co jest zgodne z wcześniejszymi badaniami, które również wykazywały częstą ekspresję tego markera w włókniakomięsach poiniekcyjnych u kotów (Hendrick i Brooks 1994; Munday i in. 2011).

Obecność komórek olbrzymich wielojądrzastych w różnych stopniach złośliwości nowotworu, ze znaczną przewagą w nowotworach III stopnia może sugerować potencjalny związek między ich obecnością a agresywnością nowotworu. Wyższa liczba komórek olbrzymich wielojądrzastych w bardziej złośliwych guzach (stopień III) jest zgodna z wcześniejszymi badaniami, które sugerowały, że komórki olbrzymie wielojądrzaste mogą przyczyniać się do progresji nowotworu (Weihua i in. 2011; Zhang i in. 2015; Hasegawa i in. 2017; Shu i in. 2018). W ludzkim brodawkowatym raku tarczycy obecność komórek olbrzymich wielojądrzastych była związana z zaawansowanymi stadiami choroby (Gulubova i Ivanova 2019), co wspiera hipotezę, że komórki olbrzymie wielojądrzaste mogą sprzyjać środowisku pro-nowotworowemu (Kloc i in. 2022; Krotofil i in. 2024). Obecność komórek olbrzymich wielojądrzastych może korelować z wyższym stopniem złośliwości nowotworu, co może wynikać z ich immunosupresyjnych właściwości. Zjawisko to jest typowe dla zaawansowanych stadiów choroby nowotworowej, w których komórki te odgrywają rolę w kształtowaniu środowiska guza w kierunku Th2, sprzyjającej progresji nowotworu i ucieczce przed nadzorem immunologicznym (Anderson i in. 1999; Kim i Cho 2022; Hild i in. 2023). Co więcej, zaobserwowano istotne powiązanie pomiędzy obecnością komórek olbrzymich wielojądrzastych a indeksem mitotycznym komórek nowotworowych, co dodatkowo wzmacnia potencjalny ich związek z agresywnym zachowaniem nowotworu.

Identyfikacja CD31-dodatnich komórek olbrzymich wielojądrzastych szczególnie w zmianach o wyższym stopniu złośliwości, sugeruje złożoną relację pomiędzy procesem unaczynienia a mikrośrodowiskiem immunologicznym w włókniakomięsach poiniekcyjnych

u kotów. CD31 jest dobrze znanym markerem śródbłonkowym, szeroko stosowanym do oceny charakterystyki naczyniowej nowotworów (Guo i in. 2022). Ekspresja CD31 w komórkach olbrzymich wielojądrzastych może wskazywać na nietypową formę unaczynienia (Jennings i in. 2012; Barnett i in. 2016).

Opisywane zjawisko jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami dotyczącymi mimikry naczyniowej, w której komórki nieendotelialne nabywają cechy komórek śródbłonka (Kim i in. 2019; Krotofil i in. 2024). Ekspresja CD31 w komórkach olbrzymich wielojądrzastych może stanowić adaptacyjną odpowiedź mikrośrodowiska nowotworu wspierającą jego przeżycie i progresję w warunkach hipoksji. Związek między gęstością naczyń a stopniem złośliwości nowotworu ujawnia również złożoność profilu naczyniowego włókniakomięsaków poiniekcyjnych u kotów. Wyniki te sugerują, że nowotwory o wysokim stopniu złośliwości mogą przechodzić na alternatywne mechanizmy pozyskiwania składników odżywczych, takie jak mimikra naczyniowa. Zwiększona obecność CD31-dodatnich komórek olbrzymich wielojądrzastych w guzach III stopnia złośliwości histologicznej sugeruje, że komórki te mogą brać udział w tworzeniu takich nieklasycznych kanałów naczyniowych, ułatwiając progresję i przeżycie nowotworu w warunkach hipoksji, charakterystycznej dla tych agresywnych nowotworów.

Adaptacja do hipoksji może być regulowana przez czynnik HIF-1, który odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi komórkowej na niski poziom tlenu. W warunkach niedoboru tlenu HIF-1 działa jako główny regulator, promując transkrypcję licznych genów zaangażowanych w angiogenezę, przeprogramowanie metaboliczne oraz przeżycie komórkowe, co jest fundamentalne dla rozwoju i progresji nowotworów (Semenza 2003; Semenza 2012). Hipoksja może nie tylko stymulować tworzenie komórek olbrzymich wielojądrzastych, ale także indukować ich fenotypową zmianę, umożliwiając nabycie cech śródbłonkowych i przyczyniając się do powstawania nieklasycznych naczyń krwionośnych (Maniotis i in. 1999). Ta zmiana jest zgodna z koncepcją mimikry naczyniowej, w której komórki nowotworowe lub komórki z nimi związane nabywają cech komórek śródbłonka, umożliwiając tworzenie alternatywnych sieci naczyniowych niezależnych od klasycznej angiogenezy (Hendrix i in. 2003).

W powyższym badaniu włókniakomięsaki poiniecyjne wykazywały paradoksalnie niższą konwencjonalną gęstość naczyń krwionośnych, jednocześnie cechując się istotnie wyższą liczbą komórek olbrzymich wielojądrzastych. Obniżona gęstość naczyń w nowotworach o wysokim stopniu złośliwości może wskazywać na przejście na alternatywne mechanizmy pozyskiwania składników odżywczych, takie jak mimikra naczyniowa.

Dodatkowo redukcja gęstości naczyń krwionośnych w nowotworach wysokiego stopnia złośliwości może być skutkiem rozległej martwicy oraz wtórnego zaniku prawidłowego unaczynienia. Takie warunki mogą dodatkowo stymulować mechanizmy kompensacyjne, prowadząc do rekrutacji lub powstawania komórek olbrzymich wielojądrzastych. Komórki te mogą następnie uczestniczyć w procesie mimikry naczyniowej, umożliwiając nowotworowi ominięcie ograniczeń wynikających z upośledzonej angiogenezy (Hendrix i in. 2003). Zaobserwowana negatywna korelacja podkreśla adaptacyjne strategie, jakie nowotwory mogą wykorzystywać w warunkach stresu hipoksyjnego, oraz wskazuje na potencjalną rolę komórek olbrzymich wielojądrzastych w alternatywnych mechanizmach unaczynienia.

W nowotworach ludzkich mimikra naczyniowa była skorelowana z wysokim stopniem złośliwości guza, inwazją komórek nowotworowych, ich zdolnością do tworzenia przerzutów oraz gorszym rokowaniem (Delgado-Bellido i in. 2023). Odwrotna zależność między gęstością naczyń a stopniem zaawansowania guza może sugerować dynamiczny proces przebudowy naczyniowej, w którym nowotwory w miarę progresji zmniejszają zależność od klasycznej angiogenezy, przechodząc na alternatywne metody unaczynienia. Obserwacja ta jest zgodna z doniesieniami dotyczącymi innych nowotworów, w których obniżona gęstość naczyń krwionośnych współwystępuje ze zwiększoną martwicą i nasilonym niedotlenieniem w guzach o wyższym stopniu złośliwości (Lugano i in. 2020). Podwyższone poziomy białka HIF-1 α , często obserwowane w nowotworach hipoksyjnych lub wynikające ze zmian genetycznych, korelują z gorszym rokowaniem pacjentów w różnych typach nowotworów (Keith i in. 2011; Chen i in. 2023). Uzyskane wyniki nie tylko podkreślają plastyczność mikrośrodowiska nowotworu, ale także wskazują na potencjalną rolę komórek olbrzymich wielojądrzastych w umożliwianiu przeżycia nowotworu w warunkach niewystarczającej angiogenezy. Jest to szczególnie istotne, ponieważ powstawanie komórek olbrzymich wielojądrzastych w nowotworach jest indukowane przez czynniki stresowe, takie jak hipoksja, chemioterapia, radioterapia, produkcja reaktywnych form tlenu, infekcje wirusowe i inne czynniki (Liu i in. 2022; Zhou i in. 2022; Krotofil i in. 2024). Chociaż dokładny mechanizm prowadzący do powstania komórek olbrzymich wielojądrzastych pozostaje niejasny, inne badania wskazują na ścieżki molekularne analogiczne do tych, które biorą udział w procesie mimikry naczyniowej (Saini i in. 2022; Liu i in. 2024). Kluczowe procesy związane z powstawaniem komórek olbrzymich wielojądrzastych obejmują aktywację szlaku białka HIF-1 oraz uszkodzenia DNA (Liu i in. 2022; Saini 2022; Zhou i in. 2022).

Ponadto, związek gęstości naczyń ze wskaźnikiem martwicy dodatkowo wzmacnia korelację między zmniejszonym unaczynieniem a progresją nowotworu. Nowotwory o

wysokim wskaźniku martwicy wykazują wyraźnie nasilone środowisko hipoksyjne, co zostało wcześniej odnotowane w różnych typach nowotworów złośliwych (Nordsmark i Overgaard 2004; Chen i in. 2023).

Zaobserwowana dodatnia korelacja między obecnością komórek olbrzymich wielojądrzastych a indeksem mitotycznym komórek nowotworowych wspiera hipotezę, że komórki olbrzymie wielojądrzaste mogą przyczyniać się do tworzenia środowiska sprzyjającego proliferacji komórkowej. Przypuszcza się, że komórki olbrzymie wielojądrzaste mogą wydzielać różne cytokiny i czynniki wzrostu, takie jak interleukina-6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- α) oraz czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowego (VEGF), które mogą modulować mikrośrodowisko guza i stymulować szlaki sygnalizacyjne związane z proliferacją. Takie prozapalne środowisko może nie tylko zwiększać zdolność proliferacyjną komórek nowotworowych, ale także ułatwiać dalszą progresję guza oraz jego inwazyjność (Coussens i Werb 2002). Zaobserwowane powiązanie może wynikać z przewlekłego stanu zapalnego, które stymuluje zarówno rekrutację komórek układu odpornościowego, jak i proliferację komórek nowotworowych, co przyczynia się do wzrostu guza i zwiększenia jego heterogenności (Ahmadzadeh i in. 2022). Dodatkowo, korelacja między obecnością komórek olbrzymich wielojądrzastych a stopniem złośliwości nowotworu jest zgodna z hipotezą, według której komórki olbrzymie wielojądrzaste nie tylko stanowią wskaźnik zaawansowania nowotworu, ale mogą również aktywnie przyczyniać się do jego progresji. Może się to odbywać poprzez modulację mikrośrodowiska zapalnego lub zwiększanie oporności nowotworu na eliminację immunologiczną (Krotofil i in. 2024).

4.3.5. Podsumowanie i wnioski

Badania mające na celu analizę złożoności włókniakomięsaków poiniekcyjnych u kotów mają znacznie poznawcze, zarówno w kontekście naukowym, jak i klinicznym. Wyniki przeprowadzonych badań poszerzają wiedzę na temat interakcji mikrośrodowiska nowotworowego z komórkami nowotworowymi. Uzyskane wyniki podkreślają znaczenie procesów zapalnych, ekspresji metalotioneiny, PD-1 i PD-L1. Dodatkowo wykazano, że nowotwory o wyższym stopniu złośliwości charakteryzują się obniżoną konwencjonalną gęstością naczyń krwionośnych oraz zwiększoną obecnością komórek olbrzymich wielojądrzastych CD31+.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano następujące wnioski:

1. Ekspresja metalotioneiny jest negatywnie skorelowana ze stopniem złośliwości nowotworu, co sugeruje jej potencjalną rolę w progresji nowotworu.

2. Ekspresja metalotioniny jest odwrotnie skorelowana z procesem zapalnym, co wskazuje na możliwy związek między jej obniżeniem a przewlekłym stanem zapalnym we włókniakomięsakach pniekcyjnych.
3. Wskaźnik Ki67 był istotnie wyższy w guzach III stopnia złośliwości histologicznej w porównaniu do guzów o niższym stopniu, co koreluje ze zwiększoną agresywnością nowotworu.
4. Wyższy poziom nacieku zapalnego w obrębie nowotworu był związany ze zwiększoną ekspresją Ki67, co sugeruje, że stan zapalny może przyczyniać się do proliferacji nowotworowej.
5. Obniżenie ekspresji metalotioniny może sprzyjać progresji nowotworu oraz jego zdolności do unikania odpowiedzi immunologicznej.
6. Ekspresja metalotioniny jest powiązana z opornością na chemioterapię i radioterapię w nowotworach, jej poziom ekspresji może wpływać na odpowiedź terapeutyczną w przypadku włókniakomięsaków pniekcyjnych.
7. Dodatnia korelacja między wskaźnikiem Ki67 a stopniem martwicy sugeruje, że martwica nowotworowa jest związana z szybkim wzrostem guza oraz stresem metabolicznym.
8. Zaobserwowana korelacja między poziomem metalotioniny, stanem zapalnym i stopniem zaawansowania nowotworu może wskazywać na potencjalną przydatność metalotioniny jako biomarkera we włókniakomięsakach pniekcyjnych.
9. PD-1 i PD-L1 wykazują wysoką ekspresję w włókniakomięsakach pniekcyjnych, co sugeruje ich potencjalną rolę w progresji nowotworu oraz mechanizmach unikania odpowiedzi immunologicznej.
10. Włókniakomięsaki pniekcyjne o wyższym stopniu złośliwości wykazują zwiększoną ekspresję PD-1 i PD-L1, co wskazuje na ich udział w agresywności guza.
11. Ekspresja PD-1 i PD-L1 korelowała z wyższym stopniem nacieku zapalnego, co sugeruje, że przewlekły stan zapalny może przyczyniać się do modulacji odpowiedzi immunologicznej nowotworu.
12. Ekspresja PD-1 w limfocytach naciekających miąższ nowotworu sugeruje, że aktywacja punktów kontrolnych układu odpornościowego odgrywa rolę w immunosupresji nowotworu.
13. Wysoka ekspresja PD-1/PD-L1 sugeruje, że blokada punktów kontrolnych układu odpornościowego może stanowić skuteczną strategię leczenia włókniakomięsaków pniekcyjnych.

14. Ekspresja PD-1/PD-L1 może stanowić biomarker progresji i rokowania włókniakomięsaków poiniekcyjnych.
15. Komórki olbrzymie wielojądrzaste CD31+ częściej obecne były w nowotworach o wysokim stopniu złośliwości, co sugeruje ich udział w progresji nowotworu.
16. Liczba komórek olbrzymich wielojądrzastych była wyższa w nowotworach III stopnia złośliwości histologicznej w porównaniu do guzów o niższym stopniu złośliwości, co wskazuje na ich możliwy wpływ na agresywność nowotworu.
17. Gęstość naczyń krwionośnych zmniejsza się wraz ze wzrostem stopnia złośliwości nowotworu, co sugeruje, że wysoko złośliwe nowotwory mogą wykorzystywać alternatywne mechanizmy unaczynienia.
18. Nowotwory z większą liczbą komórek olbrzymich wielojądrzastych wykazywały niższą gęstość naczyń, co sugeruje, że komórki olbrzymie wielojądrzaste mogą uczestniczyć w zjawisku mimikry naczyniowej jako alternatywnym mechanizmie unaczynienia guza.
19. Obecność komórek olbrzymich wielojądrzastych w nowotworach z rozległymi obszarami martwicy sugeruje, że mogą one przyczyniać się do adaptacji guza do warunków niedotlenienia.
20. Dodatnia korelacja między liczbą komórek olbrzymich wielojądrzastych a indeksem mitotycznym sugeruje, że komórki olbrzymie wielojądrzaste mogą uczestniczyć w tworzeniu mikrośrodowiska sprzyjającego proliferacji komórek nowotworowych.
21. Nowotwory o wysokim stopniu złośliwości histologicznej mogą prawdopodobnie przechodzić z klasycznej angiogenezy na mechanizm mimikry naczyniowej.
22. Liczba komórek olbrzymich wielojądrzastych może być użyta jako marker prognostyczny we włókniakomięsakach poiniekcyjnych.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że włókniakomięsaki poiniekcyjne kotów są nowotworami o dużej złożoności biologicznej, w których mikrośrodowisko zapalne, mechanizmy immunosupresji oraz alternatywne formy unaczynienia odgrywają kluczową rolę w ich progresji i agresywności. Zidentyfikowane zależności pomiędzy ekspresją markerów immunohistochemicznych, obecnością komórek olbrzymich wielojądrzastych a stopniem złośliwości nowotworu mogą stanowić podstawę do wyodrębnienia nowych czynników prognostycznych oraz potencjalnych celów terapeutycznych. Uzyskane dane mają znaczenie poznawcze i mogą znaleźć zastosowanie w dalszych badaniach nad personalizacją leczenia nowotworów mezenchymalnych u zwierząt towarzyszących.

4.3.6. Piśmiennictwo

1. Ahmadzadeh K, Vanoppen M, Rose CD, Matthys P, Wouters CH. Multinucleated Giant Cells: Current Insights in Phenotype, Biological Activities, and Mechanism of Formation. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:873226.
2. Al-Maawi S, Wang X, Sader R, Götz W, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. Multinucleated Giant Cells Induced by a Silk Fibroin Construct Express Proinflammatory Agents: An Immunohistological Study. *Materials.* 2021;14:4038.
3. Anderson S, Shires VL, Wilson RA, Mountford AP. Formation of multinucleated giant cells in the mouse lung is promoted in the absence of interleukin-12. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999;20:371–378.
4. Bahaddin MM. A comparative study between Ki67 positive versus Ki67 negative females with breast cancer: cross sectional study. *Ann Med Surg (Lond)* 2020;60:232–235.
5. Barnett FH, Rosenfeld M, Wood M, Kiosses WB, Usui Y, Marchetti V, Aguilar E, Friedlander M. Macrophages form functional vascular mimicry channels in vivo. *Sci Rep.* 2016;6:36659.
6. Bevins NJ, Okamura R, Montesion M, Adashek JJ, Goodman AM, Kurzrock R. Tumor infiltrating lymphocyte expression of PD-1 predicts response to anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. *J Immunother Precis Oncol.* 2022;5:90–97.
7. Bharadwaj D, Mandal M. Senescence in polyploid giant cancer cells: A road that leads to chemoresistance. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020;52:68–75.
8. Boxberg M, Steiger K, Lenze U, Rech H, von Eisenhart-Rothe R, Wörtler K, Weichert W, Langer R, Specht K. PD-L1 and PD-1 and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes in high grade sarcomas of soft tissue – prognostic implications and rationale for immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2018;7:e1389366.
9. Brockhoff G, Seitz S, Weber F, Zeman F, Klinkhammer-Schalke M, Ortmann O, Wege AK. The presence of PD-1 positive tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancers is associated with a favorable outcome of disease. *Oncotarget.* 2018;9:6201–6212.
10. Canpolat E, Lynes MA. In Vivo Manipulation of Endogenous Metallothionein with a Monoclonal Antibody Enhances a T-Dependent Humoral Immune Response. *Toxicol Sci.* 2001;62:61–70.
11. Carminato A, Vascellari M, Marchioro W, Melchioti E, Mutinelli F. Microchip-associated fibrosarcoma in a cat. *Vet Dermatol.* 2011;22:565–569.
12. Carneiro CS, de Queiroz GF, Pinto AC, Dagli ML, Matera JM. Feline injection site sarcoma: immunohistochemical characteristics. *J. Feline Med. Surg.* 2019;21:314–321.
13. Caruso RA, Branca G, Fedele F, Irato E, Finocchiaro G, Parisi A, Ieni A. Mechanisms of coagulative necrosis in malignant epithelial tumors (Review) *Oncol Lett.* 2014;8:1397–1402.
14. Chen Z, Han F, Du Y, Shi H, Zhou W. Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther.* 2023;8:70.
15. Cherian MG, Apostolova MD. Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000;46:347–56.
16. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;6917:860–867.
17. Datta J, Majumder S, Kutay H, Motiwala T, Frankel W, Costa R, Cha HC, MacDougald OA, Jacob ST, Ghoshal K. Metallothionein expression is suppressed in primary human hepatocellular carcinomas and is

- mediated through inactivation of CCAAT/enhancer binding protein alpha by phosphatidylinositol 3-kinase signaling cascade. *Cancer Res.* 2007;67:2736–2746.
18. de Nardi AB, Dos Santos Horta R, Fonseca-Alves CE, de Paiva FN, Linhares LCM, Firmo BF, Ruiz Sueiro FA, de Oliveira KD, Lourenço SV, De Francisco Strefezzi R, Brunner CHM, Rangel MMM, Jark PC, Castro JLC, Ubukata R, Batschinski K, Sobral RA, da Cruz NO, Nishiya AT, Fernandes SC, Dos Santos Cunha SC, Gerardi DG, Challoub GSG, Biondi LR, Laufer-Amorim R, de Oliveira Paes PR, Lavalle GE, Hupples RR, Grandi F, de Carvalho Vasconcellos CH, Dos Anjos DS, Luzo ACM, Matera JM, Vozdova M, Dagli MLZ. Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Cells.* 2022;11:618.
 19. Dean RS, Pfeiffer DU, Adams VJ. The incidence of feline injection site sarcomas in the United Kingdom. *BMC Vet Res.* 2013;9:17.
 20. Delgado-Bellido D, Oliver FJ, Vargas Padilla MV, Lobo-Selma L, Chacón-Barrado A, Díaz-Martin J, de Álava E. VE-Cadherin in Cancer-Associated Angiogenesis: A Deceptive Strategy of Blood Vessel Formation. *Int J Mol Sci.* 2023;24:9343.
 21. Dincer Z, Jasani B, Haywood S, Mullins JE, Fuentealba IC. Metallothionein expression in canine and feline mammary and melanotic tumours. *J Comp Pathol.* 2001;125:130–136.
 22. Dobromylskyj M. Feline Soft Tissue Sarcomas: A Review of the Classification and Histological Grading, with Comparison to Human and Canine. *Animals.* 2022;12:2736.
 23. Dobromylskyj MJ, Richards V, Smith KC. Prognostic factors and proposed grading system for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in cats, based on a retrospective study. *J Feline Med Surg.* 2021;23:168–174.
 24. Doddy FD, Glickman LT, Glickman NW, Janovitz EB. Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *J. Comp. Pathol.* 1996;114:165–174.
 25. Du S, McCall N, Park K, Guan Q, Fontina P, Ertel A, Zhan T, Dicker AP, Lu B. 2018. Blockade of tumor-expressed PD-1 promotes lung cancer growth. *OncoImmunology.* 2018;7:e1408747.
 26. Dziegiel P, Salwa-Zurawska W, Zurawski J, Wojnar A, Zabel M. Prognostic significance of augmented metallothionein (MT) expression correlated with Ki-67 antigen expression in selected soft tissue sarcomas. *Histol Histopathol.* 2005;20:83–89.
 27. Esplin DG, Bigelow M, McGill LD, Wilson SR. Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection in a cat. *Vet Cancer Soc Newsletter.* 1999;23:8–9.
 28. Folkl A, Wen X, Kuczynski E, Clark ME, Bienzle D. Feline programmed death and its ligand: characterization and changes with feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010;134:107–114.
 29. Fukumura D, Kloepper J, Amoozgar Z, Duda DG, Jain RK. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2018;15:325–340.
 30. Gulay KCM, Aoshima K, Maekawa N, Suzuki T, Konnai S, Kobayashi A, Kimura T. Hemangiosarcoma cells induce M2 polarization and PD-L1 expression in macrophages. *Sci. Rep.* 2022;12:2124.
 31. Gulubova MV, Ivanova KV. The Expression of Tumor-Associated Macrophages and Multinucleated Giant Cells in Papillary Thyroid Carcinoma. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019;23:3944–3949.

32. Guo CR, Han R, Xue F, Xu L, Ren WG, Li M, Feng Z, Hu BC, Peng ZM. Expression and clinical significance of CD31, CD34, and CD105 in pulmonary ground glass nodules with different vascular manifestations on CT. *Front Oncol.* 2022;12:956451.
33. Han Y, Liu D, Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am. J. Cancer Res.* 2020;10:727–742.
34. Hartmann K, Day MJ, Thiry E, Lloret A, Frymus T, Addie D, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Gruffydd-Jones T, Horzinek MC, Hosie MJ, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Truyen U, Möstl K, European Advisory Board on Cat Diseases. Feline injection-site sarcoma: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 2015;17: 606–613.
35. Hartmann K, Egberink H, Möstl K, Addie DD, Beläk S, Boucraut-Baralon C, Frymus T, Lloret A, Hofmann-Lehmann R, Marsilio F, Pennisi MG, Tasker S, Thiry E, Truyen U, Hosie MJ. Feline injection-site sarcoma and other adverse reactions to vaccination in cats. *Viruses.* 2023;15:1708.
36. Hasegawa K, Suetsugu A, Nakamura M, Matsumoto T, Aoki H, Kunisada T, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Hoffman RM. Imaging the Role of Multinucleate Pancreatic Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts in Peritoneal Metastasis in Mouse Models. *Anticancer Res.* 2017;37:3435–3440.
37. Hendrick MJ, Brooks JJ. Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Vet Pathol.* 1994;31:126–129.
38. Hendrick MJ, Dunagan CA. Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988–1989) *J Am Vet Med Assoc.* 1991;198:304–305.
39. Hendrick MJ, Goldschmidt MH. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J Am Vet Med Assoc.* 1991;199:968.
40. Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer.* 2003;6:411–421.
41. Hild V, Mellert K, Möller P, Barth TFE. Giant Cells of Various Lesions Are Characterised by Different Expression Patterns of HLA-Molecules and Molecules Involved in the Cell Cycle, Bone Metabolism, and Lineage Affiliation: An Immunohistochemical Study with a Review of the Literature. *Cancers.* 2023;15:3702.
42. Hughes KL, Rout ED, Avery PR, Pavuk AA, Avery AC, Moore AR. A series of heterogeneous lymphoproliferative diseases with CD3 and MUM1 co-expressed in cats and dogs. *J Vet Diagn Invest.* 2023;35:22–33.
43. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, Ortmann O. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139:539–552.
44. Jennings RN, Miller MA, Ramos-Vara JA. Comparison of CD34, CD31, and factor VIII-related antigen immunohistochemical expression in feline vascular neoplasms and CD34 expression in feline nonvascular neoplasms. *Vet Pathol.* 2012;49:532–537.
45. Joseph RW, Millis SZ, Carballido EM, Bryant D, Gatalica Z, Reddy S, Bryce AH, Vogelzang NJ, Stanton ML, Castle EP, Ho TH. PD-1 and PD-L1 expression in renal cell carcinoma with Sarcomatoid differentiation. *Cancer Immunol. Res.* 2015;3:1303–1307.
46. Jösten M, Rudolph R. Methods for the differentiation of giant cells in canine and feline neoplasias in paraffin sections. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1997;44:159–166.

47. Kass PH, Barnes WG, Jr, Spangler WL, Chomel BB, Culbertson MR. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 1993;203:396–405.
48. Kass PH, Spangler WL, Hendrick MJ, McGill LD, Esplin DG, Lester S, Slater M, Meyer EK, Boucher F, Peters EM, Gobar GG, Htoo T, Decile K. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2003;223:1283–1292.
49. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression. *Nat Rev Cancer.* 2011;12:9–22.
50. Kim C, Kim EK, Jung H, Chon HJ, Han JW, Shin K-H, Hu H, Kim KS, Choi YD, Kim S, Lee YH, Suh J-S, Ahn JB, Chung HC, Noh SH, Rha SY, Kim SH, Kim HS. Prognostic implications of PD-L1 expression in patients with soft tissue sarcoma. *BMC Cancer.* 2016;16:434.
51. Kim HS, Won YJ, Shim JH, Kim HJ, Kim J, Hong HN, et al. Morphological characteristics of vasculogenic mimicry and its correlation with EphA2 expression in gastric adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2019;9:3414.
52. Kim JR, Moon YJ, Kwon KS, Bae JS, Wagle S, Kim KM, Park HS, Lee H, Moon WS, Chung MJ, Kang MJ, Jang KY. Tumor infiltrating PD1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PLoS One.* 2013;8:e82870.
53. Kim SK, Cho SW. The Evasion Mechanisms of Cancer Immunity and Drug Intervention in the Tumor Microenvironment. *Front Pharmacol.* 2022;13:868695.
54. Kleffel S, Posch C, Barthel SR, Mueller H, Schlapbach C, Guenova E, Elco CP, Lee N, Juneja VR, Zhan Q, Lian CG, Thomi R, Hoetzenecker W, Cozzio A, Dummer R, Mihm M.C, Flaherty KT, Frank MH, Murphy GF, Sharpe AH, Kupper TS, Schatton T. Melanoma cell-intrinsic PD-1 receptor functions promote tumor growth. *Cell.* 2015;162:1242–1256.
55. Kloc M, Uosef A, Subuddhi A, Kubiak JZ, Piprek RP, Ghobrial RM. Giant Multinucleated Cells in Aging and Senescence-An Abridgement. *Biology.* 2022;11:1121.
56. Klöppel G, La Rosa S. Ki67 labeling index: assessment and prognostic role in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Virchows Arch.* 2018;472:341–349.
57. Krotofil M, Tota M, Siednienko J, Donizy P. Emerging Paradigms in Cancer Metastasis: Ghost Mitochondria, Vasculogenic Mimicry, and Polyploid Giant Cancer Cells. *Cancers.* 2024;16:3539.
58. Kumar SR, Kim DY, Henry CJ, Bryan JN, Robinson KL, Eaton AM. Programmed death ligand 1 is expressed in canine B cell lymphoma and downregulated by MEK inhibitors. *Vet. Comp. Oncol.* 2017;15:1527–1536.
59. Li H, Li X, Liu S, Guo L, Zhang B, Zhang J, Ye Q. Programmed cell death-1 (PD-1) checkpoint blockade in combination with a mammalian target of rapamycin inhibitor restrains hepatocellular carcinoma growth induced by hepatoma cell-intrinsic PD-1. *Hepatology.* 2017;66:1920–1933.
60. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol Med Rep.* 2015;11:1566-1572.
61. Liu P, Wang L, Yu H. Polyploid giant cancer cells: origin, possible pathways of formation, characteristics, and mechanisms of regulation. *Front Cell Dev Biol.* 2024;12:1410637.
62. Liu Y, Shi Y, Wu M, Liu J, Wu H, Xu C, Chen L. Hypoxia-induced polyploid giant cancer cells in glioma promote the transformation of tumor-associated macrophages to a tumor-supportive phenotype. *CNS Neurosci Ther.* 2022;28:1326-1338.

63. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci.* 2020;77:1745–1770.
64. Lv X, Li J, Zhang C, Hu T, Li S, He S, Yan H, Tan Y, Lei M, Wen M, Zuo J. The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. *Genes Dis.* 2017;4:19–24.
65. Lynn NN, Howe MC, Hale RJ, Collins GN, O'Reilly PH. Over expression of metallothionein predicts resistance of transitional cell carcinoma of bladder to intravesical mitomycin therapy. *J Urol.* 2003;169:721–723.
66. Maekawa N, Konnai S, Asano Y, Otsuka T, Aoki E, Takeuchi H, Kato Y, Kaneko MK, Yamada S, Kagawa Y, Nishimura M, Takagi S, Deguchi T, Ohta H, Nakagawa T, Suzuki Y, Okagawa T, Murata S, Ohashi K. Molecular characterization of feline immune checkpoint molecules and establishment of PD-L1 immunohistochemistry for feline tumors. *PLoS One.* 2023;18:e0281143.
67. Maekawa N, Konnai S, Ikebuchi R, Okagawa T, Adachi M, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- γ production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade. *PLoS One.* 2014;9:e98415.
68. Maekawa N, Konnai S, Nishimura M, Kagawa Y, Takagi S, Hosoya K, Ohta H, Kim S, Okagawa T, Izumi Y, Deguchi T, Kato Y, Yamamoto S, Yamamoto K, Toda M, Nakajima C, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. PD-L1 immunohistochemistry for canine cancers and clinical benefit of anti-PD-L1 antibody in dogs with pulmonary metastatic oral malignant melanoma. *NPJ Precis Oncol.* 2021;5:10.
69. Maekawa N, Konnai S, Okagawa T, Nishimori A, Ikebuchi R, Izumi Y, Takagi S, Kagawa Y, Nakajima C, Suzuki Y, Kato Y, Murata S, Ohashi K. Immunohistochemical analysis of PD-L1 expression in canine malignant cancers and PD-1 expression on lymphocytes in canine Oral melanoma. *PLoS One.* 2016;11:e0157176.
70. Maekawa N, Konnai S, Takagi S, Kagawa Y, Okagawa T, Nishimori A, Ikebuchi R, Izumi Y, Deguchi T, Nakajima C, Kato Y, Yamamoto K, Uemura H, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma. *Sci. Rep.* 2017;7:8951.
71. Mairinger FD, Schmeller J, Borchert S, Wessolly M, Mairinger E, Kollmeier J, Hager T, Mairinger T, Christoph DC, Walter RFH, Eberhardt WEE, Plönes T, Wohlschlaeger J, Jasani B, Schmid KW, Bankfalvi A. Immunohistochemically detectable metallothionein expression in malignant pleural mesotheliomas is strongly associated with early failure to platin-based chemotherapy. *Oncotarget.* 2018;9:22254–22268.
72. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999;155:739-752.
73. Martano M, Morello E, Buracco P. Feline injection-site sarcoma: past, present and future perspectives. *Vet J.* 2011;188:136–141.
74. McDermott DF, Atkins MB. PD-1 as a potential target in cancer therapy. *Cancer Med.* 2013;2:662–673.
75. Mikiewicz M, Otrocka-Domagała I, Paździor-Czapula K, Gesek M. Morphology and immunoreactivity of canine and feline extramedullary plasmacytomas. *Pol J Vet Sci.* 2016;19:345–352.
76. Mikiewicz M, Paździor-Czapula K, Fiedorowicz J, Gesek M, Otrocka-Domagała I. Metallothionein expression in feline injection site fibrosarcomas. *BMC Vet. Res.* 2023;19:42.

77. Miron RJ, Bosshardt DD. Multinucleated Giant Cells: Good Guys or Bad Guys? *Tissue Eng Part B Rev.* 2018;24:53–65.
78. Mirzayans R, Andrais B, Murray D. Roles of Polyploid/Multinucleated Giant Cancer Cells in Metastasis and Disease Relapse Following Anticancer Treatment. *Cancers.* 2018;10:118.
79. Mullin C, Clifford CA. Histiocytic Sarcoma and Hemangiosarcoma Update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2019;49:855–879.
80. Munday JS, Banyay K, Aberdein D, French AF. Development of an injection site sarcoma shortly after meloxicam injection in an unvaccinated cat. *J Feline Med Surg.* 2011;13:988–991.
81. Murri A, Hilmy M, Bell J, Willson C, McNicol A-M, Lannigan A, Doughty JC, McMillan DC. The relationship between the systemic inflammatory response, tumour proliferative activity, T-lymphocytic and macrophage infiltration, microvessel density and survival in patients with primary operable breast cancer. *Br J Cancer.* 2008;99:1013–1019.
82. Nascimento C, Urbano AC, Gameiro A, Ferreira J, Correia J, Ferreira F. Serum PD-1/PD-L1 levels, tumor expression and PD-L1 somatic mutations in HER2-positive and triple negative Normal-like feline mammary carcinoma subtypes. *Cancers.* 2020;12:1386.
83. Nishibori S, Sakurai M, Kagawa Y, Uchida K, Nakagawa T, Igase M, Mizuno T. Cross-reactivity of anti-human programmed cell death ligand 1 (PD-L1) monoclonal antibody, clone 28-8 against feline PD-L1. *J. Vet. Med. Sci.* 2023;85:592–600.
84. Nishimori A, Konnai S, Okagawa T, Maekawa N, Ikebuchi R, Goto S, Sajiki Y, Suzuki Y, Kohara J, Ogasawara S, Kato Y, Murata S, Ohashi K. In vitro and in vivo antiviral activity of an anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) rat-bovine chimeric antibody against bovine leukemia virus infection. *PLoS One.* 2017;12:e0174916.
85. Nordsmark M, Overgaard J. Tumor hypoxia is independent of hemoglobin and prognostic for loco-regional tumor control after primary radiotherapy in advanced head and neck cancer. *Acta Oncol.* 2004;43:396–403.
86. Nowak M, Madej JA, Dziegiel P. Extent of metallothionein expression in correlation with expression of Ki-67 antigen in soft tissue fibrosarcomas in dogs. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2007;51:139–144.
87. O'Byrne KJ, Dalglish AG. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *Br. J. Cancer.* 2001;85:473–483.
88. Oike N, Kawashima H, Ogose A, Hotta T, Hatano H, Ariizumi T, Sasaki T, Yamagishi T, Umezumi H, Endo N. Prognostic impact of the tumor immune microenvironment in synovial sarcoma. *Cancer Sci.* 2018;109:3043–3054.
89. Okagawa T, Konnai S, Nishimori A, Maekawa N, Ikebuchi R, Goto S, Nakajima C, Kohara J, Ogasawara S, Kato Y, Suzuki Y, Murata S, Ohashi K. Anti-bovine programmed Death-1 rat-bovine chimeric antibody for immunotherapy of bovine leukemia virus infection in cattle. *Front. Immunol.* 2017;8:650.
90. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in Cancer immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* 2015;14:847–856.
91. Patruno R, Passantino G, Laface C, Tinelli A, Zito A, Ruggieri R, Luposella F, Gadaleta P, Laforgia M, Lacitignola L, Ammendola M, Ranieri G, Zizzo N. Microvascular Density, Endothelial Area, and Ki-67 Proliferative Index Correlate Each Other in Cat Post-Injection Fibrosarcoma. *Cells.* 2020;10:31.

92. Pedersen MØ, Larsen A, Stoltenberg M, Penkowa M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog Histochem Cytochem.* 2009;44:29–64.
93. Porcellato I, Menchetti L, Brachelente C, Sforza M, Raginato A, Lepri E, Mechelli L. Feline Injection-Site Sarcoma: Matrix Remodeling and Prognosis. *Vet Pathol.* 2017;54:204–211.
94. Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 2011;146:873–887.
95. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe.* 1987;8:138–140.
96. Rosai J. Liver cell carcinoma with osteoclast-like giant cells: nonepitheliogenic giant cells in diverse malignancies. *Hepatology.* 1990;12:782–783.
97. Sabattini S, Bettini G. Grading Cutaneous Mast Cell Tumors in Cats. *Vet Pathol.* 2019;56:43–49.
98. Saini G, Joshi S, Garlapati C, Li H, Kong J, Krishnamurthy J, Reid MD, Aneja R. Polyploid giant cancer cell characterization: New frontiers in predicting response to chemotherapy in breast cancer. *Semin Cancer Biol.* 2022;81:220-231.
99. Sajiki Y, Konnai S, Nagata R, Kawaji S, Nakamura H, Fujisawa S, Okagawa T, Maekawa N, Kato Y, Suzuki Y, Murata S, Mori Y, Ohashi K. The enhancement of Th1 immune response by anti-PD-L1 antibody in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Vet. Med. Sci.* 2021;83:162–166.
100. Samstein RM, Lee C-H, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY, Barron DA, Zehir A, Jordan EJ, Omuro A, Kaley TJ, Kendall SM, Motzer RJ, Hakimi AA, Voss MH, Russo P, Rosenberg J, Iyer G, Bochner BH, Bajorin DF, Al-Ahmadie HA, Chaft JE, Rudin CM, Riely GJ, Baxi S, Ho AL, Wong RJ, Pfister DG, Wolchok JD, Barker CA, Gutin PH, Brennan CW, Tabar V, Mellinghoff IK, DeAngelis LM, Ariyan CE, Lee N, Tap WD, Gounder MM, D'Angelo SP, Saltz L, Stadler ZK, Scher HI, Baselga J, Razavi P, Klebanoff CA, Yaeger R, Segal NH, Ku GY, DeMatteo RP, Ladanyi M, Rizvi NA, Berger MF, Riaz N, Solit DB, Chan TA, Morris LGT. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat. Genet.* 2019;51:202–206.
101. Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell.* 2012;148:399–408.
102. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;10:721–732.
103. Shinya G, Satoru K, Yuki H, Junko K, Tomohiro O, Naoya M, Yamato S, Kei W, Erina M, Atsushi K, Satoshi G, Hidetoshi H, Masateru K, Motoshi T, Eiji T, Masaru I, Ryoko U, Shinji Y, Mika KK, Yukinari K, Keiichi Y, Mikihiro T, Yasuhiko S, Shiro M, Kazuhiko O. Clinical efficacy of the combined treatment of anti-PD-L1 rat-bovine chimeric antibody with a COX-2 inhibitor in calves infected with *mycoplasma bovis*. *Jpn. J. Vet. Res.* 2020;68:77–90.
104. Shosu K, Sakurai M, Inoue K, Nakagawa T, Sakai H, Morimoto M, Okuda M, Noguchi S, Mizuno T. 2016. Programmed cell death ligand 1 expression in canine cancer. *In Vivo.* 2016;30:195–204.
105. Shu Z, Row S, Deng WM. Endoreplication: The Good, the Bad, and the Ugly. *Trends Cell Biol.* 2018;28:465–474.
106. Si M, Lang J. The roles of metallothioneins in carcinogenesis. *J Hematol Oncol.* 2018;11:107.
107. Sierra Matiz OR, Santilli J, Anai LA, Da Silva MCL, Sueiro FA, Sequeira JL, Magalhães LF, Magalhães GM, Tinucci Costa M, Calazans SG. Prognostic significance of Ki67 and its correlation with mitotic index in dogs

- with diffuse large B-cell lymphoma treated with 19-week CHOP-based protocol. *J Vet Diagn Invest.* 2018;30:263–267.
- 108.Smith DJ, Jaggi M, Zhang W, Galich A, Du C, Sterrett SP, Smith LM, Balaji KC. Metallothioneins and resistance to cisplatin and radiation in prostate cancer. *Urology.* 2006;67:1341–1347.
- 109.Souares M, Ribeiro R, Carvalho S, Peleteiro M, Correia J, Ferreira F. Ki-67 as a Prognostic Factor in Feline Mammary Carcinoma: What Is the Optimal Cutoff Value? *Vet Pathol.* 2016;53:37–43.
- 110.Sorbye SW, Kilvaer TK, Valkov A, Donnem T, Smeland E, Al-Shibli K, Bremnes RM, Busund LT. Prognostic impact of Jab1, p16, p21, p62, Ki67 and Skp2 in soft tissue sarcomas. *PLoS One.* 2012;10:e47068.
- 111.Spranger S. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment. *Int. Immunol.* 2016;28:383–391.
- 112.Surowiak P, Materna V, Maciejczyk A, Pudelko M, Markwitz E, Spaczyński M, Dietel M, Zabel M, Lage H. Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. *Virchows Arch.* 2007;450:279–285.
- 113.Surowiak P, Matkowski R, Materna V, Györfy B, Wojnar A, Pudelko M, Dziegiel P, Kornafel J, Zabel M. Elevated metallothionein (MT) expression in invasive ductal breast cancers predicts tamoxifen resistance. *Histol Histopathol.* 2005;20:1037–1044.
- 114.Sznol M, Chen L. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin. Cancer Res.* 2013;19:1021–1034.
- 115.Takahashi S. Positive and negative regulators of the metallothionein gene (Review) *Mol Med Rep.* 2015;12:795–799.
- 116.Tan GF, Goh S, Lim AH, Liu W, Lee JY, Rajasegaran V, Sam XX, Tay TKY, Selvarajan S, Ng CC, Teh BT, Chan JY. Bizarre giant cells in human angiosarcoma exhibit chemoresistance and contribute to poor survival outcomes. *Cancer Sci.* 2021;112:397–409.
- 117.Teng MWL, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 2015;75:2139–2145.
- 118.Travaglino A, Raffone A, Catena U, De Luca M, Toscano P, Del Prete E, Vecchione ML, Lionetti R, Zullo F, Insabato L. Ki67 as a prognostic marker in uterine leiomyosarcoma: a quantitative systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2021;266:119–124.
- 119.Wang HW, Joyce JA. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: priming for protumoral functions. *Cell Cycle.* 2010;24:4824–4835.
- 120.Wang X, Yang X, Zhang C, Wang Y, Cheng T, Duan L, Tong Z, Tan S, Zhang H, Saw PE, Gu Y, Wang J, Zhang Y, Shang L, Liu Y, Jiang S, Yan B, Li R, Yang Y, Yu J, Chen Y, Gao GF, Ye Q, Gao S. Tumor cell-intrinsic PD-1 receptor is a tumor suppressor and mediates resistance to PD-1 blockade therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020;117:6640–6650.
- 121.Wei H, Desouki MM, Lin S, Xiao D, Franklin RB, Feng P. Differential expression of metallothioneins (MTs) 1, 2, and 3 in response to zinc treatment in human prostate normal and malignant cells and tissues. *Mol Cancer.* 2008;7:7.
- 122.Weihua Z, Lin Q, Ramoth AJ, Fan D, Fidler IJ. Formation of solid tumors by a single multinucleated cancer cell. *Cancer.* 2011;117:4092–4099.

123. Woldemeskel M, Hawkins I, Whittington L. Ki-67 protein expression and tumor associated inflammatory cells (macrophages and mast cells) in canine colorectal carcinoma. *BMC Vet Res.* 2017;20:111.
124. Woodward KN. Origins of injection-site sarcomas in cats: the possible role of chronic inflammation-a review. *ISRN Vet Sci.* 2011;12:210982.
125. Wu C, Zhu Y, Jiang J, Zhao J, Zhang X-G, Xu N. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem.* 2006;108:19–24.
126. Yan DW, Fan JW, Yu ZH, Li MX, Wen YG, Li DW, Zhou CZ, Wang XL, Wang Q, Tang HM, Peng ZH. Downregulation of metallothionein 1F, a putative oncosuppressor, by loss of heterozygosity in colon cancer tissue. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822:918–926.
127. Yao H, Wang H, Li C, Fang J-Y, Xu J. Cancer cell-intrinsic PD-1 and implications in combinatorial immunotherapy. *Front. Immunol.* 2018;9:1774.
128. Yee PP, Li W. Tumor necrosis: a synergistic consequence of metabolic stress and inflammation. *BioEssays.* 2021;43:e2100029.
129. Youn J, Lynes MA. Metallothionein-induced suppression of cytotoxic T lymphocyte function: an important immunoregulatory control. *Toxicol Sci.* 1999;52:199–208.
130. Zabielska-Koczywās K, Wojtalewicz A, Lechowski R. Current knowledge on feline injection-site sarcoma treatment. *Acta Vet Scand.* 2017;59:47.
131. Zhang L, Wu C, Hoffman RM. Prostate Cancer Heterogeneous High-Metastatic Multi-Organ-Colonizing Chemo-Resistant Variants Selected by Serial Metastatic Passage in Nude Mice Are Highly Enriched for Multinucleate Giant Cells. *PLoS One.* 2015;10:e0140721.
132. Zhou X, Zhou M, Zheng M, Tian S, Yang X, Ning Y, Li Y, Zhang S. Polyploid giant cancer cells and cancer progression. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:1017588.

4.4. Inne osiągnięcie, o którym mowa art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018

r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

4.4.1. Osiągnięcie pt. „Badania nad zmianami proliferacyjnymi w jamie ustnej u psów i kotów.”

Badania nad nowotworami zwierząt stanowią kluczowy obszar współczesnej weterynarii, umożliwiając pogłębienie wiedzy na temat mechanizmów patogenezy, doskonalenie metod diagnostycznych oraz rozwój skuteczniejszych strategii terapeutycznych. Moja działalność naukowa koncentruje się na analizie morfologicznej, immunofenotypowej oraz ocenie czynników prognostycznych nowotworów u zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem aspektów diagnostycznych i różnic gatunkowych. Podejmowane przeze mnie badania dostarczają danych na temat częstości występowania określonych typów zmian nowotworowych, ich potencjalnej agresywności oraz znaczenia klinicznego, co przekłada się na bardziej precyzyjne rozpoznania i szybsze podejmowanie działań terapeutycznych.

Wyniki jednego z moich projektów badawczych, dotyczącego proliferacyjnych zmian w jamie ustnej psów i kotów, zostały po raz pierwszy zaprezentowane na prestiżowym

międzynarodowym kongresie: 3rd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVF (Lyon, Francja, 2017). Prezentacja spotkała się z zainteresowaniem środowiska naukowego i stanowiła podstawę do przygotowania pełnej publikacji naukowej.

Zmiany jamy ustnej należą do często wykrywanych patologii u psów i kotów podczas rutynowych badań klinicznych. Takie zmiany mogą powodować ból, dyskomfort, trudności w przyjmowaniu pokarmu, a czasem są wykrywane przypadkowo przy okazji leczenia chorób przyzębia. Etiologia zmian bywa zróżnicowana: część rozwija się jako następstwo przewlekłego zapalenia dziąseł i jamy ustnej, inne mogą powstawać spontanicznie. Istnieją przesłanki, że przewlekłe podrażnienie błony śluzowej lub długotrwała stymulacja antygenowa mogą sprzyjać transformacji nowotworowej komórek w jamie ustnej. Sugerowano także wpływ czynników środowiskowych, takich jak dym tytoniowy, stosowanie obroży przeciwpchelných, dieta na rozwój nowotworów jamy ustnej u małych zwierząt.

Mimo różnorodnej natury zmian w jamie ustnej, często prezentują się one klinicznie bardzo podobnie – jako guzki, owrzodzenia lub zgrubienia błony śluzowej. Z tego powodu ocena makroskopowa nie pozwala na pewne odróżnienie zmian zapalnych i rozrostowych od nowotworowych. Konieczne jest badanie histopatologiczne wycinka, aby postawić trafne rozpoznanie i wdrożyć odpowiednie leczenie. W literaturze weterynaryjnej opisano wcześniej częstość występowania wybranych nowotworów jamy ustnej u psów i kotów, jednak brakowało kompleksowych opracowań obejmujących wszystkie typy zmian (zapalenia, rozrosty, nowotwory łagodne i złośliwe) w obrębie jamy ustnej.

Celem przeprowadzonych badań było lepsze poznanie epidemiologii oraz charakterystyki zmian w obrębie jamy ustnej u psów i kotów. Uzasadnieniem podjęcia omawianej tematyki była potrzeba lepszego zrozumienia, jak często poszczególne typy zmian występują oraz które z nich dominują u psów, a które u kotów. Takie dane są istotne dla lekarzy weterynarii praktyków – pomagają w ustaleniu diagnostyki różnicowej w przypadku wykrycia zmiany w jamie ustnej oraz podkreślają znaczenie badania histopatologicznego. Ponadto wyniki dostarczają informacji, czy pewne czynniki (np. wiek, płeć, rasa zwierzęcia) wiążą się z większym ryzykiem wystąpienia konkretnych zmian.

Głównym celem tych badań było określenie częstości występowania zmian zapalnych, hiperplastycznych i nowotworowych (łagodnych i złośliwych) w jamie ustnej psów i kotów. Dodatkowym aspektem tych badań było określenie czy istnieje zależność pomiędzy występowaniem określonych zmian jamy ustnej a płcią, wiekiem i rasą zwierzęcia. Badania zostały przeprowadzone za pomocą retrospektywnej analizy przypadków zmian histopatologicznych stwierdzanych w jamie ustnej psów i kotów w latach 2015–2017

pochodzących z archiwum Laboratorium Diagnostycznego Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

W celu przeprowadzenia analizy zgromadzono dokumentację histopatologiczną wszystkich guzów i zmian guzowatych jamy ustnej psów i kotów z lat 2015–2017 (łącznie 486 przypadków – 340 przypadków u psów; 146 przypadków u kotów). Każdy przypadek został zaklasyfikowany do jednej z kategorii: zmiana zapalna, zmiana hiperplastyczna, nowotwór łagodny lub nowotwór złośliwy. Określono procentowy udział zmian zapalnych, hiperplastycznych, nowotworów łagodnych i złośliwych u psów i kotów, następnie w ramach każdej kategorii zidentyfikowano konkretne jednostki chorobowe i policzono ich występowanie. Ponadto przeanalizowano wiek, płęć i rasę zwierząt z poszczególnymi typami zmian. Celem było sprawdzenie, czy występują predyspozycje rasowe czy płęć ma wpływ na częstość występowania zmian oraz jaka jest średnia wieku zwierząt dla konkretnych rozpoznań histopatologicznych.

Uzyskane dane porównano między psami a kotami, co miało na celu wykazanie różnic i podobieństw w częstości występowania poszczególnych kategorii zmian oraz określenie, czy pewne typy zmian są charakterystyczne dla jednego gatunku.

Realizacja tych zadań pozwoliła na kompleksowe scharakteryzowanie zmian jamy ustnej u obu gatunków w badanym okresie oraz sformułowanie wniosków dotyczących ich częstości i znaczenia klinicznego.

W grupie psów odnotowano zbliżoną częstość występowania zmian u obu płci – samce stanowiły 51,47% przypadków (175/340), a samice 48,53% (165/340). Większość przypadków zmian zaobserwowano u psów nierasowych. Zmiany hiperplastyczne stanowiły 24,12% (82/340) wszystkich zmian w jamie ustnej. Zaobserwowano głównie hiperplazję nabłonkowo-łącznotkankową błony śluzowej dziąseł (96,34% wszystkich zmian hiperplastycznych; 79/82), z pojedynczymi przypadkami wapnienia guzowatego oraz ziarniniaka olbrzymiokomórkowego. Hiperplazja nabłonkowo-łącznotkankowa błony śluzowej dziąsła była najczęściej związana z naciekami zapalnymi o typie limfocytarno-plazmocytarnym o różnym nasileniu. Dodatkowo, w dziewięciu przypadkach przerostu dziąseł zaobserwowano również metaplazję kostną tkanki łącznej.

Zmiany zapalne (bez wyraźnej hiperplazji nabłonkowo-łącznotkankowej błony śluzowej dziąsła) stanowiły 14,7% (50/340) wszystkich zmian w jamie ustnej psów i obejmowały: zapalenie limfocytarno-plazmocytarne (62% wszystkich zmian zapalnych; 31/50), wrzodziejące (16%; 8/50), ropne (8%; 4/50), zapalenie eozynofilne (6%; 3/50),

ziarniniakowo-ropne (4%; 2/50) oraz zapalenie mieszane (4%; 2/50). W sześciu przypadkach zmian zapalnych zaobserwowano również dysplazję nabłonka.

Nowotwory łagodne stanowiły 29,11% (99/340) wszystkich zmian w jamie ustnej psów i obejmowały: obwodowego włókniaka odontogenicznego (drugie najczęstsze rozpoznanie histopatologiczne u psów; 65,66% wszystkich łagodnych nowotworów; 65/99), brodawczaka wirusowego (11,11%; 11/99), szkliwiaka rogowiakowego (8,08%; 8/99), plazmocytomę (7,07%; 7/99) oraz pojedyncze przypadki guza ziarnistokomórkowego, włókniaka kostniejącego (ossifying fibroma), brodawczaka spontanicznego, nerwiaka osłonkowego (Schwannoma) oraz guza odontogenego produkującego amyloid. Obwodowego włókniaka odontogenicznego rozpoznano aż u dziewięciu z jedenastu psów rasy bokser uwzględnionych w badaniu.

Nowotwory złośliwe stanowiły 32,06% (109/340) wszystkich zmian w jamie ustnej psów. Najczęstszym nowotworem złośliwym był czerniak – 35,78% wszystkich nowotworów złośliwych (39/109). Spośród nich 35 przypadków sklasyfikowano jako czerniaki o wysokim stopniu złośliwości, a 4 jako czerniaki niskiego stopnia złośliwości. Innymi często diagnozowanymi nowotworami złośliwymi były: rak płaskonabłonkowy (26,61%; 29/109), włókniakomięsak (12,84%; 14/109), kostniakomięsak (10,09%; 11/109). Rzadziej występujące nowotwory złośliwe obejmowały: guz z komórek tucznych, chłoniaki (3,67%; 4/109), w tym chłoniaka nieepitelotropowy oraz chłoniaka epitelotropowego, niezróżnicowanego mięsaka, naczyńniakomięsaka oraz śluzakomięsaka. Większość przypadków nowotworów i zmian guzopodobnych jamy ustnej obserwowano u psów w średnim wieku (przedział 4–11 lat). Jedynie nieliczne przypadki – zwłaszcza wapnienie guzowate, zapalenie eozynofilne oraz brodawczak wirusowy – występowały u młodych psów (przedział wiekowy 0,5–3,5 roku).

Rozkład płci wśród kocich przypadków wynosił: 79 samców (54,11%) i 67 samic (45,89%). Większość przypadków zaobserwowano u kotów europejskich krótkowłosych. Zmiany hiperplastyczne stanowiły 15,06% (22/146) wszystkich przypadków i obejmowały: hiperplazję nabłonkowo-łącznotkankową błony śluzowej dziąseł (90,91% wszystkich zmian hiperplastycznych; 20/22), pojedynczy przypadek gruczolakowatej hiperplazji drobnych gruczołów ślinowych oraz pojedynczy przypadek obwodowego ziarniniaka olbrzymiokomórkowego. Podobnie jak u psów, hiperplazja nabłonkowo-łącznotkankowa błony śluzowej dziąseł u kotów była często związana z limfocytarno-plazmocytarnym naciekiem zapalnym o różnym nasileniu. W dwóch przypadkach hiperplazji nabłonkowo-łącznotkankowej błony śluzowej dziąsła zaobserwowano również metaplastację kostną.

Zmiany zapalne (bez wyraźnego przerostu dziąseł) stanowiły 58,22% (85/146) wszystkich zmian w jamie ustnej kotów i obejmowały: zapalenie limfocytarno-plazmocytarne (75,29% wszystkich zmian zapalnych; 64/85), zapalenie eozynofilne (18,82%; 16/85), zapalenie ropne (2,35%; 2/85), ziarniniakowo-ropne (2,35%; 2/85) oraz zapalenie mieszane (1,18%; 1/85). W trzech przypadkach naciekom zapalnym towarzyszyła dysplazja nabłonka. Dodatkowo, w trzech przypadkach limfocytarno-plazmocytarne zapalenie błony śluzowej jamy ustnej współistniała resorpcja zębów.

Nowotwory łagodne stanowiły 4,79% (7/146) wszystkich zmian nowotworowych jamy ustnej u kotów i obejmowały: obwodowego włókniaka odontogenicznego (28,57% łagodnych nowotworów; 2/7), plazmocytomę (28,57%; 2/7), brodawczak spontanicznego (28,57%; 2/7), nerwiaka osłonkowego (Schwannoma) (14,29%; 1/7).

Nowotwory złośliwe stanowiły 21,92% (32/146) wszystkich zmian nowotworowych jamy ustnej u kotów. Najczęstszym nowotworem złośliwym był rak płaskonabłonkowy, który odpowiadał za 75% wszystkich nowotworów złośliwych (24/32). W dalszej kolejności występowały: włókniakomięsak, chłoniak nieepitelotropowy, czerniak złośliwy, kostniakomięsak.

Większość przypadków nowotworów i zmian guzopodobnych jamy ustnej u kotów obserwowano u kotów w średnim wieku (przedział 4–12 lat). Jedynie plazmocytozy zostały rozpoznane u dwóch 3-letnich kotów.

Wyniki retrospektywnej analizy 486 przypadków zmian jamy ustnej u psów i kotów pozwoliły na wyodrębnienie istotnych trendów epidemiologicznych i klinicznych, które przekładają się na praktyczne wnioski diagnostyczne i terapeutyczne. W grupie psów odnotowano zbliżoną częstość występowania zmian u obu płci, a większość przypadków dotyczyła psów nierasowych. Przeważały zmiany hiperplastyczne (24,12%) i nowotwory łagodne (29,11%), wśród których najczęstszą była hiperplazja nabłonkowo-łącznotkankowa błony śluzowej dziąseł oraz obwodowy włókniak odontogeniczny (szczególnie częsty u bokserów). Nowotwory złośliwe stanowiły 32,06% przypadków i obejmowały najczęściej czerniaka (głównie o wysokim stopniu złośliwości), raka płaskonabłonkowego i włókniakomięsaka. U kotów dominowały przewlekłe stany zapalne jamy ustnej (58,22%), przede wszystkim zapalenie limfocytarno-plazmocytarne, często z towarzyszącą resorpcją zębów i dysplazją nabłonka. Hiperplazja nabłonkowo-łącznotkankowa błony śluzowej dziąseł występowała rzadziej u kotów niż u psów i miała charakter zapalny. Nowotwory złośliwe u kotów stanowiły 21,92% przypadków, z dominacją raka płaskonabłonkowego. Nowotwory

łagodne u kotów były rzadkie. U obu gatunków zmiany najczęściej dotyczyły zwierząt w średnim wieku.

Wnioski z badania potwierdzają, że każdą zmianę jamy ustnej należy kierować do badania histopatologicznego, ponieważ rozpoznanie kliniczne bywa mylące, a jedynie analiza mikroskopowa pozwala na rzetelną ocenę charakteru zmiany. W praktyce klinicznej psów częstość nowotworów, w tym złośliwych (głównie czerniaków i raków płaskonabłonkowych), wymusza ostrożność diagnostyczną, a obecność zmian dziąseł, szczególnie u bokserów, powinna sugerować podejrzenie obwodowych włókniaków odontogenicznych. U kotów przewlekłe zapalenia błony śluzowej jamy ustnej wymagają kompleksowego podejścia terapeutycznego, a obecność zmian owrzodziałych powinna zawsze budzić podejrzenie raka płaskonabłonkowego. Leczenie i monitorowanie przewlekłych zapaleń jamy ustnej, zwłaszcza z dysplazją nabłonka, może zmniejszyć ryzyko transformacji nowotworowej. Dane uzyskane w niniejszym badaniu pozwalają na lepsze planowanie postępowania diagnostycznego i terapeutycznego oraz podnoszą standard opieki nad pacjentami.

W oparciu o dostępną literaturę można stwierdzić, że omówiona wyżej analiza retrospektywna stanowi jedno z większych tego typu opracowań w Polsce. Uzyskane dane epidemiologiczne mogą mieć wartość poznawczą i praktyczną, w tym mogą być podstawą do dalszych badań nad etiopatogenezą i leczeniem wybranych jednostek chorobowych, jak również służyć jako odniesienie statystyczne w praktyce klinicznej i dydaktyce akademickiej. W mojej ocenie wyniki i wnioski uzyskane w niniejszych badaniach wypełniły lukę w wiedzy w przedmiotowym zakresie i mogą one stanowić punkt wyjścia do dalszych analiz i rozwoju nauki w dziedzinie patologii zwierząt towarzyszących.

4.4.1.2. Streszczenie pokonferencyjne oraz publikacja wchodząca w skład osiągnięcia wraz z informacją o wkładzie wnioskodawcy w prowadzeniu badań naukowych opisanych w poszczególnych publikacjach, jak i w powstanie tych publikacji.

Mikiewicz Mateusz, Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagała Iwona, Gesek Michał, Myrdek Patrycja. *Oral Cavity Lesions in Dogs: A Retrospective Study of 136 Cases*. J. Comp. Pathol. 2018;158:122. 3rd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, 35th Meeting of the ESVP, 15th Meeting of the ESTP, 28th Meeting of the ECVP. 30th August - 2nd September 2017, Lyon, France.

DOI:10.1016/j.jcpa.2017.10.085.

Mikiewicz Mateusz*, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Lemishevskiy Vladimir, Otrocka-Domagała Iwona. *Canine and Feline Oral Cavity Tumours and Tumour-like Lesions: a Retrospective Study of 486 Cases (2015-2017)*. J Comp Pathol. 2019;172:80-87.

DOI: 10.1016/j.jcpa.2019.09.007

Punktacja MNiSW₂₀₁₉ = 100; IF₂₀₁₉ = 0,994

Mój wkład w powstanie w tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 84%.

*autor korespondencyjny

4.4.2. Osiągnięcie pt. „Nowotwory zwierząt – diagnostyka, czynniki prognostyczne i znaczenie immunohistochemii w ocenie ich biologii.”

Badania nad nowotworami zwierząt odgrywają istotną rolę we współczesnej medycynie weterynaryjnej, stanowiąc fundament dla pogłębionego zrozumienia mechanizmów onkogenezy oraz opracowywania skuteczniejszych metod diagnostycznych i terapeutycznych. Moje własne zainteresowania badawcze koncentrują się na analizie biologii nowotworów u zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem ich immunofenotypu oraz znaczenia markerów prognostycznych. Nowotwory drobnych ssaków i zwierząt towarzyszących stają się coraz częstszym wyzwaniem diagnostycznym w praktyce weterynaryjnej. Podjęcie tych badań było odpowiedzią na wyraźną lukę poznawczą dotyczącą diagnostyki różnicowej guzów nowotworowych u zwierząt, a także ich potencjalnej agresywności klinicznej. Jednym z istotnych kierunków mojej pracy badawczej jest analiza wpływu przewlekłych procesów zapalnych na rozwój nowotworów, co stanowi kluczowy aspekt zarówno diagnostyki, jak i profilaktyki onkologicznej.

Celem podjętych badań była ocena morfologii, immunofenotypu oraz potencjału proliferacyjnego wybranych nowotworów występujących u zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem parametrów prognostycznych i przydatności diagnostycznej wybranych markerów.

Guz z komórek chromochłonnych jest nowotworem pochodzenia neuroendokrynnego, wywodzącym się z komórek rdzenia nadnerczy, produkujących adrenalinę i noradrenalinę. U psów występuje rzadko, a jego rozpoznanie kliniczne jest trudne ze względu na nieswoiste objawy. Zróżnicowanie między postacią łagodną a złośliwą tego nowotworu stanowi istotne wyzwanie diagnostyczne, gdyż klasyczne cechy histologiczne nie zawsze korelują z biologicznym zachowaniem guza.

W badaniu przypadku złośliwego guza z komórek chromochłonnych u psa wykazano, że makroskopowo guz był dobrze odgraniczony od otaczających tkanek, jednak nie posiadał torebki. W zrębie guza obecne były liczne ogniska martwicy. Badanie histopatologiczne ujawniło obecność mieszanego populacyjnie nowotworu wywodzącego się z rdzenia nadnercza. Komórki nowotworowe miały kształt okrągły, owalny, wrzecionowaty lub wielokątny, wykazywały wysoką anizocytozę i anizokariozę. Mniejsze komórki były przeważnie okrągłe, z małymi, okrągłymi jądrami i skąpą, eozynofilną cytoplazmą. Średnie i duże komórki miały kształt owalny, wielokątny lub wrzecionowaty, posiadały średnie lub duże, owalne lub okrągłe jądro komórkowe oraz obfitą, eozynofilną cytoplazmę i 2–3 niewyraźne jąderka. Niektóre jądra były podzielone, przypominając kształtem „ziarna kawy”, co nadawało obrazowi wygląd podwójnego jądra. Chromatyna w jądrach była skondensowana lub grudkowata. Obecne było do 2 figur podziału mitotycznego w polu widzenia. Barwienie metodą Mallory’ego wykazało obecność włókien kolagenowych otaczających komórki nowotworowe. Włókna te były również widoczne w miększu guza w postaci małych skupisk. Impregnacja srebrem ujawniła obfite włókna retikuliny, które dzieliły komórki nowotworowe na średniej wielkości gniazda. Badanie immunohistochemiczne z użyciem przeciwciała przeciwko neuroswoistej enolazie (NSE), chromograninie A (CGA) i białka S100 wykazało dodatnią reakcję w cytoplazmie komórek nowotworowych. Komórki dodatnie dla PCNA były zlokalizowane w pobliżu tkanki włóknistej, a indeks PCNA wynosił 17%. Komórki nowotworowe były natomiast ujemne pod względem ekspresji Ki67.

Na podstawie obecności silnej pleomorfii komórkowej, rozległych obszarów martwicy, wysokiej anizocytozy i anizokariozy, a także dodatniej reakcji immunohistochemicznej na CGA, NSE oraz białko S100, rozpoznano złośliwego guza z komórek chromochłonnych rdzenia nadnerczy. Pomimo braku przerzutów, fenotyp komórek, w tym obecność wrzecionowatych komórek CGA-dodatnich, wskazywał na agresywny charakter guza.

Wyniki badania potwierdzają, że złośliwy guz z komórek chromochłonnych może nie dawać przerzutów mimo obecności klasycznych cech złośliwości. Jednocześnie wykazano, że wskaźniki proliferacyjne, takie jak Ki67, mogą nie być wystarczająco wiarygodne w ocenie biologicznego zachowania tego typu nowotworu – w prezentowanym przypadku Ki67 był całkowicie ujemny, pomimo obecności innych cech agresywności. Umiarkowana aktywność proliferacyjna, wykazana przez dodatnią ekspresję PCNA, sugeruje, że PCNA może lepiej odzwierciedlać lokalną aktywność proliferacyjną niż Ki67.

Uzyskane dane podkreślają znaczenie immunohistochemii jako podstawowego narzędzia diagnostycznego w różnicowaniu nowotworów rdzenia nadnerczy u psów oraz

konieczność dalszych badań nad identyfikacją wiarygodnych markerów prognostycznych. Opisany przypadek zwraca uwagę na potrzebę opracowania obiektywnych i niezależnych od obecności przerzutów kryteriów złośliwości nowotworu z komórek chromochłonnych. Powyższe badanie może pomóc ustawić wytyczne w zakresie klasyfikacji nowotworów nadnerczy oraz prawdopodobnie przyczynić się do poprawy planowania leczenia chirurgicznego i oceny rokowania u pacjentów weterynaryjnych.

Kolejne badanie obejmowało guzy z komórek Merkla u psów i kotów, które są rzadkimi nowotworami neuroendokrynnymi skóry, których pochodzenie pozostaje nie do końca poznane. U ludzi mają one charakter wysoce złośliwy, natomiast u zwierząt, szczególnie psów i kotów, wiedza na temat ich biologii, immunofenotypu i dynamiki wzrostu jest ograniczona. W diagnostyce różnicowej guzów okrągłokomórkowych niezbędne są techniki immunohistochemiczne, a potencjalne znaczenie markerów takich jak Ki67 czy metalotioneiny pozostaje przedmiotem badań. Ze względu na niespecyficzną morfologię i rzadkość występowania, guzy z komórek Merkla u psów i kotów są często błędnie diagnozowane.

Guzy u obu gatunków występowały w postaci śródskórnej masy zlokalizowanej w okolicy policzkowej. Guz u psa pochodził od 5-letniej, niekastrowanej suki mieszańca, natomiast guz u kota – od 13-letniego, wykastrowanego samca rasy europejskiej krótkowłosej.

U psa guz był nieotorebkowany, zlokalizowany głęboko w skórze i nie wykazywał naciekania naskórka ani przydatków skóry. Komórki były małe i otoczone gęstym zrębem włóknisto-naczyniowym, co potwierdzono barwieniem Mallory'ego. Jądra komórkowe były hiperchromatyczne, a średnia liczba figur mitotycznych wynosiła 7 w $2,37\text{ mm}^2$. Cytoplazma była eozynofilna i skąpa. Komórki nowotworowe wykazywały dodatnią, wysoką (około 80% komórek nowotworowych) cytoplazmatyczną, ziarnistą lub rozlaną ekspresję NSE oraz wysoką (90% komórek) okołojądrową ekspresję cytokeratyn AE1/AE3. Ekspresja CGA była nieobecna. Ekspresja metalotioneiny w cytoplazmie i błonie komórkowej była minimalna (około 15% komórek). Indeks Ki67 wynosił 7%.

U kota guz był nieotorebkowany, zlokalizowany głęboko w skórze i nie wykazywał naciekania naskórka ani mieszków włosowych. Składał się z monomorficznych komórek o okrągłym kształcie, ułożonych w pakiety, oddzielonych delikatnym zrębem włóknisto-naczyniowym (co potwierdzono barwieniem Mallory'ego). Jądra komórkowe były centralnie położone, okrągłe do owalnych, z równomiernie rozproszoną chromatyną i wyraźnie zaznaczoną błoną jądrową. Liczba figur mitotycznych wynosiła 56 w $2,37\text{ mm}^2$. Cytoplazma była blada, eozynofilna i umiarkowanie obfita. Komórki nowotworowe wykazywały wysoką (około 90% komórek nowotworowych) ziarnistą lub rozlaną ekspresję NSE w cytoplazmie,

wysoką (około 90% komórek) cytoplazmatyczną okołojądrową ekspresję cytokeratyn AE1/AE3 oraz brak ekspresji CGA. Ekspresja metalotioneiny w cytoplazmie i jądrze komórkowym była minimalna i stwierdzono ją w około 30% komórek nowotworowych. Indeks Ki67 wynosił 25%.

W przedstawionym badaniu opisano dwa rzadkie przypadki nowotworów z komórek Merkla – u psa i u kota – z zastosowaniem kompleksowej oceny histopatologicznej i immunohistochemicznej. U obu zwierząt nowotwory charakteryzowały się silną ekspresją NSE i cytokeratyny AE1/AE3, przy braku ekspresji chromograniny A, co potwierdza neuroektodermalne pochodzenie tych guzów i podważa przydatność CGA jako markera diagnostycznego. Wyraźne różnice w aktywności proliferacyjnej – niski indeks Ki67 i mitotyczny u psa vs. wysoki indeks Ki67 i znaczna liczba mitoz u kota – sugerują większy potencjał złośliwości w przypadku guza kociego. Ekspresja metalotioneiny w obu przypadkach była minimalna, co może odzwierciedlać ograniczoną rolę metalotioneiny w patogenezie tych nowotworów, w przeciwieństwie do innych guzów o wysokim stopniu złośliwości. Opisane różnice pomiędzy psim i kocim guzem z komórek Merkla wskazują na odmienne tempo wzrostu i potencjał biologiczny tych zmian. Praca ta stanowi pierwsze opracowanie oceniające ekspresję metalotioneiny w guzach z komórek Merkla u zwierząt, rozszerzając wiedzę na temat biologii tych rzadkich nowotworów i podkreślając konieczność stosowania paneli markerów immunohistochemicznych w diagnostyce guzów okrągłokomórkowych skóry u psów i kotów, gdzie rozpoznanie na podstawie obrazu morfologicznego bywa niewystarczające. Powyższe wyniki rozszerzają wiedzę na temat biologii tych rzadkich nowotworów, wykazujących odmienne tempo wzrostu i potencjał biologiczny pomiędzy gatunkami.

W kolejnych analizach skoncentrowałem się na pozaszpikowych plazmocytomach należących do grupy nowotworów wywodzących się z dojrzałych limfocytów B, produkujących immunoglobuliny. W celach diagnostycznych często wykonuje się barwienie immunohistochemiczne celem postawienia ostatecznego rozpoznania. Do badania wykorzystano następujące przeciwciała CD79α, CD18, metalotioneinę, PCNA. Wraz z badanymi tkankami wykonano kontrolę pozytywną oraz negatywną. Dotychczas brakowało danych dotyczących ekspresji metalotionein w pozaszpikowych plazmocytomach u zwierząt, mimo ich potencjalnej roli w regulacji proliferacji.

Badaniem objęto guzy skórne, jamy ustnej oraz śledziony pochodzące od 19 psów (mieszaniec n=14, rottweiler n=2, golden retriever n=1, beagle n=1, yorkshire terrier n=1) oraz 7 kotów (wszystkie rasy europejskiej krótkowłosej). Skrawki barwiono hematoksyliną i eozyną (HE) oraz błękitem toluidyny (w celu wykluczenia guzów z komórek tucznych). Guzy

histologicznie zaklasyfikowano jako typ: dojrzały (mature type), z wciętym jądrem (cleaved type), asynchroniczny (asynchronous type), polimorficzny blastyczny (polymorphous blastic type), monomorficzny blastyczny (monomorphous blastic type) i szklisty (hyaline type).

Obliczenia statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu Statistica, wersja 12.0 (Tulsa, OK, USA). Obliczono średnią wartość oraz odchylenie standardowe dla indeksu mitotycznego i PCNA. W celu oceny ekspresji metalotioneiny zastosowano półilościową skalę, która uwzględniała zarówno intensywność reakcji barwnej, jak i procent komórek pozytywnych. Zależności pomiędzy indeksem mitotycznym, wartością ekspresji metalotioneiny a indeksem PCNA oceniano za pomocą analizy korelacji rang Spearmana. Korelacje uznawano za statystycznie istotne przy poziomie istotności $p < 0,05$.

Oceniane guzy reprezentowały następujące typy morfologiczne: dojrzały (pies $n=4$; kot $n=2$), z wciętym jądrem (pies $n=3$; kot $n=2$), asynchroniczny (pies $n=2$; kot $n=2$), polimorficzny blastyczny (pies $n=4$; kot $n=1$), monomorficzny blastyczny (pies $n=5$) oraz szklisty (pies $n=1$). W typie dojrzałym komórki nowotworowe były okrągłe do owalnych, z minimalną anizocytozą i anizokariozą, z jądrami zlokalizowanymi ekscentrycznie i zbitą chromatyną o układzie „koła od wozu” (ang. „cartwheel”), przypominając morfologicznie dojrzałe komórki plazmatyczne. W guzach psów i kotów liczba figur mitotycznych mieściła się w zakresie 3–7 w $2,37 \text{ mm}^2$. Sporadycznie obserwowano komórki olbrzymie wielojądrzaste.

W typie z wciętym jądrem charakterystyczną cechą komórek nowotworowych były pofałdowane jądra oraz lekko eozynofilna cytoplazma. Komórki miały niewyraźne granice. Chromatyna była drobnoziarnista, a jąderka niewidoczne. W guzach psów i kotów liczba figur mitotycznych wynosiła od 4 do 18 w $2,37 \text{ mm}^2$. Komórki nowotworowe tworzyły różnej wielkości pakiety poprzedzielane tkanką łączną. Obecne były komórki olbrzymie wielojądrzaste.

W typie asynchronicznym obserwowano komórki blastyczne z ekscentrycznie położonym jądrem oraz centralnie zlokalizowanym jąderkiem. Obecna była obfita, zasadochłonna cytoplazma z okołojądrowym przejaśnieniem. W guzach psów i kotów liczba figur mitotycznych wynosiła od 5 do 10 w $2,37 \text{ mm}^2$. Podobnie jak w typie z wciętym jądrem komórkowym obecne były liczne komórki olbrzymie.

W typie polimorficznym blastycznym komórki nowotworowe wykazywały wyraźną anizocytozę, anizokariozę oraz polimorfizm. Komórki blastyczne były przemieszane z komórkami dojrzałymi. W guzach u psów liczba figur mitotycznych wynosiła od 12 do 35 w $2,37 \text{ mm}^2$, natomiast u kota – 16 w $2,37 \text{ mm}^2$. Komórki olbrzymie wielojądrzaste były powszechne; niektóre z nich zawierały nawet do 7 jąder komórkowych.

W typie monomorficznym blastycznym populacja komórkowa była jednorodna. Komórki nowotworowe były okrągłe do owalnych, zbliżone wielkością, z jasnym, obszernym jądrem i 1 do 3 jąderkami w każdej komórce. W guzach psów liczba figur mitotycznych wynosiła od 6 do 10 w $2,37 \text{ mm}^2$.

W typie szklistym charakterystyczną cechą komórek nowotworowych była obfita cytoplazma, półksiężycowate, ekscentrycznie położone jądra komórkowe oraz centralnie zlokalizowane, wyraźne jąderka (od 1 do 5 na komórkę). Liczba figur mitotycznych wynosiła 9 w $2,37 \text{ mm}^2$. W mięszu guza obserwowano nieliczne komórki olbrzymie.

Niezależnie od typu pozaszpikowej plazmocytomy, indeks mitotyczny różnił się w zależności od lokalizacji guza zarówno u psów, jak i kotów. U psów liczba figur mitotycznych w $2,37 \text{ mm}^2$ wynosiła od 5 do 35 w zmianach skórnych, od 3 do 9 w śledzionie oraz od 6 do 18 w zmianach jamy ustnej. W skórze obserwowano typy: asynchroniczny ($n=2$), polimorficzny blastyczny ($n=4$) oraz monomorficzny blastyczny ($n=5$). W śledzionie występowały typy: dojrzały ($n=4$) i szklisty ($n=1$). W jamie ustnej rozpoznano wyłącznie typ z wciętym jądrem komórkowym ($n=3$).

U kotów liczba figur mitotycznych w $2,37 \text{ mm}^2$ wynosiła od 8 do 16 w skórze, 5 w śledzionie oraz od 4 do 8 w jamie ustnej. W skórze stwierdzono obecność typów: asynchronicznego ($n=2$) i polimorficznego blastycznego ($n=1$). W śledzionie i jamie ustnej występował wyłącznie typ dojrzały ($n=2$), natomiast typ wciętym jądrem komórkowym ($n=2$) rozpoznano tylko w jamie ustnej.

U psów i kotów komórki pozaszpikowej plazmocytomy wykazywały silną, dodatnią cytoplazmatyczną ekspresję CD79 α . U psów około 80% komórek nowotworowych wykazywało wysoką cytoplazmatyczną ekspresję CD18 w guzach skórnych i śledzionowych; natomiast w guzach jamy ustnej ekspresja CD18 była nieobecna. Brak immunobarwienia CD18 w dodatknej kontroli tkanki kociej wskazuje, że zastosowane w badaniu przeciwciało anty-psie nie reaguje krzyżowo z antygenami kocimi.

Ekspresja PCNA w guzach zarówno psów, jak i kotów była zróżnicowana, lecz średnia wartość wynosiła około 30%. Ekspresja metalotioneiny w guzach u psów i kotów również była zmienna. Większość typów pozaszpikowej plazmocytomy u psów wykazywała niską ekspresję metalotioneiny, przy czym tylko jeden guz skórny typu polimorficznego blastycznego z okolicy klatki piersiowej wykazywał jej umiarkowaną ekspresję. Pozostałe guzy tego typu miały niską ekspresję. Jeden z guzów typu asynchronicznego pochodzący ze skóry okolicy pachowej nie wykazywał ekspresji metalotioneiny, natomiast drugi (skóra kończyny miednicznej) miał niską ekspresję.

U kotów niska ekspresja metalotioneiny została zaobserwowana w typie polimorficznym blastycznym (skóra) oraz typie dojrzałym (śledziona). W typach asynchronicznym (skóra), z wciętym jądrem oraz dojrzałym (śledziona i jama ustna) ekspresja metalotioneiny była nieobecna.

W guzach u psów stwierdzono istotną dodatnią korelację pomiędzy indeksem mitotycznym a wartością ekspresji metalotioneiny ($r=0,805$; $p=0,000$) oraz pomiędzy indeksem PCNA a wartością ekspresji metalotioneiny ($r=0,53$; $p=0,019$). Natomiast w guzach kotów nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy indeksem mitotycznym a wartością ekspresji metalotioneiny ($r=0,642$; $p=0,120$), ani pomiędzy indeksem PCNA a wartością ekspresji metalotioneiny ($r=0,531$; $p=0,618$).

W przeprowadzonym badaniu oceniono cechy morfologiczne oraz profil immunohistochemiczny pozaszpikowych plazmocytom u psów i kotów, uwzględniając różnorodność typów histologicznych, lokalizacji oraz ekspresji wybranych markerów: CD79 α , CD18, PCNA i metalotioneiny. Ustalono, że typy dojrzały, z wciętym jądrem, asynchroniczny oraz polimorficzny blastyczny mogą występować u obu gatunków. Dodatkowo, tylko u psów zidentyfikowano typy monomorficzny blastyczny oraz szklisty. Brak tych dwóch ostatnich typów pozaszpikowej plazmocytozy u kotów może wskazywać na ich rzadkie występowanie lub ich brak. Wyniki jednoznacznie potwierdziły wysoką przydatność CD79 α jako markeru diagnostycznego w przypadkach tego nowotworu u obu gatunków. Ekspresja CD18 była zmienna i ograniczona do wybranych lokalizacji u psów, co może mieć znaczenie różnicujące, natomiast u kotów nie została wykazana, prawdopodobnie z uwagi na brak reaktywności przeciwciała z antygenami kocimi.

Aktywność proliferacyjna, oceniana na podstawie indeksów PCNA i liczby figur podziału mitotycznego, była wyraźnie wyższa w zmianach skórnych i w jamie ustnej w porównaniu do guzów zlokalizowanych w śledzionie, co sugeruje ich wyższą aktywność proliferacyjną. Co istotne, u psów wykazano istotną dodatnią korelację pomiędzy ekspresją metalotioneiny, indeksem PCNA i indeksem mitotycznym, co sugeruje udział metalotioneiny w procesach proliferacyjnych. Taka zależność nie została potwierdzona u kotów, co może świadczyć o gatunkowo specyficznych różnicach w biologii pozaszpikowych plazmocytom.

Ekspresja metalotioneiny była na ogół niska u obu gatunków, a w niektórych typach histologicznych całkowicie nieobecna. Niemniej jednak, obserwacje dokonane u psów wskazują na możliwość wykorzystania metalotioneiny jako uzupełniającego markera aktywności nowotworu, szczególnie u psów. W przypadku kotów brak zależności pomiędzy ekspresją metalotioneiny a markerami proliferacyjnymi wymaga dalszych badań na większej

liczbie przypadków, również w celu potwierdzenia/wykluczenia występowania typów monomorficznego blastycznego i szklistego u tego gatunku.

Wnioski płynące z badania mają praktyczne implikacje kliniczne – wskazują na konieczność stosowania paneli markerów immunohistochemicznych w diagnostyce pozaszpikowych plazmocytom, z uwzględnieniem lokalizacji guza i jego typu histologicznego. U psów, dla których wykazano korelację między proliferacją a ekspresją metalotioniny, możliwe jest rozważenie jej wykorzystania jako uzupełniającego markera prognostycznego, co może znaleźć zastosowanie w ocenie rokowania oraz planowaniu leczenia.

Praca dostarcza danych dotyczących ekspresji metalotioniny w pozaszpikowych plazmocytomach u kotów, a także dokumentuje korelację metalotioniny z markerami proliferacyjnymi u psów. Badanie przyczynia się do zrozumienia różnic biologicznych i diagnostycznych pomiędzy opisanymi nowotworami u różnych gatunków oraz pokazuje możliwość wykorzystania metalotioniny jako markera prognostycznego w onkologii weterynaryjnej.

W mojej praktyce badawczej miałem również okazję opisać przypadek wewnątrzgałkowego chrzęstniakomięsaka u królika. W dostępnej literaturze nie znaleziono opisu podobnego przypadku w okulistyce weterynaryjnej. Nowotwory wewnątrzgałkowe u królików są niezwykle rzadkie, a ich rozpoznanie kliniczne i histopatologiczne stanowi poważne wyzwanie diagnostyczne. U kotów znany jest tzw. pourazowy mięsak wewnątrzgałkowy, jednak jego odpowiednik u królików nie został wcześniej opisany.

Celem badania była szczegółowa charakterystyka morfologiczna i immunohistochemiczna guza, z uwzględnieniem oceny potencjału proliferacyjnego komórek nowotworowych. Uzyskane wyniki dostarczają nowych danych dotyczących rzadkich nowotworów oka u zajęczaków i mogą mieć znaczenie zarówno diagnostyczne, jak i prognostyczne w praktyce weterynaryjnej.

Ośmioletnia samica królika miniaturowego rasy karzeł niderlandzki (*Oryctolagus cuniculus*), o masie ciała 1,81 kg, trafiła do przychodni weterynaryjnej z powodu wypływu z prawego oka oraz obecności ciemnej plamki o średnicy 2 mm na rogówce. Badanie okulistyczne wykazało obecność zapalenia błony naczyniowej, precypitatów białkowych w przedniej komorze oka oraz neowaskularyzację rogówki, odpowiadającą widocznej makroskopowo ciemnej plamce. Nie stwierdzono owrzodzenia rogówki, a lewe oko było prawidłowe. Ciśnienie wewnątrzgałkowe (IOP) prawego oka, mierzone tonometrem Schiøtza (Reister, Jungingen, Niemcy), było zbyt niskie, aby można je było zmierzyć, natomiast ciśnienie w oku lewym mieściło się w normie. Miano przeciwciał przeciwko *Encephalitozoon*

cuniculi w teście immunofluorescencji pośredniej wynosiło 1:80, co jest wartością wyższą od uznawanej za dodatnią (1:40). W chwili przyjęcia morfologia krwi wykazała łagodną neutrofilie, a stężenia kinazy kreatynowej (CK) i mocznika w osoczu były podwyższone.

W celu złagodzenia objawów stosowano miejscowo deksametazon (jedna kropla do prawego i lewego oka co 4 godziny, Dexamethason 0,1% WZF, Polfa, Warszawa, Polska), kwas tolfenamowy (6 mg doustnie co 24 godziny, Tolfedine, Vetoquinol Biowet Gorzów, Gorzów Wielkopolski, Polska) oraz fenbendazol (5 mg/kg doustnie co 24 godziny, Panacur AquaSol, Intervet, Boxmeer, Holandia). Ponieważ stan oka nie uległ poprawie, zostało ono usunięte chirurgicznie i przekazane do badania histopatologicznego.

Próbkę przekazano do laboratorium gdzie wykonano obróbkę histopatologiczną i barwiono skrawki hematoksyliną i eozyną (HE) oraz błękitem alcjanowym (pH 2,5). Badanie immunohistochemiczne wykonano z użyciem przeciwciał przeciwko cytokeratynie AE1/AE3, wimentynie i Ki67.

Histopatologicznie stwierdzono słabo odgraniczony nowotwór zlokalizowany w obrębie ciała rzęskowego, który naciekał naczyniówkę, komorę przednią oka i przednią część twardówki, ogniskowo rozprzestrzeniając się również pod spojówkę gałkową. Rogówka wykazywała umiarkowany naciek złożony z heterofili, komórek plazmatycznych i limfocytów; widoczna była wyraźna neowaskularyzacja. Komórki nowotworowe kształtu poligonalnego lub owalnego wykazujące znaczną anizocytozę i anizokariozę, o pleomorficznych jądrach komórkowych, zbitej chromatynie i dużych jąderkach w liczbie 1-3 tworzyły pojedyncze lub różnej wielkości skupiska chaotycznie rozmieszczonych jamek chrzęstnych. W polu widzenia przy powiększeniu $\times 400$ obserwowano od jednej do dwóch figur mitotycznych. Stwierdzano pojedyncze komórki z makronukleozą oraz komórki olbrzymie wielojądrzaste. Cytoplazma komórek nowotworowych była obfita i lekko zasadochłonna. Zrąb nowotworu był skąpy, słabo unaczyniony, zawierał hemosyderofagi i był bogaty w mucyny o niskiej kwasowości, co potwierdzono barwieniem błękitem alcjanowym. Komórki nowotworowe wykazywały ekspresję wimentyny, natomiast nie wykazywały ekspresji cytokeratyny AE1/AE3. Obliczony indeks Ki67 wynosił 5,5%. Opisane cechy histopatologiczne i immunohistochemiczne wskazywały na chrzęstniakomięsaka wewnątrzgałkowego. Trzy dni po zabiegu chirurgicznym królik stał się apatyczny i przestał przyjmować pokarm; stwierdzono podwyższone stężenia mocznika i kreatyniny w osoczu oraz zwiększoną aktywność aminotransferazy alaninowej (ALT), aminotransferazy asparaginianowej (AST) i kinazy kreatynowej (CK). Siedem dni po operacji pojawiła się nagła duszność. Badanie ultrasonograficzne klatki piersiowej wykazało obecność płynu w jamie opłucnej oraz cieniującej masy o średnicy około 3,3 cm w prawym

tylnym płacie płuca. Zwierzę zostało poddane eutanazji miesiąc po enukleacji z powodu nasilającej się duszności i niepomysłnego rokowania. Właściciel nie wyraził zgody na wykonanie sekcji zwłok.

Przedstawione badanie opisuje przypadek chrzęstniakomięsaka wewnątrzgałkowego u królika, dokumentując jego cechy kliniczne, histopatologiczne oraz immunohistochemiczne. Nowotwór wywodził się z ciała rzęskowego i naciekał sąsiednie struktury oka. W badaniu immunohistochemicznym komórki nowotworowe wykazywały ekspresję wimentyny, natomiast nie wykazywały ekspresji cytokeratyny AE1/AE3, co potwierdza ich mezenchymalne pochodzenie. Obliczony indeks Ki67 wynosił 5,5%, co w klasyfikacji ludzkiej odpowiada I stopniowi złośliwości. Mimo, że nie wykonano sekcji zwłok, nagłe pogorszenie stanu klinicznego zwierzęcia, obecność duszności oraz cieniująca masa w płucu sugerują możliwość przerzutu, choć nie zostało to potwierdzone histopatologicznie. Opisywane cechy odpowiadają również przypadkom chrzęstniakomięsaka wewnątrzgałkowego u kotów, w których przerzuty do płuc i klatki piersiowej były opisywane.

W badaniu nie wykazano obecności organizmów *Encephalitozoon cuniculi*, jednak dodatni wynik serologiczny w teście immunofluorescencji pośredniej oraz wcześniejsze leczenie przeciwpasożytnicze mogą wskazywać na przebytą infekcję. W związku z tym przewlekły stan zapalny spowodowany przez *Encephalitozoon cuniculi* mógł stanowić potencjalny czynnik predisponujący do rozwoju nowotworu, co jest zgodne z hipotezami dotyczącymi mechanizmu powstawania mięsaka pourazowego.

Opisany przypadek poszerza diagnostykę różnicową chorób gałki ocznej u królików, w tym w sytuacjach, gdy obecne są objawy takie jak zapalenie błony naczyniowej, neowaskularyzacja, precypitaty białkowe w komorze przedniej czy przewlekły wypływ z oka. Dotychczas objawy te przypisywano głównie zapaleniom na tle infekcyjnym, np. zakażeniom *Encephalitozoon cuniculi* lub *Pasteurella multocida*, tymczasem mogą one również wskazywać na rozwijający się nowotwór złośliwy. Rozpoznanie chrzęstniakomięsaka wymaga użycia metod specjalistycznych, w tym oceny histopatologicznej oraz immunohistochemicznej.

Przedstawiony przypadek zwraca uwagę na potrzebę poszerzania diagnostyki różnicowej u królików z przewlekłymi objawami okulistycznymi oraz stanowi punkt wyjścia do dalszych badań nad patogenezą i potencjałem przerzutowym nowotworów wewnątrzgałkowych u zajęczaków. Powyższe badanie otwiera nowy kierunek badań nad wpływem procesów zapalnych na onkogenezę u zwierząt.

Powyższe wyniki badań mogą mieć zastosowanie praktyczne. Wnoszą nowe informacje do praktyki diagnostycznej, podkreślając możliwość stosowania technik

immunohistochemicznych w przypadkach nowotworów o niespecyficznej morfologii. Jednocześnie dostarczają narzędzi pomocnych w prognozowaniu przebiegu choroby, umożliwiając trafniejszy dobór strategii terapeutycznej – od leczenia radykalnego po zachowawcze. Wiedza dotycząca markerów takich jak Ki67 czy metalotioneina znajduje zastosowanie w codziennej opiece onkologicznej nad zwierzętami i przyczynia się do rozwoju weterynaryjnej patomorfologii nowotworów.

4.4.2.1. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia wraz z informacją o wkładzie wnioskodawcy w prowadzeniu badań naukowych opisanych w poszczególnych publikacjach, jak i w powstanie tych publikacji.

Mikiewicz Mateusz*, Otrocka-Domagała Iwona, Gesek Michał, Paździor-Czapula Katarzyna, Rotkiewicz Tadeusz. *Immunohistochemical and histopathological evaluation of malignant pheochromocytoma: a case study*. Med. Weter. 2015;71:453-457.

Punktacja MNiSW₂₀₁₅ = 15; IF₂₀₁₅ = 0,195

Mój wkład w powstanie w tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 53%.

Mikiewicz Mateusz*, Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Mikołajczyk Anna, Blacha Agnieszka. *Immunohistochemical evaluation of canine and feline Merkel cell tumors - a report of two cases*. Turk J Vet Anim Sci. 2016;40:124-129.

DOI: 10.3906/vet-1505-65

Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 15; IF₂₀₁₆ = 0,449

Mój wkład w powstanie w tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 53%.

Mikiewicz Mateusz*, Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał. *Morphology and immunoreactivity of canine and feline extramedullary plasmacytomas*. Pol. J. Vet. Sci. 2016;19:345-352.

DOI: 10.1515/pjvs-2016-0042

Punktacja MNiSW₂₀₁₆ = 20; IF₂₀₁₆ = 0,697

Mój wkład w powstanie w tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników,

sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

Mikiewicz Mateusz, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Dziubińska-Bartylak Paula, Otrocka-Domagała Iwona*. *Intraocular chondrosarcoma in a rabbit*. J Comp Pathol. 2020;179:41-44.

DOI: 10.1016/j.jcpa.2020.06.013

Punktacja MNiSW₂₀₂₀ = 100; IF₂₀₂₀ = 1,311

Mój wkład w powstanie w tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 60%.

*autor korespondencyjny

4.5. Osiągnięcia naukowe przedstawione w rozprawie doktorskiej

W ramach rozprawy doktorskiej skoncentrowałem się na kompleksowej ocenie wpływu długotrwałego podawania deksametazonu oraz simwastatyny na komórki wątrobowe, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów zaburzeń proliferacyjnych i apoptotycznych. Głównym celem badań było zidentyfikowanie różnic w odpowiedzi hepatocytów na leki o odmiennym mechanizmie działania oraz określenie potencjalnych markerów molekularnych, które mogą odzwierciedlać stopień uszkodzenia komórek wątrobowych.

Badania przeprowadziłem na zaprojektowanym modelu zwierzęcym, obejmującym 72 loszki rasy Wielka Biała Polska, w wieku trzech miesięcy. Zwierzęta zostały podzielone na trzy grupy: kontrolną, otrzymującą domięśniowo deksametazon oraz otrzymującą doustnie simwastatinę. Po 29 dniach stosowania leków wykonano sekcję zwierząt oraz pobrano próbki wątroby do badań histologicznych, histochemicznych (HE, PAS wg McManusa, Van Gieson'a, Feulgena i Plotona) oraz immunohistochemicznych, obejmujących ocenę ekspresji PCNA, Bcl-2, kaspazy-3 oraz analizę metodą TUNEL.

W badaniu wykazałem, że podawanie deksametazonu prowadzi do wystąpienia zmian wstecznych w postaci zwyrodnień glikogenowych, mięsaszowych i tłuszczowych hepatocytów, a także ogniskowej martwicy i przekrwienia naczyń. Jednocześnie obserwowano obniżenie wskaźników proliferacji komórkowej (PCNA, AgNORs, pAgNORs) oraz wzrost poziomu białka Bcl-2, co może świadczyć o aktywacji mechanizmów chroniących hepatocyty przed apoptozą.

Z kolei simwastatyna wywoływała zwyrodnienie mięsaszowe, spadek zawartości glikogenu w hepatocytach oraz proliferację hepatocytów w formie bezosiowych

pseudozrazików, otoczonych tkanką łączną i naciekiem eozynofilowym – zmiany mogące sugerować reakcję nadwrażliwości. W tej grupie zaobserwowałem znaczące obniżenie ekspresji markerów proliferacji oraz istotny wzrost ekspresji kaspazy-3 i indeksu apoptozy, co potwierdza proapoptotyczny efekt działania simwastatyny.

Uzyskane wyniki stanowią oryginalny wkład w rozwój wiedzy na temat toksyczności leków powszechnie stosowanych zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej. Badanie ujawniło istotne różnice w odpowiedzi hepatocytów na poszczególne substancje i wskazało na potencjalne zastosowanie markerów takich jak Bcl-2 i kaspaza-3 w ocenie ryzyka hepatotoksyczności. Wnioski płynące z rozprawy mają nie tylko wartość poznawczą, ale również praktyczne znaczenie dla oceny bezpieczeństwa farmakoterapii oraz wczesnego wykrywania uszkodzeń wątroby w przebiegu leczenia glikokortykosteroidami i statynami.

Artykuły naukowe wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

Mikiewicz Mateusz*, Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, Rotkiewicz Tadeusz. Influence of long-term, high-dose dexamethasone administration on proliferation and apoptosis in porcine hepatocytes. Vet. Sci. Res. 2017;112:141-148.

DOI: 10.1016/j.rvsc.2017.03.018

Punktacja MNiSW₂₀₁₇: 35; IF₂₀₁₇: 1,616

Mikiewicz Mateusz*, Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna. Influence of simvastatin on hepatocytes - histopathological and immunohistochemical study. Pol. J. Vet. Sci. 2019;22:263-270.

DOI: 10.24425/pjvs.2019.127095

Punktacja MNiSW₂₀₁₉: 100; IF₂₀₁₉: 0,516

*autor korespondencyjny

5. Pozostała aktywność naukowa

5.1. Wpływ wybranych dodatków paszowych i warunków środowiskowych na rozwój oraz zdrowie ryb słodkowodnych w kontekście akwakultury i ochrony gatunkowej

W ramach mojej aktywności naukowej zrealizowałem cykl badań poświęconych ocenie wpływu wybranych dodatków paszowych oraz czynników środowiskowych na wzrost, przeżywalność, morfologię tkanek i ogólną kondycję fizjologiczną ryb słodkowodnych, szczególnie istotnych z punktu widzenia nowoczesnej akwakultury oraz programów restytucyjnych. Celem prowadzonych prac było dostarczenie danych, które nie tylko wzbogacają wiedzę z zakresu biologii i patologii ryb, ale również mają wymierne znaczenie praktyczne w doskonaleniu metod hodowlanych i ochronnych.

W jednym z projektów, którego byłem współautorem, wykazałem, że dodatek pyłku pszczelego do paszy dla młodych osobników suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*) znacząco poprawiał tempo wzrostu, modyfikował korzystnie skład mikroflory jelitowej oraz sprzyjał prawidłowemu rozwojowi struktur histologicznych przewodu pokarmowego. W kolejnym badaniu, skoncentrowanym na larwach brzany (*Barbus barbus*), udokumentowano pozytywny wpływ suplementacji larw *Artemia* sp. wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi na rozwój somatyczny oraz funkcje odpornościowe ryb, co potwierdzono analizami hematologicznymi i histomorfologicznymi.

Odrębny projekt dotyczył wpływu kwasu kynureninowego – związku o potencjalnym działaniu immunomodulującym – na pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) w warunkach eksperymentalnego zakażenia *Yersinia ruckeri*. Przeprowadzone analizy wykazały, że podawanie kwasu nasilało reakcję zapalną w narządach mięsnych, co może mieć znaczenie dla bezpieczeństwa jego stosowania w warunkach stresu immunologicznego.

Równolegle zaangażowałem się w badania nad fizjologią i histogenezą układu rozrodczego minoga rzeczno (*Lampetra fluviatilis*), stanowiącego gatunek chroniony. Przeprowadzone przeze mnie analizy histologiczne i histochemiczne pozwoliły na szczegółowe scharakteryzowanie zmian morfologicznych i endokrynnych zachodzących w toku dojrzewania płciowego. Uzyskane wyniki dostarczyły cennych informacji wspierających działania z zakresu biologii rozrodu i ochrony populacyjnej tego cennego gatunku.

Wszystkie opisane projekty łączy interdyscyplinarne podejście, łączące elementy histopatologii, fizjologii, immunologii i praktyki hodowlanej. Rezultaty badań wnoszą wkład w rozwój akwakultury i ochrony ryb słodkowodnych, a jednocześnie wyznaczają nowe kierunki dla wdrażania rozwiązań poprawiających dobrostan i zdrowotność ryb w warunkach chowu intensywnego i restytucji środowiskowej.

Efektom opisanych badań jest współautorstwo w następujących pracach oryginalnych oraz doniesienia konferencyjne:

Kaczorek Edyta, Szarek Józef, **Mikiewicz Mateusz**, Terech-Majewska Elżbieta, Schulz Patrycja, Małaczewska Joanna, Wójcik Roman M., Siwicki Andrzej K. Effect of feed supplementation with kynurenic acid on the morphology of the liver, kidney and gills in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), healthy and experimentally infected with *Yersinia ruckeri*. J. Fish Dis. 2017;40:873-884.

DOI: 10.1111/jfd.12567

Punktacja MNiSW₂₀₁₇: 35; IF₂₀₁₇: 2,004

Prusińska Maja, Nowosad Joanna, Jarmołowicz Sylwia, **Mikiewicz Mateusz**, Duda Arkadiusz, Wiszniewski Grzegorz, Sikora Mateusz, Biegaj Mateusz, Samselska Agnieszka, Arciuch-Rutkowska Martyna, Targońska Katarzyna, Otrocka-Domagala Iwona, Kucharczyk Dariusz. Effect of feeding barbel larvae (*Barbus barbus* (L, 1758)) *Artemia* sp. nauplii enriched with PUFAs on their growth and survival rate, blood composition, alimentary tract histological structure and body chemical composition. Aquac. Rep. 2020;18:1-8.

DOI: 10.1016/j.aqrep.2020.100492

Punktacja MNiSW₂₀₂₀: 100; IF₂₀₂₀: 3,216

Nowosad Joanna, Jasiński Szymon, Arciuch-Rutkowska Martyna, Abdel-Latif Hany M.R., Wróbel Marcin, **Mikiewicz Mateusz**, Zielonka Łukasz, Kotsyumbas Ihor Y., Muzyka Victor P., Brezvyň Oksana M., Dietrich Grzegorz, Kucharczyk Dariusz. Effects of Bee Pollen on Growth Performance, Intestinal Microbiota and Histomorphometry in African Catfish. Animals. 2023;13: 1-16.

DOI: 10.3390/ani13010132

Punktacja MNiSW₂₀₂₃: 100; IF₂₀₂₃: 2,7

Nowosad Joanna, Kujawa Roman, Sherzada Shahid, Kucharczyk Dariusz, **Mikiewicz Mateusz**, Dryl Katarzyna, Kapusta Andrzej, Łuczyńska Joanna, Abdel-Latif Hany M.R. Histomorphological and Dynamical Changes in Female River Lampreys during Maturation under Controlled Conditions as a Part of Lamprey Restoration Programs. Animals. 2024;17:1-14.

DOI: 10.3390/ani14172516

Punktacja MNiSW₂₀₂₄: 100; IF₂₀₂₄: 2.7

Kaczorek Edyta, Terech-Majewska Elżbieta, Szarek Józef, **Mikiewicz Mateusz**, Schulz Patrycja, Małaczewska Joanna, Wójcik Roman M., Pajdak Joanna, Siwicki Andrzej K. The influence of feed supplementation with kynurenine acid (KYNA) on the gills in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected experimentally with *Yersinia ruckeri*. J. Comp. Pathol. 2017;156:93. 34th ESVP Meeting of the European Society of Veterinary Pathology: 27th ECVF Meeting of the European College of Veterinary Pathology: Bologna (Italy), September 7th-10th, 2016

DOI: 10.1016/j.jcpa.2016.11.120

Kaczorek Edyta, Terech-Majewska Elżbieta, Szarek Józef, **Mikiewicz Mateusz**, Schulz Patrycja, Małaczewska Joanna, Wójcik Roman M., Siwicki Andrzej K. Ocena wpływu suplementacji paszy kwasem kynureinowym na obraz histopatologiczny wątroby u pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) przed oraz po zakażeniu eksperymentalnym *Yersinia*

ruckeri. ANG. Influence of dietary administration of kynurenic acid on the morphological evaluation of the liver in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after experimental trial with *Yersinia ruckeri*. XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych: Lublin, 22-24 września 2016: Per scientiam ad salutem animalium et hominum: materiały kongresowe. Lublin, Wydawnictwo MORPOL s.c., 2016;166.

5.2. Charakterystyka nowotworów i zmian nowotworopodobnych u małych ssaków domowych

W ramach mojej działalności naukowej brałem aktywny udział w badaniach poświęconych identyfikacji oraz szczegółowej charakterystyce nowotworów i zmian nowotworopodobnych występujących u małych ssaków towarzyszących, takich jak świnki morskie, króliki, szczury i chomiki. Prace te stanowiły wkład w rozwój weterynaryjnej onkologii zwierząt egzotycznych, obszaru wciąż relatywnie słabo poznanego, a jednocześnie rosnącego w znaczeniu klinicznym.

Część badań miała charakter kazuistyczny i obejmowała opracowanie rzadkich przypadków klinicznych, takich jak gruczolak ślinianki podżuchwowej, nasieniak jądra czy torbielowatość jajników współistniejąca z mięśniakiem macicy u swinek morskich. Opisy te, oparte na analizie histopatologicznej i immunohistochemicznej, poszerzają wiedzę diagnostyczną i wskazują na konieczność indywidualnego podejścia do przypadków onkologicznych u tych gatunków.

Uzupełnieniem działań kazuistycznych były szeroko zakrojone, retrospektywne analizy materiału nowotworowego obejmujące guzy skóry i tkanki podskórnej, a także zmiany nowotworowe i nowotworopodobne gruczołu mlekowego oraz układu rozrodczego. Dzięki wykorzystaniu metod mikroskopowych i immunohistochemicznych udało się określić nie tylko częstość występowania poszczególnych typów nowotworów i ich lokalizację, lecz także scharakteryzować cechy histologiczne zmian z uwzględnieniem ich zróżnicowania gatunkowego i płciowego.

Rezultaty badań mają bezpośrednie przełożenie na poprawę jakości opieki weterynaryjnej nad małymi ssakami towarzyszącymi oraz wyznaczają kierunki dalszych badań w zakresie patologii nowotworów u gatunków nieudomowionych.

Efektem opisanych badań jest współautorstwo w następujących pracach oryginalnych oraz doniesienie konferencyjne:

Przyborowska Paulina, Kołodziejska-Sawerska Anna, **Mikiewicz Mateusz**. Przypadek gruczolaka ślinianki podżuchwowej u świnki morskiej. ANG A case of submandibular salivary gland adenoma in a guinea pig. Weterynaria 2014;7-8:46-50.

Przyborowska Paulina, Kołodziejska-Sawerska Anna, **Mikiewicz Mateusz**, Szcześniak Anna. Przypadek nasieniaka jądra u świnki morskiej. ANG. Case of testicular seminoma in guinea pig. Weterynaria 2014;10:30-34.

Przyborowska Paulina, Kołodziejska-Sawerska Anna, **Mikiewicz Mateusz**. Przypadek torbielowatości jajników i mięśniaka gładkokomórkowego macicy u świnki morskiej. ANG Case of polycystic ovarian disease and leiomyoma in guinea pig. Weterynaria 2014;6:56-63.

Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, Fiedorowicz Joanna, **Mikiewicz Mateusz**, Piotrowska Agnieszka, Gesek Michał. Cutaneous and subcutaneous tumours of small pet mammal - retrospective study of 256 cases (2014-2021). Animals. 2022;12:1-16.

DOI: 10.3390/ani12080965

Punktacja MNiSW₂₀₂₂: 100; IF₂₀₂₂: 3

Paździor-Czapula Katarzyna, **Mikiewicz Mateusz**, Fiedorowicz Joanna, Otrocka-Domagała Iwona. Mammary and reproductive tract tumours and tumour-like lesions of 286 small pet mammals: a retrospective study. J. Comp. Pathol. 2024;213: 46-58.

DOI: 10.1016/j.jcpa.2024.07.002

Punktacja MNiSW₂₀₂₄: 100; IF₂₀₂₄: 0.8

Otrocka-Domagała Iwona, **Mikiewicz Mateusz**, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał. Extrasketal myxoid-type chondrosarcoma in a rat. J. Comp. Pathol. 2019;166:148. The 3rd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, 35th Meeting of the ESVP, 15th Meeting of the ESTP, 28th Meeting of the ECVP. 30th August - 2nd September 2017, Lyon, France.

DOI: 10.1016/j.jcpa.2018.10.159

5.3. Immunologiczne i zapalne mechanizmy objawów systemowych w chorobach reumatycznych

W ramach współpracy z Kliniką Reumatologii Collegium Medicum Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie uczestniczyłem w interdyscyplinarnych badaniach łączących elementy reumatologii klinicznej, immunologii i patomorfologii. Działania te umożliwiły mi bezpośrednie zaangażowanie w projekty o wartości poznawczej, których wyniki poszerzają rozumienie mechanizmów ogólnoustrojowych powikłań chorób autoimmunizacyjnych.

Jednym z opracowanych projektów był opis rzadkiego i ciężkiego powikłania toczenia rumieniowatego układowego (SLE) – ostrej niewydolności serca w przebiegu zespołu aktywacji makrofagów (MAS). Przeprowadzono wszechstronną analizę kliniczną, patomorfologiczną i immunologiczną przypadku, ze szczególnym uwzględnieniem roli

makrofagów, cytokin prozapalnych (w tym IL-1, IL-6, IFN- γ) oraz szlaków sygnałowych w patogenezie MAS i kardiomiopatii zapalnej. Wyniki tego badania podkreśliły znaczenie czujności klinicznej w rozpoznawaniu atypowych manifestacji zespołu aktywacji makrofagów oraz potrzebę szerszego uwzględnienia badań histopatologicznych serca w ocenie przypadków o ostrym przebiegu.

Druga praca, w której brałem udział, miała charakter przeglądowy i koncentrowała się na mechanizmach zmęczenia w przebiegu zapalnych chorób stawów, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), zeszytniające zapalenie stawów kręgosłupa oraz łuszcycowe zapalenie stawów. Opracowanie to przedstawia aktualny stan wiedzy na temat roli cytokin zapalnych, aktywacji mikrogleju, zaburzeń funkcjonowania bariery krew-mózg oraz deregulacji układów serotoninergetycznego i dopaminergicznego w patogenezie przewlekłego zmęczenia. Szczególny nacisk położono również na ocenę skuteczności terapii biologicznych oraz ich wpływ na poprawę jakości życia pacjentów.

Efektom opisanych badań jest współautorstwo w następujących pracach oryginalnych: Kuna Jakub, Chmielewski Grzegorz, Gruchała Marcin, **Mikiewicz Mateusz**, Ręcki Przemysław, Krajewska-Włodarczyk Magdalena. Fatal Acute Heart Failure in the Course of Macrophage Activation Syndrome: Case Report and Literature Review. *J. Clin. Med.* 2022;14:1-9.

DOI: 10.3390/jcm11144208

Punktacja MNiSW₂₀₂₂: 140; IF₂₀₂₂: 3.9

Chmielewski Grzegorz, Majewski Michał S., Kuna Jakub, **Mikiewicz Mateusz**, Krajewska-Włodarczyk Magdalena. Fatigue in Inflammatory Joint Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24:1-16.

DOI: 10.3390/ijms241512040

Punktacja MNiSW₂₀₂₃: 140; IF₂₀₂₃: 4,9

5.4. Diagnostyka zmian nowotworowych i nienowotworowych różnych gatunków zwierząt

W ramach mojej działalności zawodowej i naukowej jako patomorfologa diagnostycznego brałem udział w szerokim zakresie badań obejmujących przypadki nowotworowe i inne jednostki chorobowe występujące u zwierząt towarzyszących, egzotycznych i gospodarskich. Udział w tych projektach pozwolił mi na rozwinięcie umiejętności w zakresie oceny zmian histopatologicznych i immunohistochemicznych w zróżnicowanym materiale biologicznym, a także na współtworzenie publikacji istotnych z punktu widzenia weterynaryjnej diagnostyki klinicznej i eksperymentalnej.

Szczególną grupę stanowiły badania nad nowotworami psów. Uczestniczyłem m.in. w opracowaniu przypadku agresywnego mięsaka prążkowanokomórkowego z zajęciem skóry i obecnością licznych przerzutów narządowych oraz opisie mięsaka Kaposiego z nietypową lokalizacją w sercu i jamie brzusznej. W kolejnych projektach skupiono się na guzach gruczołów apokrynowych, w tym również na ocenie ekspresji mutacji genu p53, co pozwoliło na postawienie hipotezy o związku patogenezy tych nowotworów z ekspozycją na promieniowanie UV.

Uzupełnieniem tego nurtu była retrospektywna analiza 60 guzów okrągłokomórkowych skóry psów z zastosowaniem rozszerzonego panelu przeciwciał immunohistochemicznych, co pozwoliło na doprecyzowanie rozpoznań histopatologicznych i opracowanie przydatnego w praktyce schematu różnicowania. Uczestniczyłem również w badaniu przypadków podskórnej dirofilariozy u psów, gdzie wykazano nie tylko nietypowe lokalizacje pasożytów, ale także obecność mikrofilarii *Dirofilaria repens* w płynach wysiękowych jam ciała, co miało znaczenie diagnostyczne i epidemiologiczne.

Zakres moich zainteresowań obejmował także schorzenia układu rozrodczego u koni. W ramach jednego z projektów współuczestniczyłem w opracowaniu analizy przypadków niepłodności klaczy z wykorzystaniem biopsji endometrium. W badaniu zastosowano klasyfikację zmian wg Kenney-Doig'a, oceniając zmiany zapalne, włóknienie oraz zaburzenia struktury błony śluzowej macicy. Wyniki podkreśliły wysoką wartość diagnostyczną tej metody oraz jej przydatność w rokowaniu płodności klaczy w warunkach hodowli.

Efekty tych prac przyczyniają się do poprawy standardów diagnostyki weterynaryjnej oraz poszerzają wiedzę na temat rzadkich i trudnych w rozpoznaniu przypadków klinicznych.

Efektom opisanych badań jest współautorstwo w następujących pracach oryginalnych i doniesień konferencyjnych:

Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagała Iwona, Gesek Michał, **Mikiewicz Mateusz**, Rotkiewicz Tadeusz. Guzy histiocytarne u psów i kotów. ANG. Canine and feline histiocytic neoplasia. Weterynaria w Praktyce 2014;11;89-93.

Punktacja MNiSW₂₀₁₄: 3

Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Koda Mariusz, **Mikiewicz Mateusz**, Mikołajczyk Anna. Aggressive, solid variant of alveolar rhabdomyosarcoma with cutaneous involvement in a juvenile Labrador Retriever. J. Comp. Pathol. 2015;152:177-181.

DOI: 10.1016/j.jcpa.2014.11.004

Punktacja MNiSW₂₀₁₅: 25; IF₂₀₁₅: 1,173

Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagała Iwona, Gesek Michał, **Mikiewicz Mateusz**, Rotkiewicz Tadeusz, Mikulska-Skupień Elżbieta. Kaposi-like vascular tumor of the cardiac muscle in a dog: morphological and immunohistochemical study. Med. Weter. 2015;71:513-517.

Punktacja MNiSW₂₀₁₅: 15; IF₂₀₁₅: 0,195

Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagała Iwona, Gesek Michał, **Mikiewicz Mateusz**, Rapacz-Leonard Anna. Biopsja i ocena histopatologiczna endometrium w diagnostyce niepłodności u klaczy. ANG. The endometrial biopsy and histopathological evaluation as diagnostic procedure for mare infertility. Życie Weterynaryjne. 2016;91:435-439.

Punktacja MNiSW₂₀₁₆: 4

Kycko Anna, Jasik Agnieszka, Bocian Łukasz, Otrocka-Domagała Iwona, **Mikiewicz Mateusz**, Śmiech Anna, Łopuszyński Wojciech, Dolka Izabella, Nowak Marcin, Madej Janusz. Epidemiological and histopathological analysis of 40 apocrine sweat gland carcinomas in dogs: a retrospective study. J. Vet. Res. 2016;60:331-337.

DOI: 10.1515/jvetres-2016-0050

Punktacja MNiSW₂₀₁₆: 15

Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagała Iwona, Myrdek Patrycja, **Mikiewicz Mateusz**, Gesek Michał. Dirofilaria repens - an etiological factor or an incidental finding in cytologic and histopathologic biopsies from dogs. Vet. Clin. Pathol. 2018;47:307-311.

DOI: 10.1111/vcp.12597

Punktacja MNiSW₂₀₁₈: 35; IF₂₀₁₈: 0,937

Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagała Iwona, Gesek Michał, **Mikiewicz Mateusz**. Canine oral cavity T-cell lymphoma- histopathological and immunohistochemical study. Med. Weter. 2018;74:70-72.

DOI: 10.21521/mw.5826

Punktacja MNiSW₂₀₁₈: 15; IF₂₀₁₈: 0,197

Paździor-Czapula Katarzyna, **Mikiewicz Mateusz**, Gesek Michał, Zwoliński Cezary, Otrocka-Domagała Iwona. Diagnostic immunohistochemistry for canine cutaneous round cell tumours - retrospective analysis of 60 cases. Folia Histochem Cytobiol. 2019;57:146-154.

DOI: 10.5603/FHC.a2019.0016

Punktacja MNiSW₂₀₁₉: 70; IF₂₀₁₉: 0,854

Jasik Agnieszka, Kycko Anna, Olech Monika, Wyrostek Krzysztof, Śmiech Anna, Łopuszyński Wojciech, Otrocka-Domagała Iwona, **Mikiewicz Mateusz**, Dolka Izabella. Mutations of p53 gene in canine sweat gland carcinomas probably associated with UV radiation. J. Vet. Res.

2021;65:519-526.

DOI: 10.2478/jvetres-2021-0070

Punktacja MNiSW₂₀₂₁: 140; IF₂₀₂₁: 2,058

Otrocka-Domagała Iwona, Paździor Katarzyna, Gesek Michał, **Mikiewicz Mateusz**, Rotkiewicz Tadeusz. Immunophenotype of neoplastic and bystander cells in canine cutaneous mast cell tumours (CCMCTS). J. Comp. Pathol. 2014;150:106. The 31st Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the Annual Meeting of the European College of Veterinary Pathologists, , 5-7th September, 2013, London, United Kingdom

DOI: 10.1016/j.jcpa.2013.11.128

Otrocka-Domagała Iwona, Rękawek Wojciech, Paździor Katarzyna, Gesek Michał, **Mikiewicz Mateusz**, Rotkiewicz Tadeusz. Congenital cardiac rhabdomyosarcoma in a calf. J. Comp. Pathol. 2014; 150:107. The 31st Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the Annual Meeting of the European College of Veterinary Pathologists, 5-7th September, 2013, London, United Kingdom.

DOI: 10.1016/j.jcpa.2013.11.129

Pajdak Joanna, **Mikiewicz Mateusz**, Schulz Patrycja, Kaczorek Edyta, Terech-Majewska Elżbieta. Histopathological lesions associated with metabolic bone disease (MBD) in the central bearded dragon (*Pogona vitticeps*). J. Comp. Pathol. 2016;154:97. The 33rd Annual Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the 26th Annual Meeting of the European College of Veterinary Pathologists, 2nd-5th September 2015, Helsinki, Finland.

DOI: 10.1016/j.jcpa.2015.10.098

Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagała Iwona, Gesek Michał, **Mikiewicz Mateusz**, Pawlik Marek. Expression of Ki67 in canine cutaneous histiocytoma. J. Comp. Pathol. 2019;166:123. The 3rd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, 35th Meeting of the ESVP, 15th Meeting of the ESTP, 28th Meeting of the ECVP. 30th August - 2nd September 2017, Lyon, France.

DOI: 10.1016/j.jcpa.2018.10.072

Durska M., Paździor-Czapula K., **Mikiewicz M.**, Szadurska-Noga M., Otrocka-Domagała I. Choriocarcinoma in a cat – a case study. XVII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych „Sanitas animalium pro salute homini”, 19-21.09.2024, Olsztyn, Polska.

5.5. Wpływ czynników środowiskowych i zakaźnych na strukturę i funkcję narządów wewnętrznych ptaków

W ramach prowadzonej przeze mnie działalności naukowej uczestniczyłem również w projektach badawczych poświęconych ocenie wpływu czynników środowiskowych,

żywieniowych i infekcyjnych na morfologię oraz funkcję narządów wewnętrznych ptaków, w szczególności układu pokarmowego i sercowo-naczyniowego. Celem tych prac było nie tylko poznanie patofizjologii zmian narządowych w intensywnym chowie, ale również poszukiwanie rozwiązań mogących poprawić zdrowotność i dobrostan ptaków w warunkach przemysłowych.

W jednym z projektów oceniono skuteczność suplementacji efektywnymi mikroorganizmami (EM) u przepiórek japońskich (*Coturnix japonica*) poddanych zakażeniu eksperymentalnemu *Clostridium perfringens*. Badanie wykazało, że EM skutecznie ograniczają zmiany zapalne w jelitach i narządach mięszeniowych oraz korzystnie wpływają na morfometrię kosmków jelitowych i parametry biochemiczne krwi, takie jak poziom białka całkowitego, cholesterolu czy dehydrogenazy mleczanowej (LDH). Wyniki te potwierdzają użyteczność probiotyków w profilaktyce subklinicznych form martwiczego zapalenia jelit oraz wspieraniu odporności wrodzonej u ptaków.

Drugi projekt obejmował analizę częstości i charakterystyki zmian patologicznych mięśnia sercowego w trzech liniach brojlerów kurzych. Przeprowadzona ocena histologiczna pozwoliła na identyfikację zmian zwyrodnieniowych, przekrwienia, zmian obrzękowych oraz niedokrwiennych, których największe nasilenie odnotowano w lewej komorze i przegrodzie międzykomorowej w końcowej fazie tuczu. Zmiany te uznano za potencjalne podłoże dla występowania zespołu nagłej śmierci oraz zespołu nadciśnienia płucnego, stanowiących istotne wyzwania w produkcji drobiarskiej.

Ponadto udokumentowano rzadki przypadek mięśniakomięsaka gładkokomórkowego u gołębia. Przeprowadzono szczegółową ocenę mikroskopową i immunohistochemiczną guza, uzyskując pełną charakterystykę histopatologiczną zmiany, co wzbogaciło bazę wiedzy na temat nowotworów u ptaków ozdobnych i synantropijnych, których diagnostyka nadal pozostaje wyzwaniem w medycynie weterynaryjnej. Uzyskane dane wnoszą wkład zarówno w patomorfologię drobiu, jak i w rozwój praktycznych strategii prewencyjnych w chowie ptaków.

Efektem opisanych badań jest współautorstwo w następujących pracach oryginalnych i doniesień konferencyjnych:

Gesek Michał, Otrocka-Domagała Iwona, Sokół Rajmund, Paździor-Czapula Katarzyna, Lambert Barry D., Wiśniewska Anna, Żechowicz Maciej, **Mikiewicz Mateusz**, Korzeniowska Patrycja. Histopathological studies of the heart in three lines of broiler chickens. Br. Poult. Sci. 2016;57:219-226.

DOI: 10.1080/00071668.2016.1154505

Punktacja MNiSW₂₀₁₆: 30; IF₂₀₁₆: 0,884

Michalska Korina, Gesek Michał, Sokół Rajmund, Murawska Daria, **Mikiewicz Mateusz**, Chłódowska Agnieszka. Effective Microorganisms (EM) Improve Internal Organ Morphology, Intestinal Morphometry and Serum Biochemical Activity in Japanese Quails Under *Clostridium perfringens* Challenge. *Molecules* 2021;26:1-17.

DOI: 10.3390/molecules26092786

Punktacja MNiSW₂₀₂₁: 140; IF₂₀₂₁: 4,927

Gesek Michał, Stenzel Tomasz, Otrocka-Domagala Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, **Mikiewicz Mateusz**, Michalska Korina, Koncicki Andrzej. Immunohistochemical characterization and proliferation activity of cutaneous leiomyosarcoma with multiple visceral metastases in a fantail pigeon. *J. Comp. Pathol.* 2018;158:145. The 3rd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, 35th Meeting of the ESVP, 15th Meeting of the ESTP, 28th Meeting of the ECVP. 30th August - 2nd September 2017, Lyon, France.

DOI: 10.1016/j.jcpa.2017.10.157

5.6. Wpływ wybranych mediatorów zapalnych i leków immunomodulujących na komórki układu odpornościowego

W ramach współpracy uczestniczyłem również w badaniach eksperymentalnych koncentrujących się na ocenie wpływu mediatorów zapalnych oraz wybranych substancji immunomodulujących na funkcjonowanie komórek układu odpornościowego. Badania te miały na celu lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych odpowiedzi zapalnej oraz możliwości jej farmakologicznej modulacji, co znajduje zastosowanie zarówno w immunologii klinicznej, jak i weterynaryjnej.

W jednym z badań analizowano działanie IMD-0354, który blokuje aktywację jądrowego czynnika transkrypcyjnego kappa beta (NF- κ B), w modelu mysim astmy alergicznej wywołanej owalbuminą. Wykazano, że IMD-0354 skutecznie hamuje rozwój reakcji zapalnej w obrębie układu oddechowego, co manifestowało się znacznym ograniczeniem nacieku komórek zapalnych w płucach oraz zahamowaniem aktywacji i klonalnej ekspansji efektorowych limfocytów T CD4⁺ w węzłach chłonnych śródpiersiowych. Co istotne, nie zaobserwowano jednoczesnego wzrostu liczby regulatorowych limfocytów T (Treg).

Drugi projekt badawczy poświęcony był wpływowi prostaglandyny E₂ (PGE₂) na komórki natural killer (NK) u bydła. Przeprowadzona analiza wykazała, że długotrwała ekspozycja limfocytów krwi obwodowej na PGE₂ w stężeniach $\geq 10^{-7}$ M prowadzi do istotnego wzrostu apoptozy oraz zmniejszenia liczby i proliferacji komórek NK. Badania receptorowe wykazały, że efekt antyproliferacyjny był ściśle związany z aktywacją receptora EP4, natomiast efekt proapoptotyczny nie zależał bezpośrednio od znanych receptorów PGE₂ (EP1–EP4).

Efekty tych prac stanowią wkład w rozwój badań translacyjnych nad immunomodulacją, z potencjalnym zastosowaniem w leczeniu chorób zapalnych i autoimmunologicznych.

Efektom opisanych badań jest współautorstwo w następujących pracach oryginalnych: Maślanka Tomasz, Otrocka-Domagała Iwona, Zuśka-Prot Monika, **Mikiewicz Mateusz**, Przybysz Jagoda, Jasiecka Agnieszka, Jaroszewski Jerzy J. Ik B kinase inhibitor, IMD-0354, prevents allergic asthma in a mouse model through inhibition of CD4⁺ effector T cell responses in the lung-draining mediastinal lymph nodes. Eur. J. Pharmacol. 2016;775:78-85.

DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.02.023

Punktacja MNiSW₂₀₁₆: 30; IF₂₀₁₆: 2,896

Maślanka Tomasz, Chrostowska Małgorzata, Otrocka-Domagała Iwona, Snarska Anna, **Mikiewicz Mateusz**, Zuśka-Prot Monika, Jasiecka Agnieszka, Ziółkowski Hubert, Markiewicz Włodzimierz, Jaroszewski Jerzy J. Prostaglandin E2 exerts the proapoptotic and antiproliferative effects on bovine NK cells. Res. Vet. Sci. 2016;107:80-87.

DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.05.009

Punktacja MNiSW₂₀₁₆: 35; IF₂₀₁₆: 1,298

5.7. Ocena bezpieczeństwa stosowania biomateriałów hemostatycznych w modelach urazowych

W ramach kolejnej współpracy uczestniczyłem w badaniu eksperymentalnym dotyczącym oceny bezpieczeństwa długotrwałego stosowania nowoczesnych materiałów hemostatycznych w warunkach masywnego urazu naczyniowego. Celem pracy była ocena potencjalnych działań niepożądanych związanych z obecnością biomateriału w ranie przez wydłużony czas – aspekt ten pozostaje istotny nie tylko w medycynie cywilnej, ale również w kontekście zastosowań ratunkowych i wojskowych.

W modelu doświadczalnym, opracowanym na świniach, zastosowano trzy różne opatrunki hemostatyczne: QuikClot Combat Gauze (zawierający kaolin), ChitoGauze PRO oraz Celox Gauze (obie zawierające chitozan). Każdy z materiałów został użyty w sytuacji pełnego przecięcia tętnicy udowej, a następnie pozostawiony w ranie przez 24 godziny, po czym przeprowadzono eutanazję, a następnie sekcję oraz kompleksową ocenę patomorfologiczną narządów wewnętrznych.

We wszystkich grupach zaobserwowano cechy zespołu wstrząsowego oraz obecność materiału zatorowego w tętnicy płucnej i drobnych naczyniach krążenia płucnego. Stwierdzono również rozległe uszkodzenia narządów mięsnych – w szczególności płuc, wątroby, nerek i serca – mogące świadczyć o rozwijającej się koagulopatii oraz zespole rozsianego

wykrzepiania wewnątrznaczyniowego. Mimo skutecznego działania hemostatycznego wszystkich testowanych opatrunków, wyniki jednoznacznie wskazują na ryzyko poważnych powikłań systemowych w przypadku ich długotrwałej obecności w ranie.

Uzyskane wyniki mają znaczenie praktyczne i mogą stanowić podstawę do modyfikacji zaleceń klinicznych dotyczących długości stosowania opatrunków hemostatycznych w sytuacjach wymagających interwencji chirurgicznej.

Efektem opisanych badań jest współautorstwo w następującej pracy oryginalnej: Otrrocka-Domagała Iwona, Jastrzębski Paweł, Adamiak Zbigniew, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, **Mikiewicz Mateusz**, Rotkiewicz Tadeusz. Safety of the long-term application of QuikClot Combat Gauze, ChitoGauze PRO and Celox Gauze in a femoral artery injury model in swine - a preliminary study. Pol. J. Vet. Sci. 2016;19:337-343.

DOI: 10.1515/pjvs-2016-0041

Punktacja MNiSW₂₀₁₆: 20; IF₂₀₁₆: 0,697

5.8. Wpływ czynników fizykalnych i antyoksydacyjnych na regenerację mięśni szkieletowych

W ramach badań eksperymentalnych nad procesami regeneracji tkanek mięśniowych uczestniczyłem w projekcie poświęconym ocenie wpływuiskoenergetycznej terapii laserowej oraz suplementacji koenzymem Q10 i witaminą E na procesy naprawcze w mięśniach szkieletowych na modelu świńskim po chemicznie indukowanym uszkodzeniu. Model badawczy oparty był na kontrolowanej iniekcji bupiwakainy – środka o działaniu miotoksycznym – co umożliwiło analizę faz regeneracji mięśni w warunkach powtarzalnych i porównywalnych między grupami.

Badaniem objęto 75 loszek rasy Wielka Biała Polska, które podzielono na pięć grup badawczych, uwzględniając różne schematy terapii: brak leczenia (kontrola),iskoenergetyczna terapia laserowa (LELI), suplementacja koenzymem Q10, witaminą E oraz ich połączenie. Kluczowym punktem analizy była ocena częstości apoptozy komórek uczestniczących w regeneracji mięśnia, w tym makrofagów oraz komórek prekursorowych mięśni, przy użyciu metody TUNEL.

Wyniki jednoznacznie potwierdziły korzystny wpływiskoenergetycznego napromieniania laserowego, które w istotny sposób ograniczało apoptozę zarówno makrofagów, jak i komórek prekursorowych mięśni, wspierając tym samym proces regeneracji uszkodzonej tkanki mięśniowej. Efekt ten był najbardziej wyraźny spośród wszystkich analizowanych grup. Witamina E wykazała podobne, choć słabsze działanie ochronne, głównie w odniesieniu do makrofagów. Suplementacja koenzymem Q10, zarówno samodzielna, jak i w

połączeniu z witaminą E, nie wpływała istotnie na obniżenie wskaźników apoptozy, natomiast obserwowano u tych zwierząt wzmożone tworzenie miotub i młodych włókien mięśniowych, co wskazuje na korzystny wpływ na późniejsze etapy regeneracji.

Uzyskane dane wzbogacają wiedzę na temat regeneracji mięśni szkieletowych w warunkach uszkodzenia toksycznego oraz wskazują na potencjalne zastosowanie terapii laserowej jako skutecznej i nieinwazyjnej metody wspierającej gojenie tkanek.

Efektem opisanych badań jest współautorstwo w następującej pracy oryginalnej: Otrocka-Domagała Iwona, Mikołajczyk Anna, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Rotkiewicz Tadeusz, **Mikiewicz Mateusz**. Effect of low-energy laser irradiation and antioxidant supplementation on cell apoptosis during skeletal muscle post-injury regeneration in pigs. Pol. J. Vet. Sci. 2015;18:523-531.

DOI: 10.1515/pjvs-2015-0068

Punktacja MNiSW₂₀₁₅: 20; IF₂₀₁₅: 0,719

6. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

W ramach realizowanej działalności naukowej wykazałem się aktywnością badawczą prowadzoną poza jednostką macierzystą. W okresie od 1 sierpnia do 31 października 2019 roku odbyłem staż naukowy w Zakładzie Patomorfologii i Weterynarii Sądowej Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Staż miał charakter pracy laboratoryjno-badawczej i został formalnie potwierdzony zaświadczeniem podpisanym przez kierownika jednostki.

W trakcie pobytu w Uniwersytecie Przyrodniczym w Lublinie uczestniczyłem w realizacji badań diagnostycznych i naukowych, obejmujących materiał sekcyjny oraz biopsyjny pochodzący od zwierząt towarzyszących i gospodarskich. Do moich obowiązków należało samodzielne wykonywanie i ocena preparatów histologicznych oraz immunohistochemicznych różnych typów tkanek i narządów. Uczestniczyłem również w dokumentowaniu i interpretowaniu zmian mikroskopowych oraz w opracowywaniu dokumentacji diagnostycznej w kontekście patomorfologii ogólnej i szczegółowej. Szczególną uwagę poświęciłem przypadkom zmian nowotworowych, zapalnych i zwyrodnieniowych, istotnych z punktu widzenia diagnostyki klinicznej.

Pobyt ten umożliwił mi nie tylko doskonalenie umiejętności warsztatowych i poznanie specyfiki pracy w innej jednostce naukowej, ale również stanowił rozszerzenie mojego dorobku badawczego, pozwalając na konfrontację i integrację podejść badawczych oraz rozwój

kompetencji w zakresie diagnostyki weterynaryjnej. Odbyty staż był istotnym elementem mojego rozwoju naukowego po uzyskaniu stopnia doktora, a doświadczenia i umiejętności zdobyte w trakcie jego realizacji znajdują trwałe zastosowanie w mojej dalszej działalności naukowej i dydaktycznej.

7. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

7.1. Działalność dydaktyczna

- Realizacja przedmiotu Patomorfologia I, II, III dla studentów III i IV roku kierunku Weterynaria.
- Od 1 października 2020 roku do chwili obecnej pełnię funkcję Zastępcy Opiekuna Roku przyznawaną przez Dziekana Wydziału Medycyny Weterynaryjnej.
- Koordynator przedmiotu Patomorfologia I
- Przygotowanie materiałów do e-learningu – opracowanie filmów instruktarzowych z przedmiotu Patomorfologia I dla studentów III roku kierunku Weterynaria dostępnych na Portalu Weterynaryjnym.

7.2. Osiągnięcia organizacyjne

- Członkostwo w międzynarodowych i krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych:
 - Członek Polskiego Towarzystwa Patologów.
 - Członek Polskiego Towarzystwa Reumatologów.
 - Członek European Society of Veterinary Pathology (ESVP).
- Członek Odwoławczej Komisji Dyscyplinarnej ds. doktorantów oraz Uczelnianej odwoławczej Komisji Stypendialnej w roku akademickim 2014/2015.
- Recenzje prac naukowych:
 - Recenzje artykułów naukowych o zasięgu międzynarodowym m. in. Animals (IF 2,7), Veterinary Sciences (IF 2), Applied Sciences (IF 2,5), International Journal of Molecular Science (4,9), The Veterinary Journal (2,3), Canadian Veterinary Journal (IF 1,261), Biology of Reproduction (IF 3,1), BMC Veterinary Research (IF 2,3), Cancer Management and Research (IF 2,5), Veterinary Research Communications (IF 1,8), Archives of Microbiology (2,3), JAVMA – Journal of the American Veterinary Medical Association (IF 1,6), Ciencia Rural (IF 0,8), Dermatology Research and Practice (IF 1,5), Biotechnic & Histochemistry (IF 1,6), The Anatomical Record (IF 1,8).

- Prowadzenie działalności diagnostycznej jako patomorfolog, obejmującej wykonywanie specjalistycznych ekspertyz histopatologicznych i sądowo-weterynaryjnych na zlecenie podmiotów sektora prywatnego, policji oraz prokuratury.
- Guest Editor w wydaniu Specjalnym „Stomatology of Companion Animals” w Animals (IF 2,7) 29.11.2022-31.12.2024.

7.3. Odbyte kursy i szkolenia podnoszące kwalifikacje dydaktyczne i zawodowe

- Uczestnictwo w Szkole Letniej Patologów Weterynaryjnych organizowanej przez ECVP-ESVP 18-29.07.2016, Berlin, Niemcy.
- Uczestnictwo w Szkole Letniej Patologów Weterynaryjnych organizowanej przez ECVP-ESVP 17-28.07.2017, Berlin, Niemcy.
- Uczestnictwo sympozjum zorganizowanym przez Davis Thompson DVM Foundation w dniach 29-30.08.2017, Lyon, Francja.
- Uczestnictwo w Szkole Letniej Patologów Weterynaryjnych organizowanej przez ECVP-ESVP 16-27.07.2018, Walencja, Hiszpania.
- Uczestnictwo w Szkole Letniej Patologów Weterynaryjnych organizowanej przez ECVP-ESVP 15-26.07.2019, Walencja, Hiszpania.
- Uzyskanie tytułu specjalisty z zakresu „Chorób zwierząt nieudomowionych” nadaną przez Komisję do Spraw Specjalizacji Lekarzy Weterynarii dnia 10.12.2016

7.4. Popularyzacja nauki

- Prezentacja infrastruktury dydaktycznej, laboratoryjnej i prosektoryjnej Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej uczniom szkół średnich w ramach „Dni Otwartych UWM”.
- Udział w krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych:
 - Konferencja Międzynarodowa “Current approaches to health and diseases in animals and humans”, Wydział Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, 19-20.09.2014, Lublin, Polska.
 - Konferencja „Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki” VII Edycja – Nowe trendy w naukach przyrodniczych, 6.12.2014, Kraków, Polska.
 - The 34th Annual Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and 27th Annual Meeting of the European College of Veterinary Pathologists, 07-09.09.2016, Bolonia, Włochy.
 - The 3rd Joint European Congress of the European Society of Veterinary Pathology, European Society of Toxicologic Pathology and European College

of Veterinary Pathologists, 35th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, 15th Meeting of the European Society of Toxicologic Pathology ESTP, 28th Meeting of the European College of Veterinary Pathologists, 30.08-2.09.2017, Lyon, Francja.

- XXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Patologów, 26-28.09.2019, Lublin, Polska.
- Konferencja reumatologiczno – dermatologiczna „Skóra i Kości”, 9-11.09.2021, Olsztyn, Polska.
- XVII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych „*Sanitas animalium pro salute homini*”, 19-21.09.2024, Olsztyn, Polska.

8. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

8.1. Projekty badawcze

- Kierownik projektu badawczego Miniatura 5 pt. „Charakterystyka wybranych białek prognostycznych i predykcyjnych we włókniakomięsach poiniekcyjnych u kotów” (Nr DEC-2021/05/X/NZ4/00037) 31.08.2021-30.08.2022 (49 060 zł).
- Otrzymanie „Naukowego Grantu Rektora” – edycja III na projekt badawczy pt. „Ocena ekspresji wybranych cytokin i białek regulatorowych we włókniakomięsach poiniekcyjnych u kotów – badania wstępne” (wartość projektu 40 000 zł).

8.2. Wyróżnienia

- Nagroda zespołowa Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego III stopnia za osiągnięcia w dziedzinie naukowej.
- Nagroda Rektora za najlepszą publikację naukową w roku 2023.
- Stypendium David-Thompson DVM Foundation 29.08.2017.

8.3. Szkolenia

- Szkolenie dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzanie, 12-16.10.2015, Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych PolLASA.

Mateusz Mikiewicz

.....
(podpis wnioskodawcy)

Prace wchodzące w skład cyklu
publikacyjnego pt. „*Rola markerów
immunohistochemicznych i
mikrośrodowiska zapalnego w
biologii kocich włókniakomięsaków
poiniekcyjnych*” wraz z
oświadczeniami współautorów

Oświadczenie

Wyrażam zgodę na wykorzystanie niżej wymienionych publikacji naukowych w osiągnięciu habilitacyjnym dr wet. Mateusza Mikiewicza pod tytułem „**Rola markerów immunohistochemicznych i mikrośrodowiska zapalnego w biologii kocich włókniakomięsaków poiniekcyjnych**”.

Mateusz Mikiewicz, Katarzyna Paździor-Czapula, Joanna Fiedorowicz, Michał Gesek, Iwona Otrocka-Domagala. *Metallothionein expression in feline injection site fibrosarcomas*. BMC Veterinary Research 2023; 19(1): 42.

Mateusz Mikiewicz, Katarzyna Paździor-Czapula, Joanna Fiedorowicz, Iwona Otrocka-Domagala. *Expression of programmed cell death protein 1 and programmed cell death ligand 1 in feline injection site fibrosarcomas*. Research in Veterinary Science 2024; 176: 105350.

Mateusz Mikiewicz, Iwona Otrocka-Domagala. *Immunohistochemical analysis of smooth muscle actin and CD31 in feline post-injection site fibrosarcomas: association with tumour grade, vascular density, and multinucleated giant cells*. BMC Veterinary Research 2025;21:191.

Dr n. wet. Katarzyna Paździor-Czapula

Lek. wet. Joanna Fiedorowicz

Dr hab. Michał Gesek, prof. UWM

Dr hab. Iwona Otrocka-Domagala, prof. UWM

Paździor-Czapula Katarzyna

Joanna Fiedorowicz

Michał Gesek

Iwona Otrocka-Domagala

Oświadczenie

Niniejszym oświadczamy, że wkład autorów w publikacji:

Mateusz Mikiewicz, Katarzyna Paździor-Czapula, Joanna Fiedorowicz, Michał Gesek, Iwona Otrocka-Domagala. *Metallothionein expression in feline injection site fibrosarcomas*. BMC Veterinary Research 2023; 19(1): 42.

Był następujący:

Mateusz Mikiewicz – stworzenie koncepcji badań oraz metodyki badań, uzyskanie finansowania z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura 5 (Nr DEC-2021/05/X/NZ4/00037), zaplanowanie i wykonanie analiz laboratoryjnych, opracowanie i interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu, wykonanie rycin, przygotowanie odpowiedzi na recenzję, uzyskanie finansowania na publikację wyników badań z programu Ministra Edukacji i Nauki pt. „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” (Nr 010/RID/2018/2019).

Katarzyna Paździor-Czapula – zredagowanie manuskryptu.

Joanna Fiedorowicz – zebranie próbek do wykonania badania.

Michał Gesek – udział w analizie danych i pomoc w przygotowaniu wykresów.

Iwona Otrocka-Domagala – nadzór merytoryczny i korekta ostatecznej wersji manuskryptu.

Dr wet. Mateusz Mikiewicz *Mateusz Mikiewicz*

Dr n. wet. Katarzyna Paździor-Czapula *Katarzyna Paździor - Czapula*

Lek. wet. Joanna Fiedorowicz *Joanna Fiedorowicz*

Dr hab. Michał Gesek, prof. UWM *Michał Gesek*

Dr hab. Iwona Otrocka-Domagala. Prof. UWM *Iwona Otrocka - Domagala*

RESEARCH

Open Access



Metallothionein expression in feline injection site fibrosarcomas

Mateusz Mikiewicz*, Katarzyna Paździor-Czapula, Joanna Fiedorowicz, Michał Gesek and Iwona Otrrocka-Domagala

Abstract

Background Feline injection site fibrosarcoma is an aggressive and infiltrative tumour arising in the background of chronic inflammation. The aim of this study was to evaluate the expression of metallothionein (I-II) in feline injection site fibrosarcomas and to assess its possible relationships with Ki67 index, inflammation score and tumour grade. The study included 40 feline fibrosarcomas, located in the common injection sites (i.e., interscapular area, thigh, flank), constituting archival diagnostic specimens collected between 2019–2020. Tumours were graded histologically according to the newly proposed soft-tissue sarcoma grading system in cats. Immunohistochemistry was performed to evaluate the expression of Ki67 and metallothionein in tumour cells.

Results The cytoplasmic and sometimes nuclear expression of metallothionein was observed in all tumours grade I, 66.67% of tumours grade II and 55% of tumours grade III. The expression of metallothionein was negatively correlated with tumour grade and inflammation score, while the Ki67 index was positively correlated with tumour grade, inflammation score and necrosis score.

Conclusion The downregulation of MT expression in feline injection site fibrosarcomas seems to be connected with an increase in the inflammatory infiltration, hence tumour progression. This is the first study describing metallothionein expression in feline injection site fibrosarcomas.

Keywords Feline injection site fibrosarcoma, Proliferation index, Ki67, Metallothionein, Immunohistochemistry

Background

Feline injection site sarcoma (FISS) is a malignant tumour arising in the area of a former injection site [1, 2]. The vast majority of FISSs are fibrosarcomas, however other malignancies such as osteosarcoma, chondrosarcoma, rhabdomyosarcoma, malignant fibrous histiocytoma and myofibroblastic sarcoma have also been reported [3]. Although the first cases of FISS in cats were related to the increased use of rabies and feline leukaemia virus

(FeLV) vaccinations [4–6], subsequent observations revealed that other non vaccine injectables, i.e. drugs, foreign material, microchip implantation and trauma can also induce chronic inflammation, essential in the pathogenesis of FISS [2, 7–9]. However, chronic inflammation alone probably cannot induce neoplastic transformation [8, 10]. The exact pathogenesis of FISS is not fully understood and requires further research.

Metallothioneins (MTs; with the best characterised isoforms MT I and II) are a group of small cysteine-rich proteins, playing an important role in metal homeostasis and protection against heavy metal toxicity, DNA damage, oxidative stress, and apoptosis [11]. MT I-II also shows immunomodulatory effects by reducing the synthesis of pro-inflammatory cytokines and increasing the synthesis of anti-inflammatory cytokines [12]. These properties

*Correspondence:

Mateusz Mikiewicz
mateusz.mikiewicz@uwm.edu.pl
Department of Pathological Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 13, 10-719,
Olsztyn, Poland



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

make MT I-II an interesting object of research, particularly in tumours arising in the background of chronic inflammation, irritation or injury. Due to its antioxidant and cytoprotective role, MT I-II expression can be responsible for tumour resistance to radiotherapy or chemotherapy [12–15]. As radiotherapy and – to a lesser extent – adjuvant chemotherapy, in addition to aggressive surgery, are used in treatment of FISS [16], the expression of MT I-II could be the potential predictive factor. Furthermore, as the chronic inflammation predispose to FISS, the possible downregulation of MT I-II (due to its antiinflammatory properties) could also play a role in the pathogenesis of FISS. In feline mammary gland tumours and cutaneous melanomas, increased expression of MT I-II was related to tumour progression [17]. The expression of metallothionein has not been previously investigated in FISS.

The aim of this study was to evaluate the expression of MT I-II in feline injection site fibrosarcomas and to

investigate possible relationships between the expression of metallothionein, Ki67 index, inflammation score, necrosis score and tumour grade.

Results

Histological analysis of evaluated tumours is summarised in Table 1, and detailed characteristics of all evaluated tumours are presented in Supplementary Table 1. Five tumours were graded I (12.5%), 15 tumours—II (37.5%) and 20 tumours—III (50%). In tumours grade I, necrosis was either absent or involved less than 50% of the tumour parenchyma. Inflammatory infiltrates were absent or mild. In tumours grade II, necrosis was observed in only 40% of cases, and inflammatory infiltrates were variable. In tumours grade III, necrosis was observed in all cases, most of which involved more than 50% of the tumour parenchyma. Inflammatory infiltrates were massive in 75% of cases.

The mean Ki67 (Fig. 1A–C) index was 6.64 ± 3.31 in tumours grade I, 15.25 ± 5.36 in tumours grade II and 38.4 ± 14.4 in tumours grade III. Statistical analysis revealed that the Ki67 index was significantly higher in tumours grade III compared to grade II ($p=0.000$) and to grade I ($p=0.000$; Fig. 2A). Additionally, the Ki67 index was positively correlated with tumour grade ($r=0.853$; $p=0.000$; Fig. 2B), inflammation score ($r=0.452$; $p=0.003$; Fig. 2C), and necrosis score ($r=0.37$; $p=0.018$; Fig. 2D).

The cytoplasmic and sometimes nuclear MT expression was observed in all tumours grade I (100%), 10 tumours grade II (66.67%), and 11 tumours grade III (55%) (Fig. 3A–C). The mean immunoreactive score (IRS) for MT expression was 6.2 ± 3.03 , 1.87 ± 2.1 , and 1.65 ± 2.18 for tumours grade I, II, and III, respectively. Statistical analysis showed that the IRS for MT expression was significantly higher in grade I compared to grade II ($p=0.04$) and to grade III ($p=0.012$; Fig. 4A). Moreover, IRS for MT expression was negatively correlated with

Table 1 Percentage of tumours grade I, II and III with particular mitotic, necrosis and inflammation scores, and IRS for MT expression (range, mean with standard deviation)

		Tumour grade		
		I	II	III
Mitotic score	1	80%	26.67%	-
	2	20%	26.67%	20%
	3	-	46.67%	80%
Necrosis score	0	60%	20%	-
	1	40%	80%	75%
	2	-	-	25%
Inflammation score	1	100%	46.67%	15%
	2	-	13.33%	10%
	3	-	40%	75%
IRS for MT expression	Range	2–9	0–6	0–6
	mean, SD	6.2 ± 3.03	1.87 ± 2.1	1.65 ± 2.18

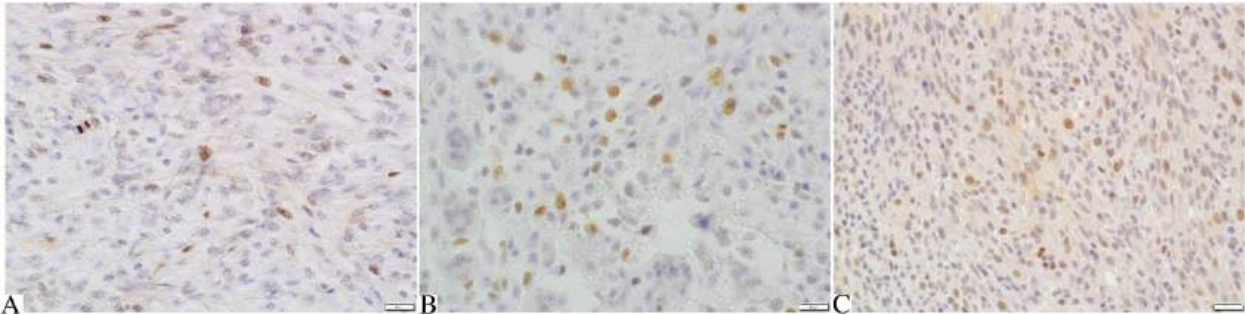


Fig. 1 Feline injection site fibrosarcomas. **A** Tumour grade I. Small number of tumour cells show nuclear expression of Ki67. **B** Tumour grade II. Moderately numerous tumour cells show nuclear expression of Ki67. **C** Tumour grade III. Numerous tumour cells show nuclear expression of Ki67. Ki67 immunostaining with DAB, counterstaining with Mayer's haematoxylin, 400x

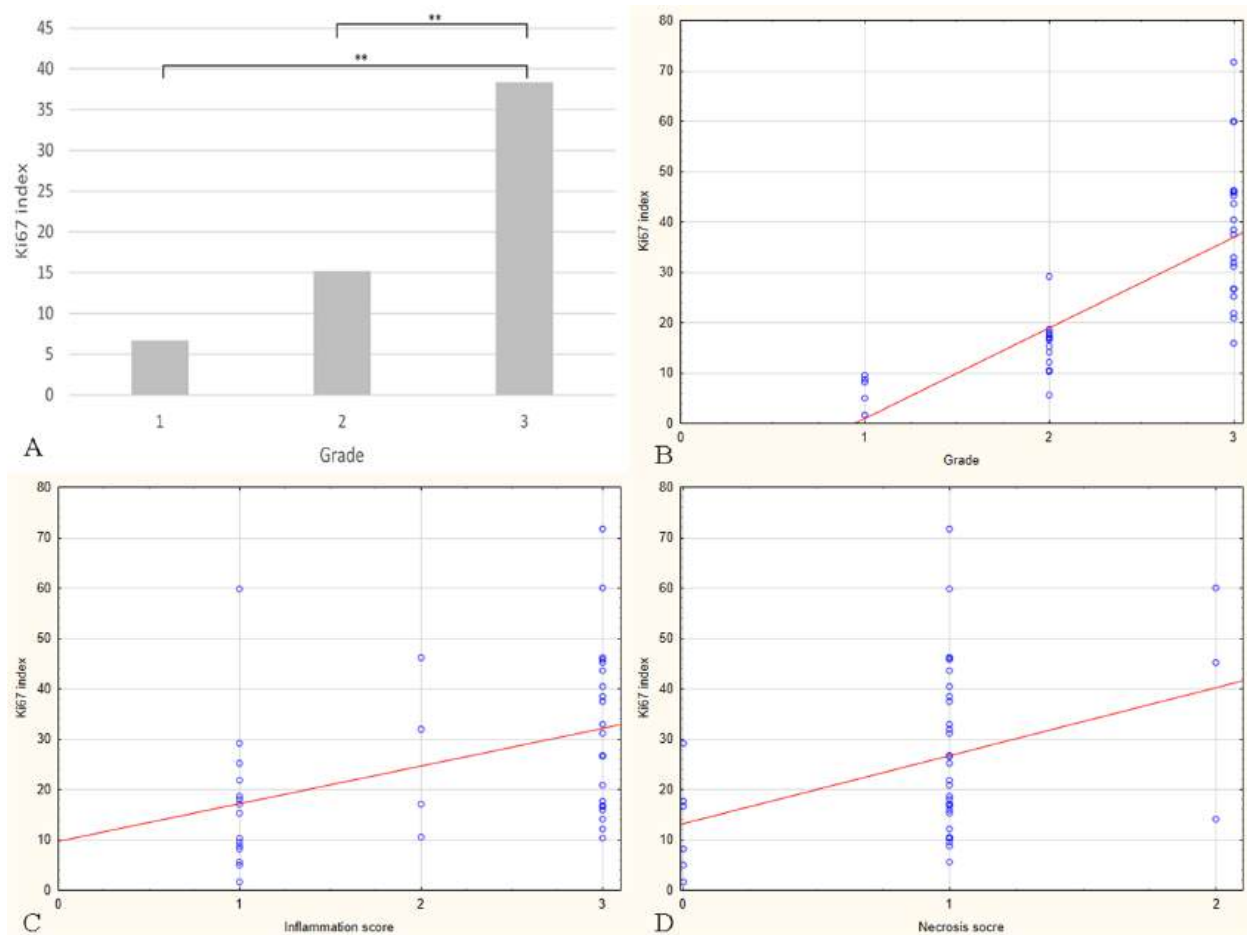


Fig. 2 Feline injection site fibrosarcomas. **A** Mean Ki67 index values in tumours grade I, II, and III. The Ki67 index was significantly higher in tumours grade III compared to grade II ($p = 0.000$) and I ($p = 0.000$). **B** Positive correlation between the Ki67 index and the tumour grade. The Ki67 index increased with the tumour grade ($r = 0.853$; $p = 0.000$). **C** Positive correlation between the Ki67 index and the inflammation score. The Ki67 index increased with the inflammation score ($r = 0.452$; $p = 0.003$). **D** Positive correlation between the Ki67 index and the necrosis score. The Ki67 index increases with the necrosis score ($r = 0.37$; $p = 0.018$)

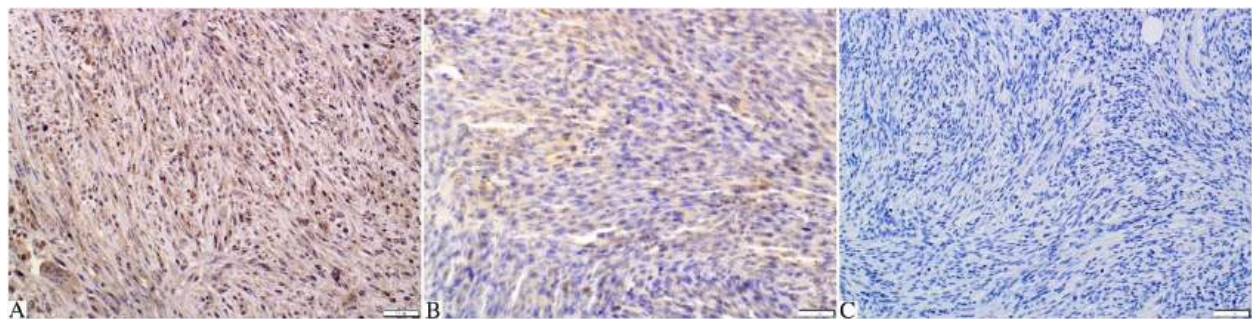


Fig. 3 Feline injection site fibrosarcomas. **A** Tumour grade I. Numerous tumour cells (quantitative score: 3) show moderate (qualitative score: 2) expression of metallothionein (IRS: 6). The expression is mostly cytoplasmic, but the nuclear expression is also present in some tumour cells. **B** Tumour grade II. Moderately numerous tumour cells (quantitative score: 2) show weak (qualitative score: 1) cytoplasmic expression of metallothionein (IRS: 2). **C** Tumour grade III. Absence of metallothionein expression in tumour cells. Metallothionein immunostaining with DAB, counterstaining with Mayer's haematoxylin, 200x

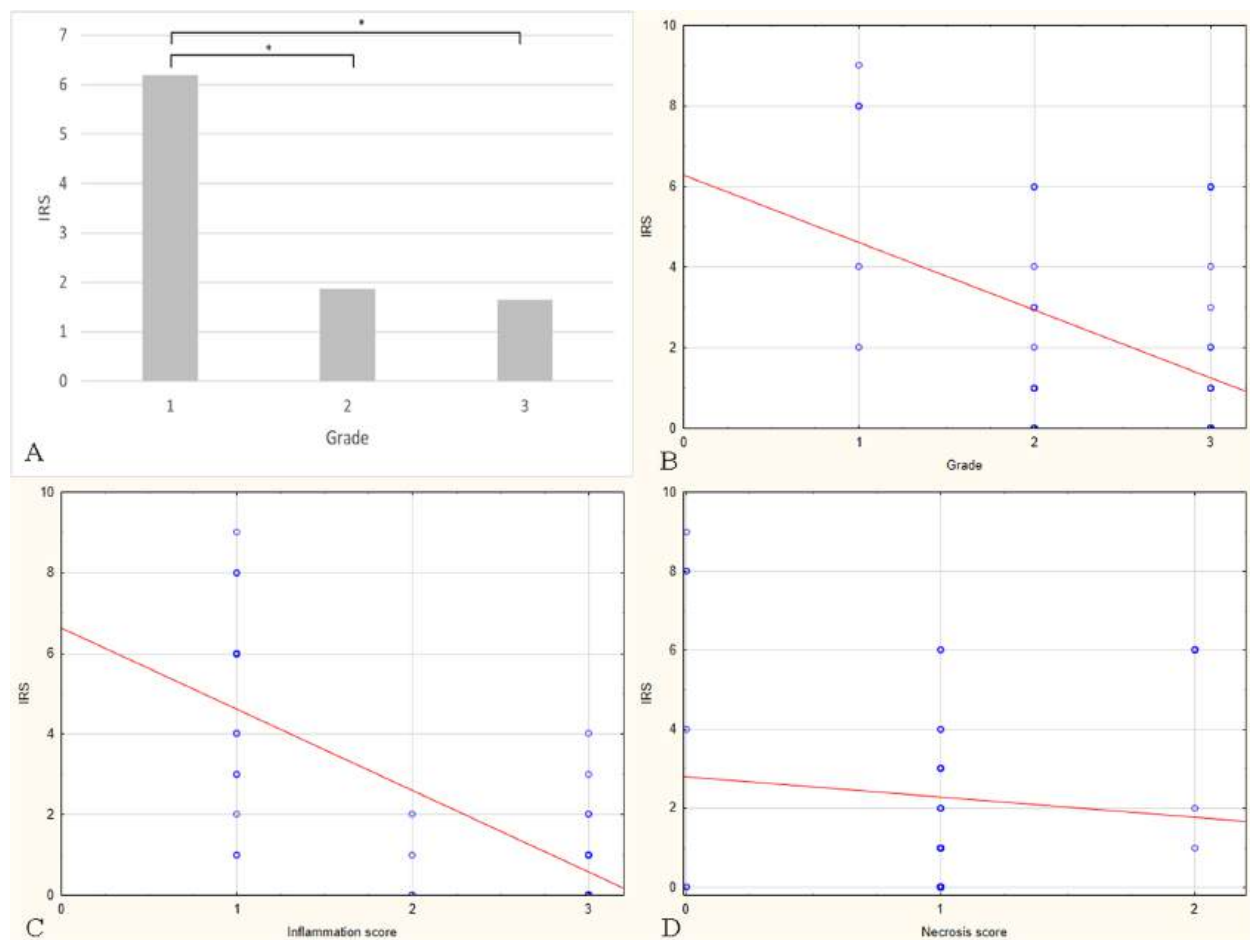


Fig. 4 Feline injection site fibrosarcomas. **A** Mean IRS for MT expression values in tumours grade I, II, and III. The IRS for MT expression was significantly higher in tumours grade I compared to grade II ($p = 0.04$) and III ($p = 0.012$). **B** Negative correlation between the IRS for MT expression and the tumour grade. The metallothionein expression decreased as the tumour grade was higher ($r = -0.356$; $p = 0.024$). **C** Negative correlation between the IRS for MT expression and the inflammation score. The metallothionein expression decreased as the inflammation score was higher ($r = -0.713$; $p = 0.000$). **D** No correlation was found between IRS for MT expression and necrosis score ($r = 0.014$; $p = 0.9$)

tumour grade ($r = -0.356$; $p = 0.024$; Fig. 4B) and inflammation score ($r = -0.713$; $p = 0.000$; Fig. 4C). No correlation was found between IRS for MT expression and necrosis score ($r = 0.014$; $p = 0.9$; Fig. 4D).

Discussion

We observed the expression of MT in 26 cases (out of 40) of feline injection site fibrosarcomas, and this expression was negatively correlated with the degree of inflammation and tumour grade. It was previously shown that MT has immunomodulatory properties, suppressing T-dependent humoral immune response [18] and function of cytotoxic T-cells [19]. The chronic inflammation is a key point in the pathogenesis of FISS. Free radicals generated during persistent inflammation cause DNA damage [20]. Furthermore, the degree of

inflammatory infiltration is one of three parameters of a recently proposed grading system for feline soft tissue sarcomas [21]. Therefore, the negative correlation between MT expression and the degree of inflammatory infiltration (and tumour grade) in feline injection site fibrosarcomas indicates that the downregulation of MT expression may be involved in tumour progression. The downregulation of MT expression was observed in several human cancers, i.e. liver, colon and prostate [22–24]. In human colon carcinoma downregulation of a specific isoform of MT (MT1F) resulted from loss of heterozygosity [24]. As MT protects cells from oxidative stress, downregulation of MT expression might be linked to increased risk of DNA damage and mutagenic changes, responsible for carcinogenesis [17, 25] which is also very likely in feline injection site fibrosarcoma.

On the contrary, a positive correlation between MT expression and tumour grade was found in selected human soft tissue sarcomas [26]. The elevated expression of MT allows tumour cells to evade the host immune response [19]. Furthermore, as the MT is responsible for resistance to radiotherapy [25], it can be assumed that feline injection site fibrosarcomas grade I could be possibly more resistant to radiotherapy (compared to grade II and III), but this relationship must be further evaluated in prospective clinical studies. Although MT expression was mainly cytoplasmic, we also observed nuclear expression in some tumour cells. The nuclear localization of MT is transiently observed during cell proliferation and early differentiation; this protein protects DNA from oxidative damage and apoptosis [27]. It was previously shown that nuclear expression of MT was responsible for cisplatin resistance in ovarian cancer [28].

The Ki67 index is associated with tumour proliferation, growth, and progression, and it is commonly used in human and veterinary medicine as a prognostic marker [29–33]. A high Ki67 index is associated with poor prognosis in several human and animal tumours, e.g., human and feline mammary gland tumours and human soft-tissue sarcomas [29, 34, 35]. In our study, the Ki67 index was positively correlated with tumour grade, but its prognostic significance must be elucidated in the further studies. Furthermore, we found a positive correlation between Ki67 index and inflammatory score. In a study on canine colorectal carcinoma, Ki67 index was positively correlated with the number of tumour associated macrophages and mast cells [36]. It is suggested that inflammatory cells have an impact on cancer development by increasing the invasive capacity, angiogenesis and motility of tumour cells [37]. In human breast cancer, the inflammation is closely associated with tumour proliferation and progression. This correlation may reflect an active immune response to poor tumour cell differentiation or may be a consequence of increased cytokine secretion by high-grade tumours [38]. The association between inflammatory infiltration and Ki67 index (as well as tumour grade) in feline injection site fibrosarcomas suggests that the inflammation plays an important role not only in pathogenesis, but also in tumour progression. Additionally, we found a positive correlation between Ki67 index and necrosis score. This is not surprising since tumour necrosis is a consequence of ischemic injury caused by rapid tumour growth [39]. Furthermore, necrotic cells release factors enhancing tumour cell proliferation [40]. In human breast cancer, the degree of the tumour necrosis reflects higher metabolic activity and more

rapid growth, which results in higher Ki67 index in tumours with extent areas of necrosis [41].

Conclusion

The downregulation of MT expression in feline injection site fibrosarcomas is connected with an increase in the inflammatory infiltration. Both the reduction of MT expression and the increased degree of inflammatory infiltration seem to be associated with tumour progression.

Methods

Study design

The study included surgically excised cutaneous tumours collected from 40 cats between 2019–2020, 28 (70%) males and 12 (30%) females, aged 4–17 (mean: 11 ± 3 years). The samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, processed routinely, embedded in paraffin wax, cut and stained with Mayer's haematoxylin and eosin (HE). Inclusion criteria included morphological features [42, 43] and localisation in the injection site: interscapular region (50%; 20/40 cases), thigh (12.5%; 5/40 cases), flank (12.5%; 5/40 cases), lumbar area (10%; 4/40 cases), shoulder (10%; 4/40 cases), and dorsal area of the neck (5%; 2/40 cases). Histologically, the tumours were graded into grade I, II and III, according to the grading system proposed by Dobromylskyj et al. [21] for feline soft tissue sarcomas (Table 2). The number of inflammatory cells was categorised as none or mild (1), when inflammatory cells were absent or only few, scattered throughout the tumour parenchyma; moderate (2), when inflammatory cells were more numerous, forming distinct foci within the tumour parenchyma; and severe

Table 2 Grading system for cutaneous soft tissue sarcomas [21]

Mitotic score	Number of mitoses in 2.37mm ² ; 400x
1	0–9
2	10–19
3	> 19
Tumour necrosis score	Necrosis as % of tumour area
0	Absent
1	≤ 50%
2	> 50%
Inflammation score	
1	None or mild
2	Mild to moderate
3	Severe
Histological grade (Sum of score)	
≤ 3 – I (low grade)	
4 or 5 – II (intermediate grade)	
6 or more – III (high grade)	

(3), when the inflammatory cells were numerous, and formed large foci. The necrosis extent was classified as 0 (no necrosis within the tumour), 1 (necrotic area up to 50% of tumour parenchyma) and 2 (necrotic area covers more than 50% of tumour parenchyma).

Immunohistochemical evaluation

The sections for immunohistochemistry were mounted on silanized glass slides. Heat-induced antigen retrieval was performed in Tris–EDTA buffer pH 9.0 (EnVision™ Flex Target Retrieval Solution High pH, DAKO, Glostrup, Denmark) for 20 min at 96 °C using a PT-Link module (Dako, Glostrup, Denmark). Immunohistochemical examination of each tumour was performed using primary antibodies: Ki67 (monoclonal mouse anti-human, clone MIB-1, dilution 1:75, incubation time: 30 min in a humid chamber at room temperature; Dako, Glostrup, Denmark) and metallothionein (monoclonal mouse anti-metallothionein I-II, clone UC1MT, dilution 1:1000, incubation time: 60 min in a humid chamber at 60°C; Abcam, Cambridge, Great Britain) and a visualisation system based on the immunoperoxidase method, with 3,3-diaminobenzidine (DAB) as a substrate (EnVision + System-HRP, Mouse, Dako, Glostrup, Denmark). The slides were counterstained with Mayer's haematoxylin. Positive and negative control slides were processed together with the evaluated slides (metallothionein – feline mammary gland, Ki67 – feline skin). Brown precipitate at the antigen site was regarded as a positive reaction (Ki67 – nuclear; MT I-II – nuclear and cytoplasmic). The slides were evaluated under a light microscope (BX63, Olympus, Tokyo, Japan) using CellSense (Olympus, Tokyo, Japan) software.

Ki67 evaluation

The expression of Ki67 was calculated in 10 HPFs (high power fields, 400x), in areas with the most numerous positive cells ("hot-spots"), avoiding areas of inflammation and necrosis. The Ki67 index was expressed as a percentage of positive cells and was obtained by calculating the ratio of positively stained tumour cells and all tumour cells observed in the analysed microscopic fields, as was previously described by Patruno et al. [32]. Mean values (with standard deviation) were calculated for groups with grades I, II and III.

MT evaluation

The expression of MT was assessed in 10 randomly selected HPFs (400x), using a semiquantitative scale that included the intensity of the immunostaining (0: none; 1: weak; 2: moderate; 3: intense) and the percentage of immunoreactive tumour cells (1: < 10%; 2:

10–50%; 3: 51–80%; 4: > 80%). IRS for MT expression was a product of multiplication of points given for individual traits and ranged between 0 and 12 [44–47]. Mean values (with standard deviation) were calculated for groups with grades I, II and III.

Statistical analysis

The variables were checked for normality using the Shapiro–Wilk test. Differences in Ki67 index and IRS for MT expression between groups with grade I, II and III were analysed using Kruskal–Wallis H test (one-way ANOVA on ranks) followed by Dunn's post-hoc test. Correlations between tumour grade, inflammation score, necrosis score, Ki67 index and IRS for MT expression were examined using Spearman's rank correlation (r : Spearman's rank correlation coefficient); $p < 0.05$ was considered statistically significant, and $p < 0.001$ as highly significant. The statistical analysis was performed using Statistica 14 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03604-5>.

Additional file 1: Supplementary Table 1. Detailed characteristics of evaluated feline injection site fibrosarcomas.

Acknowledgements

We would like to thank Cezary Zwoliński and Dominika Piech for preparing the archival specimens.

Authors' contributions

Mateusz Mikiewicz designed and performed the experiments, analysed the data, and wrote the manuscript; Katarzyna Paździor-Czapula edited the manuscript; Joanna Fidorowicz collected samples; Michał Gesek contributed to data analysis and graphs preparation; Iwona Otrócka-Domagala supervised and corrected the manuscript. The authors read and approved the final manuscript.

Funding

Project financially supported by the Minister of Education and Science under the program entitled "Regional Initiative of Excellence" for the years 2019–2023, Project No. 010/RID/2018/19, amount of funding 12,000,000 PLN; the National Science Center, project No. 2021/05/X/NZ4/00037.

Availability of data and materials

Data used in this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Ethics approval is not applicable under the Act of 15 January 2015 on the protection of animals used for scientific or educational purposes – Journal of Laws of the Republic of Poland (Journal of Laws 2015 item 266) and Local Ethics Committee for Animal Experiments. The study used archival specimens collected in the Department of Pathological Anatomy. Written informed consent was obtained from the owner or legal custodian of all animals described in this work for the procedures undertaken in this retrospective study. No

animals or humans are identifiable within this publication, and therefore additional informed consent for publication was not required.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Received: 14 December 2022 Accepted: 3 February 2023

Published online: 10 February 2023

References

- Martano M, Morello E, Buracco P. Feline injection-site sarcoma: past, present and future perspectives. *Vet J*. 2011;188:136–41.
- Porcellato I, Menchetti L, Brachelente C, Sforza M, Raginato A, Lepri E, Mechelli L. Feline Injection-Site Sarcoma: Matrix Remodeling and Prognosis. *Vet Pathol*. 2017;54:204–11.
- Hartmann K, Day MJ, Thiry E, Lloret A, Frymus T, Addie D, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Gruffydd-Jones T, Horzinek MC, Hosie MJ, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Truyen U, Möstl K, European Advisory Board on Cat Diseases. Feline injection-site sarcoma: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*. 2015;17:606–13.
- Hendrick MJ, Dunagan CA. Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988–1989). *J Am Vet Med Assoc*. 1991;198:304–5.
- Hendrick MJ, Goldschmidt MH. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J Am Vet Med Assoc*. 1991;199:968.
- Kass PH, Barnes WG Jr, Spangler WL, Chomel BB, Culbertson MR. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J Am Vet Med Assoc*. 1993;203:396–405.
- Esplin DG, Bigelow M, McGill LD, Wilson SR. Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection in a cat. *Vet Cancer Soc Newsletter*. 1999;23:8–9.
- Kass PH, Spangler WL, Hendrick MJ, McGill LD, Esplin DG, Lester S, Slater M, Meyer EK, Boucher F, Peters EM, Gobar GG, Htoo T, Decile K. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc*. 2003;223:1283–92.
- Munday JS, Banyay K, Aberdein D, French AF. Development of an injection site sarcoma shortly after meloxicam injection in an unvaccinated cat. *J Feline Med Surg*. 2011;13:988–91.
- Carminato A, Vascellari M, Marchioro W, Melchietti E, Mutinelli F. Microchip-associated fibrosarcoma in a cat. *Vet Dermatol*. 2011;22:565–9.
- Si M, Lang J. The roles of metallothioneins in carcinogenesis. *J Hematol Oncol*. 2018;11:107.
- Pedersen MØ, Larsen A, Stoltenberg M, Penkowa M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Prog Histochem Cytochem*. 2009;44:29–64.
- Lynn NN, Howe MC, Hale RJ, Collins GN, O'Reilly PH. Over expression of metallothionein predicts resistance of transitional cell carcinoma of bladder to intravesical mitomycin therapy. *J Urol*. 2003;169:721–3.
- Smith DJ, Jaggi M, Zhang W, Galich A, Du C, Sterrett SP, Smith LM, Balaji KC. Metallothioneins and resistance to cisplatin and radiation in prostate cancer. *Urology*. 2006;67:1341–7.
- Mairinger FD, Schmeller J, Borchert S, Wessolly M, Mairinger E, Kollmeier J, Hager T, Mairinger T, Christoph DC, Walter RFH, Eberhardt WEE, Plönes T, Wohlschlaeger J, Jasani B, Schmid KW, Bankfalvi A. Immunohistochemically detectable metallothionein expression in malignant pleural mesotheliomas is strongly associated with early failure to platin-based chemotherapy. *Oncotarget*. 2018;9:22254–68.
- Zabielska-Koczywś K, Wojtawicz A, Lechowski R. Current knowledge on feline injection-site sarcoma treatment. *Acta Vet Scand*. 2017;59:47.
- Dincer Z, Jasani B, Haywood S, Mullins JE, Fuentealba IC. Metallothionein expression in canine and feline mammary and melanotic tumours. *J Comp Pathol*. 2001;125:130–6.
- Canpolat E, Lynes MA. In Vivo Manipulation of Endogenous Metallothionein with a Monoclonal Antibody Enhances a T-Dependent Humoral Immune Response. *Toxicol Sci*. 2001;62:61–70.
- Youn J, Lynes MA. Metallothionein-induced suppression of cytotoxic T lymphocyte function: an important immunoregulatory control. *Toxicol Sci*. 1999;52:199–208.
- Woodward KN. Origins of injection-site sarcomas in cats: the possible role of chronic inflammation—a review. *ISRN Vet Sci*. 2011;12:210982.
- Dobromylyskij MJ, Richards V, Smith KC. Prognostic factors and proposed grading system for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in cats, based on a retrospective study. *J Feline Med Surg*. 2021;23:168–74.
- Datta J, Majumder S, Kutay H, Motiwala T, Frankel W, Costa R, Cha HC, MacDougald OA, Jacob ST, Ghoshal K. Metallothionein expression is suppressed in primary human hepatocellular carcinomas and is mediated through inactivation of CCAAT/enhancer binding protein alpha by phosphatidylinositol 3-kinase signaling cascade. *Cancer Res*. 2007;67:2736–46.
- Wei H, Desouki MM, Lin S, Xiao D, Franklin RB, Feng P. Differential expression of metallothioneins (MTs) 1, 2, and 3 in response to zinc treatment in human prostate normal and malignant cells and tissues. *Mol Cancer*. 2008;7:7.
- Yan DW, Fan JW, Yu ZH, Li MX, Wen YG, Li DW, Zhou CZ, Wang XL, Wang Q, Tang HM, Peng ZH. Downregulation of metallothionein 1F, a putative oncosuppressor, by loss of heterozygosity in colon cancer tissue. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822:918–26.
- Takahashi S. Positive and negative regulators of the metallothionein gene (Review). *Mol Med Rep*. 2015;12:795–9.
- Dziegiel P, Salwa-Zurawska W, Zurawski J, Wojnar A, Zabel M. Prognostic significance of augmented metallothionein (MT) expression correlated with Ki-67 antigen expression in selected soft tissue sarcomas. *Histol Histopathol*. 2005;20:83–9.
- Cherian MG, Apostolova MD. Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2000;46:347–56.
- Surowiak P, Materna V, Maciejczyk A, Pudelko M, Markwitz E, Spaczyński M, Dietel M, Zabel M, Lage H. Nuclear metallothionein expression correlates with cisplatin resistance of ovarian cancer cells and poor clinical outcome. *Virchows Arch*. 2007;450:279–85.
- Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, Ortmann O. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;139:539–52.
- Klöppel G, La Rosa S. Ki67 labeling index: assessment and prognostic role in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Virchows Arch*. 2018;472:341–9.
- Sierra Matiz OR, Santilli J, Anai LA, Da Silva MCL, Sueiro FA, Sequeira JL, Magalhães LF, Magalhães GM, Tinucci Costa M, Calazans SG. Prognostic significance of Ki67 and its correlation with mitotic index in dogs with diffuse large B-cell lymphoma treated with 19-week CHOP-based protocol. *J Vet Diagn Invest*. 2018;30:263–7.
- Patrino R, Passantino G, Laface C, Tinelli A, Zito A, Ruggieri R, Luposella F, Gadaleta P, Laforgia M, Lacitignola L, Ammendola M, Ranieri G, Zizzo N. Microvascular Density, Endothelial Area, and Ki-67 Proliferative Index Correlate Each Other in Cat Post-Injection Fibrosarcoma. *Cells*. 2020;10:31.
- Travaglio A, Raffone A, Catena U, De Luca M, Toscano P, Del Prete E, Vecchione ML, Lionetti R, Zullo F, Insabato L. Ki67 as a prognostic marker in uterine leiomyosarcoma: a quantitative systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2021;266:119–24.
- Sorbye SW, Kilvaer TK, Valkov A, Donnem T, Smeland E, Al-Shibli K, Bremnes RM, Busund LT. Prognostic impact of Jab1, p16, p21, p62, Ki67 and Skp2 in soft tissue sarcomas. *PLoS One*. 2012;10:e47068.
- Soares M, Ribeiro R, Carvalho S, Peleteiro M, Correia J, Ferreira F. Ki-67 as a Prognostic Factor in Feline Mammary Carcinoma: What Is the Optimal Cutoff Value? *Vet Pathol*. 2016;53:37–43.
- Woldemeskel M, Hawkins I, Whittington L. Ki-67 protein expression and tumor associated inflammatory cells (macrophages and mast cells) in canine colorectal carcinoma. *BMC Vet Res*. 2017;20:111.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;6917:860–7.
- Murri A, Hilmy M, Bell J, Willson C, McNicol A-M, Lannigan A, Doughty JC, McMillan DC. The relationship between the systemic inflammatory response, tumour proliferative activity, T-lymphocytic and macrophage infiltration, microvessel density and survival in patients with primary operable breast cancer. *Br J Cancer*. 2008;99:1013–9.

39. Caruso RA, Branca G, Fedele F, Irato E, Finocchiaro G, Parisi A, Ieni A. Mechanisms of coagulative necrosis in malignant epithelial tumors (Review). *Oncol Lett*. 2014;8:1397–402.
40. Yee PP, Li W. Tumor necrosis: a synergistic consequence of metabolic stress and inflammation. *BioEssays*. 2021;43:e2100029.
41. Bahaddin MM. A comparative study between Ki67 positive versus Ki67 negative females with breast cancer: cross sectional study. *Ann Med Surg (Lond)*. 2020;60:232–5.
42. Doddy FD, Glickman LT, Glickman NW, Janovitz EB. Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *J Comp Pathol*. 1996;114:165–74.
43. Dean RS, Pfeiffer DU, Adams VJ. The incidence of feline injection site sarcomas in the United Kingdom. *BMC Vet Res*. 2013;9:17.
44. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe*. 1987;8:138–40.
45. Surowiak P, Matkowski R, Materna V, Györfy B, Wojnar A, Pudelko M, Dziegiel P, Kornafel J, Zabel M. Elevated metallothionein (MT) expression in invasive ductal breast cancers predicts tamoxifen resistance. *Histol Histopathol*. 2005;20:1037–44.
46. Nowak M, Madej JA, Dziegiel P. Extent of metallothionein expression in correlation with expression of Ki-67 antigen in soft tissue fibrosarcomas in dogs. *Bull Vet Inst Pulawy*. 2007;51:139–44.
47. Mikiewicz M, Otrocka-Domagala I, Paździor-Czapula K, Gesek M. Morphology and immunoreactivity of canine and feline extramedullary plasmacytomas. *Pol J Vet Sci*. 2016;19:345–52.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Oświadczenie

Niniejszym oświadczamy, że wkład autorów w publikacji:

Mateusz Mikiewicz, Katarzyna Paździor-Czapula, Joanna Fiedorowicz, Iwona Otrocka-Domagala. Expression of programmed cell death protein 1 and programmed cell death ligand 1 in feline injection site fibrosarcomas. Research in Veterinary Science 2024; 176: 105350.

Był następujący:

Mateusz Mikiewicz – stworzenie koncepcji badań oraz metodyki badań, uzyskanie finansowania z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura 5 (Nr DEC-2021/05/X/NZ4/00037), zaplanowanie i wykonanie analiz laboratoryjnych, opracowanie i interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu, wykonanie rycin, przygotowanie odpowiedzi na recenzję.

Katarzyna Paździor-Czapula – zredagowanie manuskryptu.

Joanna Fiedorowicz – zebranie próbek do wykonania badania.

Iwona Otrocka-Domagala – nadzór merytoryczny i korekta ostatecznej wersji manuskryptu.

Dr wet. Mateusz Mikiewicz *Mateusz Mikiewicz*

Dr n. wet. Katarzyna Paździor-Czapula *Katarzyna Paździor-Czapula*

Lek. wet. Joanna Fiedorowicz *Joanna Fiedorowicz*

Dr hab. Iwona Otrocka-Domagala. Prof. UWM *Iwona Otrocka-Domagala*



Expression of programmed cell death protein 1 and programmed cell death ligand 1 in feline injection site fibrosarcomas

Mateusz Mikiewicz^{*}, Katarzyna Paździor-Czapula, Joanna Fiedorowicz, Iwona Otrocka-Domagala

Department of Pathological Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego St. 13, 10-719 Olsztyn, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Immunohistochemistry
Feline injection site fibrosarcoma
PD-1
PD-L1
PD-1/PD-L1 axis

ABSTRACT

Feline injection site fibrosarcomas represent a unique challenge in veterinary oncology due to their association with injection sites and aggressive behaviour. The study explores the expression of immune checkpoints programmed cell death protein 1 and programmed cell death ligand 1 in the malignancy, aiming to unravel their potential significance in tumour progression. The study included 31, archival diagnostic specimens of feline fibrosarcomas, located in the common injection sites. The programmed cell death protein 1 and programmed cell death ligand 1 expression in tumour cells and tumour infiltrating lymphocytes were assessed by immunohistochemical methods. Programmed cell death protein 1 and programmed cell death ligand 1 expression were observed in 84% and 81% of cases, respectively. In tumour infiltrating lymphocytes the PD-1 expression was observed in 71% of cases. Notably, higher programmed cell death protein 1 expression correlated with tumour grade and heightened inflammation score, suggesting a potential association with tumour aggressiveness. Similarly, programmed cell death ligand 1 expression exhibited a positive correlation with tumour grade and inflammation score. The observed findings suggest a potential role for programmed cell death protein 1 and programmed cell death ligand 1 in tumour progression and immune response within the tumour microenvironment. Moreover, this study contributes to a deeper understanding of feline injection site fibrosarcoma pathogenesis, emphasizing the importance of considering immunological perspectives in developing effective treatment strategies for this challenging condition. Further investigations are warranted to advance our knowledge and refine therapeutic approaches for feline injection site fibrosarcoma management.

1. Introduction

Feline injection site sarcomas (FISS) have garnered considerable attention due to their unique association with injection sites and their aggressive behaviour (Martano et al., 2011; Porcellato et al., 2017). The most commonly diagnosed histological type is fibrosarcoma (Carneiro et al., 2019; Doddy et al., 1996). The most commonly and widely accepted theory is that the tumour arises due to chronic inflammation caused by vaccination, long-acting drug injections, trauma, and microchip implantation (Esplin et al., 1999; Kass et al., 2003; Munday et al., 2011; Porcellato et al., 2017), however, the mechanism by which the chronic inflammatory reaction might cause tumour formation is not fully understood. The inflammation can induce the production of free radicals and metabolites that cause DNA damage and mutations, acting as an initiator of carcinogenesis (Hartmann et al., 2023), thus altering the susceptibility to carcinogenic injuries in conjunction with a chronic

inflammatory environment and a genetic predisposition (O'Byrne and Dalgleish, 2001). Consequently, the significance of inflammation in malignancy formation highlights the necessity for further research aimed at a better understanding of the mechanisms that connect inflammation, DNA damage, and neoplasm development. Previously, we have shown a connection among the Ki67 index, tumour grade and inflammatory score in feline injection site fibrosarcomas, indicating that inflammation may have a significant role not just in the development of the malignancy but also in tumour progression (Mikiewicz et al., 2023).

Programmed cell death protein 1 (PD-1) is a receptor which plays a crucial role in suppressing immune responses and fostering self-tolerance by regulating T-cell activity, initiating the apoptosis of antigen-specific T cells, and impeding the apoptosis of regulatory T cells. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) is a transmembrane protein recognized as a coinhibitory factor in the immune response. It can bind to PD-1, reducing the proliferation of PD-1-positive cells, suppressing

^{*} Corresponding author.

E-mail address: mateusz.mikiewicz@uwm.edu.pl (M. Mikiewicz).

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105350>

Received 4 January 2024; Received in revised form 31 May 2024; Accepted 30 June 2024

Available online 2 July 2024

0034-5288/© 2024 Elsevier Ltd. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

their cytokine secretion, and inducing apoptosis. PD-L1 is also significant in various malignancies, where it diminishes the host immune response to tumour cells (Han et al., 2020). PD-1 can be found on activated T and B lymphocytes and neoplastic cells, while PD-L1 is mostly expressed on the surface of tumour cells (Yao et al., 2018). The interaction between PD-1 and PD-L1 inhibits T cell function and promotes immune evasion by the tumour (Joseph et al., 2015; Samstein et al., 2019). Following its binding to a ligand, PD-1 inhibits the anti-tumour capabilities of T cells and diminishes the responsiveness of T cells (Yao et al., 2018). In humans, this immune checkpoint mechanism has been recently identified and linked to the development of different types of neoplasms (Han et al., 2020). PD-L1 expression is correlated with poor prognosis in cancer patients (Patel and Kurzrock, 2015; Sznol and Chen, 2013; Wu et al., 2006). In humans, the potential involvement of PD-1/PD-L1 mechanism in undifferentiated pleomorphic sarcoma, synovial sarcoma, angiosarcoma, leiomyosarcoma, epithelioid sarcoma, alveolar soft part sarcoma has been documented, yet its exact role remains ambiguous (Boxberg et al., 2018; Oike et al., 2018). The connection between the PD-1/PD-L1 pathway and its role in malignancy in cats is not yet well understood (Maekawa et al., 2023). The elevation of PD-1/PD-L1 protein expression within lymphocytes was observed in cats infected with immunodeficiency virus (Folkl et al., 2010). Furthermore, PD-L1 expression was observed in HER2-positive and triple-negative feline mammary carcinomas (Nascimento et al., 2020). In feline injection site fibrosarcoma the role of PD-1/PD-L1 remains obscure, and therefore understanding the expression patterns and significance of PD-1 and PD-L1 could offer insights into the immune interactions occurring within the tumour microenvironment, potentially informing the development of novel therapeutic strategies. So far despite advancements in understanding their clinical presentation and treatment strategies, the intricate interplay between tumour biology, immune response, and the microenvironment remains a subject of investigation.

This study aimed to investigate the correlation between tumour grade, PD-1 and PD-L1 expression, and the degree of inflammation in feline injection site fibrosarcoma. By analysing the distribution of tumour grades, assessing the levels of PD-1 and PD-L1 expression, and evaluating their associations with inflammation scores, the study aimed to provide insights into these factors in the context of this malignancy. Ultimately, a comprehensive understanding of these intricate interactions may pave the way for improved diagnostic, prognostic, and treatment strategies for this challenging malignancy.

2. Materials and methods

2.1. Study design

The study included surgically excised cutaneous tumours collected from 31 cats, 17 (55%) males and 14 (45%) females, aged 4–17 (mean: 11 ± 3 years). The samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, processed routinely, embedded in paraffin wax, cut, and stained with Mayer's hematoxylin and eosin (HE). Inclusion criteria included morphological features described previously (Dean et al., 2013; Doddy et al., 1996; Mikiewicz et al., 2023) and localisation in the injection site: interscapular region (45%; 14/31 cases), thigh (13%; 4/31 cases), flank (16%; 5/31 cases), lumbar area (6.5%; 2/31 cases), shoulder (6.5%; 2/31 cases), and dorsal area of the neck (13%; 4/31 cases). Histologically, the tumours were graded into grades I, II and III, according to the grading system proposed by Dobromylskyj et al. (Dobromylskyj et al., 2021) for feline soft tissue sarcomas and described previously (Mikiewicz et al., 2023).

2.2. Immunohistochemical evaluation

The sections for immunohistochemistry were mounted on silanized glass slides. Heat-induced antigen retrieval was performed in Tris-EDTA

buffer pH 9.0 (EnVision™ Flex Target Retrieval Solution High pH, DAKO, Glostrup, Denmark) for 20 min at 96°C using a PT-Link module (Dako, Glostrup, Denmark). Immunohistochemical examination of each tumour was performed using primary antibodies: PD-1 (monoclonal mouse anti-PD-1, clone J166, dilution 1:25, incubation time: overnight in a humid chamber at 4°C ; Abcam, Cambridge, Great Britain) and PD-L1 (monoclonal rabbit anti-PD-L1, clone 28–8, dilution 1:100, incubation time: overnight in a humid chamber at 4°C ; Abcam, Cambridge, Great Britain) and a visualisation system based on the immunoperoxidase method, with 3,3-diaminobenzidine (DAB) as a substrate (for PD-1: EnVision + System-HRP, Anti-Mouse, Dako, Glostrup, Denmark; for PD-L1: EnVision + System-HRP, Anti-Rabbit, Dako, Glostrup, Denmark). A previous study has shown that the anti-human programmed cell death 1 (PD-1) monoclonal antibody, clone J116, cross-reacts with feline PD-1, confirming its suitability for feline tissues (Nascimento et al., 2020). The cross-reactivity of anti-human programmed cell death ligand 1 (PD-L1) monoclonal antibody, clone 28–8 against feline PD-L1 confirms that the PD-L1 clone 28–8 antibody is suitable for feline tissues (Nishibori et al., 2023). The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin. Positive and negative control slides were processed with the evaluated slides (PD-1 and PD-L1 – feline tonsil; Fig. 1 and Fig. 2). For the negative control slides the primary antibody was omitted. Brown precipitate at the antigen site was regarded as a positive reaction. The slides were evaluated under a light microscope (BX63, Olympus, Tokyo, Japan) using CellSense (Olympus, Tokyo, Japan) software.

2.3. PD-1 and PD-L1 evaluation

The expression of PD-1 and PD-L1 was calculated in neoplastic cells in 4 representative HPFs (high-power fields, $400\times$), avoiding areas of necrosis. For PD-1 and PD-L1 a semiquantitative scale that included the intensity of the immunostaining (0: none; 1: weak to moderate; 2: strong) and the percentage of immunoreactive tumour cells (0: no positive cells; 1: $<10\%$; 2: $10\text{--}50\%$; 3: $>50\%$) was used. The percentage of positive cells and intensity scores were then multiplied to obtain a final IHC score (Kim et al., 2016). Additionally, PD-1 expression was calculated in TILs, which were identified based on morphologic evaluation. The score included the percentage of immunoreactive TILs (0: no positive cells; 1: $<10\%$; 2: $10\text{--}50\%$; 3: $>50\%$) (Brockhoff et al., 2018). The positivity rate was defined as the number of positive cells/total cell number. Membranous staining at least weak and partially counted as a positive cell.

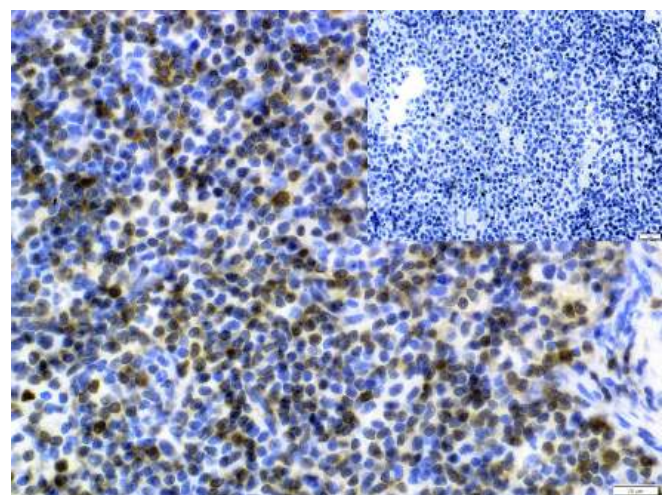


Fig. 1. Feline tonsil. Membranous PD-1 immunoexpression in cells (positive control to PD-1). Inset: lack of PD-1 immunoexpression in cells (negative control to PD-1). PD-1 immunostaining with DAB, counterstaining with Mayer's hematoxylin, $400\times$.

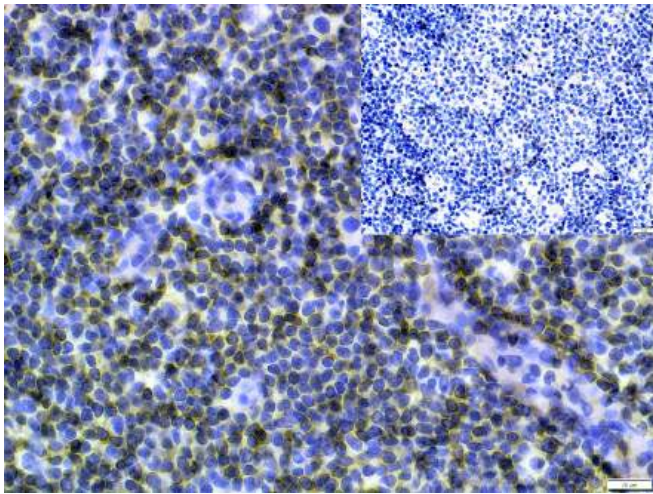


Fig. 2. Feline tonsil. Membranous PD-L1 immunoperoxidase staining in cells (positive control to PD-L1). Inset: lack of PD-L1 immunoperoxidase staining in cells (negative control to PD-L1). PD-L1 immunostaining with DAB, counterstaining with Mayer's hematoxylin, 400 × .

2.4. Statistical analysis

The variables were checked for normality using the Shapiro-Wilk test. Differences in PD-1, PD-L1 between groups with grades I, II and III, and inflammation score were analysed using the Kruskal–Wallis H test (one-way ANOVA on ranks) followed by Dunn's post hoc test. Correlations between tumour grade, inflammation score, TILs, PD-1 and PD-L1 were examined using Spearman's rank correlation (r : Spearman's

rank correlation coefficient); $p \leq 0.05$ was considered statistically significant, and $p \leq 0.001$ as highly significant. The statistical analysis was performed using Statistica 14 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results

Histological analysis of evaluated tumours revealed 3 grade I (10%), 13 grade II (42%) and 15 grade III (48%). The membranous PD-1 immunolabelling was observed in 84% of cases (Fig. 3 A-C) and included 2 grade I (66.7%), 10 grade II (76.9%), and 14 grade III (93.3%) tumours. The highest PD-1 expression was observed in 5 grade III (16.1%) cases. The PD-1 immunoperoxidase staining was observed in tumour infiltrating lymphocytes (TILs) in 22 cases (71%) and included 2 grade I (66.7%), 7 grade II (53.8%), and 13 grade III (86.7%) tumours. The PD-1 immunoperoxidase staining in TILs is shown in Fig. 3D.

Statistical analysis revealed that the PD-1 immunoperoxidase staining in tumour cells was higher in grade III compared to grade II tumours ($p = 0.025$; Fig. 4A), and it was positively correlated with tumour grade ($r = 0.52$; $p = 0.003$; Fig. 4B). Additionally, PD-1 expression in tumour cells was positively correlated with the inflammation score ($r = 0.53$; $p = 0.002$; Fig. 4C). The lowest mean PD-1 expression in tumour cells was observed in cases with the lowest inflammation score (score 1), and the highest expression was observed in tumours with highest inflammation score (score 3). Additionally, the differences were statistically significant ($p = 0.047$; Fig. 4D).

Furthermore, a positive correlation was observed between PD-1 positive TILs and tumour grade ($r = 0.4$; $p = 0.028$; Fig. 5A), inflammation score ($r = 0.75$; $p = 0.000$; Fig. 5B), PD-1 expression in tumour cells ($r = 0.81$; $p = 0.000$; Fig. 5C), and PD-L1 expression in tumour cells ($r = 0.82$; $p = 0.000$; Fig. 5D).

The membranous PD-L1 immunolabelling in tumour cells was

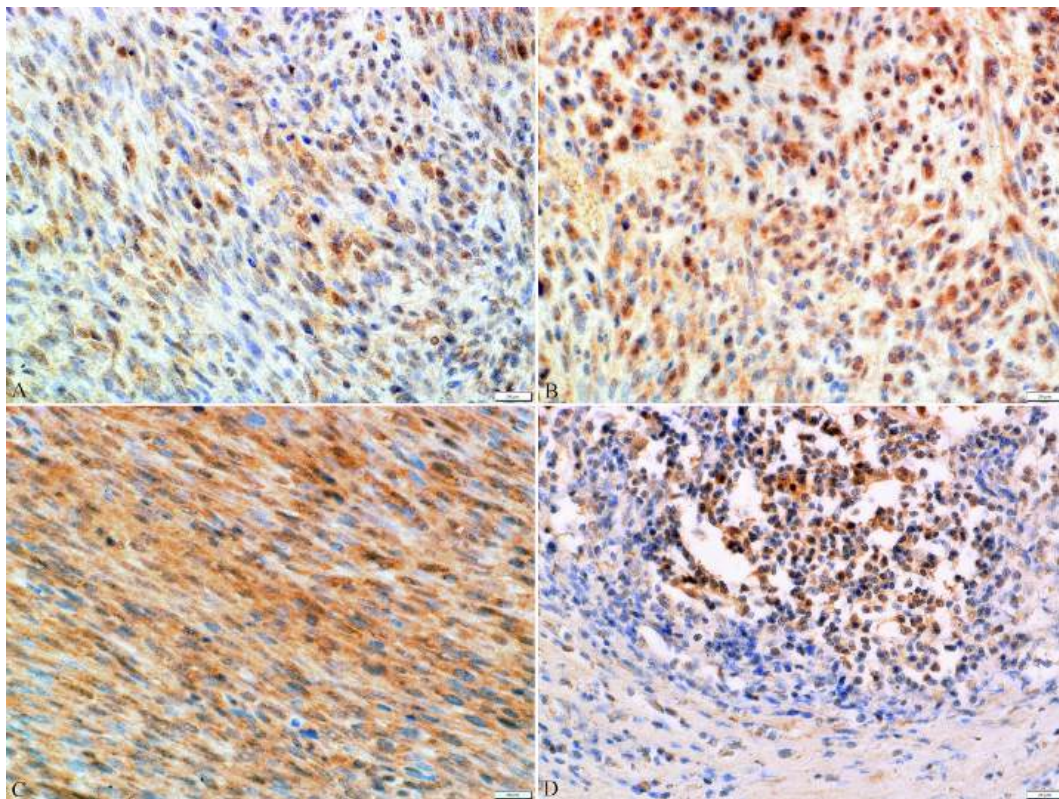


Fig. 3. Feline injection site fibrosarcoma. A. Tumour grade I. Tumour cells (quantitative score: 1) show weak to moderate (intensity score: 1) expression of PD-1 (score: 1). B. Tumour grade II. Tumour cells (quantitative score: 3) show weak to moderate (intensity score: 1) expression of PD-1 (score: 3). C. Tumour grade III. Tumour cells (quantitative score: 3) show strong (intensity score: 2) expression of PD-1 (score: 6). D. PD-1 immunoperoxidase staining in TILs. PD-1 immunostaining with DAB, counterstaining with Mayer's hematoxylin, 400 × .

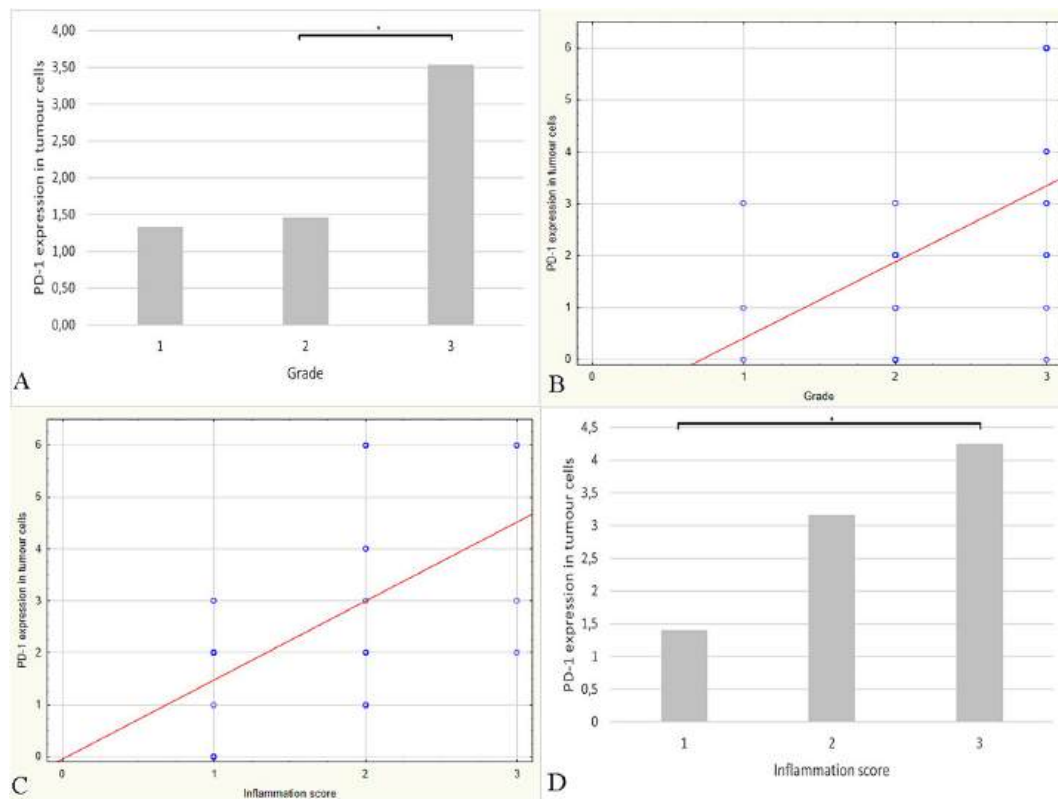


Fig. 4. Feline injection site fibrosarcoma. A. Mean PD-1 immunoreactivity values in tumour cells in tumours grade I, II, and III. PD-1 immunoreactivity was significantly higher in tumours grade III compared to grade II ($p = 0.025$). B. Positive correlation between the PD-1 immunoreactivity values in tumour cells and the tumour grade. The PD-1 immunoreactivity increased with the tumour grade ($r = 0.52$; $p = 0.003$). C. Positive correlation between the PD-1 immunoreactivity in values in tumour cells and the inflammation score. The PD-1 immunoreactivity increased with the inflammation score ($r = 0.53$; $p = 0.002$). D. Mean PD-1 immunoreactivity values in tumour cells in low (1), moderate (2), and severe (3) inflammation score. PD-1 immunoreactivity was significantly higher in tumours with severe (3) inflammation score compared to low (1) inflammation score ($p = 0.047$).

observed in 81% of cases (Fig. 6 A-C) and included 2 grade I (66.7%), 9 grade II (69.2%), and 14 grade III (93.3%) tumours. The highest PD-L1 expression in tumour cells was observed in 9 cases (29%), in which 8 tumours were grade III and 1 tumour was histologically classified as grade II.

The PD-L1 immunoreactivity in tumour cells was higher in grade III compared to grade II tumours ($p = 0.03$; Fig. 7A), and it was positively correlated with tumour grade ($r = 0.5$; $p = 0.004$; Fig. 7B). Furthermore, similar as in case of PD-1, PD-L1 immunoreactivity in tumour cells was positively correlated with the inflammation score ($r = 0.81$; $p = 0.000$; Fig. 7C). Statistical analysis revealed that the lowest mean PD-L1 expression in tumour cells was observed in cases with the lowest inflammation score (score 1), and the highest expression was observed in tumours with the highest inflammation score (score 3). The statistically significant differences were observed between cases with the highest inflammation score (score 3) and lowest inflammation score ($p = 0.001$; score 1) and between moderate inflammation score (score 2) and lowest ($p = 0.002$; score 1) (Fig. 7D). The data on histological grade, PD-1, and PD-L1 expression in tumour cells are presented in Table 1.

4. Discussion

In the present study, PD-1 expression was observed in 84% of cases, with the highest expression observed in grade III tumours. PD-1 expression was positively correlated with tumour grade and inflammation score indicating a potential association with tumour aggressiveness. Similarly, PD-L1 expression, observed in 81% of cases, demonstrated a positive correlation with tumour grade and inflammation score. Our study significantly contributes to our understanding of feline injection

site fibrosarcoma pathogenesis by investigating the expression of immune checkpoints PD-1 and PD-L1 within the tumour microenvironment. Additionally, the above findings provide crucial insights into the immunological mechanisms that may influence tumour progression, offering a foundation for potential therapeutic strategies.

The high prevalence of membranous PD-1 immunolabelling among evaluated fibrosarcoma cases underscores the involvement of the PD-1 pathway in malignancies. PD-1, a critical regulator of T-cell function, plays a pivotal role in dampening the immune response against cancer cells, leading to immune evasion and tumour growth in humans (Han et al., 2020). Silencing PD-1 or PD-L1, promotes cell proliferation and colony formation in vitro and tumour growth in vivo, while overexpression of PD-1 or PD-L1 inhibits tumour cell proliferation. Additionally, the coordination of PD-1 and PD-L1 activates major downstream signalling pathways, including the AKT and ERK1/2 pathways, leading to enhanced tumour cell growth (Wang et al., 2020). Recent studies have revealed intrinsic expression of PD-1 in melanoma, liver, and non-small cell lung cancer cells, influencing tumour growth independent of adaptive immunity (Kleffel et al., 2015; Li et al., 2017; Du et al., 2018). In melanoma and liver cancer, PD-1 activation was found to promote tumour growth through downstream mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling independent of adaptive immunity and its blockade has shown therapeutic effects (Kleffel et al., 2015; Li et al., 2017), while in non-small cell lung cancer, PD-1 blockade led to tumour proliferation (Du et al., 2018). Taken together, these findings suggest that the roles of tumour cell-intrinsic PD-1 can vary considerably across different cancer types, and further research is needed to precisely define its functions and therapeutic implications in individual cancer cases. Understanding these multifaceted roles is crucial for refining

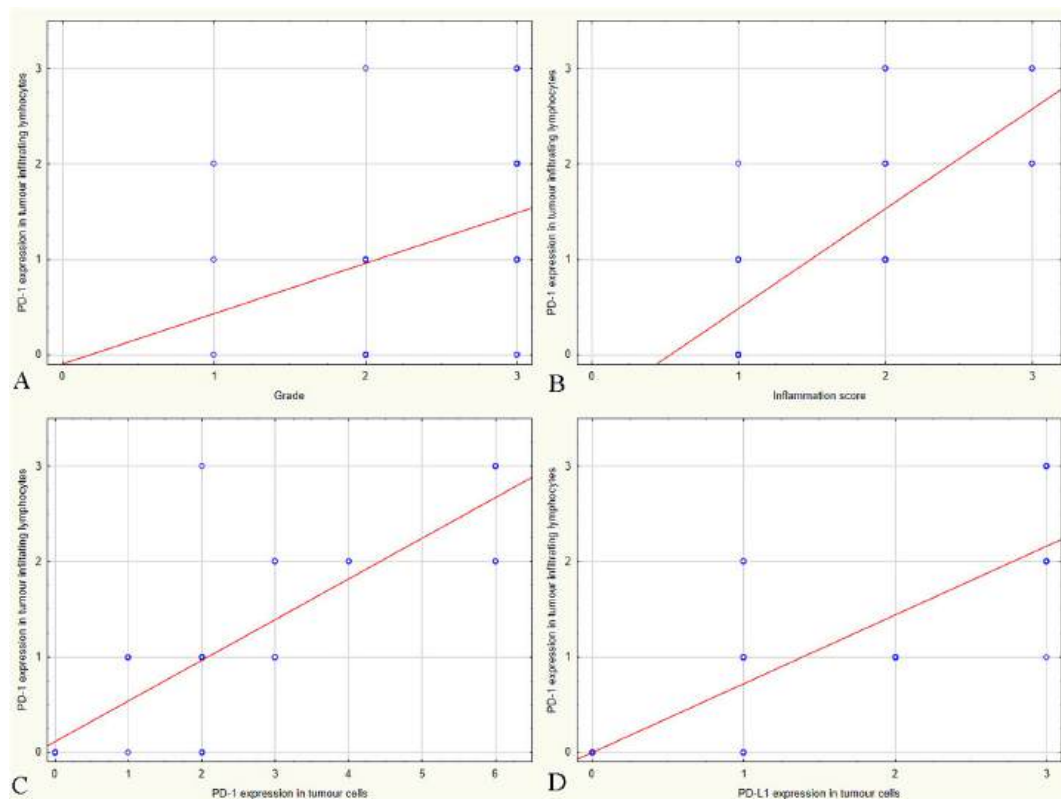


Fig. 5. Feline injection site fibrosarcoma. A. Positive correlation between PD-1 expression in tumour infiltrating lymphocytes and the tumour grade. The number of tumour infiltrating lymphocytes increased with the tumour grade ($r = 0.4$; $p = 0.028$). B. Positive correlation between PD-1 expression in tumour infiltrating lymphocytes and the inflammation score. The number of tumour-infiltrating lymphocytes increased with the inflammation score ($r = 0.75$; $p = 0.000$). C. Positive correlation between PD-1 expression in tumour infiltrating lymphocytes and the PD-1 expression in tumour cells. The number of tumour-infiltrating lymphocytes increased with the increased expression of PD-1 in tumour cells ($r = 0.81$; $p = 0.000$). D. Positive correlation between PD-1 expression in tumour infiltrating lymphocytes and the PD-L1 expression in tumour cells. The number of tumour-infiltrating lymphocytes increased with the increased expression of PD-L1 in tumour cells ($r = 0.82$; $p = 0.000$).

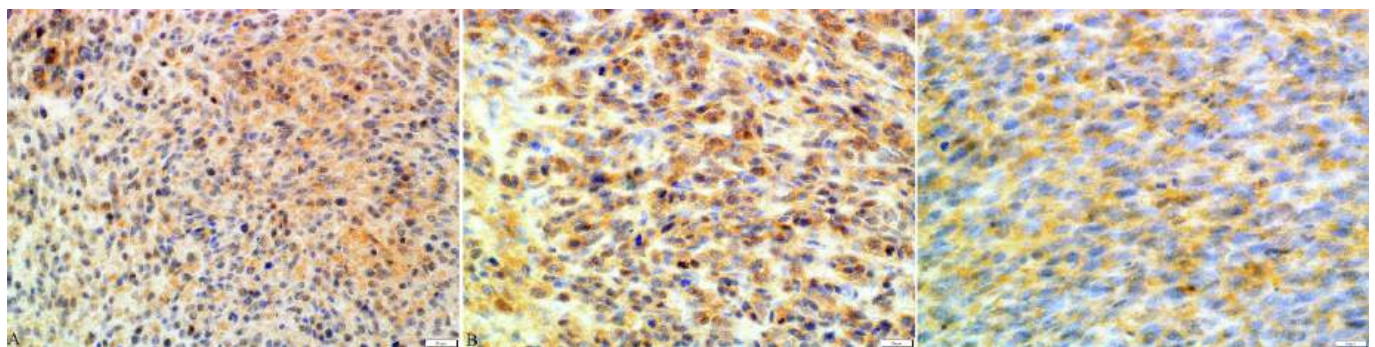


Fig. 6. Feline injection site fibrosarcoma. A. Tumour grade I. Tumour cells (quantitative score: 1) show weak to moderate (intensity score: 1) expression of PD-L1 (score: 1). B. Tumour grade II. Tumour cells (quantitative score: 2) show weak to moderate (intensity score: 1) expression of PD-L1 (score: 2). C. Tumour grade III. Tumour cells (quantitative score: 3) show weak to moderate (intensity score: 1) expression of PD-L1 (score: 3). PD-L1 immunostaining with DAB, counterstaining with Mayer's hematoxylin, $400\times$.

combinatorial immunotherapies and developing more effective treatment strategies.

The observed correlation between PD-1 expression and tumour grade is a noteworthy finding in our study. The elevated PD-1 expression in feline injection site fibrosarcoma in grade III tumours aligns with previous research across diverse cancer types, where elevated PD-1 expression has been associated with advanced disease stages and poorer prognosis (McDermott and Atkins, 2013; Oike et al., 2018; Samstein et al., 2019). In the context of feline injection site fibrosarcoma, this correlation may suggest the potential prognostic value of PD-

1 as a biomarker for tumour aggressiveness, however further studies are needed to determine the utility of PD-1 as a biomarker in feline injection site fibrosarcoma.

Our study revealed a positive correlation between PD-1 expression and inflammation score. This intriguing association implies a dynamic interplay between chronic inflammation and PD-1 activation in feline injection site fibrosarcoma development. Chronic inflammation has long been recognized as a promoter of tumorigenesis in various malignancies (Coussens and Werb, 2002; Murri et al., 2008; Sorbye et al., 2012), furthermore, our findings provide additional insight into the already

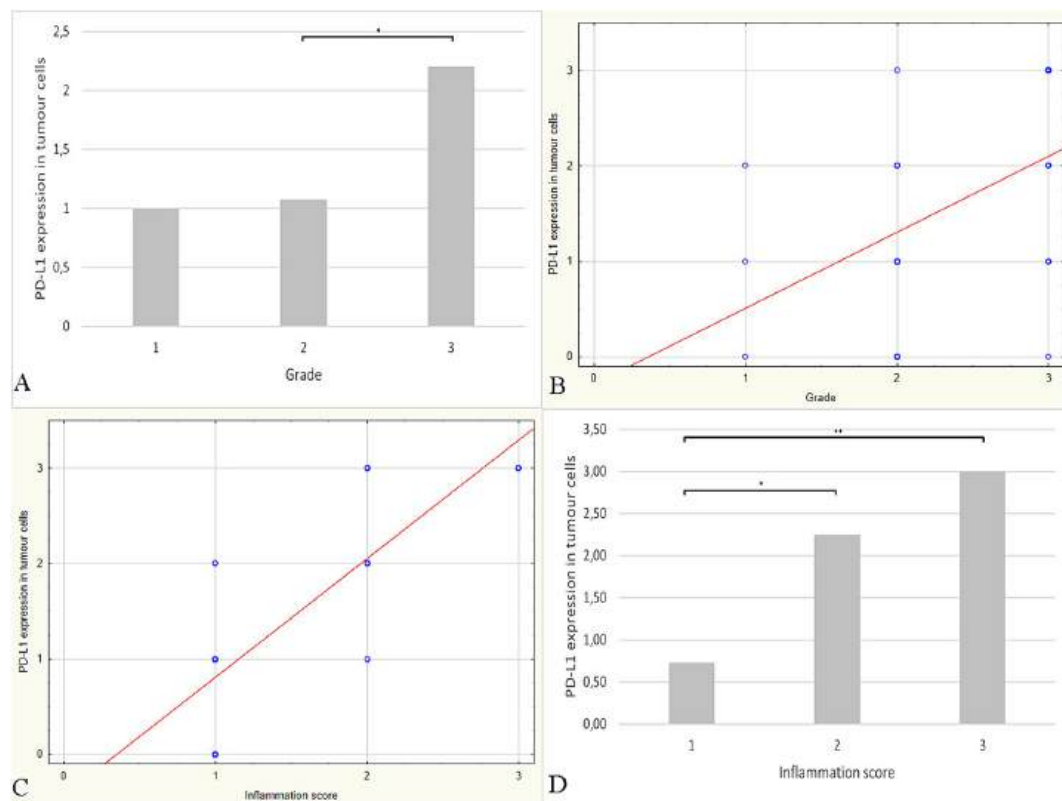


Fig. 7. Feline injection site fibrosarcoma. A. Mean PD-L1 immunoreexpression values in tumour cells in tumours grade I, II, and III. PD-L1 immunoreexpression was significantly higher in tumours grade III compared to grade II ($p = 0.03$). B. Positive correlation between the PD-L1 immunoreexpression values in tumour cells and the tumour grade. The PD-L1 immunoreexpression increased with the tumour grade ($r = 0.5$; $p = 0.004$). C. Positive correlation between the PD-L1 immunoreexpression values in tumour cells and the inflammation score. The PD-L1 immunoreexpression increased with the inflammation score ($r = 0.81$; $p = 0.000$). D. Mean PD-L1 immunoreexpression values in tumour cells in low (1), moderate (2), and severe (3) inflammation score. PD-L1 immunoreexpression was significantly higher in tumours with severe (3) inflammation score compared to low (1) inflammation score ($p = 0.001$), and higher in tumours with moderate (2) inflammation score compared to low (1) inflammation score ($p = 0.002$).

established connection between chronic inflammation and the development of feline injection site fibrosarcoma (Dean et al., 2013; Hartmann et al., 2015; Hendrick and Dunagan, 1991; Porcellato et al., 2017). It is conceivable that the sustained inflammatory environment at the injection site primes the microenvironment for immune checkpoint activation, potentially creating a conducive setting for tumour growth and immune evasion. The tumour microenvironment is characterised by hypoxia, low pH, and high interstitial fluid pressure, which can reduce the effectiveness of anticancer therapies, including immunotherapy (Fukumura et al., 2018).

The positive correlation between PD-1 positive TILs and various parameters highlights the intricate interplay between immune response markers and the tumour microenvironment in feline injection site fibrosarcoma. The observed correlation with the tumour grade may suggest that PD-1 expression on TILs may be associated with the aggressiveness of the malignancy (Kim et al., 2013). The positive correlation with the inflammation score suggests a possible link between the presence of PD-1-positive TILs and the immune response against the tumour. A recent study on human soft-tissue sarcoma showed that patients with the presence of PD-1 TILs in tumours had increased progression-free survival and overall survival after treatment with monoclonal antibodies targeting the PD-1/PD-L1 signalling axis (Bevins et al., 2022).

The expression of PD-1/PD-L1 in tumour cells and TILs has been investigated across various types of tumours (Boxberg et al., 2018; Han et al., 2020). Activation of PD-1 and PD-L1 leads to T-cell exhaustion, thus contributing to immune evasion (Patel and Kurzrock, 2015; Teng et al., 2015; Spranger, 2016). Previous study has demonstrated a close

relationship between PD-L1/PD-1 expression and T-cell populations. In undifferentiated pleomorphic sarcoma, PD-L1 expression in tumour cells was notably higher in cases with PD-L1-positive TILs, and both PD-L1 expression in tumour cells and TILs were associated with a high density of lymphocytic infiltration (Boxberg et al., 2018). While these findings provide insights into complex dynamics between immune response and tumour features, further research is needed to elucidate the underlying mechanisms and potential therapeutic implications. Understanding the interactions between PD-1 positive TILs and those parameters may contribute to the development of targeted immunotherapies.

Moreover, studies in various human malignancies have highlighted the critical role of PD-L1 expression as a predictor of response to immunotherapies targeting the PD-1/PD-L1 axis (Joseph et al., 2015; Samstein et al., 2019). PD-L1 expression was found in canine squamous cell carcinoma, mammary adenocarcinoma, transitional cell carcinoma, and haemangiosarcoma (Maekawa et al., 2014; Maekawa et al., 2016; Shosu et al., 2016; Kumar et al., 2017; Maekawa et al., 2021; Gulay et al., 2022). In veterinary medicine, the anti-PD-1/PD-L1 antibody treatment has been shown to be useful in cattle infected with bovine leukaemia virus, mycoplasmosis, and John's disease (Nishimori et al., 2017; Okagawa et al., 2017; Shinya et al., 2020; Sajiki et al., 2021). Furthermore, in dogs diagnosed with malignant melanoma and undifferentiated sarcoma, treatment involving anti-PD-L1 antibodies has proven effective in impeding tumour progression (Maekawa et al., 2017; Maekawa et al., 2021). Moreover, due to the resemblance in tumour development and the immune systems across mammalian species, it is hypothesised that immune checkpoint blockade could serve as an

Table 1
Detailed characteristics of evaluated feline injection-site fibrosarcomas.

Case no.	Histological grade	Inflammation score	PD-1 expression in tumour cells	PD-L1 expression in tumour cells
1	1	2	1	2
2	1	1	0	0
3	1	1	3	1
4	2	1	0	0
5	2	1	0	0
6	2	1	2	1
7	2	1	0	0
8	2	1	2	2
9	2	2	1	2
10	2	1	1	0
11	2	1	2	2
12	2	1	2	1
13	2	1	2	1
14	2	3	2	3
15	2	1	3	1
16	2	1	2	1
17	3	2	2	2
18	3	3	6	3
19	3	1	2	1
20	3	1	0	0
21	3	2	4	3
22	3	2	1	2
23	3	2	6	3
24	3	2	2	3
25	3	3	6	3
26	3	3	3	3
27	3	2	6	3
28	3	2	2	1
29	3	2	3	2
30	3	2	4	1
31	3	2	6	3

effective therapeutic approach for feline tumours including feline injection site fibrosarcoma (Maekawa et al., 2023). Additionally, based on the similarity in tumorigenesis and the immune system among mammalian species it is hypothesised that the immune checkpoint blockade may be an effective therapeutic strategy for feline injection site fibrosarcoma. The positive correlation between PD-L1 expression, tumour grade, and inflammation scores suggests a potential avenue for immunotherapeutic intervention. The highest PD-L1 expression in grade III tumours further supports the notion of a more pronounced immune evasion mechanism in a high-grade feline injection site fibrosarcoma, aligning with similar observations in human soft tissue sarcomas (Boxberg et al., 2018). The upregulation of PD-L1 may signify an adaptive response of the tumour to evade immune surveillance, allowing for continued growth and progression.

5. Conclusion

Our study enhances our comprehension of the immunological mechanisms underlying feline injection site fibrosarcoma progression. The observed correlations between PD-1/PD-L1 expression, tumour grade, and inflammation score provide valuable insights into the immunopathogenic mechanisms driving feline injection site fibrosarcoma development. These findings underscore the potential therapeutic implications of targeting the PD-1/PD-L1 axis in feline injection site fibrosarcoma treatment and call for further exploration of immunotherapeutic strategies for patients. The multifaceted interplay between immune checkpoints, chronic inflammation, and tumour progression highlights the complexity of feline injection site fibrosarcoma pathogenesis and emphasises the importance of an immunological perspective in unravelling the intricacies of this challenging condition.

Ethical approval and consent to participate

Ethics approval is not applicable under the Act of 15 January 2015 on the protection of animals used for scientific or educational purposes – Journal of Laws of the Republic of Poland (Journal of Laws 2015 item 266) and Local Ethics Committee for Animal Experiments. The study used archival specimens collected in the Department of Pathological Anatomy. Written informed consent was obtained from the owner or legal custodian of all animals described in this work for the procedures undertaken in this retrospective study. No animals or humans are identifiable within this publication, and therefore additional informed consent for publication was not required.

Funding

Project financially supported by the National Science Centre, project No. 2021/05/X/NZ4/00037.

CRedit authorship contribution statement

Mateusz Mikiewicz: Writing – original draft, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Conceptualization. **Katarzyna Paździor-Czapula:** Writing – review & editing, Validation. **Joanna Fiedorowicz:** Resources. **Iwona Otrocka-Domała:** Supervision.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgements

We would like to thank Dominika Piech and Cezary Zwoliński for preparing the archival specimens.

References

Bevins, N.J., Okamura, R., Montesion, M., Adashek, J.J., Goodman, A.M., Kurzrock, R., 2022. Tumor infiltrating lymphocyte expression of PD-1 predicts response to anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy. *J Immunother Precis Oncol* 5, 90–97. <https://doi.org/10.36401/JIPO-22-9>.

Boxberg, M., Steiger, K., Lenze, U., Rech, H., von Eisenhart-Rothe, R., Wörtler, K., Weichert, W., Langer, R., Specht, K., 2018. PD-L1 and PD-1 and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes in high grade sarcomas of soft tissue - prognostic implications and rationale for immunotherapy. *Oncoimmunology* 7, e1389366. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1389366>.

Brockhoff, G., Seitz, S., Weber, F., Zeman, F., Klinkhammer-Schalke, M., Ortmann, O., Wege, A.K., 2018. The presence of PD-1 positive tumor infiltrating lymphocytes in triple negative breast cancers is associated with a favorable outcome of disease. *Oncotarget* 9, 6201–6212. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23717>.

Carneiro, C.S., de Queiroz, G.F., Pinto, A.C., Dagli, M.L., Matera, J.M., 2019. Feline injection site sarcoma: immunohistochemical characteristics. *J. Feline Med. Surg.* 21, 314–321. <https://doi.org/10.1177/1098612X18774709>.

Coussens, L.M., Werb, Z., 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>.

Dean, R.S., Pfeiffer, D.U., Adams, V.J., 2013. The incidence of feline injection site sarcomas in the United Kingdom. *BMC Vet. Res.* 9, 17. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-17>.

Dobromylyskij, M.J., Richards, V., Smith, K.C., 2021. Prognostic factors and proposed grading system for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in cats, based on a retrospective study. *J. Feline Med. Surg.* 23, 168–174. <https://doi.org/10.1177/1098612X20942393>.

Doddy, F.D., Glickman, L.T., Glickman, N.W., Janovitz, E.B., 1996. Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *J. Comp. Pathol.* 114, 165–174. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(96\)80005-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(96)80005-3).

Du, S., McCall, N., Park, K., Guan, Q., Fontana, P., Ertel, A., Zhan, T., Dicker, A.P., Lu, B., 2018. Blockade of tumor-expressed PD-1 promotes lung cancer growth. *Oncoimmunology* 7, e1408747. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1408747>.

Esplin, D.G., Bigelow, M., McGill, L.D., Wilson, S.R., 1999. Fibrosarcoma at the site of a lufenuron injection. *Vet Cancer Soc Newsletter* 8–9.

Folkl, A., Wen, X., Kuczynski, E., Clark, M.E., Bienzle, D., 2010. Feline programmed death and its ligand: characterization and changes with feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 134, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.10.019>.

- Fukumura, D., Kloepper, J., Amoozgar, Z., Duda, D.G., Jain, R.K., 2018. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, 325–340. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.29>.
- Gulay, K.C.M., Aoshima, K., Maekawa, N., Suzuki, T., Konnai, S., Kobayashi, A., Kimura, T., 2022. Hemangiosarcoma cells induce M2 polarization and PD-L1 expression in macrophages. *Sci. Rep.* 12, 2124. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06203-w>.
- Han, Y., Liu, D., Li, L., 2020. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am. J. Cancer Res.* 10, 727–742.
- Hartmann, K., Day, M.J., Thiry, E., Lloret, A., Frymus, T., Addie, D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Gruffydd-Jones, T., Horzinek, M.C., Hosie, M.J., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Truyen, U., Möstl, K., European Advisory Board on Cat Diseases, 2015. Feline injection-site sarcoma: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 17, 606–613. <https://doi.org/10.1177/1098612X15588451>.
- Hartmann, K., Egberink, H., Möstl, K., Addie, D.D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Frymus, T., Lloret, A., Hofmann-Lehmann, R., Marsilio, F., Pennisi, M.G., Tasker, S., Thiry, E., Truyen, U., Hosie, M.J., 2023. Feline injection-site sarcoma and other adverse reactions to vaccination in cats. *Viruses* 15, 1708. <https://doi.org/10.3390/v15081708>.
- Hendrick, M.J., Dunagan, C.A., 1991. Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988–1989). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198, 304–305.
- Joseph, R.W., Millis, S.Z., Carballido, E.M., Bryant, D., Gatalica, Z., Reddy, S., Bryce, A.H., Vogelzang, N.J., Stanton, M.L., Castle, E.P., Ho, T.H., 2015. PD-1 and PD-L1 expression in renal cell carcinoma with Sarcomatoid differentiation. *Cancer Immunol. Res.* 3, 1303–1307. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0150>.
- Kass, P.H., Spangler, W.L., Hendrick, M.J., McGill, L.D., Esplin, D.G., Lester, S., Slater, M., Meyer, E.K., Boucher, F., Peters, E.M., Gobar, G.G., Htoo, T., Decile, K., 2003. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 223, 1283–1292. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.223.1283>.
- Kim, J.R., Moon, Y.J., Kwon, K.S., Bae, J.S., Wagle, S., Kim, K.M., Park, H.S., Lee, H., Moon, W.S., Chung, M.J., Kang, M.J., Jang, K.Y., 2013. Tumor infiltrating PD-1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PLoS One* 8, e82870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082870>.
- Kim, C., Kim, E.K., Jung, H., Chon, H.J., Han, J.W., Shin, K.-H., Hu, H., Kim, K.S., Choi, Y.D., Kim, S., Lee, Y.H., Suh, J.-S., Ahn, J.B., Chung, H.C., Noh, S.H., Rha, S.Y., Kim, S.H., Kim, H.S., 2016. Prognostic implications of PD-L1 expression in patients with soft tissue sarcoma. *BMC Cancer* 16, 434. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2451-6>.
- Kleffel, S., Posch, C., Barthel, S.R., Mueller, H., Schlapbach, C., Guenova, E., Elco, C.P., Lee, N., Juneja, V.R., Zhan, Q., Lian, C.G., Thomi, R., Hoetzenecker, W., Cozzio, A., Dummer, R., Mihm, M.C., Flaherty, K.T., Frank, M.H., Murphy, G.F., Sharpe, A.H., Kupper, T.S., Schatton, T., 2015. Melanoma cell-intrinsic PD-1 receptor functions promote tumor growth. *Cell* 162, 1242–1256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.052>.
- Kumar, S.R., Kim, D.Y., Henry, C.J., Bryan, J.N., Robinson, K.L., Eaton, A.M., 2017. Programmed death ligand 1 is expressed in canine B cell lymphoma and downregulated by MEK inhibitors. *Vet. Comp. Oncol.* 15, 1527–1536. <https://doi.org/10.1111/vco.12297>.
- Li, H., Li, X., Liu, S., Guo, L., Zhang, B., Zhang, J., Ye, Q., 2017. Programmed cell death-1 (PD-1) checkpoint blockade in combination with a mammalian target of rapamycin inhibitor restrains hepatocellular carcinoma growth induced by hepatoma cell-intrinsic PD-1. *Hepatology* 66, 1920–1933. <https://doi.org/10.1002/hep.29360>.
- Maekawa, N., Konnai, S., Ikebuchi, R., Okagawa, T., Adachi, M., Takagi, S., Kagawa, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Murata, S., Ohashi, K., 2014. Expression of PD-L1 on canine tumor cells and enhancement of IFN- γ production from tumor-infiltrating cells by PD-L1 blockade. *PLoS One* 9, e98415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098415>.
- Maekawa, N., Konnai, S., Okagawa, T., Nishimori, A., Ikebuchi, R., Izumi, Y., Takagi, S., Kagawa, Y., Nakajima, C., Suzuki, Y., Kato, Y., Murata, S., Ohashi, K., 2016. Immunohistochemical analysis of PD-L1 expression in canine malignant cancers and PD-1 expression on lymphocytes in canine Oral melanoma. *PLoS One* 11, e0157176. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157176>.
- Maekawa, N., Konnai, S., Takagi, S., Kagawa, Y., Okagawa, T., Nishimori, A., Ikebuchi, R., Izumi, Y., Deguchi, T., Nakajima, C., Kato, Y., Yamamoto, K., Uemura, H., Suzuki, Y., Murata, S., Ohashi, K., 2017. A canine chimeric monoclonal antibody targeting PD-L1 and its clinical efficacy in canine oral malignant melanoma or undifferentiated sarcoma. *Sci. Rep.* 7, 8951. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09444-2>.
- Maekawa, N., Konnai, S., Nishimura, M., Kagawa, Y., Takagi, S., Hosoya, K., Ohta, H., Kim, S., Okagawa, T., Izumi, Y., Deguchi, T., Kato, Y., Yamamoto, S., Yamamoto, K., Toda, M., Nakajima, C., Suzuki, Y., Murata, S., Ohashi, K., 2021. PD-L1 immunohistochemistry for canine cancers and clinical benefit of anti-PD-L1 antibody in dogs with pulmonary metastatic oral malignant melanoma. *NPJ Precis Oncol* 5, 10. <https://doi.org/10.1038/s41698-021-00147-6>.
- Maekawa, N., Konnai, S., Asano, Y., Otsuka, T., Aoki, E., Takeuchi, H., Kato, Y., Kaneko, M.K., Yamada, S., Kagawa, M., Takagi, S., Deguchi, T., Ohta, H., Nakagawa, T., Suzuki, Y., Okagawa, T., Murata, S., Ohashi, K., 2023. Molecular characterization of feline immune checkpoint molecules and establishment of PD-L1 immunohistochemistry for feline tumors. *PLoS One* 18, e0281143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0281143>.
- Martano, M., Morello, E., Buracco, P., 2011. Feline injection-site sarcoma: past, present and future perspectives. *Vet. J.* 188, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.025>.
- McDermott, D.F., Atkins, M.B., 2013. PD-1 as a potential target in cancer therapy. *Cancer Med.* 2, 662–673. <https://doi.org/10.1002/cam4.106>.
- Mikiewicz, M., Paździor-Czapula, K., Fiedorowicz, J., Gesek, M., Otrocka-Domagala, I., 2023. Metallothionein expression in feline injection site fibrosarcomas. *BMC Vet. Res.* 19, 42. <https://doi.org/10.1186/s12917-023-03604-5>.
- Munday, J.S., Banyay, K., Aberdein, D., French, A.F., 2011. Development of an injection site sarcoma shortly after meloxicam injection in an unvaccinated cat. *J. Feline Med. Surg.* 13, 988–991. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2011.07.015>.
- Murri, A.M.A., Hilmy, M., Bell, J., Wilson, C., McNicol, A.-M., Lannigan, A., Doughty, J. C., McMillan, D.C., 2008. The relationship between the systemic inflammatory response, tumour proliferative activity, T-lymphocytic and macrophage infiltration, microvessel density and survival in patients with primary operable breast cancer. *Br. J. Cancer* 99, 1013–1019. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604667>.
- Nascimento, C., Urbano, A.C., Gameiro, A., Ferreira, J., Correia, J., Ferreira, F., 2020. Serum PD-1/PD-L1 levels, tumor expression and PD-L1 somatic mutations in HER2-positive and triple negative Normal-like feline mammary carcinoma subtypes. *Cancers (Basel)* 12, 1386. <https://doi.org/10.3390/cancers12061386>.
- Nishibori, S., Sakurai, M., Kagawa, Y., Uchida, K., Nakagawa, T., Igase, M., Mizuno, T., 2023. Cross-reactivity of anti-human programmed cell death ligand 1 (PD-L1) monoclonal antibody, clone 28-8 against feline PD-L1. *J. Vet. Med. Sci.* 85, 592–600. <https://doi.org/10.1292/jvms.23-0003>.
- Nishimori, A., Konnai, S., Okagawa, T., Maekawa, N., Ikebuchi, R., Goto, S., Sajiki, Y., Suzuki, Y., Kohara, J., Ogasawara, S., Kato, Y., Murata, S., Ohashi, K., 2017. In vitro and in vivo antiviral activity of an anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) rat-bovine chimeric antibody against bovine leukemia virus infection. *PLoS One* 12, e0174916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174916>.
- O'Byrne, K.J., Dalgleish, A.G., 2001. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *Br. J. Cancer* 85, 473–483. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1943>.
- Oike, N., Kawashima, H., Ogose, A., Hotta, T., Hatano, H., Ariizumi, T., Sasaki, T., Yamagishi, T., Umez, H., Endo, N., 2018. Prognostic impact of the tumor immune microenvironment in synovial sarcoma. *Cancer Sci.* 109, 3043–3054. <https://doi.org/10.1111/cas.13769>.
- Okagawa, T., Konnai, S., Nishimori, A., Maekawa, N., Ikebuchi, R., Goto, S., Nakajima, C., Kohara, J., Ogasawara, S., Kato, Y., Suzuki, Y., Murata, S., Ohashi, K., 2017. Anti-bovine programmed Death-1 rat-bovine chimeric antibody for immunotherapy of bovine leukemia virus infection in cattle. *Front. Immunol.* 8, 650. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00650>.
- Patel, S.P., Kurzrock, R., 2015. PD-L1 expression as a predictive biomarker in Cancer immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* 14, 847–856. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0983>.
- Porcellato, L., Menchetti, L., Bracheler, C., Sforza, M., Reginato, A., Lepri, E., Mechelli, L., 2017. Feline injection-site sarcoma. *Vet. Pathol.* 54, 204–211. <https://doi.org/10.1177/0300985816677148>.
- Sajiki, Y., Konnai, S., Nagata, R., Kawaji, S., Nakamura, H., Fujisawa, S., Okagawa, T., Maekawa, N., Kato, Y., Suzuki, Y., Murata, S., Mori, Y., Ohashi, K., 2021. The enhancement of Th1 immune response by anti-PD-L1 antibody in cattle infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Vet. Med. Sci.* 83, 162–166. <https://doi.org/10.1292/jvms.20-0590>.
- Samstein, R.M., Lee, C.-H., Shoushtari, A.N., Hellmann, M.D., Shen, R., Janjigian, Y.Y., Barron, D.A., Zehir, A., Jordan, E.J., Omuro, A., Kaley, T.J., Kendall, S.M., Motzer, R. J., Hakimi, A.A., Voss, M.H., Russo, P., Rosenberg, J., Iyer, G., Bochner, B.H., Bajorin, D.F., Al-Ahmadie, H.A., Chaff, J.E., Rudin, C.M., Riely, G.J., Baxi, S., Ho, A. L., Wong, R.J., Pfister, D.G., Wolchok, J.D., Barker, C.A., Gutin, P.H., Brennan, C.W., Tabar, V., Mellinger, I.K., DeAngelis, L.M., Ariyan, C.E., Lee, N., Tap, W.D., Gounder, M.M., D'Angelo, S.P., Saltz, L., Stadler, Z.K., Scher, H.I., Baselga, J., Razavi, P., Klebanoff, C.A., Yaeger, R., Segal, N.H., Ku, G.Y., DeMatteo, R.P., Ladanyi, M., Rizvi, N.A., Berger, M.F., Riaz, N., Solit, D.B., Chan, T.A., Morris, L.G.T., 2019. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat. Genet.* 51, 202–206. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0312-8>.
- Shinya, G., Satoru, K., Yuki, H., Junko, K., Tomohiro, O., Naoya, M., Yamato, S., Kei, W., Erina, M., Atsushi, K., Satoshi, G., Hidetoshi, H., Masateru, K., Motoshi, T., Eiji, T., Masaru, I., Ryoko, U., Shinji, Y., Mika, K.K., Yukinari, K., Keichi, Y., Mikihiro, T., Yasuhiko, S., Shiro, M., Kazuhiko, O., 2020. Clinical efficacy of the combined treatment of anti-PD-L1 rat-bovine chimeric antibody with a COX-2 inhibitor in calves infected with *mycoplasma bovis*. *Jpn. J. Vet. Res.* 68, 77–90.
- Shosu, K., Sakurai, M., Inoue, K., Nakagawa, T., Sakai, H., Morimoto, M., Okuda, M., Noguchi, S., Mizuno, T., 2016. Programmed cell death ligand 1 expression in canine Cancer. *In Vivo* 30, 195–204.
- Sorbye, S.W., Kilvaer, T.K., Valkov, A., Donnem, T., Smeland, E., Al-Shibli, K., Bremnes, R.M., Busund, L.-T., 2012. Prognostic impact of Jab1, p16, p21, p62, Ki67 and Skp2 in soft tissue sarcomas. *PLoS One* 7, e47068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047068>.
- Spranger, S., 2016. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment. *Int. Immunol.* 28, 383–391. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxw014>.
- Sznol, M., Chen, L., 2013. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin. Cancer Res.* 19, 1021–1034. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2063>.
- Teng, M.W.L., Ngiew, S.F., Ribas, A., Smyth, M.J., 2015. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 75, 2139–2145. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0255>.

- Wang, X., Yang, X., Zhang, C., Wang, Y., Cheng, T., Duan, L., Tong, Z., Tan, S., Zhang, H., Saw, P.E., Gu, Y., Wang, J., Zhang, Y., Shang, L., Liu, Y., Jiang, S., Yan, B., Li, R., Yang, Y., Yu, J., Chen, Y., Gao, G.F., Ye, Q., Gao, S., 2020. Tumor cell-intrinsic PD-1 receptor is a tumor suppressor and mediates resistance to PD-1 blockade therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 6640–6650. <https://doi.org/10.1073/pnas.1921445117>.
- Wu, C., Zhu, Y., Jiang, J., Zhao, J., Zhang, X.-G., Xu, N., 2006. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. *Acta Histochem.* 108, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2006.01.003>.
- Yao, H., Wang, H., Li, C., Fang, J.-Y., Xu, J., 2018. Cancer cell-intrinsic PD-1 and implications in combinatorial immunotherapy. *Front. Immunol.* 9, 1774. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01774>.

Oświadczenie

Niniejszym oświadczamy, że wkład autorów w publikacji:

Mateusz Mikiewicz, Iwona Otrocka-Domagała. Immunohistochemical analysis of smooth muscle actin and CD31 in feline post-injection site fibrosarcomas: association with tumour grade, vascular density, and multinucleated giant cells. BMC Veterinary Research 2025;21:191.

Był następujący:

Mateusz Mikiewicz – stworzenie koncepcji badań oraz metodyki badań, uzyskanie finansowania z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura 5 (Nr DEC-2021/05/X/NZ4/00037), zebranie próbek do wykonania badania. zaplanowanie i wykonanie analiz laboratoryjnych, opracowanie i interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu, wykonanie rycin, przygotowanie odpowiedzi na recenzję.

Iwona Otrocka-Domagała – nadzór merytoryczny.

Dr wet. Mateusz Mikiewicz *Mateusz Mikiewicz*

Dr hab. Iwona Otrocka-Domagała. Prof. UWM *Iwona Otrocka-Domagała*

RESEARCH

Open Access



Immunohistochemical analysis of smooth muscle actin and CD31 in feline post-injection site fibrosarcomas: association with tumour grade, vascular density, and multinucleated giant cells

Mateusz Mikiewicz^{1*} and Iwona Otrocka-Domagala¹

Abstract

Background Multinucleated giant cells are commonly observed in various malignancies; however their clinical and biological significance remains largely unexplored and it has been hypothesised that the cells may play a role in vascular mimicry, tumour progression and tumour survival. This study aimed to investigate the expression of smooth muscle actin and CD31 in feline post-injection site fibrosarcomas, focusing on relationships between multinucleated giant cells presence, tumour grade, and vascular density to elucidate their potential role in tumour progression.

Results A total of 61 feline post-injection site fibrosarcomas, histologically graded into grades I, II, and III, were examined immunohistochemically. Smooth muscle actin immunoreactivity was detected in 57/61 (93.4%) cases. Multinucleated giant cells expressing CD31 were identified in 39/61 (63.9%) cases, predominantly in high-grade tumours, with a correlation observed between multinucleated giant cell presence, tumour grade, and mitotic index. Vascular density differed across tumour grades. A negative correlation between vascular density, tumour grade and necrosis score was identified. Additionally, a negative correlation was observed between multinucleated giant cells presence and vascular density.

Conclusions The findings suggest a complex tumour microenvironment in which multinucleated giant cells and vascular mimicry may facilitate tumour survival under hypoxic conditions, potentially contributing to an aggressive tumour phenotype.

Keywords Feline injection site fibrosarcoma, Multinucleated giant cell, Smooth muscle actin, CD31, Immunohistochemistry

*Correspondence:

Mateusz Mikiewicz
mateusz.mikiewicz@uwm.edu.pl

¹Department of Pathological Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 13 St,
Olsztyn, Poland



© The Author(s) 2025. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

Background

Multinucleated giant cells (MGCs) have been recognized in various malignancies, including canine and feline mast cell tumours [1, 2], histiocytic sarcoma [3], plasma cell tumour [4], soft-tissue sarcoma, and feline post-injection site sarcoma [5]. Despite being frequently observed in tumours, their clinical and biological significance remains largely unexplored. Macrophages have been identified as the primary precursors of epithelioid cells *in vitro*, induced to differentiate into these cells by treatment with interleukin 4 (IL-4) [6]. This is significant as a Th2 cytokine environment is commonly linked to the enhanced activation of macrophages and recent studies have confirmed that M2 macrophages can give rise to multinucleated giant cells [7].

In the tumour microenvironment MGCs may represent a senescent cells [8] or can exhibit non-senescent CD31+ immunophenotype [9]. Additionally, these cells might form in response to chronic inflammation which may be associated with the tumour, similar as can be observed in foreign body reaction [10]. This may be supported by the theory that MGCs may form in response to an attempt to eliminate a chronic irritant [11]. Although this seems a logical suggestion, many MGCs, particularly those that are poorly differentiated, are not effective at eradicating neoplasms and are now thought to contribute to tumour progression [12–14]. A previous study on human papillary thyroid carcinoma has revealed that MGCs occurrence is associated with advanced malignancy stage and therefore is connected to tumour progression [14].

While MGCs can appear in the context of tumours, their presence is generally not a direct immune mechanism against the malignancies. Instead, they often reflect a complex interaction between the tumour and the immune system, where the MGCs may represent a response to chronic inflammation or be part of the tumour's microenvironment rather than an active anti-tumour mechanism [11, 14]. Recent studies on human cancer cells have revealed that MGCs are metabolically active and may contribute to tumour heterogeneity and resistance to therapy [15].

Angiogenesis is essential for processes like wound healing; however it can be also seen in pathological conditions such as tumour growth [16]. The process is triggered by growth factors or low oxygen levels, which activate hypoxia-inducible factors [17]. During angiogenesis, previously inactive endothelial cells that line the blood vessels are prompted to proliferate, modify the extracellular matrix, migrate, and differentiate to form the structure of new vessels in response to angiogenic signals [18]. In solid tumours, the vasculature consists of endothelial-lined blood vessels and a non-endothelial microcirculatory network. This non-endothelial network

is known as vascular mimicry (VM), and it is thought to arise from the differentiation of cancer stem cells into endothelial-like cells [19].

The aim of the present study was to investigate the expression of immunohistochemical markers, specifically smooth muscle actin (SMA) and CD31, in feline post-injection site fibrosarcomas. Additionally, this study sought to elucidate the relationship between tumour grade, vascular density, and the presence of multinucleated giant cells, with an emphasis on understanding these features and their potential role in tumour progression and aggressiveness.

Results

Histological examination of the tumour samples revealed a distribution across three grades, with 6 tumours classified as grade I (9.8%), 24 as grade II (39.3%), and 31 as grade III (50.8%). In all cases FISS were poorly demarcated, located in the dermis and subcutis. The cells were spindle or polyhedral with marked anisocytosis and anisokaryosis with macronucleosis, and multinucleated giant cells scattered through neoplastic mass. Mitotic count was variable. In most cases various necrotic areas in tumour mass were seen. In all tumours various degree of peripheral mostly perivascular lymphocyte and plasma cell infiltration were seen, also scattered macrophages were seen in tumour mass.

SMA immunolabelling was detected in 93.44% of cases (Fig. 1A). Specifically, SMA expression was observed in 6 grade I tumours (10.53%), 22 grade II tumours (38.6%), and 29 grade III tumours (50.88%). SMA immunolabelling was absent in 4 cases, including 2 grade II tumours (3.28%) and 2 grade III tumours (3.28%).

CD31 immunolabelling was present in multinucleated giant cells in 39 tumours (63.93%) (Fig. 1B). CD31-positive multinucleated giant cells were present in 2 grade I tumours (5.13%), 14 grade II tumours (35.9%), and 23 grade III tumours (58.97%). The mean MGCs count varied across grades, with grade I tumours showing an average of 8 ± 5 cells, grade II tumours showing 15 ± 17 cells, and grade III tumours showing 23 ± 14 cells. Statistical analysis revealed a higher count of multinucleated giant cells in grade III tumours compared to grade II ($p = 0.004$) and grade I ($p = 0.017$) (Fig. 2A). Furthermore, a positive correlation was observed between MGCs occurrence and tumour grade ($r = 0.49$; $p = 0.000$) (Fig. 2B). Additionally, the presence of MGCs varied between mitotic score (1 vs. 3 $p = 0.022$; 2 vs. 3 $p = 0.02$) (Fig. 2C), with a positive correlation between these two parameters ($r = 0.441$; $p = 0.000$) (Fig. 2D).

Vascular density showed a mean value of 21 ± 7 in grade I tumours, 29 ± 11 in grade II, and 17 ± 6 in grade III. Comparative analysis indicated that vascular density was higher in grade II tumours compared to grade III

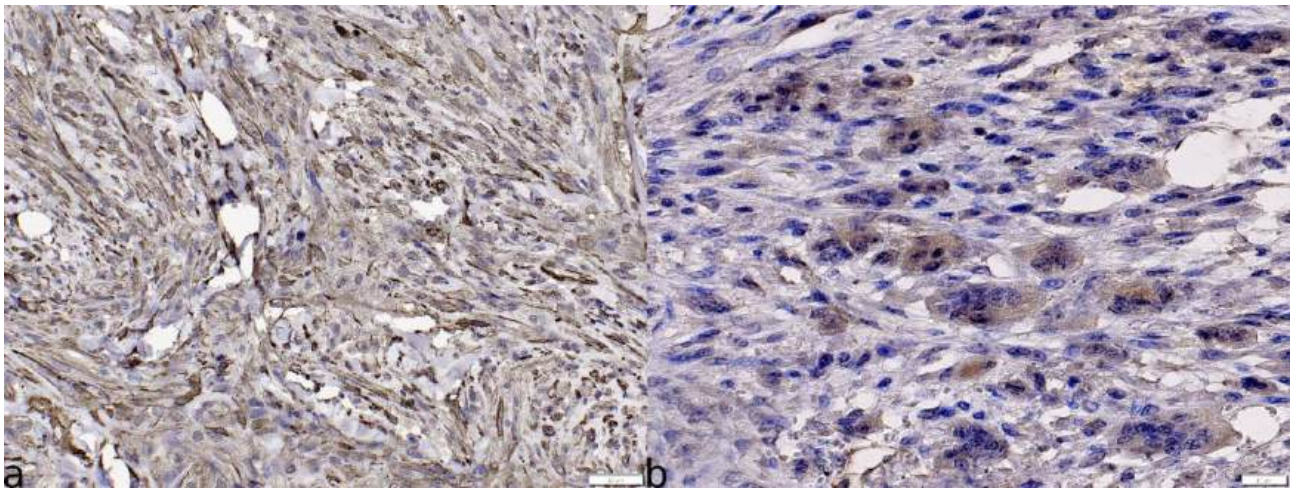


Fig. 1 Feline injection-site fibrosarcoma. **(A)** Tumour cells show positive expression to SMA. SMA immunostaining with DAB, counterstaining with Mayer's haematoxylin, 200x **(B)** Multinucleated giant cell show positive expression to CD31. CD31 immunostaining with DAB, counterstaining with Mayer's haematoxylin, 400x

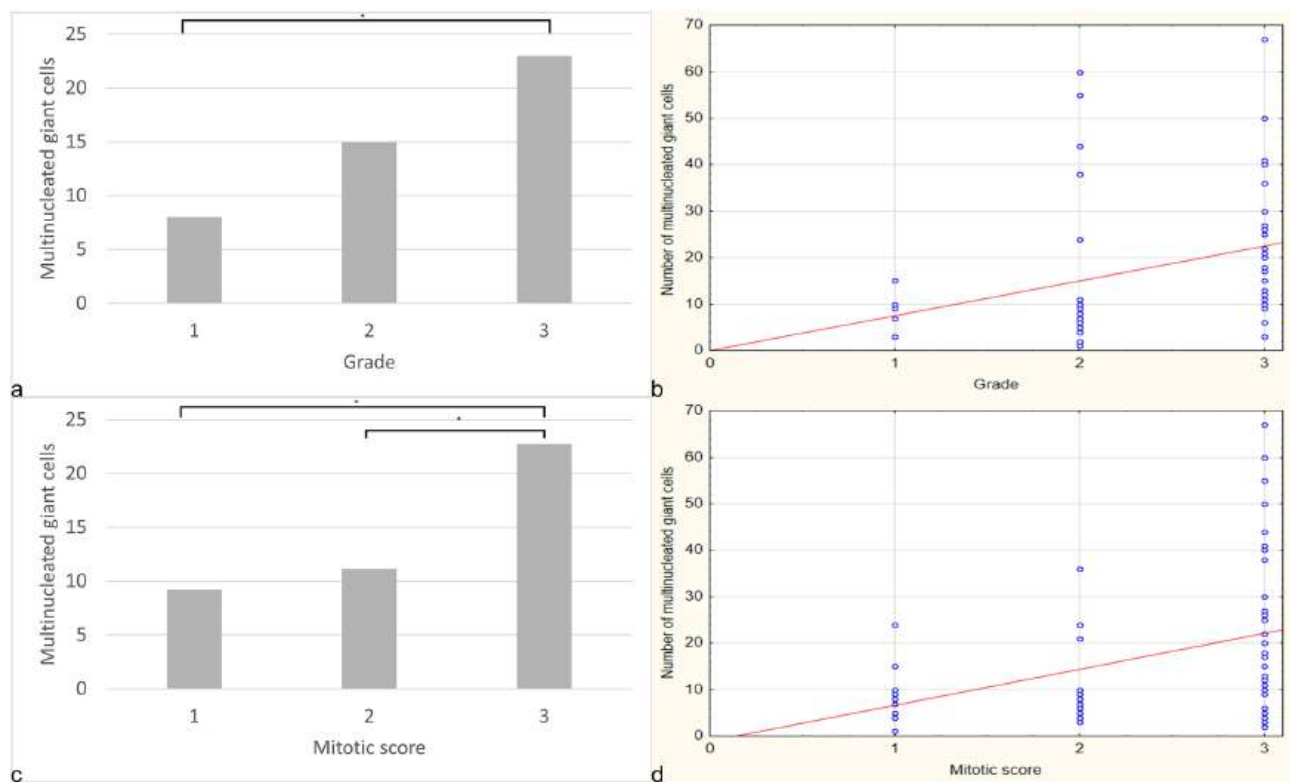


Fig. 2 Feline injection-site fibrosarcoma. **(A)** Mean multinucleated giant cell count in grade I, II, and III tumours. Significantly higher multinucleated giant cell count was observed in grade III tumours compared to grade II ($p=0.004$) and grade I ($p=0.017$). **(B)** A positive correlation between multinucleated giant cell occurrence and tumour grade ($r=0.49$; $p=0.000$). **(C)** Mean multinucleated giant cell count compared to mitotic score. Significantly higher multinucleated giant cell count was observed in mitotic score 3 compared to mitotic score 1 ($p=0.022$) and mitotic score 2 ($p=0.02$). **(D)** A positive correlation between multinucleated giant cell count and mitotic score ($r=0.441$; $p=0.000$)

($p=0.000$) (Fig. 3A). Furthermore, a negative correlation was found between vascular density and tumour grade ($r=-0.444$; $p=0.000$) (Fig. 3B). Blood vessel count was highest in with necrosis score 0 and a statistically significant difference was observed between necrosis score

0 vs. 2 ($p=0.005$) (Fig. 3C), with a negative correlation ($r=-0.411$; $p=0.001$) (Fig. 3D). Moreover, a negative correlation was found between the MGCs count and vascular density ($r=-0.262$; $p=0.042$) (Fig. 4). Comprehensive

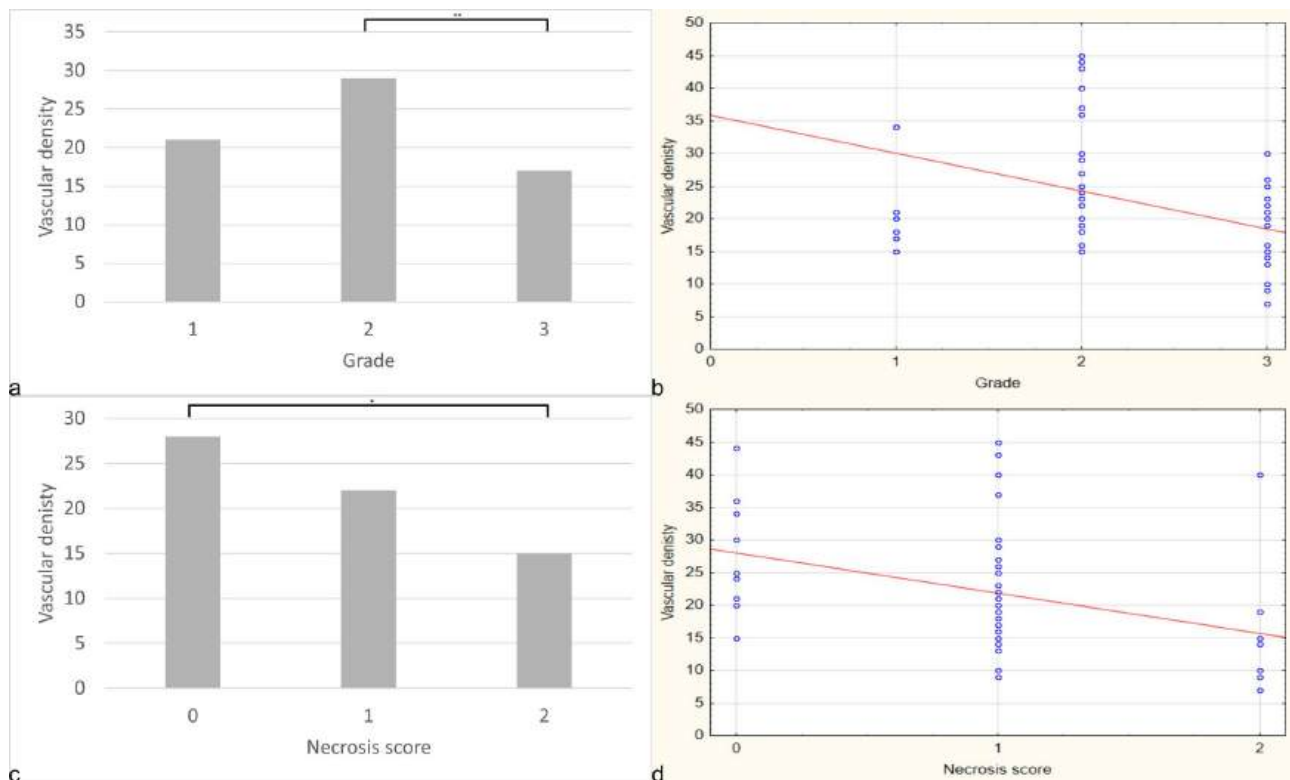


Fig. 3 Feline injection-site fibrosarcoma. **(A)** Mean vascular density in grade I, II, and III tumours. Significantly higher vascular density was in grade II tumours compared to grade III ($p=0.000$). **(B)** A negative correlation between vascular density and tumour grade ($r=-0.444$; $p=0.000$). **(C)** Vascular density compared to necrosis score. Vascular density was significantly higher in necrosis score 0 compared to necrosis score 2 ($p=0.005$). **(D)** A negative correlation between vascular density and necrosis score ($r=-0.411$; $p=0.001$)

tumour characteristics are collected in Supplemental Table 1.

Discussion

The histological and immunohistochemical findings of this study revealed an important insights into the tumour microenvironment and the progression of feline post-injection site fibrosarcomas. A significant correlation between MGCs presence, tumour grade, and mitotic score was observed. Additionally, the vast majority of evaluated cases were SMA positive, which aligns with previous studies reporting frequent SMA positivity in feline post-injection fibrosarcomas [20, 21].

The presence of MGCs in different tumour grades, with a significant prevalence in grade III tumours, may suggest a potential link between MGCs and tumour aggressiveness. The higher MGCs count in more advanced (grade III) tumours, aligns with previous studies which suggested that MGCs may contribute to tumour progression [22–25]. In human papillary thyroid carcinoma the presence of MGCs has been associated with advanced malignancy stages [14], supporting the hypothesis that MGCs, although originating from immune cells, may foster a pro-tumorigenic environment [26, 27]. This relationship between MGCs and tumour grade may reflect

the immunosuppressive properties often observed in advanced tumours, where MGCs contribute to a Th2-polarized environment that favours tumour growth and immune evasion [28–30]. Moreover, a significant association was observed between MGCs occurrence and mitotic score, which further strengthens the potential link between MGCs and aggressive tumour behaviour.

The identification of CD31-positive MGCs in more than half evaluated cases, particularly within higher-grade lesions, suggests an intricate relationship between vascularization and the immune microenvironment in post-injection feline fibrosarcomas. CD31, is known as a well-established endothelial marker and it is widespread used in assessing vascular characteristics in tumours [31], and when expressed on MGCs, may indicate a non-traditional form of vasculature [16, 32]. However, we recognize, that employing CD31 alone does not definitively distinguish vascular mimicry from conventional angiogenesis. Thus, while the detection of CD31-positive MGCs suggests an endothelial-like phenotype, these findings should be interpreted with caution. Inclusion of additional markers (e.g., vascular epithelial growth factor, VE-cadherin) and functional assays would ideally provide more robust validation of vascular mimicry [33, 34]. Due to limitations in tissue availability and the scope of the

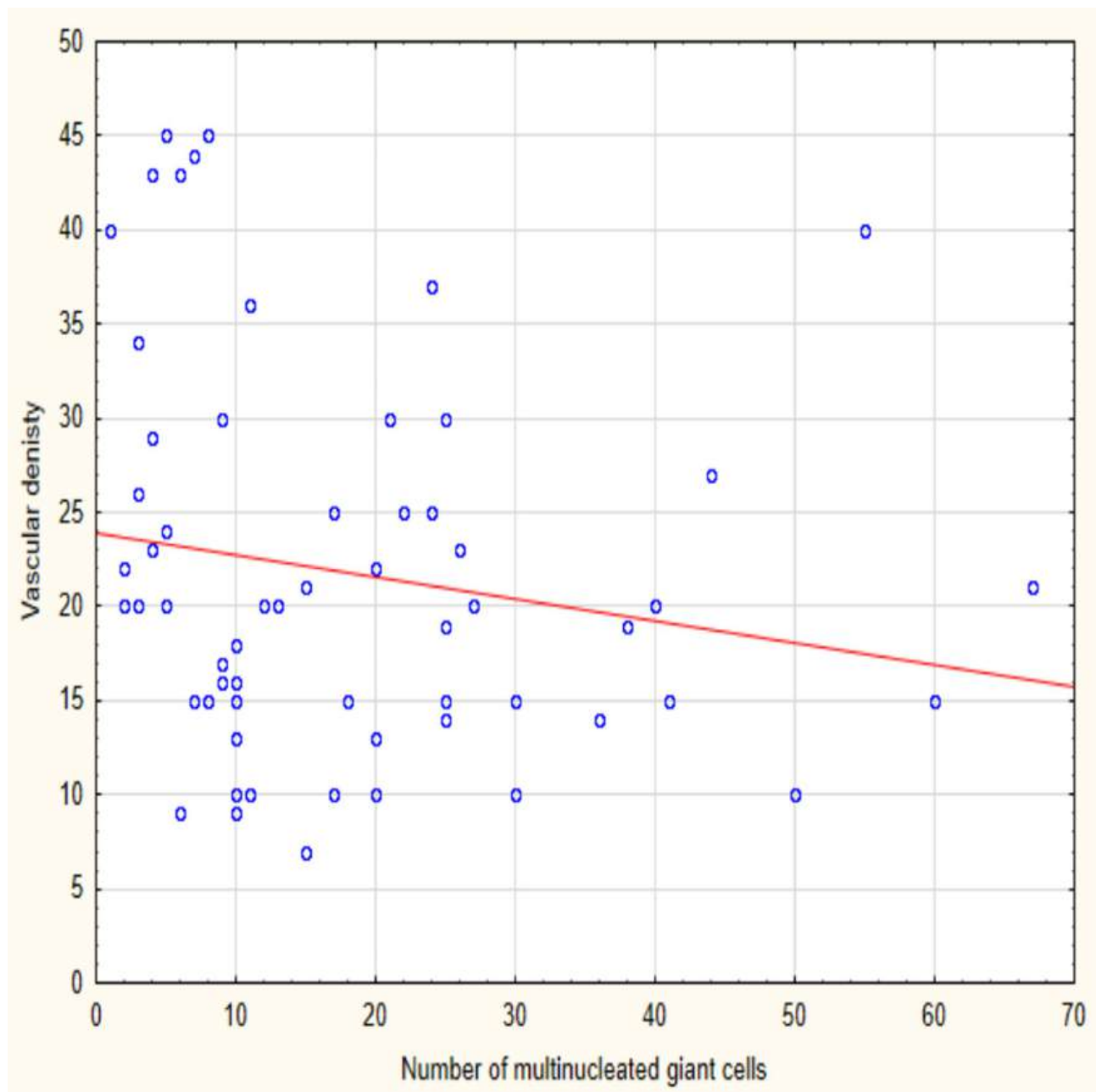


Fig. 4 A negative correlation between the multinucleated giant cell count and vascular density ($r=-0.262$; $p=0.042$)

present study, such supplementary analyses were not performed, and therefore our results represent preliminary evidence that warrants further investigation into the role of MGCs in alternative vascular network formation in feline post-injection site fibrosarcomas.

This phenomenon is in agreement with reports on VM, where non-endothelial cells acquire endothelial-like properties [19, 27]. CD31 expression in MGCs might represent an adaptive response within the tumour microenvironment to support tumour survival and progression under hypoxic conditions. The association between

vascular density and tumour grade also reveals complexities in the angiogenic profile of feline post-injection site fibrosarcomas. This finding suggests that high-grade tumours may shift toward alternative mechanisms of nutrient acquisition, such as VM. The increased presence of CD31-positive MGCs in grade III tumours suggests that these cells might participate in the formation of such non-classical vascular channels, thereby facilitating tumour progression and survival within the hypoxic microenvironment characteristic of these aggressive tumours. The adaptation to hypoxia may be driven by

the activation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), a key regulator of cellular responses to low oxygen levels. Under hypoxic stress conditions, HIF-1 acts as a master regulator by promoting the transcription of numerous genes involved in angiogenesis, metabolic reprogramming, and cellular survival, which are fundamental to cancer development and progression [35, 36]. Such hypoxic conditions may not only stimulate the formation of MGCs but also induce a phenotypic shift in these cells, enabling them to acquire endothelial-like characteristics, thereby contributing to the formation of non-traditional vascular channels that help sustain the tumour despite a reduction in classical blood vessels [37]. This transition is in line with the concept of VM, where tumour cells or associated cells adopt features of endothelial cells to form alternative vascular networks independent of traditional angiogenesis [38]. In our study, high-grade feline post-injection site fibrosarcomas exhibited a paradoxically lower conventional vascular density while simultaneously displaying a significantly higher count of MGCs. Above findings are important in understanding the complex interplay between tumour vascularization and the immune microenvironment. We propose that the lower vascular density in high-grade tumours may reflect a shift towards alternative nutrient acquisition mechanisms, such as VM.

Alternative interpretations of this negative correlation are also plausible. The decreased vascular density in high-grade tumours could result from extensive necrosis and the collapse of normal vasculature, conditions that may further stimulate a compensatory response leading to the recruitment or formation of MGCs. These cells might then participate in VM, serving as a mechanism to bypass the limitations imposed by reduced angiogenesis [38].

Overall, the observed negative correlation underscores the adaptive strategies tumours may employ under hypoxic stress and highlights the potential role of MGCs in facilitating alternative vascularization. Future studies are warranted to further explore these mechanisms, which could ultimately lead to the identification of novel therapeutic targets for managing aggressive malignancies. In human malignancies VM was correlated with high tumour grade, cancer cell invasion, cancer cell metastasis, and reduced survival of cancer [39]. This inverse relationship between vascular density and tumour grade may imply a dynamic vascular remodelling process, where tumours progress toward an increasingly aggressive phenotype by reducing reliance on traditional angiogenesis and adopting alternative vascular strategies. This observation aligns with reports from other malignancies, where declining vascularity accompanies increased necrosis and hypoxia in higher-grade tumours [40]. Elevated levels of HIF-1 α , frequently observed in

hypoxic tumours or resulting from genetic changes, correlate with poorer patient outcomes across various cancer types [41, 42]. The findings not only highlight the plasticity of the tumour microenvironment but also underscore the potential for MGCs to facilitate tumour survival when conventional angiogenic mechanisms are insufficient. This is noteworthy since as the formation of MGCs in tumours is driven by cellular stress factors such as hypoxia, chemotherapy, radiotherapy, reactive oxygen species production, viral infections, and other factors [27, 43, 44]. Although the exact mechanism underlying MGCs induction remains unclear, other studies point to pathways analogous to those involved in VM [45, 46]. Key processes contributing to MGCs formation are connected with the HIF-1 pathway activation and DNA damage [43, 45].

Furthermore, the association of vascular density with the necrosis score strengthens the link between reduced vascularity and tumour progression. Tumours with high necrosis score exhibit pronounced hypoxic environment, what was previously reported in different malignancy types [42, 47].

The observed positive correlation between MGCs and the mitotic score supports the hypothesis that MGCs could contribute to an environment that promotes cellular proliferation. It is hypothesized that MGCs may secrete various cytokines and growth factors, such as interleukin-6 (IL-6), tumour necrosis factor- α (TNF- α), and vascular endothelial growth factor (VEGF), which can modulate the tumour microenvironment and stimulate proliferative signalling pathways. This pro-inflammatory milieu may not only enhance the proliferative capacity of tumour cells but also facilitate further tumour progression and invasion [48]. This association could result from chronic inflammation, which may stimulate both the recruitment of immune cells and the proliferation of tumour cells, contributing to tumour growth and heterogeneity [11]. Moreover, the correlation between MGCs occurrence and tumour grade aligns with the theory, that MGCs not only indicate, but may actively contribute to the malignant progression, potentially by modulating the inflammatory microenvironment or enhancing resistance to immune clearance [27].

Above findings are important in understanding the complex interplay between vascularization and the immune microenvironment in post-injection feline fibrosarcomas. However, a limitation of our study is the absence of comprehensive follow-up data, including parameters such as tumour recurrence, metastasis, and overall survival. Due to limitations in the available follow-up information for the cases studied, we were unable to correlate our histological findings with clinical outcomes. Future studies should aim to incorporate such clinical data to better assess the prognostic significance

of these histopathological markers and to enhance the clinical relevance of these observations.

Conclusion

In summary, our study demonstrates that higher-grade feline post-injection site fibrosarcomas exhibit a lower conventional vascular density alongside an increased presence of CD31-positive MGCs. A significant positive correlation between MGC counts and mitotic scores was observed, suggesting that MGCs may be linked to increased cellular proliferation, potentially through alternative vascular mechanisms such as VM. Although the data indicate that MGCs might play a pivotal role in promoting tumour proliferation, the complexity of the tumour microenvironment precludes the identification of a single element as solely responsible for this process. We conclude that MGCs appear to play a special role in tumour proliferation; however, additional studies employing further markers and functional assays are needed to fully elucidate their precise contribution. Overall, our findings highlight the complex interplay between immune, vascular, and stromal components in feline post-injection site fibrosarcomas and underscore the need for further investigation into the roles of MGCs and vascular mimicry in tumour progression. Future studies focusing on the molecular pathways that drive MGC formation and VM could yield valuable insights into therapeutic targets, potentially improving outcomes for feline patients diagnosed with feline post-injection site fibrosarcoma.

Methods

Study design

The study included surgically excised cutaneous tumours collected from 61 cats, 32 (52%) males and 29 (48%) females, aged 4–22 (mean: 12 ± 4 years). The samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, processed routinely, embedded in paraffin wax, cut and stained with Mayer's haematoxylin and eosin (HE). The inclusion criteria included morphological features described previously [49–51]. The tumours were located at typical injection sites: flank (34.4%; 21/61 cases), interscapular region (26.2%; 16/61 cases), lumbar area (18%; 11/61 cases), thigh (11.5%; 7/61 cases), dorsal area of the neck (8.2%; 5/61 cases), and shoulder (1.6%; 1/61 cases). Histologically, the tumours were graded into grade I, II and III, according to the grading system proposed by Dobromylyskij et al. [52] for feline soft tissue sarcomas and described previously [51].

Immunohistochemical evaluation

The sections for immunohistochemistry were mounted on silanized glass slides. Heat-induced antigen retrieval was performed in Tris-EDTA buffer pH 9.0 (EnVision™

Flex Target Retrieval Solution High pH, DAKO, Glostrup, Denmark) for 20 min at 96 °C using a PT-Link module (Dako, Glostrup, Denmark). Immunohistochemical examination of each tumour was performed using primary antibodies: α -SMA (monoclonal mouse anti-human, clone 1A4, dilution 1:50, incubation time: 30 min in a humid chamber at room temperature; Dako, Glostrup, Denmark) and CD31 (monoclonal mouse anti-human, clone JC70A, dilution 1:20, incubation time: overnight in a humid chamber at 4 °C; Dako, Glostrup, Denmark) and a visualisation system based on the immunoperoxidase method, with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as a substrate (EnVision+System-HRP, Mouse, Dako, Glostrup, Denmark). The slides were counterstained with Mayer's haematoxylin. Positive and negative control slides were processed together with the evaluated slides. For the negative control, the primary antibody was replaced by the isotype-matched mouse IgG (Dako) at the appropriate dilution. For the positive control, normal tissues were processed in the similar manner as the evaluated slides (for α -SMA and CD31– feline intestine). Brown precipitate at the antigen site was regarded as a positive reaction. The slides were evaluated under a light microscope (BX63, Olympus, Tokyo, Japan) using CellSense (Olympus, Tokyo, Japan) software.

Vascular density evaluation

Vascular “hot spots” were selected for each tumour under low magnification ($\times 100$). Subsequently, vessels were quantified within a 2.37 mm^2 area at $\times 400$ magnification. Any brown-stained endothelial cell or endothelial cell cluster that was clearly separated from adjacent microvessels, tumour cells, and surrounding connective tissue was considered as a single, countable vessel. The presence of vessel lumens, though typically observable, was not requisite for microvessel designation, nor was the presence of red blood cells within lumens considered a defining criterion. Mean values (with standard deviation) were calculated for groups with grades I, II and III.

Multinucleated giant cells evaluation

Multinucleated giant cells “hot spots” within tumour parenchyma were selected for each tumour grade under low magnification ($\times 100$). Subsequently, the cells were quantified within a 2.37 mm^2 area at $\times 400$ magnification. Mean values (with standard deviation) were calculated for groups with grades I, II and III.

Statistical analysis

Differences in vascular density and multinucleated giant cell in groups with grade I, II and III were analysed using Kruskal-Wallis H test (one-way ANOVA on ranks) followed by Dunn's post-hoc test. Correlations between tumour grade, MGCs count, vascular density and mitotic

index were examined using Spearman's rank correlation (r : Spearman's rank correlation coefficient); $p \leq 0.05$ was considered statistically significant, and $p \leq 0.001$ as highly significant. The statistical analysis was performed using Statistica 14 software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12917-025-04637-8>.

Supplementary Material 1: Supplementary Table 1. Detailed characteristics of evaluated feline injection-site fibrosarcomas.

Acknowledgements

We would like to thank Dominika Piech and Cezary Zwoliński for preparing the archival specimens.

Author contributions

MM: writing manuscript, project administration, methodology, investigation, funding acquisition, conceptualization, validation, resources. IO-D: supervision.

Funding

Project financially supported by the Minister of Science under the Regional Initiative of Excellence Program; the National Science Centre, project No. 2021/05/X/NZ4/00037.

Data availability

Data used in this study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Ethical approval and consent to participate

Ethics approval is not applicable under the Act of 15 January 2015 on the protection of animals used for scientific or educational purposes—Journal of Laws of the Republic of Poland (Journal of Laws 2015 item 266) and Local Ethics Committee for Animal Experiments. The study used archival specimens collected in the Department of Pathological Anatomy. Written informed consent was obtained from the owner or legal custodian of all animals described in this work for the procedures undertaken in this retrospective study. No animals or humans are identifiable within this publication, and therefore additional informed consent for publication was not required.

Received: 30 November 2024 / Accepted: 3 March 2025

Published online: 21 March 2025

References

- Sabattini S, Bettini G. Grading cutaneous mast cell tumors in cats. *Vet Pathol*. 2019;56(1):43–9.
- de Nardi AB, Dos Santos Horta R, Fonseca-Alves CE, de Paiva FN, Linhares LCM, Firmo BF, et al. Diagnosis, prognosis and treatment of canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors. *Cells*. 2022;11(4):618.
- Mullin C, Clifford CA. Histiocytic sarcoma and hemangiosarcoma update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2019;49(5):855–79.
- Hughes KL, Rout ED, Avery PR, Pavuk AA, Avery AC, Moore AR. A series of heterogeneous lymphoproliferative diseases with CD3 and MUM1 co-expressed in cats and dogs. *J Vet Diagn Invest*. 2023;35(1):22–33.
- Dobromylskij M. Feline soft tissue sarcomas: A review of the classification and histological grading, with comparison to human and canine. *Animals*. 2022;12(20):2736.
- Wang HW, Joyce JA. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: priming for protumoral functions. *Cell Cycle*. 2010;9(24):4824–35.
- Miron RJ, Bosshardt DD. Multinucleated giant cells: good guys or bad guys? *Tissue Eng Part B Rev*. 2018;24(1):53–65.
- Bharadwaj D, Mandal M. Senescence in polyploid giant cancer cells: A road that leads to chemoresistance. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2020;52:68–75.
- Tan GF, Goh S, Lim AH, Liu W, Lee JY, Rajasegaran V, et al. Bizarre giant cells in human angiosarcoma exhibit chemoresistance and contribute to poor survival outcomes. *Cancer Sci*. 2021;112(1):397–409.
- Al-Maawi S, Wang X, Sader R, Götz W, Motta A, Migliaresi C, et al. Multinucleated giant cells induced by a silk fibroin construct express Proinflammatory agents: an Immunohistological study. *Materials*. 2021;14(14):4038.
- Ahmadzadeh K, Vanoppen M, Rose CD, Matthys P, Wouters CH. Multinucleated giant cells: current insights in phenotype, biological activities, and mechanism of formation. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:873226.
- Rosai J. Liver cell carcinoma with osteoclast-like giant cells: nonepitheliogenic giant cells in diverse malignancies. *Hepatology*. 1990;12(4 Pt 1):782–3.
- Jösten M, Rudolph R. Methods for the differentiation of giant cells in canine and feline neoplasias in paraffin sections. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1997;44(3):159–66.
- Gulubova MV, Ivanova KV. The expression of Tumor-Associated macrophages and multinucleated giant cells in papillary thyroid carcinoma. *Open Access Maced J Med Sci*. 2019;7(23):3944–9.
- Mirzayans R, Andrais B, Murray D. Roles of polyploid/multinucleated giant Cancer cells in metastasis and disease relapse following anticancer treatment. *Cancers*. 2018;10(4):118.
- Barnett FH, Rosenfeld M, Wood M, Kiousses WB, Usui Y, Marchetti V, et al. Macrophages form functional vascular mimicry channels in vivo. *Sci Rep*. 2016;6(1):36659.
- Lv X, Li J, Zhang C, Hu T, Li S, He S, et al. The role of hypoxia-inducible factors in tumor angiogenesis and cell metabolism. *Genes Dis*. 2017;4(1):19–24.
- Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*. 2011;146(6):873–87.
- Kim HS, Won YJ, Shim JH, Kim HJ, Kim J, Hong HN, et al. Morphological characteristics of vasculogenic mimicry and its correlation with EphA2 expression in gastric adenocarcinoma. *Sci Rep*. 2019;9(1):3414.
- Hendrick MJ, Brooks JJ. Postvaccinal sarcomas in the Cat: histology and immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 1994;31(1):126–9.
- Munday JS, Banyay K, Aberdeen D, French AF. Development of an injection site sarcoma shortly after meloxicam injection in an unvaccinated Cat. *J Feline Med Surg*. 2011;13(12):988–91.
- Weihua Z, Lin Q, Ramoth AJ, Fan D, Fidler IJ. Formation of solid tumors by a single multinucleated cancer cell. *Cancer*. 2011;117(17):4092–9.
- Zhang L, Wu C, Hoffman RM. Prostate Cancer heterogeneous High-Metastatic Multi-Organ-Colonizing Chemo-Resistant variants selected by serial metastatic passage in nude mice are highly enriched for multinucleate giant cells. *PLoS ONE*. 2015;10(11):e0140721.
- Hasegawa K, Suetsugu A, Nakamura M, Matsumoto T, Aoki H, Kunisada T, et al. Imaging the role of multinucleate pancreatic Cancer cells and Cancer-Associated fibroblasts in peritoneal metastasis in mouse models. *Anticancer Res*. 2017;37(7):3435–40.
- Shu Z, Row S, Deng WM. Endoreplication. The good, the bad, and the ugly. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):465–74.
- Kloc M, Uosef A, Subuddhi A, Kubiak JZ, Piprek RP, Ghobrial RM. Giant multinucleated cells in aging and Senescence-An abridgement. *Biology*. 2022;11(8):1121.
- Krotofil M, Tota M, Siednienko J, Donizy P. Emerging paradigms in Cancer metastasis: ghost mitochondria, vasculogenic mimicry, and polyploid giant Cancer cells. *Cancers*. 2024;16(20):3539.
- Anderson S, Shires VL, Wilson RA, Mountford AP. Formation of multinucleated giant cells in the mouse lung is promoted in the absence of interleukin-12. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20(3):371–8.
- Kim SK, Cho SW. The evasion mechanisms of Cancer immunity and drug intervention in the tumor microenvironment. *Front Pharmacol*. 2022;13:868695.
- Hild V, Mellert K, Möller P, Barth TFE. Giant cells of various lesions are characterised by different expression patterns of HLA-Molecules and molecules involved in the cell cycle, bone metabolism, and lineage affiliation:

- an immunohistochemical study with a review of the literature. *Cancers*. 2023;15(14):3702.
31. ran Guo C, Han R, Xue F, Xu L, Ren W, gang, Li M, et al. Expression and clinical significance of CD31, CD34, and CD105 in pulmonary ground glass nodules with different vascular manifestations on CT. *Front Oncol*. 2022;12:956451.
 32. Jennings RN, Miller MA, Ramos-Vara JA. Comparison of CD34, CD31, and factor VIII-related antigen immunohistochemical expression in feline vascular neoplasms and CD34 expression in feline nonvascular neoplasms. *Vet Pathol*. 2012;49(3):532–7.
 33. Guzman G, Cotler SJ, Lin AY, Maniotis AJ, Folberg R. A pilot study of vasculogenic mimicry immunohistochemical expression in hepatocellular carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(12):1776–81.
 34. Wechman SL, Emdad L, Sarkar D, Das SK, Fisher PB. Vascular mimicry: triggers, molecular interactions and in vivo models. *Adv Cancer Res*. 2020;148:27–67.
 35. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(10):721–32.
 36. Semenza GL. Hypoxia-Inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012;148(3):399–408.
 37. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LMG, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*. 1999;155(3):739–52.
 38. Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):411–21.
 39. Delgado-Bellido D, Oliver FJ, Vargas Padilla MV, Lobo-Selma L, Chacón-Barrado A, Díaz-Martin J, et al. VE-Cadherin in Cancer-Associated angiogenesis: A deceptive strategy of blood vessel formation. *Int J Mol Sci*. 2023;24(11):9343.
 40. Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(9):1745–70.
 41. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression. *Nat Rev Cancer*. 2011;12(1):9–22.
 42. Chen Z, Han F, Du Y, Shi H, Zhou W. Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):70.
 43. Liu Y, Shi Y, Wu M, Liu J, Wu H, Xu C, et al. Hypoxia-induced polyploid giant cancer cells in glioma promote the transformation of tumor-associated macrophages to a tumor-supportive phenotype. *CNS Neurosci Ther*. 2022;28(9):1326–38.
 44. Zhou X, Zhou M, Zheng M, Tian S, Yang X, Ning Y, et al. Polyploid giant cancer cells and cancer progression. *Front Cell Dev Biol*. 2022;10:1017588.
 45. Saini G, Joshi S, Garlapati C, Li H, Kong J, Krishnamurthy J, et al. Polyploid giant cancer cell characterization: new frontiers in predicting response to chemotherapy in breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2022;81:220–31.
 46. Liu P, Wang L, Yu H. Polyploid giant cancer cells: origin, possible pathways of formation, characteristics, and mechanisms of regulation. *Front Cell Dev Biol*. 2024;12:1410637.
 47. Nordsmark M, Overgaard J. Tumor hypoxia is independent of hemoglobin and prognostic for loco-regional tumor control after primary radiotherapy in advanced head and neck cancer. *Acta Oncol*. 2004;43(4):396–403.
 48. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860–7.
 49. Dean RS, Pfeiffer DU, Adams VJ. The incidence of feline injection site sarcomas in the united Kingdom. *BMC Vet Res*. 2013;9:17.
 50. Doddy FD, Glickman LT, Glickman NW, Janovitz EB. Feline fibrosarcomas at vaccination sites and non-vaccination sites. *J Comp Pathol*. 1996;114(2):165–74.
 51. Mikiewicz M, Paździor-Czapula K, Fiedorowicz J, Gesek M, Otrocka-Domagala I. Metallothionein expression in feline injection site fibrosarcomas. *BMC Vet Res*. 2023;19(1):42.
 52. Dobromylskij MJ, Richards V, Smith KC. Prognostic factors and proposed grading system for cutaneous and subcutaneous soft tissue sarcomas in cats, based on a retrospective study. *J Feline Med Surg*. 2021;23(2):168–74.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Pozostałe publikacje wchodzące w
skład osiągnięcia habilitacyjnego
wraz z oświadczeniami
współautorów**

Oświadczenie

Niniejszym oświadczamy, że wkład autorów w publikacji:

Mikiewicz Mateusz, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Lemishevskiyi Vladimir, Otrocka-Domagała Iwona. Canine and Feline Oral Cavity Tumours and Tumour-like Lesions: a Retrospective Study of 486 Cases (2015-2017). J Comp Pathol. 2019;172:80-87. DOI: 10.1016/j.jcpa.2019.09.007.

Był następujący:

Mateusz Mikiewicz – opracowanie koncepcji badań, metodyki, zaplanowanie i wykonanie analiz, opracowanie i interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na recenzję.

Katarzyna Paździor-Czapula – korekta językowa, pomoc w diagnostyce preparatów histopatologicznej.

Michał Gesek – przygotowanie mikrofotografii.

Vladimir Lemishevskiyi – pomoc w przeszukaniu archiwum Laboratorium Diagnostycznego Katedry Anatomii Patologicznej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM w Olsztynie.

Iwona Otrocka-Domagała – pomoc w diagnostyce histopatologicznej, nadzór merytoryczny.

Dr wet. Mateusz Mikiewicz *Mateusz Mikiewicz*

Dr n. wet. Katarzyna Paździor-Czapula

Katarzyna Paździor-Czapula

Dr hab. Michał Gesek, Prof. UWM

Michał Gesek

Dr Vladimir Lemishevskiyi

Dr hab. Iwona Otrocka-Domagała. Prof. UWM

Iwona Otrocka-Domagała

LTA4H AND FXR1 GENE AND PROTEIN EXPRESSION IN CANINE ORAL MELANOMA

L. Nordio*, F. Genova*, V. Serra*, C. Bazzocchi*, M.L. Longeri*, D. Stefanello*, M. Rondena† and C. Giudice*

*Department of Veterinary Medicine, Università degli Studi di Milano, Milan and †Laboratorio Veterinario San Marco, Padova, Italy

Introduction: Canine oral melanoma is a common neoplasm that is usually considered malignant, although the correlation between histology and prognosis is still controversial. Therefore, research of new biological markers is ongoing. In this study, LTA4H (an enzyme of the arachidonic acid cascade) and FXR1 (a RNA binding protein) are investigated. Both have been investigated previously for their possible role in metastasis of ocular melanoma, and are studied here in canine oral melanoma.

Materials and Methods: Twenty-nine samples of formalin-fixed and paraffin wax-embedded canine oral melanomas were analyzed. Routine HE sections were evaluated on light microscopy and received a histological description, including mitotic activity index (MI). Immunohistochemistry (IHC) for LTA4H, FXR1 and Ki67 was performed. LTA4H and FXR1 were scored semiquantitatively and Ki67 was scored quantitatively. The expression of LTA4H and FXR1 genes was also quantified by RT-PCR.

Results: Most of the cases were epithelioid, poorly pigmented melanomas. MI ranged from 0.1 to 9.2 (median 1.1). Ki67 index ranged from 7.9 to 44.4% (median 19%). IHC was positive in 29/29 LTA4H and 28/29 FXR1, with variable intensity and percentage of positivity. RT-PCR relative expression values ranged from 0.49 to 9.11 for LTA4H and 0.15 to 10.33 for FXR1 (in four cases was under the detection limit).

Conclusions: LTA4H and FXR1 were detected in all tested melanomas. Marked differences between cases were noted with RT-PCR, although target gene expression levels were not consistent with histological parameters or Ki67 index. Conversely, immunohistochemical positivity was elevated in most cases with negligible expression differences. Further work is ongoing to clarify the prognostic significance of different levels of expression.

ORAL CAVITY LESIONS IN DOGS: A RETROSPECTIVE STUDY OF 136 CASES

M. Mikiewicz, K. Paździor-Czapula, I. Otrocka-Domagala, M. Gesek and P. Myrdek

Department of Pathological Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland

Introduction: Oral cavity lesions are common in dogs. They can develop spontaneously or secondary to chronic inflammation. The aim of this study was to evaluate the incidence of inflammatory, hyperplastic and neoplastic lesions of the canine oral cavity.

Materials and Methods: Canine oral cavity lesions ($n = 136$), diagnosed routinely in 2016, were classified as inflammatory, hyperplastic and neoplastic (i.e. benign and malignant).

Results: The majority (72.8%) of the evaluated lesions were benign neoplastic, hyperplastic or inflammatory in nature; the most common being gingival hyperplasia (24.3%) and peripheral odontogenic fibroma (24.3%). The other benign or hyperplastic lesions were represented by viral filiform papilloma (3.7%), calcinosis circumscripta (1.5%) and single cases of squamous papilloma, plasma cell tumour, granular cell tumour, acanthomatous ameloblastoma and giant cell granuloma. Inflammatory lesions constituted 14.7% of the evaluated cases. Half of these cases represented lymphoplasmacytic stomatitis and the remaining half were chronic stomatitis of purulent, pyogranulomatous, mixed, ulcerative or eosinophilic types. In four of these cases, the inflammatory infiltrates were accompanied by epithelial dysplasia. Malignant tumours constituted 27.2% of the evaluated cases, with the most frequent being melanoma (11%, mostly high grade), followed by fibrosarcoma (4.4%), squamous cell carcinoma (3.7%), undifferentiated round cell tumour (2.2%), mast cell tumour (2.2%), poorly differentiated sarcoma (2.2%) and single cases of osteosarcoma and epitheliotropic lymphoma.

Conclusions: The majority of canine oral cavity lesions are benign, hyperplastic or inflammatory. However, approximately 30% of canine oral cavity lesions are malignant, and therefore surgical excision followed by histopathological examination is recommended in each case.

FELINE MESENCHYMAL NASAL HAMARTOMA IN TWO SIBLINGS

J.M. Monné Rodríguez*, C. Cambi†, A. Pratesi‡ and R. Verin*

*Department of Veterinary Pathology and Public Health, Institute of Veterinary Science, †University of Liverpool Small Animal Practice and ‡Small Animal Teaching Hospital, University of Liverpool, UK

Introduction: Mesenchymal nasal hamartoma (MNH) is a rare benign entity affecting young cats that has similar histological features to nasal hamartoma (NH) in children. In both species the lesions are benign, albeit they can be locally invasive hence leading to misdiagnosis. The underlying cause for these lesions is undetermined; however, a congenital origin is suspected.

Materials and Methods: Two 1-year-old cats from the same litter, with respiratory signs and monolateral epistaxis were diagnosed concurrently by means of radiography and rhinoscopy with a nasal osteolytic mass partially protruding from the nostrils. Complete surgical removal was undertaken and tissues were fixed and processed. Sections were stained for histological examination (HE).

Results: Both cats showed a mesenchymal proliferation expanding the submucosa to form an exophytic nodule lined by respiratory epithelium and composed of 15 mm diameter plump spindle-shaped cells arranged in streams and supported by a moderate loose to dense fibrous stroma. Large blood-filled cavities were present multifocally, together with clusters of osteoid lined by well-differentiated osteoblasts and occasional osteoclasts. Mitotic index was low (<1 mitosis per 10 HPF). Numerous inflammatory cells including neutrophils, macrophages, lymphocytes and plasma cells were observed as well as numerous areas of haemorrhage with associated hemosiderophages.

Conclusions: The histological features were compatible with feline MNH. The concomitant presence of the nasal masses in two siblings supports the congenital origin of the lesion. MNH should be included in the differential diagnosis of osteolytic lesions in the nasal cavity of cats.



NEOPLASTIC DISEASE

Canine and Feline Oral Cavity Tumours and Tumour-like Lesions: a Retrospective Study of 486 Cases (2015–2017)

M. Mikiewicz^{*}, K. Paździor-Czapula^{*}, M. Gesek^{*}, V. Lemishevskiy[†]
and I. Otrocka-Domagała^{*}

^{*} University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Olsztyn, Poland and [†] Lviv National Stepan Gzhytskyi University of Veterinary Medicine and Biotechnology Pekarska, Lviv, Ukraine

Summary

Oral cavity tumours and tumour-like lesions are common in dogs and cats, and their diagnosis and classification requires histopathological examination. The aim of this study was to analyse retrospectively oral cavity lesions in dogs and cats in order to evaluate the distribution of inflammatory, hyperplastic and neoplastic lesions manifested as tumours. A total of 486 oral cavity tumours and tumour-like lesions (340 canine; 146 feline), diagnosed routinely from 2015 to 2017, were included. The lesions were classified as inflammatory, hyperplastic or neoplastic (benign and malignant). Histopathological diagnosis was based on haematoxylin and eosin staining and, when necessary, May-Grünwald–Giemsa (for mast cell tumours) or Masson's Fontana (for melanomas) stains or immunohistochemistry (for CD3, CD79 α and S100 markers). For dogs, 29.11% (99/340) of the lesions were benign tumours, 24.12% (82/340) were hyperplastic lesions and 14.7% (50/340) were inflammatory lesions. For cats, 4.79% (7/146) were benign tumours, 15.07% (22/146) were hyperplastic lesions and 57.53% (84/146) were inflammatory lesions. Furthermore, 23.24% (79/340) of canine cases were diagnosed with gingival hyperplasia and 19.12% (65/340) were diagnosed with peripheral odontogenic fibroma, while 43.84% (64/146) of feline cases were diagnosed with chronic lymphoplasmacytic stomatitis. Malignant tumours in dogs and cats constituted 32.06% (109/340) and 21.91% (32/146) of the lesions, respectively, with high-grade melanoma in dogs and squamous cell carcinoma in cats being the most common.

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: cat; dog; hyperplastic lesions; inflammation

Introduction

Oral cavity tumours and tumour-like lesions are detected commonly during routine clinical examination in both dogs and cats. These lesions can cause pain, discomfort and/or reluctance to eat or may be discovered accidentally, as they sometimes accompany periodontal diseases (Verhaert, 2010). Some oral cavity lesions in dogs and cats are consequences or manifestations of chronic gingivitis/stomatitis, but others can

develop spontaneously, such as benign odontogenic neoplasia or malignancies (Lommer, 2013). However, it has been claimed that chronic irritation or persistent antigenic stimulation may play a role in malignant transformation (Coussens and Werb, 2002; Ekere *et al.*, 2010). It has also been suggested that canine and feline oral cavity tumours can develop due to passive tobacco smoke inhalation, flea control collars and dietary and environmental factors (Bertone *et al.*, 2003; Bronden *et al.*, 2009).

Canine and feline oral cavity tumour-like lesions may be true benign or malignant tumours, but hyperplastic and inflammatory lesions may clinically

Correspondence to: M. Mikiewicz (e-mail: mateusz.mikiewicz@uwm.edu.pl).

masquerade as neoplasia (Yoshida *et al.*, 1999; Kouki *et al.*, 2013). Despite the different nature of these lesions, they appear similar macroscopically, and therefore their clinical classification is difficult or impossible. There are some previous reports analysing the incidence of specific malignancies of the canine and feline oral cavity (Heldmann *et al.*, 2000; Ramos-Vara *et al.*, 2000; Nemec *et al.*, 2012; Liptak and Withrow, 2013; Bonfanti *et al.*, 2015; Gardner *et al.*, 2015; Wingo, 2018), but knowledge of the incidence of inflammatory, hyperplastic, benign and malignant oral cavity tumours and tumour-like lesions in dogs and cats in Eastern Europe is sparse.

The aim of this study was to analyse retrospectively oral cavity tumours (benign and malignant) and tumour-like lesions (inflammatory and hyperplastic) in dogs and cats, with regard to age, sex and breed, diagnosed in the Pathomorphological Laboratory of the Department of Pathological Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland, during the period of 2015–2017.

Materials and Methods

The retrospective analysis was performed on 486 excisional biopsy samples (340 canine and 146 feline). These were archival diagnostic specimens diagnosed by two of the authors (IOD and KPC). The samples had been fixed in 10% neutral buffered formalin, processed routinely and embedded in paraffin wax. Sections were stained with Mayer's haematoxylin and eosin (HE). When appropriate, May–Grunwald–Giemsa stain (for mast cell tumours) or Mason's Fontana stain (for hypomelanotic melanomas) was also performed. In poorly differentiated tumours, immunohistochemistry (IHC) was performed at the request of the submitting veterinarian using markers specific for CD3 and CD79 α (for lymphoma) and S100 (for amelanotic melanoma). IHC involved initial heat-induced antigen retrieval (in Tris–EDTA buffer, pH 9.0), conducted in a microwave oven at 650W (samples were microwaved twice to the boiling point, and incubated in hot buffer for 20 min after boiling each time). Sections were subsequently overlaid with primary antibodies specific for CD3 (polyclonal rabbit anti-human CD3, 1 in 50 dilution; Dako, Glostrup, Denmark), CD79a (monoclonal mouse anti-human CD79a, clone HM57, 1 in 100 dilution; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA) and S100 (polyclonal rabbit anti-bovine S100, 1 in 50 dilution; Dako). 'Visualization' of labelling was achieved by the immunoperoxidase method with 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) as a sub-

strate (Impress Universal Reagent anti-mouse/rabbit Ig peroxidase; Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). The slides were counterstained with Mayer's haematoxylin. Positive and negative controls were processed together with the evaluated slides.

The data obtained from the archival records included sex, age, breed and histopathological diagnosis. The lesions were subsequently classified as hyperplastic, inflammatory or neoplastic (benign or malignant).

Results

Canine Lesions

The sex distribution of the canine cases was 51.47% male (175 cases) and 48.53% female (165 cases). Most cases of the lesions were observed in crossbred dogs (Table 1).

Hyperplastic lesions constituted 24.12% (82/340) of the total oral lesions and were mostly gingival

Table 1
Breed distribution of canine cases

Breed	Number of cases (%)
Crossbred	216 (63.53%)
Labrador retriever	15 (4.41%)
Yorkshire terrier	15 (4.41%)
German Shepherd dog	12 (3.53%)
Boxer	11 (3.24%)
American Staffordshire bull terrier	6 (1.76%)
Dachshund	6 (1.76%)
Bernese Mountain dog	5 (1.47%)
Spaniel	5 (1.47%)
Miniature schnauzer	4 (1.18%)
Other breeds (fox terrier, French bulldog, golden retriever, pointer, bloodhound, Chihuahua, great Dane, Irish setter, Maltese, poodle, pug, Alaskan malamute, black Russian terrier, border terrier, Cao File de San Miguel, Chinese crested, chow-chow, doberman pincher, English bulldog, giant schnauzer, Jack Russell terrier, miniature pincher, Shih-tzu, Siberian husky, St. Bernard, Wachtelhund, Welsh corgi)	Single cases*

*One to three cases each (0.29–0.88%).

hyperplasia (96.34% of all hyperplastic lesions; 79/82), with isolated cases of calcinosis circumscripta (2.44%; 2/82) and giant cell granuloma (1.22%; 1/82). The gingival hyperplasia was mostly accompanied by lymphoplasmacytic inflammation of various degrees (Fig. 1). Additionally, in nine cases of gingival hyperplasia, bony metaplasia of the connective tissue was also observed.

Inflammatory lesions (without distinct gingival hyperplasia) constituted 14.7% (50/340) of the total oral lesions and included lymphoplasmacytic (62% of all inflammatory lesions; 31/50), ulcerative (16%; 8/50), purulent (8%; 4/50), eosinophilic (6%; 3/50), pyogranulomatous (4%; 2/50) and mixed stomatitis (4%; 2/50). In six cases with inflammatory lesions, epithelial dysplasia was observed.

Benign neoplastic lesions constituted 29.11% (99/340) of the total oral lesions and included peripheral odontogenic fibroma (the second most common lesion in dogs; 65.66% of all benign tumours; 65/99), viral filiform papilloma (11.11%; 11/99), acanthomatous ameloblastoma (8.08%; 8/99), plasmacytoma (7.07%; 7/99) and single cases of granular cell tumour (3.03%; 3/99), ossifying fibroma (2.02%; 2/99), squamous papilloma (1.01%; 1/99), Schwannoma (1.01%; 1/99) and amyloid-producing odontogenic tumour (1.01%; 1/99). Peripheral odontogenic fibroma (Fig. 2) was diagnosed in nine out of 11 boxers included in this study.

The malignant tumours constituted 32.06% (109/340) of the total oral lesions in dogs. The most frequent malignancy was melanoma (Fig. 3) (35.78% of all malignant tumours; 39/109). Thirty-five of these were high-grade and four were low-grade melanomas according to the grading schemes of Spangler and Kass (2006), Bergin *et al.* (2011),

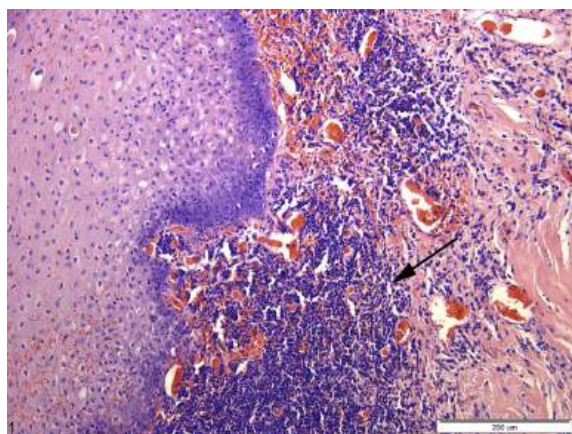


Fig. 1. Gingival hyperplasia, dog. Epithelial and connective tissue proliferation with plasma cell and lymphocyte infiltration (arrow). HE.

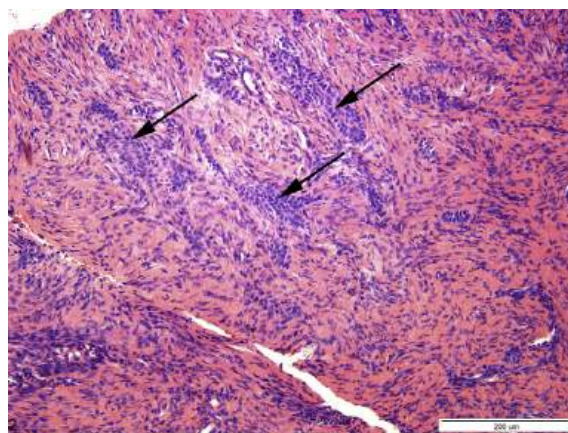


Fig. 2. Peripheral odontogenic fibroma, dog. Odontogenic epithelial islands (arrows) in hyperplastic connective tissue. HE.

Smedley *et al.* (2011) and Meuten *et al.* (2016). Other commonly diagnosed malignancies were squamous cell carcinoma (26.61%; 29/109), fibrosarcoma (12.84%; 14/109) and osteosarcoma (10.09%; 11/109). Other less frequent malignancies included mast cell tumour (5.5%; 6/109), lymphoma (3.67%; 4/109), including non-epitheliotropic (75%; 3/4) and epitheliotropic (25%; 1/4) lymphoma, undifferentiated sarcoma (2.75%; 3/109), haemangiosarcoma (1.83%; 2/109) and myxosarcoma (0.92%; 1/109).

Most cases of oral cavity tumours and tumour-like lesions were observed in middle-aged dogs (range 4–11 years), and few cases, particularly those with calcinosis circumscripta, eosinophilic stomatitis and viral filiform papilloma, were observed in young animals (range 0.5–3.5 years). Detailed data regarding

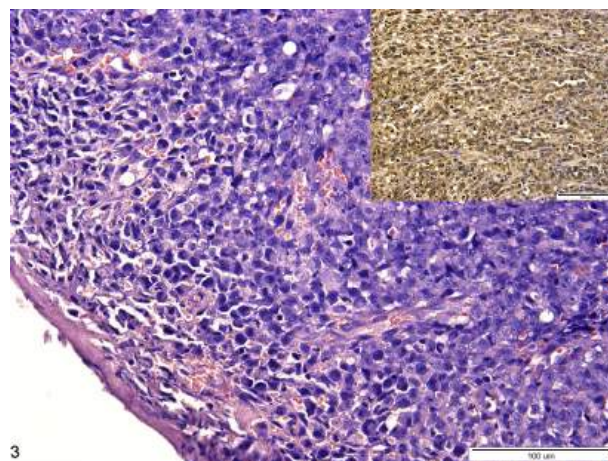


Fig. 3. Amelanotic melanoma, dog. Neoplastic cells with marked anisocytosis and anisokaryosis. HE. Inset: amelanotic melanoma, dog. S100 protein immunohistochemistry in neoplastic cells.

histological diagnosis, the number of cases and the mean age of dogs affected with oral cavity tumours and tumour-like lesions are summarized in Table 2.

Feline Lesions

The sex distribution of the feline cases was 79 (54.11%) male and 67 (45.89%) female. Most cases were seen in European shorthair cats (Table 3).

Hyperplastic lesions constituted 15.06% (22/146) of all cases and were represented by gingival hyperplasia (90.91% of all hyperplastic lesions; 20/22) and single cases of adenomatoid hyperplasia of the minor salivary glands (4.55%; 1/22) and peripheral giant cell granuloma (4.55%; 1/22). Similar to dogs, gingival hyperplasia was often accompanied by lymphoplasmacytic inflammation of various degrees. In two cases of gingival hyperplasia, bony metaplasia was observed.

Inflammatory lesions (without distinct gingival hyperplasia) constituted 58.22% (85/146) of the feline oral cavity lesions and included lymphoplasmacytic

Table 3
Breed distribution of feline cases

Breed	Number of cases (%)
European shorthair	129 (88.36%)
Maine Coon	5 (3.42%)
Persian	5 (3.42%)
British shorthair	4 (2.74%)
Ragdoll	1 (0.68%)
Siamese	1 (0.68%)
Sphinx	1 (0.68%)

(75.29% of all inflammatory lesions; 64/85), eosinophilic (eosinophilic ulcer; Fig. 4) (18.82%; 16/85), purulent (2.35%; 2/85), pyogranulomatous (2.35%; 2/85) and mixed type (1.18%; 1/85) reactions. In three cases, the inflammatory infiltrates were accompanied by epithelial dysplasia. Additionally, in three cases, lymphoplasmacytic stomatitis was accompanied by tooth resorption.

Benign neoplastic lesions constituted 4.79% (7/146) of the feline oral cavity tumours and included peripheral odontogenic fibroma (28.57% of all benign tumours; 2/7), plasmacytoma (28.57%; 2/7), squamous papilloma (28.57%; 2/7) and Schwannoma (14.29%; 1/7).

Malignant tumours constituted 21.92% (32/146) of the feline oral cavity tumours. The most common malignancy of the feline oral cavity was squamous cell carcinoma (Fig. 5) (75% of all malignant tumours; 24/32), followed by fibrosarcoma (12.5%; 4/32). Other malignancies included a few or single cases of non-epitheliotropic lymphoma (6.25%; 2/32), melanoma (3.13%; 1/32) and osteosarcoma (3.13%; 1/32).

Most cases of oral cavity tumours and tumour-like lesions were seen in middle-aged cats (4–12 years), and only plasmacytomas were observed in two 3-

Table 2
Canine oral cavity tumours and tumour-like lesions

Histological diagnosis	Number of cases (%)	Age (mean $\pm$ SD)
HYPERPLASTIC 82 (24.12% of total oral lesions)		
Gingival hyperplasia	79 (23.24%)	9 $\pm$ 3.6
Calcinosis circumscripta	2 (0.59%)	2 $\pm$ 1.6
Giant cell granuloma	1 (0.29%)	8
INFLAMMATORY 50 (14.7 % of total oral lesions)		
Lymphoplasmacytic stomatitis	31 (9.12%)	9 $\pm$ 2.7
Ulcerative stomatitis	8 (2.35%)	10 $\pm$ 4.9
Purulent stomatitis	4 (1.18%)	9 $\pm$ 4.1
Eosinophilic stomatitis	3 (0.88%)	2 $\pm$ 1
Pyogranulomatous stomatitis	2 (0.59%)	6.5 $\pm$ 2.1
Mixed stomatitis	2 (0.59%)	8.5 $\pm$ 0.7
NEOPLASTIC: BENIGN 99 (29.11% of total oral lesions)		
Peripheral odontogenic fibroma	65 (19.12%)	8 $\pm$ 2.6
Viral filiform papilloma	11 (3.24%)	2 $\pm$ 1.83
Acanthomatous ameloblastoma	8 (2.35%)	9 $\pm$ 2.97
Plasmacytoma	7 (2.06%)	10 $\pm$ 3.6
Granular cell tumour	3 (0.88%)	12 $\pm$ 0.58
Ossifying fibroma	2 (0.59%)	14 $\pm$ 1.41
Squamous papilloma	1 (0.29%)	7
Schwannoma	1 (0.29%)	5
Amyloid-producing odontogenic tumour	1 (0.29%)	8
NEOPLASTIC: MALIGNANT 109 (32.06% of total oral lesions)		
Melanoma	39 (11.47%)	11.5 $\pm$ 2.35
Squamous cell carcinoma	29 (8.53%)	10 $\pm$ 3.22
Fibrosarcoma	14 (4.12%)	11 $\pm$ 4.08
Osteosarcoma	11 (3.24%)	9.5 $\pm$ 3
Mast cell tumour	6 (1.76%)	8.5 $\pm$ 3.02
Lymphoma	4 (1.18%)	8 $\pm$ 4.57
Undifferentiated sarcoma	3 (0.88%)	9 $\pm$ 7
Haemangiosarcoma	2 (0.59%)	11 $\pm$ 4.24
Myxosarcoma	1 (0.29%)	11

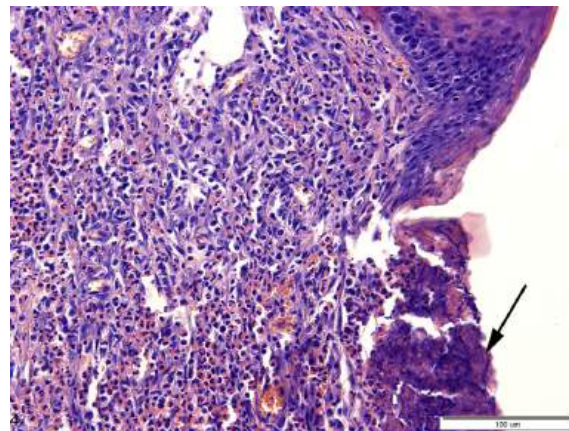


Fig. 4. Eosinophilic ulcer, cat. Ulceration (arrow) and eosinophilic infiltration of the gingiva. HE.

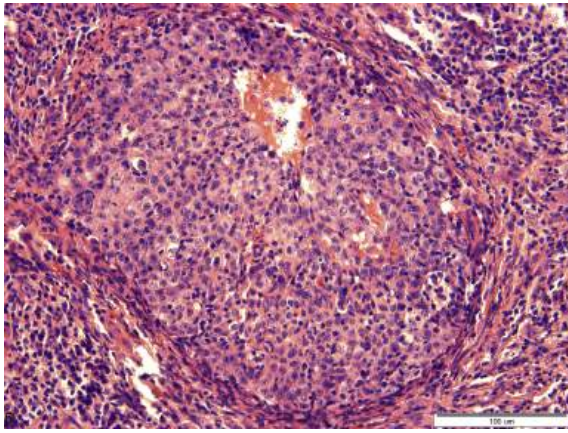


Fig. 5. Squamous cell carcinoma, cat. Neoplastic cells with marked anisocytosis and anisokaryosis. HE.

year-old cats. Detailed data regarding histological diagnosis, the number of cases and the mean age of cats affected diagnosed with oral cavity tumours and tumour-like lesions are summarized in Table 4.

Discussion

The results of this study showed that the majority (53.2%) of oral cavity lesions in dogs were either hyperplastic lesions (mostly gingival hyperplasia) or benign tumours (most commonly peripheral odontogenic fibroma), while in cats inflammatory lesions

were most common (58.2%). In dogs and cats, both sexes were almost equally affected. The age of dogs and cats included in the study was similar, and ranged from 0.5 to 16.5 years (mean 9 years) and from 0.5 to 17 years (mean 8 years), respectively. Most tumours and tumour-like lesions occurred in middle-aged animals, which is in agreement with the findings of other studies (Gorlin and Peterson, 1967; Dorn and Priester, 1976; Svendenius and Warfvinge, 2010; Verhaert, 2010; Wingo, 2018). The most common lesions in young dogs (age range 0.5–2 years) were calcinosis circumscripta and viral filiform papilloma, as reported previously (Tafti *et al.*, 2005; Uzal *et al.*, 2016).

Gingival hyperplasia was the most common oral cavity lesion in dogs. Gingival hyperplasia is an excessive proliferation of overlying epithelium and stromal connective tissue, occurring as a focal or, more frequently, multifocal lesion (Verhaert, 2010). Gingival hyperplasia can be caused by dental plaque accumulation, gingivitis or certain medications, such as calcium channel blockers (i.e. amlodipine) or ciclosporin (Pariser and Berdoulay, 2011; Desmet and van der Meer, 2017). In the present study, gingival hyperplasia in dogs was accompanied by lymphoplasmacytic infiltrates in most cases, suggesting an inflammatory background to this lesion. However, inflammation secondary to chronic irritation cannot be excluded, as these cases lacked a full clinical history.

Bony metaplasia of the connective tissue was observed in nine cases of gingival hyperplasia in dogs. Metaplastic bone formation can result from chronic gingival inflammation (Reichart *et al.*, 1989). Nevertheless, because bony metaplasia is not uncommon within various gingival tumours and tumour-like lesions in dogs, it likely has little or no diagnostic importance (Reichart *et al.*, 1989; Uzal *et al.*, 2016), as is the case in man (D'Astous, 2015).

Peripheral odontogenic fibroma was the second most common oral cavity lesion in dogs, which was in accordance with the findings of other studies (Verstraete *et al.*, 1992; Gardner, 1996; Verhaert, 2010). Additionally, in the present study, peripheral odontogenic fibroma was diagnosed in nine out of 11 boxers, suggesting a breed predisposition, which has also been reported previously (Gorlin and Peterson, 1967; Verhaert, 2010).

Although canine acanthomatous ameloblastoma is a common odontogenic tumour in dogs (Wingo, 2018), only eight cases were reported in the present study. This tumour originates from the epithelial rests of Malassez or the reduced enamel epithelium of the Serres rests (Poulet *et al.*, 1992; Wingo, 2018). Macroscopically, acanthomatous ameloblastoma

Table 4

Feline oral cavity tumours and tumour-like lesions

Histological diagnosis	Number of cases (%)	Age (mean $\pm$ SD)
HYPERPLASTIC 22 (15.07 % of total oral lesions)		
Gingival hyperplasia	20 (13.7%)	8 $\pm$ 4.06
Adenomatoid hyperplasia of the minor salivary glands	1 (0.68%)	7.5
Giant cell granuloma	1 (0.68%)	12
INFLAMMATORY 85 (58.22 % of total oral lesions)		
Lymphoplasmacytic stomatitis	64 (43.84%)	7.5 $\pm$ 3.8
Eosinophilic ulcer	16 (10.95%)	7 $\pm$ 4.51
Purulent stomatitis	2 (1.37%)	6.5 $\pm$ 2.12
Pyogranulomatous stomatitis	2 (1.37%)	6 $\pm$ 5.66
Mixed stomatitis	1 (0.68%)	6
NEOPLASTIC: BENIGN 7 (4.79 % of total oral lesions)		
Peripheral odontogenic fibroma	2 (1.37%)	8 $\pm$ 1.41
Plasmacytoma	2 (1.37%)	3 $\pm$ 0
Squamous papilloma	2 (1.37%)	9.5 $\pm$ 0.71
Schwannoma	1 (0.68%)	8
NEOPLASTIC: MALIGNANT 32 (21.92 % of total oral lesions)		
Squamous cell carcinoma	24 (16.44%)	11 $\pm$ 2.12
Fibrosarcoma	4 (2.74%)	9 $\pm$ 3.52
Lymphoma	2 (1.37%)	9 $\pm$ 0
Melanoma	1 (0.68%)	15
Osteosarcoma	1 (0.68%)	12

may look similar to peripheral odontogenic fibroma. However, unlike the latter, the lesion is highly invasive, albeit ostensibly benign, and therefore wide surgical excision with partial mandibulectomy or maxillectomy is recommended (Wingo, 2018).

Inflammatory lesions constituted approximately 15% of the canine cases. Stomatitis in the gingival sulcus involves interactions between the host immune system and various antigens. Although the precise aetiology in most cases is unknown, various infectious agents have been described, including bacteria, fungi and viruses (Lyon, 2005). The most common infectious agents of canine stomatitis include *Actinobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Porphyromonas* spp., *Bacterioides* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. and *Proteus* spp. (Senhorinho *et al.*, 2011; Polkowska *et al.*, 2014). Other possible factors include genetics, nutrition, environment and domestication (Lyon, 2005). Dogs affected by oral cavity inflammation had higher levels of alanine transaminase, aspartate transaminase and urea concentration in serum compared with healthy animals, which suggested co-existing health problems connected with the liver, kidney and/or heart (Senhorinho *et al.*, 2012; Polkowska *et al.*, 2014).

Our study showed that 32.06% of the evaluated oral cavity lesions in dogs were malignant tumours. A similar result was obtained by Wingo (2018). This result is inconsistent with the results of another study, in which 15% of evaluated canine oral biopsies were diagnosed as malignant lesions (Svendenius and Warfvinge, 2010). The most common malignancy was high-grade melanoma, which was also previously reported (Gorlin and Peterson, 1967; Borthwick *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 2002; Bergman, 2007; Svendenius and Warfvinge, 2010; Bonfanti *et al.*, 2015), followed by squamous cell carcinoma and fibrosarcoma. All evaluated cases of oral melanoma in dogs occurred in older individuals; however, this malignancy can also be observed in young dogs (Ramos-Vara *et al.*, 2000; Bergman, 2007). Highly pigmented melanomas are not diagnostically challenging; however, hypomelanotic and amelanotic tumours are difficult to diagnose and often mimic other lesions, therefore requiring immunophenotyping (Bergman, 2007).

The second most common malignancy in dogs was squamous cell carcinoma. Previous studies also showed that squamous cell carcinoma is a common malignant tumour of the oral cavity of dogs (Dorn and Priester, 1976; Verhaert, 2010; Munday *et al.*, 2017). The neoplasm is locally invasive and has low metastatic potential; however, squamous cell carcinoma arising from lingual epithelium has higher metastatic potential than its counterpart

arising elsewhere in the oral cavity (Carpenter *et al.*, 1993; Hayes *et al.*, 2007; Buckley and Nuttall, 2012). Fibrosarcoma was the third most common oral cavity malignancy in dogs. This tumour is locally invasive and can infiltrate the adjacent bone. Furthermore, in dogs, metastases to regional lymph nodes and distant organs are common (Munday *et al.*, 2017).

In cats, the majority (58.2%) of oral cavity lesions were stomatitis (mostly lymphoplasmacytic), which was also reported previously (Wingo, 2018). Stomatitis with ulceration is mostly associated with infection by feline calicivirus, feline immunodeficiency virus, feline leukaemia virus, feline herpesvirus or anaerobic bacteria (Healey *et al.*, 2007). Cats with stomatitis had differences in cytokine expression and immunoglobulin profiles compared with healthy animals, and this may contribute to oral cavity inflammation (Harley *et al.*, 1999). It has been suggested that immunosuppression caused by unconnected health problems may play a role in oral cavity inflammation (Williams and Aller, 1992).

Gingival hyperplasia in cats was less common than in dogs and in all cases was accompanied by lymphoplasmacytic inflammation of various degrees, suggesting a primary inflammatory origin. In two cases, bony metaplasia was observed. Knaake and Verhaert (2010) suggested that gingival hyperplasia with bone- or cementum-like hard tissue formation in cats should be diagnosed as peripheral ossifying fibroma. Peripheral odontogenic fibroma was diagnosed in only two cats, confirming that it is a rare condition in this species (Stebbins *et al.*, 1989; Wingo, 2018).

Malignant neoplasms constituted 21.91% of the feline cases. Squamous cell carcinoma constituted the majority of malignant tumours, consistent with previous reports (Dorn and Priester, 1976; Stebbins *et al.*, 1989; Bertone *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2007; Verhaert, 2010; Bonfanti *et al.*, 2015; Wingo, 2018). This tumour often clinically resembles a non-healing ulcer and mimics foreign body reactions or eosinophilic ulcers (Verhaert, 2010; Martin *et al.*, 2011). As in dogs, feline oral cavity squamous cell carcinomas are locally invasive and have low metastatic potential. Several factors have been described that can lead to the development of oral squamous cell carcinoma in cats, including contact with carcinogens in flea collars, topical tick and flea medications or grooming behaviour (Bertone *et al.*, 2003; Wingo, 2018). Chronic stomatitis has also been proposed as a predisposing factor for squamous cell carcinoma in both dogs and cats (Stebbins *et al.*, 1989).

In this study, fibrosarcoma was reported in only four cats. The low incidence of oral cavity fibrosarcoma in cats is in contrast to the high incidence of its dermal counterpart (Fox, 1995). The tumour in cats has low metastatic potential (Stebbins *et al.*, 1989; Munday *et al.*, 2017). Oral melanoma was reported only in one cat (15 years old). Oral melanoma occurs rarely in cats (compared with dogs) and the mean age of affected cats is 12 years (Munday *et al.*, 2017).

In conclusion, most cases of oral cavity tumours and tumour-like lesions in dogs and cats are hyperplastic, inflammatory or benign tumours, and occur in middle-aged animals, without sex predilection. The most common lesion in dogs was gingival hyperplasia, followed by peripheral odontogenic fibroma, while in cats lymphoplasmacytic stomatitis was most common. Boxers appear predisposed to peripheral odontogenic fibroma. Young age may be a risk factor for calcinosis circumscripta and viral papilloma in dogs. The most common oral cavity malignancy in dogs and cats is high-grade melanoma and squamous cell carcinoma, respectively. Feline oral melanoma is a rare disease. Due to the wide spectrum of observed oral cavity tumours and tumour-like lesions and their macroscopic similarity, clinical diagnosis may be challenging, therefore histopathological examination is recommended in each case.

References

- Bergin IL, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M (2011) Prognostic evaluation of Ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Veterinary Pathology*, **48**, 41–53.
- Bergman PJ (2007) Canine oral melanoma. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, **22**, 55–60.
- Bertone ER, Snyder LA, Moore AS (2003) Environmental and lifestyle risk factors for oral squamous cell carcinoma in domestic cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, **17**, 557–562.
- Bonfanti U, Bertazzolo W, Garcis M, Roccabianca P, Romanelli G *et al.* (2015) Diagnostic value of cytological analysis of tumour and tumour-like lesions of the oral cavity in dogs and cats: a prospective study on 114 cases. *Veterinary Journal*, **205**, 322–327.
- Borthwick R, Else RW, Head KW (1982) Neoplasia and allied conditions of the canine oropharynx. *Veterinary Annual*, **22**, 248–269.
- Brønden LB, Eriksen T, Kristensen AT (2009) Oral malignant melanomas and other head and neck neoplasm in Danish dogs – data from the Danish Veterinary Cancer Registry. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **51**, 54.
- Buckley L, Nuttall T (2012) Feline eosinophilic granuloma complex(ities): some clinical clarification. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, **14**, 471–481.
- Carpenter LG, Withrow SJ, Powers BE, Ogilvie GK, Schwarz PD *et al.* (1993) Squamous cell carcinoma of the tongue in 10 dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **29**, 19–24.
- Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature*, **6917**, 860–867.
- D'Astous J (2015) Periodontology: an overview of alveolar bone expansion. *Canadian Veterinary Journal*, **56**, 295–300.
- Desmet L, van der Meer J (2017) Antihypertensive treatment with telmisartan in a cat with amlodipine-induced gingival hyperplasia. *Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports*, **3**, 2055116917745236.
- Dorn CR, Priester WA (1976) Epidemiologic analysis of oral and pharyngeal cancer in dogs, cats, horses, and cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **169**, 1202–1206.
- Ekere AU, Adiola VU, Kejeh BM (2010) Malignant change in chronic irritation: a case series. *West African Journal of Medicine*, **29**, 38–40.
- Fox LE (1995) Feline cutaneous and subcutaneous neoplasms. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **25**, 961–979.
- Gardner DG (1996) Epulides in the dog: a review. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, **25**, 32–37.
- Gardner H, Fidel J, Halderson G, Dernell W, Wheeler B (2015) Canine oral fibrosarcomas: a retrospective analysis of 65 cases (1998–2010). *Veterinary and Comparative Oncology*, **13**, 40–47.
- Gorlin RJ, Peterson WC Jr. (1967) Oral disease in man and animals based on analysis of 1,135 cases in a variety of species. *Archives of Dermatology*, **96**, 390–403.
- Harley R, Helps CR, Harbour DA, Gruffydd-Jones TJ, Day MJ (1999) Cytokine mRNA expression in lesions in cats with chronic gingivostomatitis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **6**, 471–478.
- Hayes AM, Adams VJ, Scase TJ, Murphy S (2007) Survival of 54 cats with oral squamous cell carcinoma in United Kingdom general practice. *Journal of Small Animal Practice*, **48**, 394–399.
- Healey KA, Dawson S, Burrow R, Cripps P, Gaskell CJ *et al.* (2007) Prevalence of feline chronic gingivostomatitis in first opinion veterinary practice. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, **9**, 373–381.
- Heldmann E, Anderson MA, Wagner-Mann C (2000) Feline osteosarcoma: 145 cases (1990–1995). *Journal of the American Animal Hospital Association*, **36**, 518–521.
- Knaake FAC, Verhaert L (2010) Histopathology and treatment of nine cats with multiple epulides. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, **79**, 48–53.
- Kouki MI, Papadimitriou SA, Kazakos GM, Savas I, Bitchava D (2013) Periodontal disease as a potential factor for systemic inflammatory response in the dog. *Journal of Veterinary Dentistry*, **30**, 26–29.
- Liptak JM, Withrow SJ (2013) Oral tumours. In: *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 5th Edit., SJ Withrow, DM Vail, Eds., Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 381–398.

- Lommer MJ (2013) Oral inflammation in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **43**, 555–571.
- Lyon KF (2005) Gingivostomatitis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **35**, 891–911.
- Martin CK, Tannehill-Gregg SH, Wolfe TD, Rosol TJ (2011) Bone-invasive oral squamous cell carcinoma in cats: pathology and expression of parathyroid hormone-related protein. *Veterinary Pathology*, **48**, 302–312.
- Meuten DJ, Moore FM, George JW (2016) Mitotic count and the field of view area: time to standardize. *Veterinary Pathology*, **53**, 7–9.
- Munday JS, Löhr CV, Kiupel M (2017) Tumors of alimentary tract. In: *Tumors in Domestic Animals*, 5th Edit., DJ Meuten, Ed., Wiley Blackwell, Raleigh, pp. 499–602.
- Nemec A, Murphy B, Kass PH, Verstraete FJ (2012) Histological subtypes of oral non-tonsillar squamous cell carcinoma in dogs. *Journal of Comparative Pathology*, **147**, 111–120.
- Pariser MS, Berdoulay P (2011) Amlodipine-induced gingival hyperplasia in a great Dane. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **47**, 375–376.
- Polkowska I, Sobczyńska-Rak A, Gołyńska M (2014) Analysis of gingival pocket microflora and biochemical blood parameters in dogs suffering from periodontal disease. *In Vivo*, **6**, 1085–1090.
- Poulet FM, Valentine BA, Summers BA (1992) A survey of epithelial odontogenic tumors and cysts in dogs and cats. *Veterinary Pathology*, **29**, 369–380.
- Ramos-Vara JA, Beissenherz ME, Miller MA, Johnson GC, Pace LW *et al.* (2000) Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic and immunohistochemical review of 129 cases. *Veterinary Pathology*, **37**, 597–608.
- Reichart PA, Philipsen HP, Dürr UM (1989) Epulides in dogs. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, **18**, 92–96.
- Senhorinho GN, Nakano V, Liu C, Song Y, Finegold SM *et al.* (2011) Detection of *Porphyromonas gulae* from subgingival biofilms of dogs with and without periodontitis. *Anaerobe*, **17**, 257–258.
- Senhorinho GN, Nakano V, Liu C, Song Y, Finegold SM *et al.* (2012) Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas* spp. and *Fusobacterium* spp. in dogs with and without periodontitis. *Anaerobe*, **4**, 381–385.
- Smedley RC, Spangler WL, Esplin DG, Kitchell BE, Bergman PJ *et al.* (2011) Prognostic markers for canine melanocytic neoplasms: a comparative review of the literature and goals for future investigation. *Veterinary Pathology*, **48**, 54–72.
- Smith SH, Goldschmidt MH, McManus PM (2002) A comparative review of melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology*, **39**, 665–678.
- Spangler WL, Kass PH (2006) The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Veterinary Pathology*, **43**, 136–149.
- Stebbins KE, Morse CC, Goldschmidt MH (1989) Feline oral neoplasia: a ten-year survey. *Veterinary Pathology*, **26**, 121–128.
- Svendenius L, Warfvinge G (2010) Oral pathology in Swedish dogs: a retrospective study of 280 biopsies. *Journal of Veterinary Dentistry*, **27**, 91–97.
- Tafti AK, Hanna P, Bourque AC (2005) Calcinosis circumscripta in the dog: a retrospective pathological study. *Journal of Veterinary Medicine*, **52**, 13–17.
- Uzal FA, Plattner BL, Hostetter JM (2016) Alimentary system. In: *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*, 6th Edit, Vol. 2, MG Maxie, Ed., Elsevier, St. Louis, pp. 1–257.
- Verhaert L (2010) Oral proliferative lesions in the dog and cat. *European Journal of Companion Animal Practice*, **20**, 252–264.
- Verstraete FJM, Ligthelm AJ, Weber A (1992) The histologic nature of epulides in dogs. *Journal of Comparative Pathology*, **106**, 169–182.
- Williams CA, Aller MS (1992) Gingivitis/stomatitis in cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, **22**, 1361–1378.
- Wingo K (2018) Histopathologic diagnoses from biopsies of the oral cavity in 403 dogs and 73 cats. *Journal of Veterinary Dentistry*, **35**, 7–17.
- Yoshida K, Yanai T, Iwasaki T, Sakai H, Ohta J *et al.* (1999) Clinicopathological study of canine oral epulides. *Journal of Veterinary Medical Science*, **61**, 897–902.

[Received, June 21st, 2019
Accepted, September 16th, 2019]

Oświadczenie

Niniejszym oświadczamy, że wkład autorów w publikacji:

Mikiewicz Mateusz, Otrocka-Domagała Iwona, Gesek Michał, Paździor-Czapula Katarzyna, Rotkiewicz Tadeusz. Immunohistochemical and histopathological evaluation of malignant pheochromocytoma: a case study. Med. Weter. 2015;71:453-457.

Był następujący:

Mateusz Mikiewicz – opracowanie koncepcji badań, metodyki, zaplanowanie i wykonanie analiz laboratoryjnych, opracowanie i interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, przygotowaniu manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na recenzję.

Iwona Otrocka-Domagała – pomoc w diagnostyce zmiany, pomoc w interpretacji i opracowaniu wyników oraz pomoc przy przygotowaniu manuskryptu.

Michał Gesek – przygotowanie mikrofotografii.

Katarzyna Paździor-Czapula – korekta językowa manuskryptu, pomoc w wykonaniu barwienia immunohistochemicznego.

Tadeusz Rotkiewicz – pomoc w diagnostyce zmiany, nadzór merytoryczny.

Dr wet. Mateusz Mikiewicz *Mateusz Mikiewicz*

Dr hab. Iwona Otrocka-Domagała, Prof. UWM *Iwona Otrocka-Domagała*

Dr hab. Michał Gesek, Prof. UWM *Michał Gesek*

Dr n. wet. Katarzyna Paździor-Czapula *Katarzyna Paździor-Czapula*

Prof. dr hab. Tadeusz Rotkiewicz, Prof. zw.

Immunohistochemical and histopathological evaluation of malignant pheochromocytoma: a case study

MATEUSZ MIKIEWICZ, IWONA OTROCKA-DOMAGAŁA, MICHAŁ GESEK,
KATARZYNA PAŹDZIOR-CZAPULA, TADEUSZ ROTKIEWICZ

Department of Pathological Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn,
M. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn, Poland

Received 26.02.2014

Accepted 07.05.2014

Mikiewicz M., Otrocka-Domagala I., Gesek M., Paździor-Czapula K., Rotkiewicz T.

Immunohistochemical and histopathological evaluation of malignant pheochromocytoma: a case study

Summary

Malignant pheochromocytoma is an uncommon neoplasm in dogs. This study evaluated the histopathological and immunohistochemical profile of malignant pheochromocytoma. The report presents a case of bilateral adrenal gland tumor in a 6-year-old female golden retriever, diagnosed during necropsy. The necropsy also showed changes in other organs, i.e. heart (left ventricular hypertrophic cardiomyopathy, right ventricular dilated cardiomyopathy and infarction foci), lungs (multifocal alveolar emphysema and atelectasis). Metastases were not present. A histological examination showed that neoplastic cells were round, oval, polygonal and spindle with a high degree of anisocytosis and anisokaryosis. The nuclei were small, round, oval and some were divided. The nucleoli were faintly visible, and numbered from 2 to 3. The number of mitotic figures per 400 high power fields ranged from 0 to 2. Immunohistochemical staining using an antibody panel revealed that the tumor cells were strongly positive for chromogranin A, S100 protein and neuron specific enolase, but were negative for Ki67. PCNA expression was observed in some neoplastic cells, especially in those located close to the connective tissue stroma. Malignant pheochromocytoma was diagnosed on the basis of a immunohistochemical examination and tumor morphology.

Keywords: adrenal gland tumor, S100 protein, chromogranin A (CGA), neuron specific enolase (NSE), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Ki67

Pheochromocytoma is an endocrine neoplasm derived from epinephrine and norepinephrine-producing chromaffin cells localized in the adrenal medulla (2, 13, 14) and can be benign or malignant. Chromaffin cells are modified post-ganglionic sympathetic neurons derived from the same sympathoadrenal (SA) progenitor cell as sympathetic neurons. The major difference between chromaffin cells and sympathetic neurons is the ability of the chromaffin cells to secrete epinephrine and phenylethanolamine N – methyltransferase (PNMT) (14). Pheochromocytomas are rare tumors in all animal species except rats, in which they are common. Dogs and cattle are more susceptible to pheochromocytoma than other animals (13, 14). In humans, the pheochromocytoma is a more frequent neoplasm, especially in the case of the familial predisposition for this kind of tumor (14). Benign pheochromocytomas occur as solitary, mostly unilateral neoplasms of the adrenal gland medulla. Bilateral pheochromocytomas

are frequently seen in rats. The tumor size is variable. Benign adrenal gland tumor is unencapsulated, with low-to-medium cellularity, composed of round-to-polyhedral secretory epithelial cells with pale eosinophilic, finely granular cytoplasm and round-to-ovoid hyperchromatic nuclei (5). Nuclear pleomorphism is mild-to-moderate (15). Malignant pheochromocytoma is composed of a mixture of small cells resembling chromaffin cells and larger, more pleomorphic (often spindle) cells. Cells are organized in lobules, solid sheets and palisades, usually localized along sinusoids. In over 50% cases of malignant pheochromocytoma in animal metastases into the vena cava, tissues surrounding the adrenal gland, lymph nodes and distant organs such as liver, lung, kidney, spleen and bone were noted (3-5). Barthez et al. (1) found that in 61 cases of pheochromocytoma, tumors were locally invasive in 39% of affected animals and metastases were found in 13% of cases. Massive retroperitoneal hemorrhages due to

Tab. 1. Primary antibodies used with the particular methods of antigen retrieval and visualization

Primary Antibody	Clone	Optimal dilution	Source	Antigen retrieval	Visualization system	Chromogen
CGA	polyclonal rabbit anti – human chromogranin A	Ready-to-Use	DAKO, Denmark	2 × 3 min* Tris EDTA buffer pH = 9	DAKO, Denmark ^a	DAB ^a
NSE	monoclonal mouse anti – human, clone BBS/NC/VI – H14	1 : 100	DAKO, Denmark	2 × 3 min* Tris EDTA buffer pH = 9	DAKO, Denmark ^a	DAB ^a
S100 protein	polyclonal rabbit anti – S100 antibody	1 : 50	DAKO, Denmark	2 × 3 min* Tris EDTA buffer pH = 9	DAKO, Denmark ^a	DAB ^a
Ki67	monoclonal mouse anti – human, clone MIB-1	1 : 75	DAKO, Denmark	2 × 3 min* Tris EDTA buffer pH = 9	DAKO, Denmark ^a	DAB ^a
PCNA	monoclonal mouse anti – PCNA, clone PC10	1 : 200	DAKO, Denmark	2 × 3 min* Tris EDTA buffer pH = 9	DAKO, Denmark ^a	DAB ^a

Explanations: CGA = chromogranin A; NSE = neuron specific enolase; PCNA = proliferating cell nuclear antigen; *antigen retrieval was conducted in a microwave oven, 650 W; ^aDako EnVision + System-HRP (DAB), DakoCytomation, Denmark

the high blood pressure and injury to the blood vessel walls were also observed in affected animals (4). The accompanying clinical signs in dogs are different and depend on the secondary involved organs (8).

Histopathological diagnosis of pheochromocytoma is difficult due to the variable morphology of tumor cells. Therefore, the final diagnosis should be based on the immunohistochemical identification of cells. Pheochromocytoma cells show cytoplasmic expression of chromogranin A (CGA). Chromogranins are the major proteins of adrenal medulla and play an important role in binding and aggregating intracellular calcium. They also play a role as prohormones, molecular chaperones and gene expression modulators (10). In malignant pheochromocytoma there is a population of spindle cells which are positive for CGA. Those cells are absent in the benign form of the tumor (12). In immunohistochemical evaluation, chromaffin neoplastic cells also show moderate reaction with leu- and met-enkephalin (ME) (5), which depends on the tumor origin. If the tumor is forming extramedullary, the concentration of leu- and met-enkephalin in cell cytoplasm is lower than in the medullary tumor (16). Other antibodies which react with neoplastic cells are substance P (SP), synaptophysin (SYN), vasoactive intestinal peptide (VIP), neuropeptide Y, calcitonin gene-related polypeptide (CGRP), calcitonin, protein gene product 9.5 (PGP 9.5), Leu 7, S100 protein and galanin (GAL) (10, 13).

The cell proliferation markers seem to be an important prognostic factor, but so far there is no single histological or immunohistochemical marker which may predict the malignant behavior of the tumor. Therefore, it is justified to undertake research on determining a group of features and markers that may have a diagnostic value in distinguishing benign from malignant pheochromocytoma (15).

The aim of this study was to determine the histopathological and immunohistochemical profile of a malignant pheochromocytoma in a dog.

Material and methods

A 6-year-old female golden retriever was euthanized at the university clinic. The clinical signs and history of treatment were unknown. A necropsy examination was performed. During the necropsy, left ventricular hypertrophic cardiomyopathy, right ventricular dilated cardiomyopathy and infarction foci in a heart muscle were observed. In the lungs, multifocal alveolar emphysema and atelectasis were seen. Hydrothorax was also diagnosed. The kidneys were swollen and infarction foci in the cortex were present. Both adrenal glands were enlarged. Two reddish, 3-cm-in-diameter tumors were found in the left and right adrenal glands. Metastases were not found.

The tumor samples were collected, fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. The paraffin sections (5 µm) were routinely stained with hematoxylin and eosin (HE). Reticulin fibers were detected by using the modified method according to Gordon and Sweet (Bio-Optica, Italy) and collagen fibers were shown in Mallory trichrome staining (Bio-Optica, Italy).

The immunohistochemical examination was performed using primary antibodies, a visualization system and chromogen as summarized in Table 1. The specimens were counterstained with Mayer's hematoxylin. The slides were scanned and evaluated using 3DHISTECH (Hungary) software. The PCNA expression was evaluated in nine randomly-chosen areas of the slide (40 × magnification). The PCNA index was expressed as the percentage of PCNA-positive cells.

Results and discussion

Macroscopically, the tumor was well-demarcated from the surrounding tissues, but the capsule was not present. In the tumor stroma, numerous foci of necrosis were present. Histopathological examination revealed the presence of mixed cell populations of neoplastic cells arising from adrenal gland medulla. The cells were round, oval, spindle and polygonal with a high degree of anisocytosis and anisokaryosis. Smaller cells were mostly round with small, round nuclei and scant, eosinophilic cytoplasm. The medium and large cells were oval, polygonal or spindle and had medium or large, round-to-oval nuclei and abundant, eosinophilic

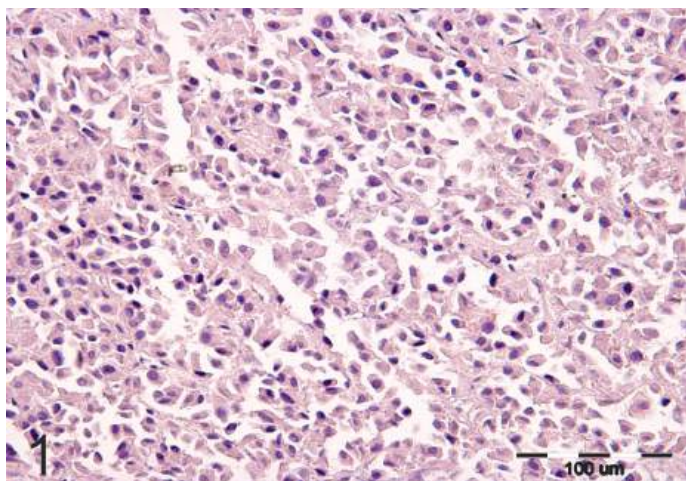


Fig. 1. Adrenal gland, dog. Pleomorphic neoplastic cells. Nucleoli are faintly visible. In single cells 2-3 nucleoli are seen. HE

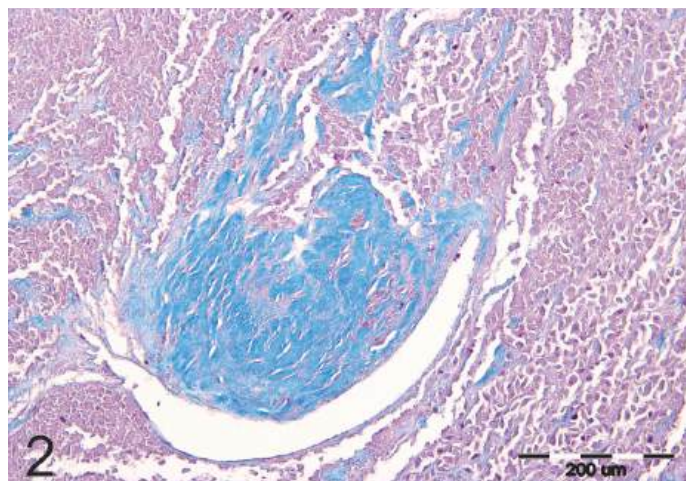


Fig. 2. Adrenal gland, dog. Small clusters of collagen fibers inside the tumor mass. Collagen structures are surrounded by neoplastic cells. Mallory trichrome

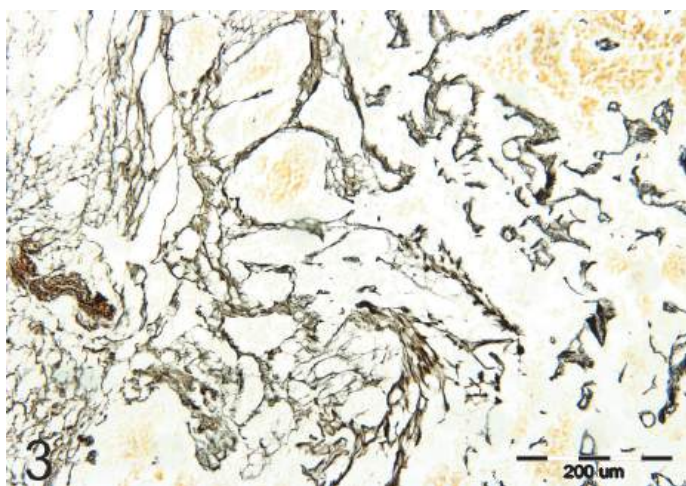


Fig. 3. Adrenal gland, dog. Reticulin fibers which are dividing neoplastic cells into Zellballen pattern. Silver impregnation

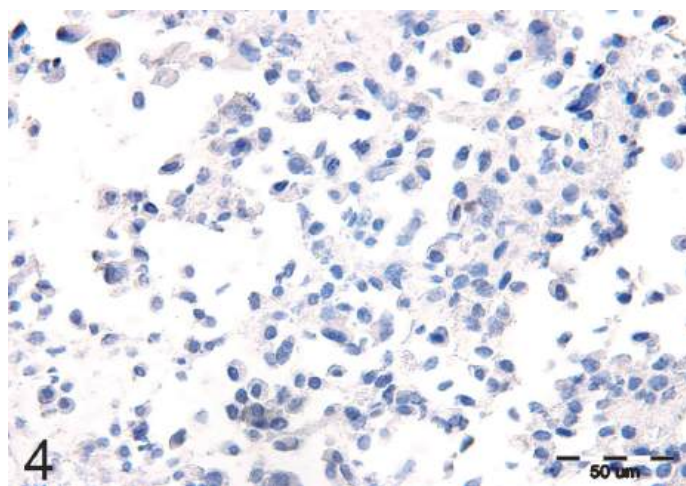


Fig. 4. Adrenal gland, dog. Neoplastic cells Ki67 negative. Ki67 immunostaining

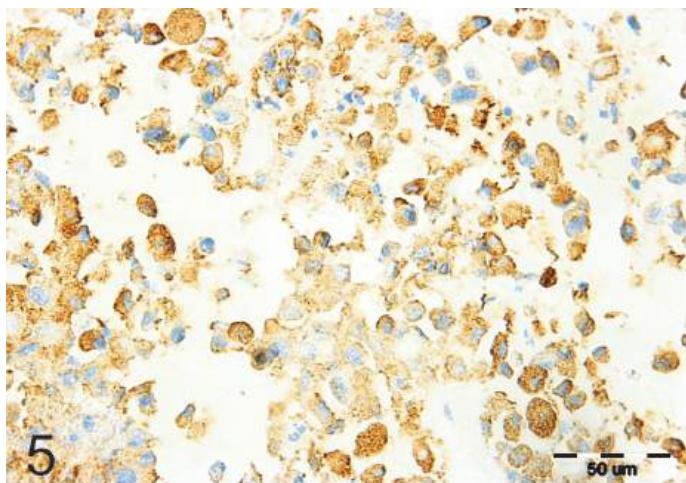


Fig. 5. Adrenal gland, dog. Positive neoplastic cells show cytoplasmic granular staining pattern. CGA immunostaining

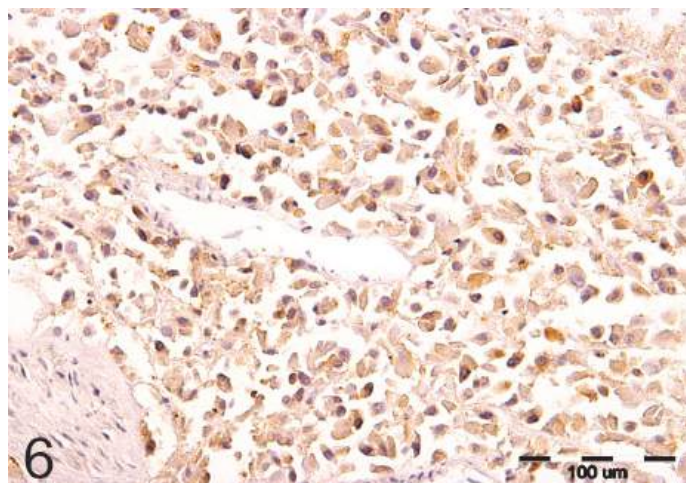


Fig. 6. Adrenal gland, dog. Neoplastic cells show positive moderate to strong cytoplasmic expression. NSE immunostaining

cytoplasm and 2-3 indistinct nucleoli. Some nuclei were divided, resembling “coffee beans”, which gave an image of a double nucleus. The chromatin in the nuclei was condensed or stippled. Mitotic figures were not frequent and ranged from 0 to 2 per 400 × magnification (Fig. 1).

The mallory trichrome method showed the presence of collagen fibers surrounding neoplastic cells (Fig. 2). They were also seen in tumor parenchyma as small clusters. Silver impregnation showed abundant reticulin fibers which divided neoplastic cells into medium-sized nests (Fig. 3).

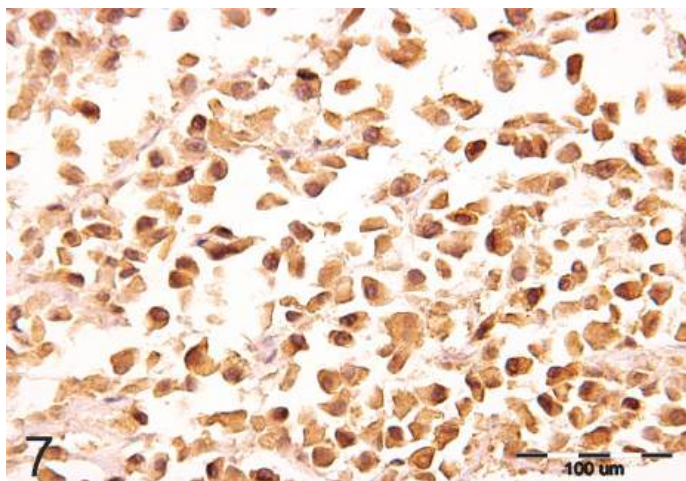


Fig. 7. Adrenal gland, dog. Neoplastic cells show strong reaction. S100 protein immunostaining

Immunohistochemical examination using NSE (Fig. 6) and S100 protein (Fig. 7) revealed a positive reaction in the cytoplasm of the tumor cells. Immunohistochemical reaction with CGA was also positive and was seen as a granular staining pattern in the cytoplasm of all populations of neoplastic cells (Fig. 5). PCNA positive cells were located near fibrous tissue (Fig. 8). The PCNA index was 17%. The neoplastic cells were negative for Ki67 (Fig. 4). Malignant pheochromocytoma was diagnosed on the basis of the histological and immunohistochemical examination findings.

Pheochromocytoma is a tumor of chromaffin cells of the adrenal gland medulla (7, 9). The diagnosis of the tumor during life is difficult due to a variety of clinical symptoms (6, 8). Some authors suggest that clinical signs such as weakness, episodic collapse, tachypnoea, panting, tachycardia, pacing, polyuria, polydipsia, hypertension, vomiting and diarrhea have prognostic value (6). However, these symptoms are non-specific and therefore cannot be indicators of the disease. Glison et al. (3) found that in 24 out of 50 dogs (48%), none developed any clinical signs during pheochromocytoma and tumors were usually diagnosed accidentally during necropsy or surgery. When the clinical signs occurred, they were related to nervous system (27%), circulatory and respiratory distress (17%) or were linked to many systems, which was probably connected with the relatively long period of the tumor presence/growth. The current diagnosis was based mostly on the histopathology of adrenal tissue after adrenalectomy or necropsy. In humans, detection of increased concentrations of catecholamines and their breakdown products, such as metanephrine (MN) and normetanephrine (NMN) in urine or plasma, is a standard test for pheochromocytoma diagnosis. Unfortunately, this test is rarely performed in animals. Measurement of the urinary NMN-to-creatinine ratio has been shown to be significantly increased in dogs with pheochromocytoma compared to dogs with hyperadrenocorticism or healthy animals (4). Symptoms

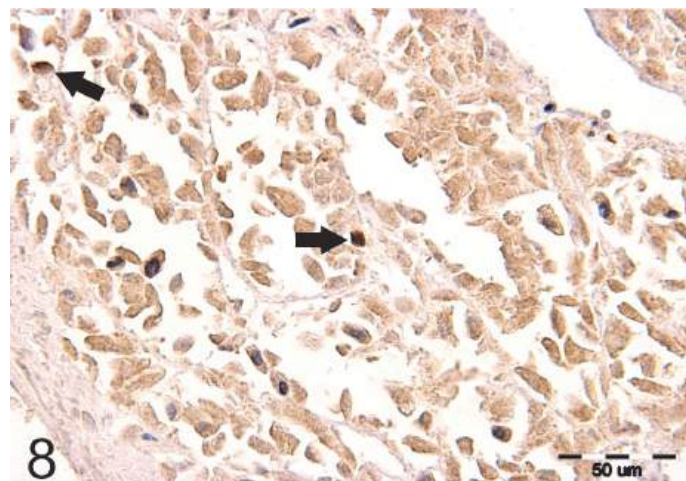


Fig. 8. Adrenal gland, dog. A small percentage of the tumor nucleus showed PCNA expression. PCNA immunostaining

found during clinical examination are non-specific and cannot be used to diagnose adrenal gland tumor. Pheochromocytomas may be associated with clinical signs as a result of continuous or episodic secretion of the catecholamines. Evaluation of blood pressure induced by the sudden release of catecholamines can precipitate acute congestive heart failure, pulmonary edema, myocardial infarction, ventricular fibrillation and cerebral hemorrhage (13).

Glison et al. (3) also showed that malignant pheochromocytoma with local invasion was present in 26 out of 50 dogs (52%), with metastasis to a regional lymph node in 6 out of 50 dogs (12%) and distant metastasis in 12 out of 50 dogs (24%). The tumor was the main cause of death in 19 out of 50 dogs (38%) (3). In our study no local or distant metastases were diagnosed.

Morphology of pheochromocytoma cells is not very characteristic. According to the WHO classification, cellular and nuclear pleomorphism of neoplastic cells and diffuse areas of necrosis are criteria of tumor malignancy (5), as was confirmed in our study. An immunohistochemistry examination, particularly the presence of a positive CGA reaction in the cytoplasm of neoplastic cells, confirmed the chromaffin cell origin, which was consistent with the results of other studies (1, 5, 9, 10, 13). Some authors also suggest that the presence of spindle CGA-positive cells is linked to malignant behavior (12, 15). In our case, spindle cells were CGA-positive. No metastases were noted in the presented case, which may indicate benign tumor behavior. However, many studies have confirmed that malignant pheochromocytoma can grow at the origin site without any signs of the metastases (1, 3). On the other hand, some authors have accepted the thesis that the only absolute criterion of tumor malignancy is the presence of distant metastases (9). The Ki67 index is not a reliable indicator of malignancy in malignant pheochromocytoma. In the presented case it was absent, which was also confirmed by other authors (12, 15). The PCNA index in malignant pheochromocytoma

varies. Pace et al. have shown that the proliferation index in rat malignant tumors differ from 11% to 61% (11).

Silver impregnation showed plenty of reticulin fibers, which divided the neoplastic cells into groups. This phenomenon is called the Zellballen growth pattern (7). The presence of numerous collagen fibers and connective tissue around neoplastic cells usually prevents the formation of distant metastases, as occurred in our case.

On the basis of tumor morphology (strong cellular polymorphism, confluent areas of necrosis, high anisocytosis and anisokaryosis) and positive immunoreactivity of the neoplastic cells with CGA, NSE, and S100 proteins, malignant pheochromocytoma was diagnosed, despite the low mitotic activity and the absence of metastases. In conclusion, due to the specific biology of the tumor, future studies should be focused on finding specific and reliable methods to differentiate benign and malignant pheochromocytoma.

References

1. Barthez P. Y., Marks S. L., Woo J., Feldman E. C., Matteucci M.: Pheochromocytoma in dogs: 61 cases (1984-1995). *J. Vet. Intern. Med.* 1997, 11, 272-278.
2. Chatzizisis Y. S., Ziakas A., Feloukidis C., Paramythiotis D., Hadjimiltiades S., Iliadis A., Basdanis G., Styliadis I.: Pheochromocytoma crisis presenting with cardiogenic shock. *Herz.* 2013, DOI 10.1007/s00059-013-3778-2.
3. Gilson S. D., Withrow S. J., Wheeler S. L., Twedt D. C.: Pheochromocytoma in 50 dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 1994, 8, 228-232.
4. Gostelow R., Bridger N., Syme H. M.: Plasma-free metanephrine and free normetanephrine measurement for the diagnosis of pheochromocytoma in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 2009, 27, 83-90.
5. Kiupel M., Capen C., Miller M., Smedly R.: Tumors of the adrenal medulla, [in]: Schulman F. Y. (ed.): *Histological classification of the tumor of the endocrine system of domestic animals*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C. 2008, 46-47.
6. Kook P. H., Boretti F. S., Hersberger M., Glaus T. M., Reusch C. E.: Urinary catecholamine and metanephrine to creatinine ratios in healthy dogs at home and a hospital environmental and in 2 dogs with pheochromocytoma. *J. Vet. Intern. Med.* 2007, 21, 388-393.
7. Lee J. H., Lee S. S., Lee J. C., Kim M. S., Choi J. H.: Functional mediastinal pheochromocytoma. *Korean J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2013, 46, 88-91.
8. Loste A., Borobia M., Lacasta D., Carbonell M., Basurco A., Marca M. C.: Adrenal gland tumors. Different clinical presentations in three dogs: a case report. *Veterinarni Medicina*. 2013, 58, 377-384.
9. McNicol A. M.: Histopathology and immunohistochemistry of adrenal medullary tumors and paragangliomas. *Endocr. Pathol.* 2006, 17, 329-336.
10. Miller A. D., Masek-Hammerman K., Dalecki K., Mansfield K. G., Westmoreland S. V.: Histologic and immunohistochemical characterization of pheochromocytoma in 6 cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). *Vet. Pathol.* 2009, 46, 1221-1229.
11. Pace V., Perentes E., Germann P. G.: Pheochromocytomas and ganglioneuromas in aging rats: morphological and immunohistochemical characterization. *Toxicol. Pathol.* 2002, 30, 492-500.
12. Portela-Gomes G. M., Stridsberg M., Grimelius L., Falkmer U. G., Falkmer S.: Expression of chromogranins A, B, and C (secretogranin II) in human adrenal medulla and in benign and malignant pheochromocytomas. An immunohistochemical study with region-specific antibodies. *APMIS*. 2004, 112, 663-673.
13. Sato T., Kitamura N., Kagawa Y., Hirayama K., Morita M., Kurosawa T., Yoshino T., Taniyama H.: Immunohistochemical evaluation of malignant pheochromocytomas in a wolfdog. *Vet. Pathol.* 2001, 38, 447-450.
14. Tischler A. S., Powers J. F., Alroy J.: Animal models of pheochromocytoma. *Histol. Histopathol.* 2004, 19, 883-895.
15. Thompson L. D. R.: Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score (PASS) to separate Benign from malignant neoplasms. *Am. J. Surg. Pathol.* 2002, 26, 551-566.
16. Yoshimasa T., Nakao K., Ohtsuki H., Li S., Imura H.: Methionine-enkephalin and leucine-enkephalin in human sympathoadrenal system and pheochromocytoma. *J. Clin. Invest.* 1982, 69, 643-650.

Corresponding author: Veterinary Dr Mateusz Mikiewicz, Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn, Poland; e-mail: mateusz.mikiewicz@uwm.edu.pl

Oświadczenie

Niniejszym oświadczamy, że wkład autorów w publikacji:

Mikiewicz Mateusz, Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Mikołajczyk Anna, Blacha Agnieszka. Immunohistochemical evaluation of canine and feline Merkel cell tumors - a report of two cases. Turk J Vet Anim Sci. 2016;40:124-129. DOI: 10.3906/vet-1505-65.

Był następujący:

Mateusz Mikiewicz – opracowanie koncepcji badań, metodyki, zaplanowanie i wykonanie analiz laboratoryjnych, opracowanie i interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, przygotowaniu manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na recenzję.

Iwona Otrocka-Domagała – diagnostyka zmian, pomoc w interpretacji i opracowaniu wyników oraz pomoc przy przygotowaniu manuskryptu.

Katarzyna Paździor-Czapula – korekta językowa manuskryptu, pomoc w wykonaniu barwienia immunohistochemicznego.

Michał Gesek – przygotowanie mikrofotografii.

Anna Mikołajczyk – pomoc techniczna przy przygotowaniu preparatów do barwienia.

Agnieszka Blacha – pomoc przy barwieniu preparatów.

Dr wet. Mateusz Mikiewicz *Mateusz Mikiewicz*

Dr hab. Iwona Otrocka-Domagała. Prof. UWM *Iwona Otrocka-Domagała*

Dr n. wet. Katarzyna Paździor-Czapula *Katarzyna Paździor-Czapula*

Dr hab. Michał Gesek, Prof. UWM *Michał Gesek*

Dr n. wet. Anna Mikołajczyk *Anna Mikołajczyk*

Lek. wet. Agnieszka Blacha

Immunohistochemical evaluation of canine and feline Merkel cell tumors—a report of two cases

Mateusz MIKIEWICZ*, Iwona OTROCKA-DOMAGALA, Katarzyna PAZDZIOR-CZAPULA,

Michał GESEK, Anna MIKOLAJCZYK, Agnieszka BLACHA

Department of Pathological Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Olsztyn, Poland

Received: 20.05.2015 • Accepted/Published Online: 17.08.2015 • Final Version: 05.01.2016

Abstract: Merkel cell tumors, a type of cutaneous round-cell tumors, are rarely observed in dogs and cats. This tumor type originates from cutaneous neuroendocrine cells. In the present study, the morphology of canine and feline Merkel cell tumors and their immunoexpression of neuron-specific enolase, cytokeratin, chromogranin A, Ki67, and metallothionein were evaluated using histopathological and immunohistochemical methods. The canine Merkel cell tumor displayed a diffuse morphological pattern, whereas the feline tumor displayed a solid morphological pattern. Both tumors were positive for neuron-specific enolase and cytokeratin, but negative for chromogranin A. The Ki67 indexes in the canine and feline tumors were 7% and 25%, respectively. The expression of metallothionein was minimal in both tumors. In conclusion, this paper describes the detailed histopathological and immunohistochemical features of uncommon canine and feline Merkel cell tumors, including metallothionein expression, which has never been studied in such tumors previously.

Key words: Merkel cell tumor, dog, cat, immunohistochemistry

1. Introduction

Merkel cell tumors (MCTs) are a rare neuroendocrine neoplasm. This tumor type arises from Merkel cells of the skin, the origin of which is not fully understood. There are hypotheses that suggest a crest or epidermal origin (1–3). It is hypothesized that these cells have somatosensory, chemosensory, secretory, trophic, or inductive functions in the development of peripheral nerves and epidermal structures (2). Tumors arising from Merkel cells can be benign or malignant. In humans, MCTs are a form of the highly aggressive Merkel cell carcinoma (MCC) and are classified into 3 subtypes: trabecular (classic pattern), intermediate (solid pattern), and small cell (diffuse pattern) (1). MCTs are rarely diagnosed in dogs and cats; therefore, little is known about MCT pathogenesis, breed predilections, and etiology in these species. Canine MCTs are considered to be a benign neoplasm (3,4), whereas feline MCTs are considered to be malignant, similar to their human equivalent (4). The tumor is usually in the form of an intradermal, unencapsulated mass extending into the subcutis. The neoplastic cells are round, resembling other cutaneous round-cell tumors such as plasmacytoma, mast-cell tumors, histiocytoma, transmissible venereal tumors, balloon-cell melanoma, and nonepitheliotropic lymphoma.

Epidermal and adnexal invasions are not observed (3). Due to the nonspecific morphology and rarity of MCTs in dogs and cats, these tumors are often misdiagnosed by routine hematoxylin and eosin (H&E) staining. Therefore, additional immunohistochemical experiments should be conducted to properly diagnose MCTs (3). The neoplastic cells of MCTs in animals and MCC in humans typically express neuroendocrine markers, such as neuron-specific enolase (NSE), chromogranin A (CGA), synaptophysin (SYP), protein gene product 9.5 (PGP 9.5), substance P (SP), vasoactive intestinal polypeptide (VIP), insulin, gastrin, and epithelial marker cytokeratin (AE1/AE3) (3–6). However, CGA expression is occasionally absent in MCC (4).

The metallothioneins (MTs) are a family of cysteine-rich proteins located in the cytoplasm and nucleus during the S phase of the cell cycle (7). The key functions of these proteins are neutralization of free radicals, immunomodulation, and apoptosis inhibition. There are 2 forms of MTs, varying by metal occupancy: metal-free (apo-MT) and metal-bound (holo-MT) (8). Holo-MT has anticarcinogenic activity because it protects DNA from damaging agents, whereas apo-MT is correlated with tumor growth and progression. The interaction of apo-

* Correspondence: mateusz.mikiewicz@uwm.edu.pl

MT sulfhydryl groups with p53 leads to p53 inactivation and initiation of neoplastic cell proliferation (9,10). Overexpression of MT in human tumors, and particularly in breast, ovarian, uterine, and prostate carcinomas, is related to high proliferative activity of neoplastic cells and to therapeutic resistance. However, downregulation of MT expression in hepatocellular carcinomas is associated with poor prognosis (11). In certain tumors, i.e. primary pulmonary carcinoma, MT expression is positively correlated with the expression of the cellular proliferation marker Ki67 (12,13). In dogs, the expression of MT has been studied in apocrine gland tumors, mammary gland tumors, melanotic tumors, and primary pulmonary carcinomas. In cats, studies have been limited to melanotic tumors and primary pulmonary carcinomas. The expression of MT in both MCTs and human MCC has not been previously evaluated.

The aim of the present study was to examine the immunoreexpression of NSE, CGA, AE1/AE3, MT, and Ki67 in 2 cases of MCTs (canine and feline).

2. Case history

The tumors in both species presented as an intradermal mass located in the buccal area. The canine tumor was obtained from a 5-year-old intact mongrel bitch, and the feline tumor was obtained from a 13-year-old neutered European shorthair male. Both tumors were surgically excised, sampled, immediately fixed in 10% buffered formalin, and routinely processed. Histological diagnosis was based on H&E and Mallory trichrome staining (staining kits from Bio-Optica, Milan, Italy). Sections destined for immunohistochemistry underwent antigen retrieval before staining. The immunohistochemical examination was performed using primary antibodies, visualization systems, and a chromogen, as summarized in the Table. The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin. As positive controls, both canine and

feline tissue sections were processed together with the evaluated slides (NSE–brain cortex; CGA–gastric mucosa; AE1/AE3–skin; MT–mammary gland; Ki67–tonsil). As negative controls, the primary antibody was either replaced with mouse IgG2a (DAKO, Glostrup, Denmark) at the appropriate dilution (for NSE, Ki67, MT, and AE1/AE3) or omitted (for CGA). Brown precipitate was regarded as an indicator of a positive reaction. The slides were evaluated by light microscopy (BX52, Olympus, Tokyo, Japan) using Cell^B (Olympus) software. The immunoreactivities of NSE, CGA, AE1/AE3, and MT were evaluated using digital microphotography and were described as absent (–), minimal (10%–30%), moderate (30%–70%), or high (70%–100%) in a high-power field (HPF) (400×). The mitotic figures were counted in 10 randomly chosen areas of each slide (HPF 400×). Ki67 immunoreexpression was evaluated quantitatively in 10 randomly chosen areas of each slide (HPF 400×). The Ki67 index was expressed as a percentage of positively stained cells.

3. Results and discussion

In the dog, the tumor was unencapsulated, located in a deep area of the skin, and did not exhibit invasion into the skin or the adnexal structures. The cells were small (Figure 1) and surrounded by thick fibrovascular stroma, as confirmed by Mallory trichrome staining (inset of Figure 1). The nuclei were hyperchromatic, with an average of 7 per 10 HPFs of mitotic figures (400×). The cytoplasm was eosinophilic and sparse. The neoplastic cells had positive, high (approximately 80% of the neoplastic cells) intracytoplasmic granular or diffuse expression of NSE (Figure 2) and high (90% of the neoplastic cells) perinuclear expression of AE1/AE3 (Figure 3). CGA expression was absent (Figure 4). Cytoplasmic and membranous MT expression was minimal (approximately 15% of the cells) (Figure 5). The Ki67 index was 7% (Figure 6).

Table. Primary antibodies used for the particular methods of antigen retrieval and visualization.

Primary antibody	Clone	Dilution	Source	Antigen retrieval	Visualization system
Neuron-specific enolase (NSE)	Monoclonal mouse antihuman BBS/NC/VI-H14	1:100	DAKO, Denmark	2 × 5 min* TrisEDTA buffer pH 9	EnVision + System-HRP, Mouse (DAB)‡
Cytokeratin (AE1/AE3)	Monoclonal mouse antihuman AE1/AE3	1:50	DAKO, Denmark	2 × 5 min* TrisEDTA buffer pH 9	EnVision + System-HRP, Mouse (DAB)‡
Metallothionein (MT)	Monoclonal mouse antimetallothionein clone E9	1:50	DAKO, Denmark	2 × 5 min* TrisEDTA buffer pH 9	EnVision + System-HRP, Mouse (DAB)‡
Chromogranin A (CGA)	Polyclonal rabbit antihuman	Ready-to-use	DAKO, Denmark	2 × 5 min* TrisEDTA buffer pH 9	Impress Universal Reagent Anti-Mouse/Rabbit Ig Peroxidase§
Ki67	Monoclonal mouse antihuman MIB-1	1:75	DAKO, Denmark	2 × 5 min* TrisEDTA buffer pH 9	EnVision + System-HRP, Mouse (DAB)‡

*Antigen retrieval was conducted in a microwave oven at 650 W; ‡DAKO, Glostrup, Denmark; §Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA.

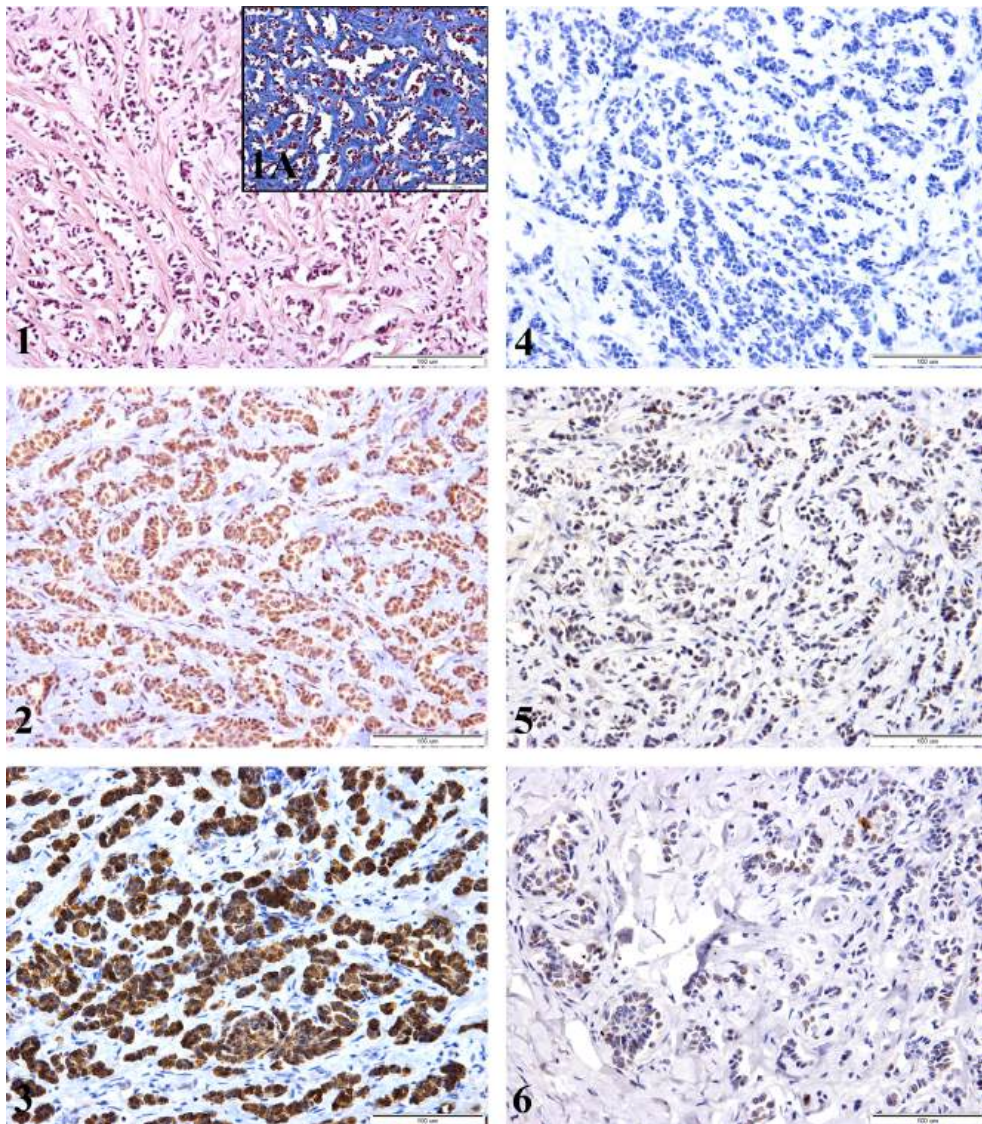


Figure 1. Merkel cell tumor in dog skin. Clusters of small neoplastic cells surrounded by abundant fibrovascular stroma – small cell subtype (H&E). Inset: Collagen fibers surrounding clusters of neoplastic cells (Mallory trichrome).

Figure 2. Merkel cell tumor in dog skin. Positive immunolabeling of neoplastic cells to NSE, DAB.

Figure 3. Merkel cell tumor in dog skin. Positive immunolabeling of neoplastic cells to AE1/AE3, DAB.

Figure 4. Merkel cell tumor in dog skin. No CGA expression in neoplastic cells, DAB.

Figure 5. Merkel cell tumor in dog skin. Cytoplasmic and membranous expression of MT in neoplastic cells, DAB.

Figure 6. Merkel cell tumor in dog skin. Expression of Ki67 in neoplastic cells, DAB.

In the cat, the tumor was unencapsulated, located in a deep area of the skin, and did not show epidermal or follicular invasion. The tumor was composed of monomorphic round cells that were arranged in sheets (Figure 7) and separated by delicate fibrovascular stroma (confirmed by Mallory trichrome staining, inset of Figure 7). The centrally located nuclei were round to oval in shape, with evenly dispersed chromatin and a sharply defined nuclear membrane. The number of mitotic figures was 56 per 10 HPFs (400×).

The cytoplasm was pale, eosinophilic, and moderate. The neoplastic cells showed high (approximately 90% of the neoplastic cells) cytoplasmic granular or diffuse expression of NSE (Figure 8), high (approximately 90% of the neoplastic cells) cytoplasmic perinuclear expression of AE1/AE3 (Figure 9), and no CGA expression (Figure 10). Cytoplasmic and nuclear expression of MT (Figure 11) was minimal and was observed in approximately 30% of the neoplastic cells. The Ki67 index was 25% (Figure 12).

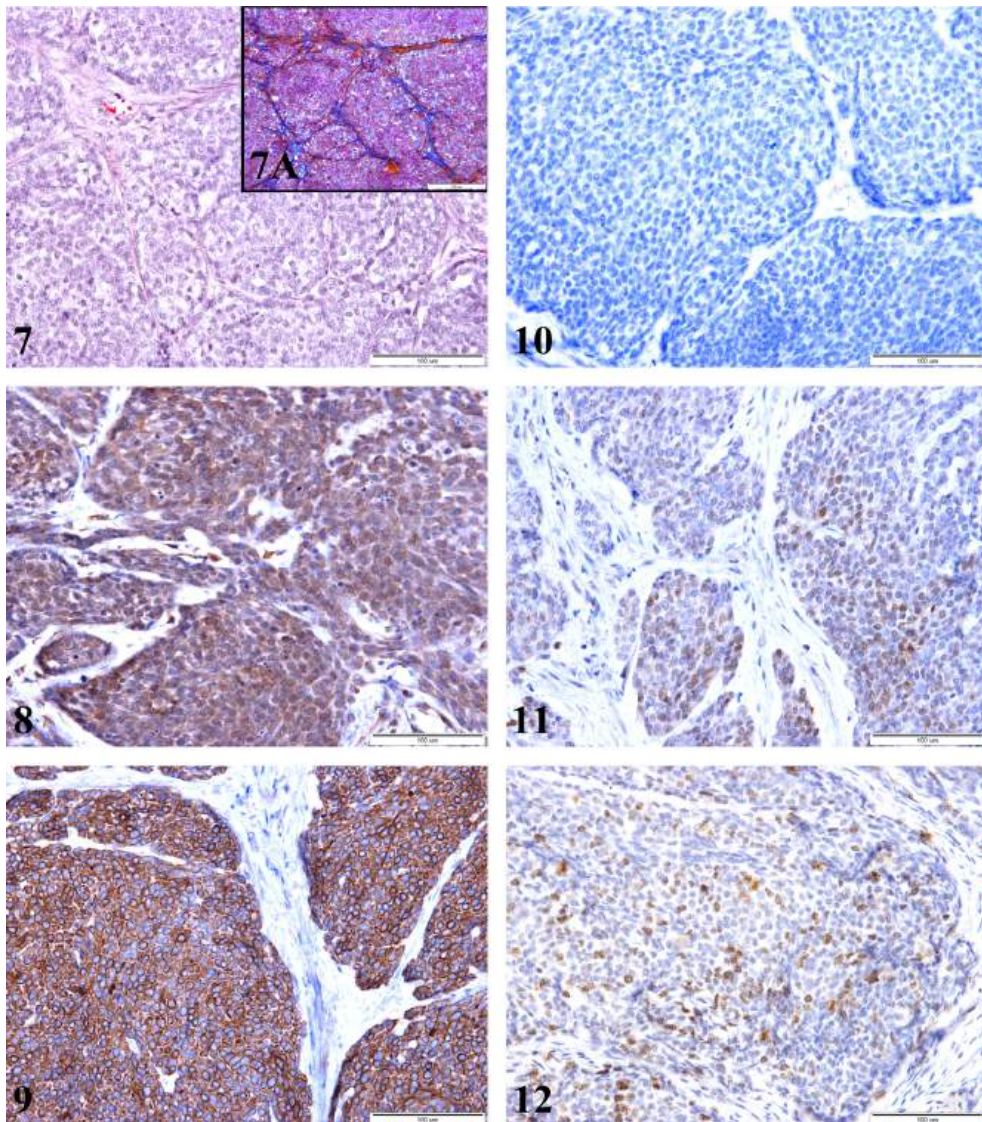


Figure 7. Merkel cell tumor in cat skin. Round neoplastic cells divided by thin fibrovascular stroma – intermediate subtype (HE). Inset: Delicate collagen fibers surrounding packets of neoplastic cells (Mallory trichrome).

Figure 8. Merkel cell tumor in cat skin. Positive immunolabeling of neoplastic cells to NSE, DAB.

Figure 9. Merkel cell tumor in cat skin. Positive immunolabeling of neoplastic cells to AE1/AE3, DAB.

Figure 10. Merkel cell tumor in cat skin. No CGA expression in neoplastic cells, DAB.

Figure 11. Merkel cell tumor in cat skin. Cytoplasmic and nuclear expression of MT in neoplastic cells, DAB.

Figure 12. Merkel cell tumor in cat skin. Expression of Ki67 in neoplastic cells, DAB.

The results of the present study suggest that canine MCTs correspond to the diffuse pattern (small-cell subtype) of human MCC, whereas feline MCTs correspond to the solid pattern (intermediate subtype). In both cases, the immunoreactivities of the neoplastic cells indicated positivity for NSE and AE1/AE3, which suggests a neuroectodermal origin of the cells. Similar immunolabeling was also observed by other authors (4–

6,14,15). In the present study, the neoplastic cells were CGA negative in both the canine and the feline MCTs, which corresponds to CGA-negative cases of human MCC (15).

Both the canine and the feline MCTs had minimal MT expression. In human large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung, the expression of MT is also minimal or even absent (16). A complete lack of MT

expression is associated with amplified spontaneous and mutagenic DNA damage (10). High MT expression in canine apocrine gland tumors as well as in canine and feline melanomas is positively associated with tumor grade. Similar associations have been observed in many human tumors, e.g., cutaneous melanoma, adenoid cystic carcinoma of the salivary gland, and breast carcinoma (i.e. invasive carcinoma of no special type, invasive lobular carcinoma, tubular carcinoma, cribriform carcinoma, mucinous carcinoma, carcinoma with medullary features, and invasive papillary carcinoma) (9). However, only 25% of canine cutaneous melanomas and only 6% of feline cutaneous melanomas show expression of MT (10). Given that holo-MT protects DNA from damage and that apo-MT is related to tumor growth and progression, future research on the role of both MT forms in the pathogenesis of canine and feline MCTs will be necessary (9,10).

Mitotic activity and the Ki67 index were low in the canine MCT, whereas in the feline MCT mitotic activity was high and the Ki67 index was moderate. High mitotic activity and a high Ki67 index are indicative of malignancy

in many cutaneous neoplasms (17,18). In neuroendocrine tumors, the Ki67 and mitotic indexes have been considered to be malignancy indicators, although Ki67 is a more precise malignancy marker (19). These results suggest that the growth and progression of the evaluated feline MCT were probably more dynamic than those of the evaluated canine MCT. However, mitotic activity or the Ki67 index alone is not sufficient to determine the malignancy of a tumor. The major malignancy criterion is the metastatic potential of the neoplastic cells (20). Unfortunately, follow-up information was not available in the present study.

In this report, the histopathological and immunohistochemical findings of unusual MCTs were described in a dog and a cat. In the presented cases, the canine and feline MCTs showed high NSE and AE1/AE3 expression, indicating neuroectodermal origin. The lack of CGA expression in both evaluated tumors suggests that this marker cannot be used as a diagnostic marker in canine and feline MCTs. To the best of our knowledge, this is the first immunohistochemical study to evaluate MT expression in canine and feline MCTs.

References

- Lowell DL, Roberts J, Gogate P, Goodwin R. Merkel cell carcinoma: case study and literature review. *J Foot Ankle Surg* 2014; 53: 219–225.
- Munde PB, Khandekar SP, Dive AM, Sharma A. Pathophysiology of Merkel cell. *J Oral Maxillofac Pathol* 2013; 17: 408–412.
- Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. *Skin Diseases of the Dog and Cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis*. 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing; 2005.
- Bagnasco G, Properzi R, Porto R, Nardini V, Poli A, Abramo F. Feline cutaneous neuroendocrine carcinoma (Merkel cell tumour): clinical and pathological findings. *Vet Dermatol* 2003; 14: 111–115.
- Joiner KS, Smith AN, Henderson RA, Brawner WR, Spangler EA, Sartin EA. Multicentric cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma in a dog. *Vet Pathol* 2010; 47: 1090–1094.
- Konno A, Nagata M, Nanko H. Immunohistochemical diagnosis of a Merkel cell tumor in a dog. *Vet Pathol* 1998; 35: 538–540.
- Cherian MG, Apostolova MD. Nuclear localization of metallothionein during cell proliferation and differentiation. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2000; 46: 347–356.
- Pattanaik A, Shaw CF 3rd, Petering DH, Garvey J, Kraker AJ. Basal metallothionein in tumors: widespread presence of apoprotein. *J Inorg Biochem* 1994; 54: 91–105.
- Martano M, Carella F, Squillacioti C, Restucci B, Mazzotta M, Lo Muzio L, Maiolino P. Metallothionein expression in canine cutaneous apocrine gland tumors. *Anticancer Res* 2012; 32: 747–752.
- Dincer Z, Jasani B, Haywood S, Mullins JE, Fuentealba IC. Metallothionein expression in canine and feline mammary and melanotic tumours. *J Comp Pathol* 2001; 125: 130–136.
- Gumulec J, Raudenska M, Adam V, Kizek R, Masarik M. Metallothionein – immunohistochemical cancer biomarker: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9: e85346.
- Werynska B, Pula B, Muszczynska-Bernhard B, Piotrowska A, Jethon A, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, Jankowska R. Correlation between expression of metallothionein and expression of Ki-67 and MCM-2 proliferation markers in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2011; 31: 2833–2839.
- Kim JS, Jung J, Lee HJ, Kim JC, Wang H, Kim SH, Shin T, Moon C. Differences in immunoreactivities of Ki-67 and doublecortin in the adult hippocampus in three strains of mice. *Acta Histochem* 2009; 111: 150–156.
- Gil da Costa RM, Rema A, Pires MA, Gärtner F. Two canine Merkel cell tumours: immunoexpression of c-KIT, E-cadherin, beta-catenin and S100 protein. *Vet Dermatol* 2010; 21: 198–201.
- Jirásek T, Matej R, Pock L, Knotková I, Mandys V. Merkel cell carcinoma--immunohistochemical study in a group of 11 patients. *Cesk Patol* 2009; 45: 9–13.
- Okada D, Kawamoto M, Koizumi K, Tanaka S, Fukuda Y. Immunohistochemical study of the expression of drug-resistant proteins in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung. *Jpn J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 51: 272–276.
- Sabattini S, Bassi P, Bettini G. Histopathological findings and proliferative activity of canine sebaceous gland tumours with a predominant reserve cell population. *J Comp Pathol* 2015; 152: 145–152.

18. Kramer E, Herman O, Frand J, Leibou L, Schreiber L, Vaknine H. Ki67 as a biologic marker of basal cell carcinoma: a retrospective study. *Isr Med Assoc J* 2014; 16: 229–232.
19. Lowe K, Khithani A, Liu E, Winston T, Christian D, Saad J, Jeyarajah DR. Ki-67 labeling: a more sensitive indicator of malignant phenotype than mitotic count or tumor size? *J Surg Oncol* 2012; 106: 724–727.
20. Kusewitt DF. Neoplasia and tumor biology. In: Zachary JF, McGavin MD, editors. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 5th ed. St. Louis, MO, USA: Mosby Elsevier; 2012. pp. 289–320.

Oświadczenie

Niniejszym oświadczamy, że wkład autorów w publikacji:

Mikiewicz Mateusz, Otrocka-Domagala Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał.
Morphology and immunoreactivity of canine and feline extramedullary plasmacytomas. Pol. J.
Vet. Sci. 2016;19:345-352. DOI: 10.1515/pjvs-2016-0042.

Był następujący:

Mateusz Mikiewicz – opracowanie koncepcji badań, metodyki, zaplanowanie i wykonanie analiz laboratoryjnych, opracowanie i interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na recenzję.

Iwona Otrocka-Domagala – pomoc merytoryczna w opracowaniu manuskryptu, korekta językowa.

Katarzyna Paździor-Czapula – korekta językowa manuskryptu, pomoc w wykonaniu barwienia immunohistochemicznego.

Michał Gesek – przygotowanie mikrofotografii.

Dr wet. Mateusz Mikiewicz *Mateusz Mikiewicz*

Dr hab. Iwona Otrocka-Domagala. Prof. UWM *Iwona Otrocka-Domagala*

Dr n. wet. Katarzyna Paździor-Czapula *Katarzyna Paździor-Czapula*

Dr hab. Michał Gesek, Prof. UWM *Michał Gesek*

DOI 10.1515/pjvs-2016-0042

Original article

Morphology and immunoreactivity of canine and feline extramedullary plasmacytomas

M. Mikiewicz, I. Otrocka-Domagala, K. Paździor-Czapula, M. Gesek

Department of Pathological Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine,
University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn, Poland

Abstract

The aim of the study was the evaluation of morphology and immunophenotype of canine (19 cases) and feline (7 cases) extramedullary plasmacytomas. Tumours, located in skin, oral cavity and spleen were surgically excised, fixed and processed for histopathology and immunohistochemistry (CD79 α , CD18, proliferating cell nuclear antigen, metallothionein). Histologically, tumours were classified into mature, cleaved, asynchronous, polymorphous blastic, hyalin, or monomorphous blastic type. All evaluated tumours showed cytoplasmic expression of CD79 α antigen. The expression of CD18 was observed in canine cutaneous and splenic tumours. In canine tumours expression of metallothionein was low to moderate, while in feline plasmacytomas – absent or low. In canine tumours, the mitotic index and proliferating cell nuclear antigen index were positively correlated with the expression of metallothionein. In feline tumours no correlation between mitotic index, proliferating cell nuclear antigen and metallothionein was found. This is the first study describing expression of metallothionein in canine and feline extramedullary plasmacytoma.

Key words: plasma cell tumour, metallothionein, dog, cat, immunohistochemistry

Introduction

According to the classification of the World Health Organization, plasma cell tumour is the neoplasm arising from mature B-cells, producing immunoglobulin (Ig) (Valli et al. 2002). Canine and feline plasma cell tumours can be divided into: multiple myeloma (MM) and solitary plasmacytoma with solitary osseous plasmacytoma and extramedullary plasmacytoma (EMP) subtypes. Cutaneous EMP, together with canine cutaneous histiocytoma, neuroendocrine tumours, transmissible venereal tumour, mast

cell tumours, and cutaneous lymphoplasmocytic lymphoma are included in the group of round cell tumours. Due to its nonspecific morphology, EMP is often misdiagnosed, therefore immunohistochemistry is necessary for definitive diagnosis (Morton et al. 1986, Baer et al. 1989, Ramos-Vara et al. 2007). Tumour cells express CD79 α , a transmembrane protein which is a part of B-cell antigen receptor (BCR). This protein is specific to B lymphocytes and plasma cells (Schrenzel et al. 1998, Ramos-Vara et al. 2007). Due to antibodies production, detection of the lambda chain subunit of immunoglobulin is a useful diagnos-

tic tool (Rowland and Linke 1994, Majzoub et al. 2003). Neoplastic plasma cells can also express CD18 antigen (Ramos-Vara et al. 2007).

EMP is uncommon neoplasm in dogs and cats (Baer et al. 1989, Adelman et al. 2014), and occurs especially in old animals (Rannou et al. 2009). The predisposed locations in dogs are pinnae, digits, and oral cavity (Van Wettere et al. 2009, Gupta et al. 2014). In dogs, malignancy of the neoplasm depends on the primary lesion localization. Cutaneous and oral cavity EMPs have more benign behavior than EMPs localized elsewhere (Borgatti 2010, Gupta et al. 2014). In cats, European Short-Haired breed is predisposed to EMP (Majzoub et al. 2003, Borgatti 2010). EMP in cats mostly arises in the gastrointestinal tract, especially rectal mucosa, sometimes tumour can be found in the esophagus, lungs, spleen, kidney, retroperitoneal space, orbit, and brain (Majzoub et al. 2003, Borgatti 2010). The previous studies revealed that the feline EMPs are mostly benign. However, the possibility of metastases and recurrence cannot be excluded (Platz et al. 1999, Gupta et al. 2014). In contrast to multiple myeloma, there is no bone and bone marrow involvement in animals (Gupta et al. 2014).

Metallothioneins (MTs) are members of a family of cysteine-rich proteins, located in cytoplasm and during S phase also in the nucleus. Key functions of these proteins are free radicals neutralization, immunomodulation, and apoptosis inhibition. The metal-bound MT shields DNA from damaging agents. The metal-free MT interacts with the tumour suppressor protein p53, leading to its inactivation, followed by increased cellular proliferation (Dincer et al. 2001, Martano et al. 2012). The studies of MT expression have been limited to canine apocrine gland tumours, mammary gland tumours, melanocytic tumours, and primary pulmonary carcinomas. In cats, reports concerned only melanocytic tumours, mammary gland tumours, and primary pulmonary carcinomas. In canine apocrine gland tumours high MT expression is correlated with malignancy (Martano et al. 2012). However, in dogs the majority of the benign and malignant mammary tumours also express MT. Interestingly, feline benign mammary tumours are mostly MT-negative, and only 30% of malignant variants of mammary tumours express MT (Dincer et al. 2001).

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a subunit of DNA polymerase delta and its main function is the DNA repair. The high PCNA level can be found in replicating cells during the cell cycle's from late G1 phase to early S phase (Webster et al. 2007). Overexpression of PCNA has been correlated with cellular proliferation in malignant tumours, and its higher value is associated with advanced stage of ma-

lignancy (Alexandrakis et al. 2005, Tsirakis et al. 2011). In canine mast cell tumours PCNA has been shown to be one of the tumour malignancy indicators (Simoes et al. 1994, Webster et al. 2007). The MT expression is positively correlated with PCNA in human benign and malignant laryngeal epithelial tumours (Ioachim et al. 1999). The correlation of MT and PCNA has not been studied in canine and feline EMPs.

The aims of this study were to compare the morphology of canine and feline EMPs and evaluation of CD79, CD18, MT and PCNA expression by neoplastic cells.

Materials and Methods

The study included cutaneous, oral cavity and splenic tumours collected from 19 dogs (mongrels $n=14$, Rottweilers $n=2$, Golden Retriever $n=1$, Beagle $n=1$, Yorkshire Terrier $n=1$) and 7 cats (European Short-Haired $n=7$). Detailed data is summarized in Table 1 and Table 2. The tumours were surgically excised, immediately fixed in 10% neutral formalin, processed routinely and paraffin wax-embedded. Sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) and toluidine blue (to exclude mast cell tumours). The sections for immunohistochemistry were mounted on silanized glass slides, deparaffinized, rehydrated, and exposed to antigen retrieval. The immunohistochemical examination was performed using primary antibodies, visualization system, and 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) as chromogen (Table 3).

The specimens were counterstained with Mayer's haematoxylin. Positive controls for canine and feline tumours separately were processed together with the evaluated slides (CD79 α – tonsil; CD18 – lymph node; MT – mammary gland; PCNA – skin). As negative controls, the primary antibody was replaced with mouse IgG2a (DAKO, Glostrup, Denmark) at the appropriate dilution (MT and PCNA), mouse IgG1 (AbD Serotec, Raleigh, North Carolina, USA) at the appropriate dilution (CD79 α) or omitted (CD18). The slides were evaluated in light microscope BX 52 (Olympus, Japan) using Cell^B (Olympus, Japan) software. The brown precipitate in CD79 α and CD18 immunolabelling was regarded as the positive reaction. The PCNA index was expressed as the percentage of PCNA-positive cells in ten randomly chosen areas of the slide (HPF 400x). The mitotic index has been counted in ten randomly-chosen areas of the slide (HPF 400x). Statistical calculations were performed using Statistica software ver 12.0 (Tulsa, OK, USA). Mean value and standard deviation (SD) was

Table 1. Site of lesion, sex, age, mitoses, and immunohistochemical labeling of tumour cells in 19 dogs with plasma cell tumour.

Site	No. Dogs	Sex (male/female)	Mean age (years and SD)	Mitoses (mean and SD)	CD18	CD79 α	PCNA (mean and SD)	IRS (MT expression)
Skin	11	3/8	10.18 ($\pm$ 2.47)	12.73 $\pm$ 10.02	+	+	40.73 $\pm$ 13.94	0-6
Spleen	5	2/3	11.4 ($\pm$ 3.13)	5.75 $\pm$ 2.5	+	+	25.2 $\pm$ 4.38	1-4
Oral cavity	3	1/2	11.67 ($\pm$ 3.79)	10.67 $\pm$ 6.43	–	+	32.33 $\pm$ 11.37	2-4
Total	19	6/13	10.74 ($\pm$ 2.76)	10.83 $\pm$ 8.57			34.35 $\pm$ 13.21	0-6

Table 2. Site of lesion, sex, age, mitoses, and immunohistochemical labeling of tumour cells in 7 cats with plasma cell tumour.

Site	No. cats	Sex (male/female)	Mean age (years and SD)	Mitoses (mean and SD)	CD18	CD79 α	PCNA (mean and SD)	IRS (MT expression)
Skin	3	2/1	7.17 ($\pm$ 5.30)	11.33 $\pm$ 4.16	ND*	+	28.67 $\pm$ 7.37	0-2
Spleen	1	0/1	13	5	ND*	+	20	2
Oral cavity	3	1/2	8.67 ($\pm$ 4.04)	6.33 $\pm$ 2.08	ND*	+	24.67 $\pm$ 4.93	0
Total	7	3/4	8.64 ($\pm$ 4.64)	8.29 $\pm$ 3.95			25.71 $\pm$ 6.05	0-2

*ND – not done

Table 3. Primary antibodies used with the particular methods of antigen retrieval and visualization.

Primary antibody	Clone	Dilution	Source	Antigen retrieval	Visualization system
CD79 α	Monoclonal mouse anti-human MCA2538	1:100	AbD Serotec, USA	4 x 5min* TrisEDTA buffer pH=9	EnVision + System-HRP, Mouse (DAB)**
CD18	Monoclonal mouse anti-canine CA16.3C10	1:10	P.F. Moore, USA	Proteinase K Ready-to-Use 5 min, DAKO, Denmark	EnVision + System-HRP, Mouse (DAB)**
Metallothionein	Monoclonal mouse anti-metallothionein clone E9	1:50	DAKO, Denmark	2 x 5 min* TrisEDTA buffer pH=9	EnVision + System-HRP, Mouse (DAB)**
PCNA	Monoclonal mouse anti-proliferating cell nuclear antigen clone PC10	1:200	DAKO, Denmark	2 x 5 min* TrisEDTA buffer pH=9	EnVision + System-HRP, Mouse (DAB)**

* antigen retrieval was conducted in a microwave oven, 650Watts.

** Dako, Glostrup, Denmark.

calculated for the mitotic and PCNA index. In order to evaluate the expression of MT a semi-quantitative scale of ImmunoReactive Score (IRS) was applied, in which intensity of colour reaction and positive cells percentage were taken into account (Remmele and

Stegner, 1987). Relationships between mitotic index, IRS, and PCNA index were evaluated using the Spearman rank correlation analysis (r: Spearman rank correlation coefficient). The correlations were considered statistically significant when $p < 0.05$.

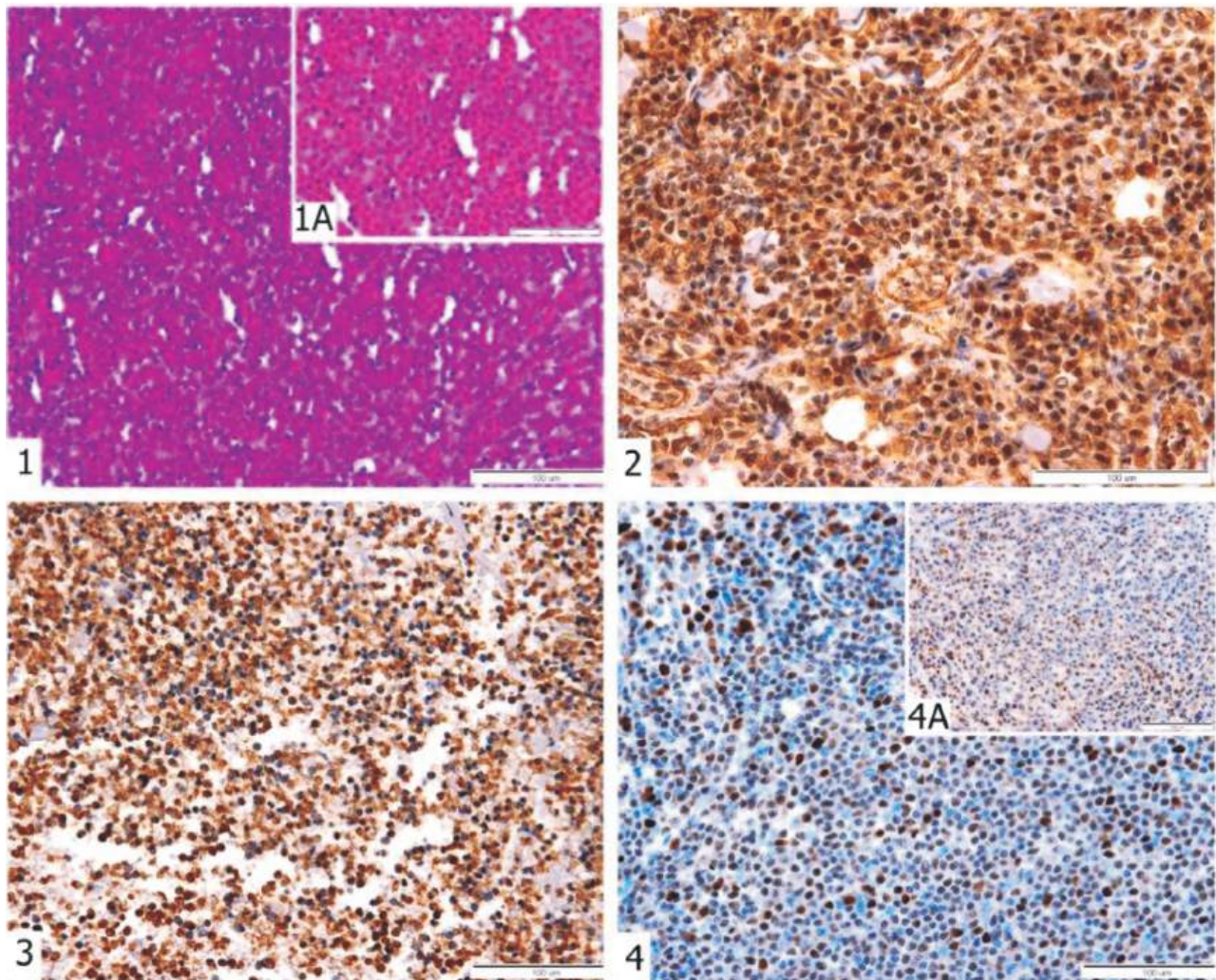


Fig. 1. EMP mature type, spleen. Dog. Round to oval cells with round to oval, eccentrically located nuclei are present. HE. Fig. 1A EMP mature type, spleen. Dog. Magnification x100. HE; Fig. 2. EMP mature type, spleen. Dog. Immunohistochemical labelling to CD79 α . CD79 α immunolabelling, DAB; Fig. 3. EMP mature type, spleen. Dog. Immunohistochemical labelling to CD18. CD18 immunolabelling, DAB; Fig. 4. EMP mature type, spleen. Dog. A large percentage of the tumour cell nucleus showed PCNA expression. PCNA immunolabelling, DAB. Fig. 4A. EMP monomorphous blastic type, skin. Dog. Low number of tumour cells are MT positive. MT immunolabelling, DAB.

Results

The evaluated tumours represented mature type (canine n=4; feline n=2), cleaved type (canine n=3, feline n=2), asynchronous type (canine n=2, feline n=2), polymorphous blastic type (canine n=4; feline n=1), monomorphous blastic type (canine n=5) and hyaline type (canine n=1).

In the mature type (Fig. 1), the tumour cells were round to oval with minimal anisocytosis and anisokaryosis, eccentrically located nuclei and clumped chromatin („cartwheel”), resembling mature plasma cells (Fig 1A). In canine and feline tumours mitotic figures ranged from 3 to 7 per 10/HPF $\times$ 400. Occasionally, multinucleated giant cells were seen.

In the cleaved type, the prominent feature of the

tumour cells was convoluted nuclei and slightly eosinophilic cytoplasm. The cells had indistinct cell borders. The chromatin was finely granulated and nucleoli were invisible. In canine and feline tumours mitotic figures ranged from 4 to 18 per 10/HPF $\times$ 400. Fibrous septa divided tumour cells into packets. The multinucleated giant cells were present.

In the asynchronous type (Fig. 5), blastic cells with eccentric nucleus and centrally located nucleolus were seen. Abundant, basophilic cytoplasm with perinuclear halo was observed (Fig. 5A). In canine and feline tumours mitotic figures ranged from 5 to 10 per 10/HPF $\times$ 400. Alike in cleaved type the giant cells were numerous.

In the polymorphous blastic type, the tumour cells showed marked anisocytosis, anisokaryosis and poly-

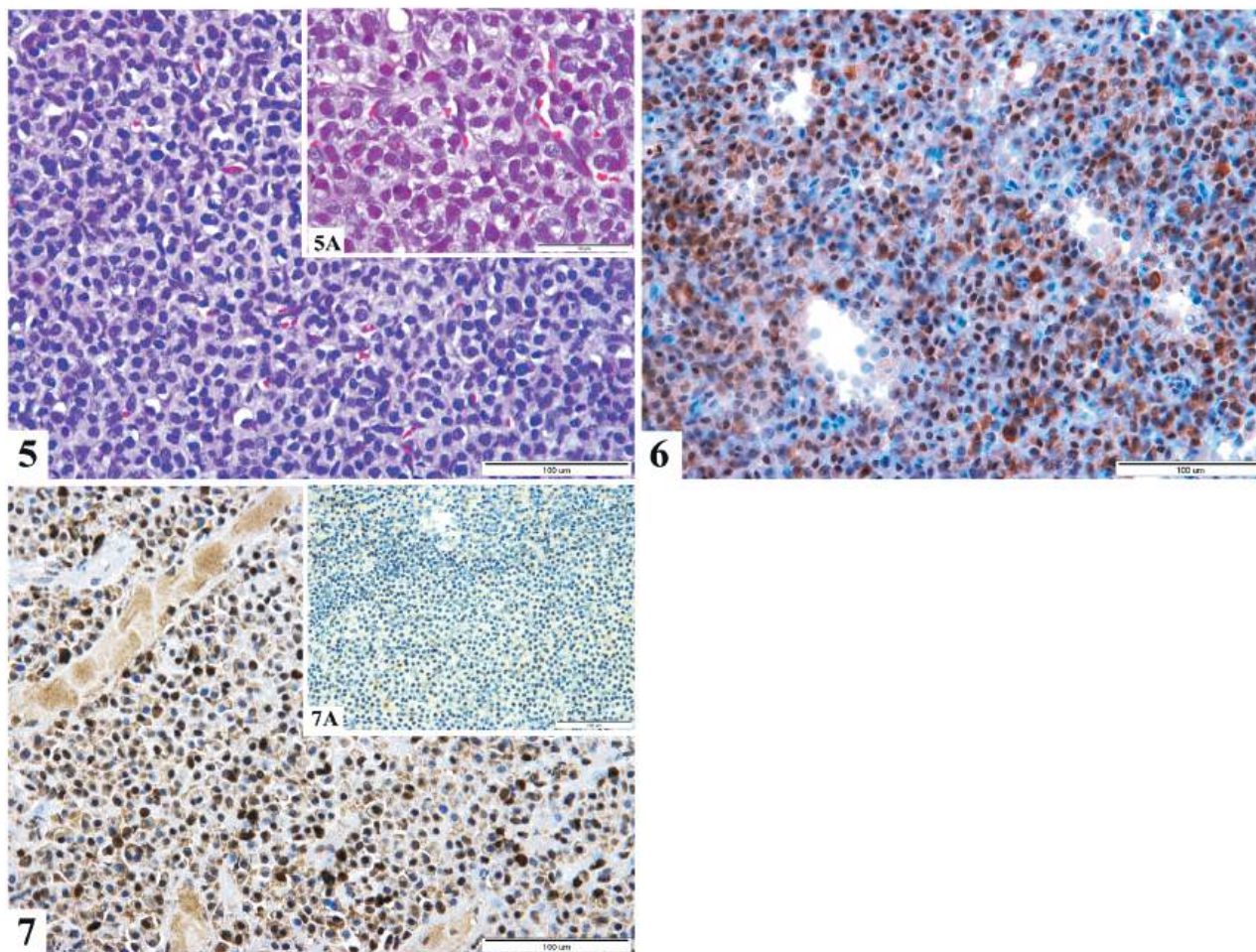


Fig. 5. EMP, asynchronous type, skin. Cat. Round to oval cells with round to oval, eccentrically located nuclei and clumped chromatin are present. HE. Fig. 5A EMP asynchronous type, skin. Cat. Magnification x100. HE; Fig. 6. EMP, asynchronous type, skin. Cat. Immunohistochemical labelling to CD79 α . CD79 α immunolabelling, DAB; Fig. 7. EMP, asynchronous type, skin. Cat. A large percentage of the tumour cell nucleus showed PCNA expression. PCNA immunolabelling, DAB. Fig. 7A. EMP polymorphous blastic type, skin. Cat. Most tumour cells are MT negative. MT immunolabelling, DAB.

morphism. The blastic cells were admixed with mature cells. In canine tumours mitotic figures ranged from 12 to 35 per 10/HPFx400, while in feline there was 16 per 10/HPFx400. The multinucleated giant cells were common. Some giant cells had up to 7 nuclei.

In the monomorphous blastic type, the cellular population was monotonous. The tumour cells were round to oval, similar in size, with light, vast nucleus and small 1 to 3 nucleoli per cell. In canine tumours mitotic figures ranged from 6 to 10 per 10/HPFx400.

In the hyaline type, the distinguishing feature of the tumour cells was abundant cytoplasm, crescent-shaped, eccentrically located nuclei, and central prominent 1 to 5 nucleoli per cell. The number of mitotic figures was 9 per 10/HPFx400. A few giant cells were seen in the tumour.

Despite of EMP type the mitotic index ranged depending on the tumour localization in both dogs and cats. In dogs, mitotic figures counted per 10/HPFx400

numbered from 5 to 35 in skin, 3 to 9 in spleen, and 6 to 18 in oral cavity EMPs (Table 1). In the skin asynchronous (n=2), polymorphous blastic (n=4), and monomorphous blastic (n=5) types were observed. In the spleen mature (n=4) and hyaline (n=1) types were observed. In the oral cavity only cleaved (n=3) type was found. In cats, mitotic figures counted per 10/HPFx400 numbered from 8 to 16 in skin, 5 in spleen, and 4 to 8 in oral cavity EMPs (Table 2). In the skin asynchronous (n=2) and polymorphous blastic (n=1) types were observed. In the spleen and oral cavity mature type (n=2) was seen. Cleaved type (n=2) was only diagnosed in oral cavity.

In dogs (Fig. 2) and cats (Fig. 6) EMP cells had high, positive (90%) cytoplasmic expression of CD79 α . In dogs, approximately 80% of the neoplastic cells showed high, cytoplasmic CD18 expression in cutaneous and splenic (Fig. 3) tumours, however in oral cavity tumours the expression of CD18 was

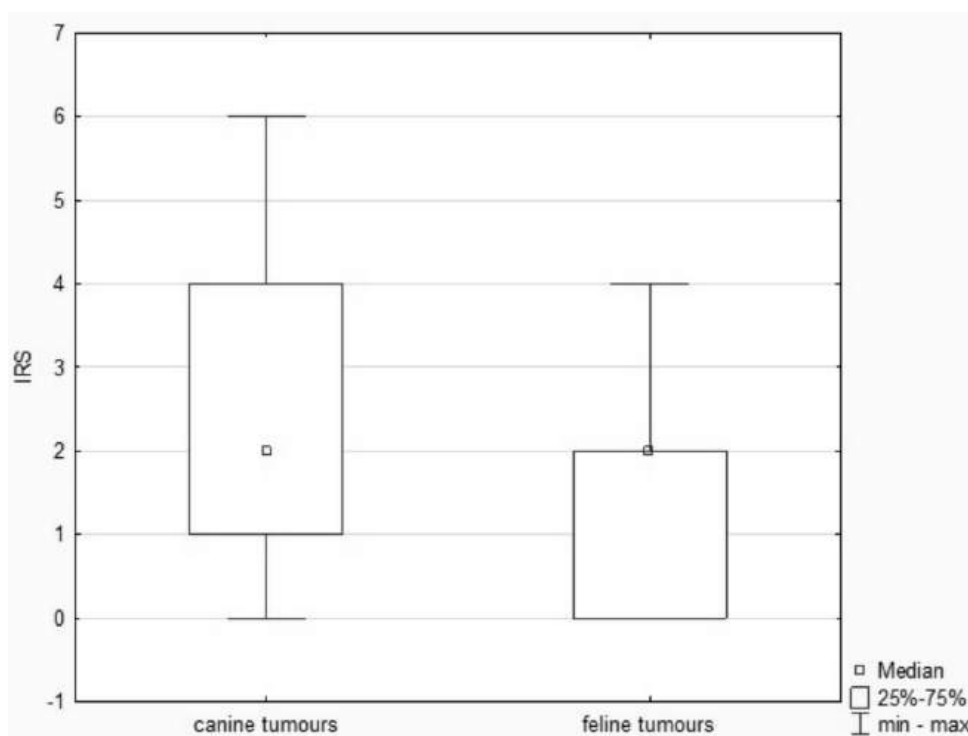


Fig. 6. IRS in canine (n=19) and feline tumours (n=7).

absent. The lack of CD18 immunolabelling in the feline positive control slide indicates, that anti-canine antibody used in this study does not cross-react with the feline antigens. The PCNA expression in both canine (Fig. 4) and feline (Fig. 5) tumours varied, but the mean value was approximately 30%. In dog and cat tumours MT expression was variable. Most of canine tumour types had low MT expression (Fig. 4A), however only one cutaneous polymorphous blastic (thoracic area) EMP type had moderate MT expression. Other cutaneous polymorphous blastic type had low MT expression. One of the asynchronous type (skin, axillary area) showed no MT expression, but the other one from skin of the hind limb had low expression. In cats low MT expression (Fig. 7A) was observed in polymorphous blastic (skin) and mature type (spleen). In asynchronous (skin), cleaved and mature type (spleen and oral cavity) absent MT expression was seen. Detailed characteristics of the immunoreactivity of evaluated tumours were collected in Table 1 and Table 2.

The results of IRS are shown on Fig. 6. In canine tumours, the mitotic index ($r=0.805$; $P=0.000$) and PCNA index ($r=0.53$; $P=0.019$) were positively correlated with IRS. In feline tumours, there was no correlation between the mitotic index and IRS ($r=0.642$; $P=0.120$), and PCNA index and IRS ($r=0.531$; $P=0.618$).

Discussion

Plasma cell tumours are neoplasms arising from B-lymphocytes, which occur in mature animals and are more frequently seen in dogs aged 11 years or more, and cats aged 9 years or more. The evaluated in our study EMPs were seen mostly in older animals, what corresponds to other reports (Platz et al. 1999, Majzoub et al. 2003, Rannou B et al. 2009, Gupta et al. 2014). Most of the tumours were located in the skin, what was also revealed by other authors (Platz et al. 1999). The vast majority of the evaluated canine EMPs occurred in mongrels. The previous studies revealed that American Cocker Spaniel, English Cocker Spaniel, Airdale Terrier, Kerry Blue Terrier, Scottish Terrier, Yorkshire Terrier, Golden Retriever, Labrador Retriever and mixed breeds are predisposed to EMP (Cangul et al. 2002, Gupta et al. 2014). The evaluated canine EMPs were seen more often in bitches than in males, in contrary to previous studies (Brunnert and Altman 1991, Cangul et al. 2002).

In the present study, in cats EMP affected only the European Short-Haired breed, equally females and males. Although, there are single records of EMP in Abyssinian, Long-Haired Persian and Burmese cats, the breed predisposition of EMP in cats is unknown. Male cats seem to be most affected (Majzoub et al. 2003). The low number of feline EMPs evalu-

gated in our study do not permit any generalization regarding the breed or sex predispositions.

Regarding morphology of the tumour cells and the tumour architecture, the EMP can be classified into six types (mature, hyalin, cleaved, asynchronous, monomorphous blastic, polymorphous blastic types) (Cangul et al. 2002). The present study described all six types of EMP in dogs, and among them monomorphous blastic type was the most frequent. According to the previous studies, the monomorphous blastic and cleaved type are the most common types of EMPs in dogs (Platz et al. 1999, Cangul et al. 2002).

Due to the similar morphology and tumour architecture, as observed in canine EMP, the same histological types can be distinguished in cats. In a previous study, the asynchronous EMP was the most common type of feline EMP (Majzoub et al. 2003). In our study four types (mature, cleaved, asynchronous, and polymorphous blastic) of EMPs were equally represented, while the monomorphous blastic type and hyaline type were not revealed, what may suggest that these EMP types are rare in cats, however, further study involving more cases of feline EMP should be performed to confirm these findings.

In multiple myeloma, well-differentiated, mature and small cells are indicators of a low grade, whereas plasmablastic, immature cells are the feature of high-grade malignancy tumours. In EMPs, there is no correlation between tumour type and prognosis, however well-differentiated forms appear to have benign behaviour but anaplastic types are considered as locally-aggressive, slowly-progressive and rarely metastasizing tumours (Cangul et al. 2002). The obtained results provided the basis for indicating an increased risk of local recurrence or distant metastases. The follow-up data, not available in the present study, would be necessary to estimate the biological behavior of the evaluated tumours.

Positive CD79 α labelling was observed in all evaluated canine and feline tumours, what was also confirmed in other research (Webb et al. 2008, Van Wette et al. 2009). However, Moore et al. revealed, that about 20% of EMPs are CD79 α -negative (Moore et al. 2000). CD18 is a marker of all leukocytes, however, its expression is 10 times higher in macrophages, monocytes and dendritic cells compared with lymphocytes, as well as plasma cells (Mazzone and Ricevuti 1995, Schrenzel et al. 1998). The expression of CD18 in canine EMP is variable regardless of the tumour type and localization (Ramos-Vara et al. 2007). In our study CD18 expression was observed in cutaneous and splenic tumours, with no immunoreactivity in EMPs located in oral cavity. Nevertheless, the low number of evaluated tumours does not allow to

draw any relationship between the tumour localisation and the expression of CD18.

In both canine and feline EMPs, the PCNA and mitotic index was higher in cutaneous and oral cavity tumours than in spleen. This result may indicate that those tumours had more dynamic cellular proliferation, therefore showed more intensive and faster growth.

The positive correlation between MT expression and mitotic index was shown in canine apocrine gland tumours and canine and feline melanomas (Martano et al. 2012). The expression of MT fluctuates during tumour growth, and in some human tumours (breast, colon, kidney, liver, lung, nasopharynx, ovary, prostate, salivary gland, testes, thyroid, and urinary bladder tumours) the level of MT is positively correlated with the proliferation rate and the malignancy grade (Gumulec et al. 2014). On the other hand, a complete lack of MT expression was observed in some human colo-rectal adenocarcinomas, what was linked to spontaneous and mutagenic DNA damage (Dincer et al. 2001). In the evaluated canine EMPs, the expression of MT was variable, but usually low to moderate, in contrast to the feline EMPs, where MT expression was absent or low despite the type and tumour localization. The positive correlation between PCNA, mitotic index and IRS in canine tumours suggests, that the expression of MT is connected with the tumour growth. However, the mechanism of such relationship remains unclear. In the human cervical carcinoma, the expression of MT increased with the intensity of the local spread of the disease (Walentowicz-Sadlecka et al. 2013). In cats, the tumour growth is probably unrelated to the expression of MT, as there is no correlation between PCNA, mitotic index and IRS. However, the study including more cases of the feline EMPs is necessary to confirm the lack of the relationship between expression of MT and tumour growth.

Summarizing, mature, cleaved, asynchronous, and polymorphous blastic histological types of EMPs can be diagnosed in both dogs and cats. Additionally, in dogs monomorphous blastic and hyaline types could be observed. The absence of the two former types of EMPs in cats can indicate that those types have rare occurrence in these animals. CD79 α seems to be a good diagnostic marker for EMPs in dogs and cats. In canine tumours positive correlation between PCNA, mitotic index and IRS is mostly connected with tumour growth, however, in cats no such correlation was found, still the study including more cases of feline EMPs is necessary to confirm the occurrence of monomorphous blastic, hyaline type and the absence of the relationship between expression of MT and tumour growth.

References

- Adelman L, Larson V, Sissener T, Sportswood T (2014) Extramedullary plasmacytoma in the lung of a Doberman pinscher dog. *Can Vet J* 55: 1237-1240.
- Alexandrakis MG, Passam FH, Dambaki K, Passam AM, Nalbanti F, Stathopoulos ES, Kyriakou DS (2005) The assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining in myelodysplastic syndromes and its prognostic significance. *Eur J Histochem* 49: 27-32.
- Baer KE, Patnaik AK, Gilbertson SR, Hurvitz AI (1989) Cutaneous plasmacytomas in dogs: a morphologic and immunohistochemical study. *Vet Pathol* 26: 216-221.
- Borgatti A (2010) Plasma cell tumors. In: Weiss DJ, Wardrop KJ (eds) *Schalm's veterinary hematology*. Blackwell Publishing Ltd, USA, pp 516-518.
- Brunnert SR, Altman NH (1991) Identification of immunoglobulin light chains in canine extramedullary plasmacytomas by thioflavine T and immunohistochemistry. *J Vet Diagn Invest* 3: 245-251.
- Cangul IT, Wijnen M, Van Garderen E, van den Ingh TS (2002) Clinico-pathological aspects of canine cutaneous and mucocutaneous plasmacytomas. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49: 307-312.
- Dincer Z, Jasani B, Haywood S, Mullins JE, Fuentealba IC (2001) Metallothionein expression in canine and feline mammary and melanotic tumours. *J Comp Pathol* 125: 130-136.
- Gumulec J, Raudenska M, Adam V, Kizek R, Masarik M (2014) Metallothionein – immunohistochemical cancer biomarker: a meta-analysis *PLoS One* 9: e85346.
- Gupta A, Fry JL, Meindel M, Gumber S (2014) Pathology in practice. Cutaneous extramedullary solitary digital plasmacytoma in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 244: 163-165.
- Ioachim E, Assimakopoulos D, Peschos D, Zissi A, Skevas A, Agnantis NJ (1999) Immunohistochemical expression of metallothionein in benign premalignant and malignant epithelium of the larynx: correlation with p53 and proliferative cell nuclear antigen. *Pathol Res Pract* 195: 809-814.
- Majzoub M, Breuer W, Platz SJ, Linke RP, Hermanns W (2003) Histopathologic and immunophenotypic characterization of extramedullary plasmacytomas in nine cats. *Vet Pathol* 40: 249-253.
- Mazzone A, Ricevuti G (1995) Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica* 80: 161-175.
- Moore PF, Affolter VK, Vernau W (2000) Immunophenotyping in the dog. In: Bonagura JD (ed) *Kirk's current veterinary therapy XIII: Small Animal Practice*. WB Saunders Company, USA, pp 505-509.
- Martano M, Carella F, Squillacioti C, Restucci B, Mazzotta M, Lo Muzio L, Maiolino P (2012) Metallothionein expression in canine cutaneous apocrine gland tumors. *Anticancer Res* 32: 747-752.
- Morton LD, Barton CL, Elissalde GS, Wilson SR (1986) Oral extramedullary plasmacytomas in two dogs. *Vet Pathol* 23: 637-639.
- Platz SJ, Breuer W, Pfliegerhaer S, Minkus G, Hermanns W (1999) Prognostic value of histopathological grading in canine extramedullary plasmacytomas. *Vet Pathol* 36: 23-27.
- Ramos-Vara JA, Miller MA, Valli VE (2007) Immunohistochemical detection of multiple myeloma 1/interferon regulatory factor 4 (MUM1/IRF-4) in canine plasmacytoma: comparison with CD79a and CD20. *Vet Pathol* 44: 875-884.
- Rannou B, Hélie P, Bédard C (2009) Rectal plasmacytoma with intracellular hemosiderin in a dog. *Vet Pathol* 46: 1181-1184.
- Remmele W, Stegner HE (1987) Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathology* 8: 138-140.
- Rowland PH, Linke RP (1994) Immunohistochemical characterization of lambda light-chain-derived amyloid in one feline and five canine plasma cell tumors. *Vet Pathol* 31: 390-393.
- Schrenzel MD, Naydan DK, Moore PF (1998) Leukocyte differentiation antigens in canine cutaneous and oral plasmacytomas. *Vet Dermatol* 9: 33-41.
- Simoes JP, Schoning P, Butine M (1994) Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet Pathol* 31: 637-647.
- Tsirakis G, Pappa CA, Kaparou M, Katsomitrou V, Hatzivasili A, Alegakis T, Xekalou A, Stathopoulos EN, Alexandrakis MG (2011) Assessment of proliferating cell nuclear antigen and its relationship with proinflammatory cytokines and parameters of disease activity in multiple myeloma patients. *Eur J Histochem* 55: e21.
- Valli VE, Jacobs RM, Parodi AL, Vernau W, Moore PF (2002) *Histological classification of hematopoietic tumors of domestic animals*, 2nd ed., American Registry of Pathology, Washington, DC, USA.
- Van Wettene AJ, Linder KE, Suter SE, Olby NJ (2009) Solitary intracerebral plasmacytoma in a dog: microscopic, immunohistochemical, and molecular features. *Vet Pathol* 46: 949-951.
- Walentowicz-Sadlecka M, Koper A, Galazka K, Koper K, Basta P, Mach P, Skret-Magierlo J, Dutsch-Wicherek M, Sikora J, Grabiec M, Kazmierczak W, Wicherek L (2013) The analysis of metallothionein immunoreactivity in stromal fibroblasts and macrophages in cases of uterine cervical carcinoma with respect to both the local and distant spread of the disease. *Am J Reprod Immunol* 70: 253-261.
- Webb J, Chary P, Northrup N, Almy F (2008) Erythrophagocytic multiple myeloma in a cat. *Vet Clin Pathol* 37: 302-307.
- Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller RA, Kaneene JB, Kiupel M (2007) Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet Pathol* 44: 298-308.

Oświadczenie

Niniejszym oświadczamy, że wkład autorów w publikacji:

Mikiewicz Mateusz, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Dziubińska-Bartylak Paula, Otrocka-Domagała Iwona. Intraocular chondrosarcoma in a rabbit. J Comp Pathol. 2020;179:41-44. DOI: 10.1016/j.jcpa.2020.06.013

Był następujący:

Mateusz Mikiewicz – opracowanie koncepcji badań, metodyki, zaplanowanie i wykonanie analiz laboratoryjnych, opracowanie i interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie odpowiedzi na recenzję.

Katarzyna Paździor-Czapula – korekta językowa manuskryptu, pomoc w wykonaniu barwienia immunohistochemicznego.

Michał Gesek – przygotowanie mikrofotografii.

Paula Dziubińska-Bartylak – pomoc w klinicznym opisie przydatku.

Iwona Otrocka-Domagała – pomoc merytoryczna w opracowaniu manuskryptu, korekta językowa.

Dr wet. Mateusz Mikiewicz *Mateusz Mikiewicz*

Dr n. wet. Katarzyna Paździor-Czapula *Katarzyna Paździor-Czapula*

Dr hab. Michał Gesek, Prof. UWM *Michał Gesek*

Lek. wet. Paula Dziubińska-Bartylak *Paula Dziubińska-Bartylak*

Dr hab. Iwona Otrocka-Domagała, Prof. UWM *Iwona Otrocka-Domagała*



ELSEVIER

www.elsevier.com/locate/jcpa

NEOPLASTIC DISEASE

Intraocular Chondrosarcoma in a Rabbit

M. Mikiewicz^{*}, K. Paździor-Czapula^{*}, M. Gesek^{*},
P. Dziubińska-Bartylak[†] and I. Otrocka-Domagala^{*}

^{*} Department of Pathological Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Olsztyn and [†] Private Veterinary Clinic Sowa Egzotica, Bydgoszcz, Poland

Summary

Post-traumatic intraocular sarcomas are rarely reported in domestic animals and are most common in cats. An 8-year-old rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) was referred to a veterinary clinic due to ocular discharge, uveitis and protein precipitate in the anterior chamber of the right eye. The eye was enucleated and histopathological examination revealed a poorly demarcated tumour within the ciliary body with invasion to adjacent eye structures. Neoplastic cells formed chaotic cartilage lacunae and were immunopositive for vimentin but immunonegative for pancytokeratin. On this basis, the neoplasm was diagnosed as a chondrosarcoma. To the best of our knowledge, this is the first report of intraocular chondrosarcoma in a rabbit. There was no history of previous ocular trauma but as there was serological evidence of *Encephalitozoon cuniculi* infection, inflammation could have been a predisposing factor to development of the neoplasm.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: chondrosarcoma; neoplasia; rabbit; sarcoma

Post-traumatic ocular sarcomas are rare in animals but have been described in cats, rabbits, dogs and discus (*Symphisodon aequifasciatus*) (McPherson *et al.*, 2009; Magi *et al.*, 2013; Perlmann *et al.*, 2013; Moreira *et al.*, 2018). In cats, post-traumatic ocular sarcoma occurs in three variants: spindle cell sarcoma, lymphoma, osteosarcoma and chondrosarcoma (Zeiss *et al.*, 2003; Naranjo and Dubielzig, 2007; Dubielzig *et al.*, 2010). Post-traumatic intraocular spindle cell sarcoma and lymphoma have been described in rabbits (McPherson *et al.*, 2009; Keller *et al.*, 2019). Ocular osteosarcoma and chondrosarcoma are rare and are thought to originate from mesenchymal stem cells (Dubielzig *et al.*, 2010).

Intraocular neoplasms are regarded as having low metastatic potential and metastases have been only rarely reported in domestic animals (McPherson *et al.*, 2009; Wilcock and Njaa, 2016). However, there is a single report of post-traumatic intraocular chon-

drosarcoma with lung metastasis in a cat (Moreira *et al.*, 2018). In this report we document the clinical, histological and immunohistochemical findings of intraocular chondrosarcoma with possible lung metastasis in a rabbit.

An 8-year-old, 1.81 kg, female Netherland Dwarf rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) was presented with right ocular discharge and a dark spot, 2 mm in diameter, on the cornea. Ophthalmological examination of the affected eye revealed uveitis, protein precipitate in the anterior chamber and neovascularization of the cornea, which corresponded to the grossly visible dark spot. Corneal ulceration was absent and the left eye was normal. The intraocular pressure (IOP) of the right eye was tested with a Schiötz Tonometer (Reister, Jungingen, Germany) and found to be too low to be measured while the IOP of the left eye was normal range. A serological titre of 1:80 in an immunofluorescence antibody (IFA) test for *Encephalitozoon cuniculi* was higher than the 1:40 titre regarded as positive (Suter *et al.*, 2001; Künzel *et al.*, 2008). At the time of presentation, a complete blood count

Correspondence to: I. Otrocka-Domagala (e-mail: i.otrocka-domagala@uwm.edu.pl).

revealed mild neutrophilia while plasma concentrations of creatine kinase (CK) and urea were elevated (Supplementary Table 1). Topical dexamethasone (one drop to the right and left eyes every 4 h, Dexamethasone 0.1% WZF, Polfa, Warsaw, Poland), tolfenamic acid (6 mg per os every 24 h, Tolfedine, Vetoquinol Biowet Gorzów, Gorzów Wielkopolski, Poland) and fenbendazole (5 mg/kg per os every 24 h, Panacur AquaSol, Intervet, Boxtmeer, Holland) was applied. As the eye did not improve, it was removed surgically and submitted for histopathological examination. The sample was fixed in 10% buffered formalin, processed routinely for histopathology, embedded in paraffin wax and cut at 3 µm. The sections were stained with haematoxylin and eosin (HE) and alcian blue (pH 2.5). Immunohistochemical examination was performed using antibodies against pancytokeratin, vimentin and Ki67 antigens and a visualization system based on the immunoperoxidase method with 3,3-diaminobenzidine (DAB) as chromogen (Table 1). The slides were counterstained with Mayer's haematoxylin. The expression of Ki67 (nuclear) was evaluated quantitatively in the areas of the slide with the highest number of immunopositive cells. All positive and negative neoplastic cells were counted in 5 high-power fields (HPFs; x400) and the Ki67 index was expressed as a percentage of positive cells (total number of cells counted 500). The slides were evaluated by light microscopy (BX52, Olympus, Tokyo, Japan) using CellB (Olympus, Tokyo, Japan) software.

Histopathologically, a poorly demarcated neoplasm was seen within the ciliary body that infiltrated the choroid, anterior chamber and anterior sclera, focally extending under the bulbar conjunctiva. The cornea was moderately infiltrated with heterophils, plasma cells and lymphocytes; distinct

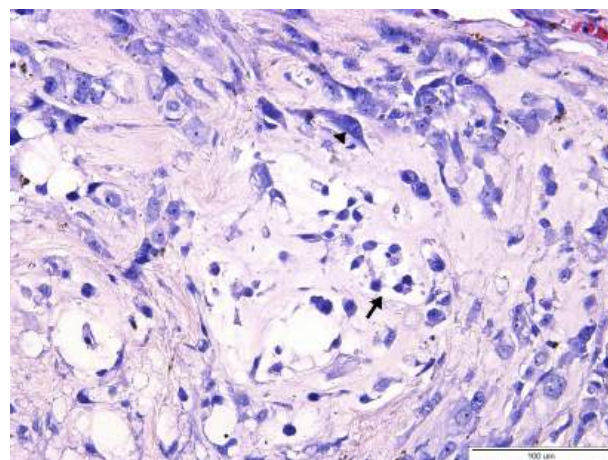


Fig. 1. Ciliary body, rabbit. Pleomorphic neoplastic cells with marked anisocytosis and anisokaryosis form chaotic cartilage lacunae (arrow) or are seen individually (arrowhead) (A). HE, x400.

neovascularization was apparent. The neoplastic cells formed individual or variably sized clusters of chaotic cartilage lacunae (Fig. 1). The cells were polygonal or oval with frequent anisocytosis and anisokaryosis, pleomorphic nuclei, clumped chromatin and one-three large nucleoli. One or two mitotic figures were seen per HPF (x400). Single cells with enlarged nuclei and multinucleated giant cells were observed. The cytoplasm of the neoplastic cells was abundant and slightly basophilic. The neoplastic stroma was scant, poorly vascularized, infiltrated with haemosiderophages and rich in low acidity (carboxylated) mucins as indicated by alcian blue staining (Fig. 2). The neoplastic cells expressed vimentin (Fig. 3) but not pancytokeratin as assessed by immunohistochemical labelling. The Ki67 index was calculated as 5.5%. These histopathological and immunohistochemical

Table 1
Primary antibodies, antigen retrieval and visualization system

Primary antibody	Clone	Dilution	Incubation time	Antigen retrieval	Visualization system
Vimentin*	Monoclonal mouse anti-bovine clone Vim 3B4	1:100	30 min [†]	2 x 3 min [‡] TrisEDTA buffer pH = 9	EnVision + System-HRP, Mouse (DAB)*
Pancytokeratin [§]	Monoclonal mouse anti-human clone AE1/AE3/PCK26	ready-to-use	30 min [†]	2 x 3 min [‡] TrisEDTA buffer pH = 9	EnVision + System-HRP, Mouse (DAB)*
Ki67*	Monoclonal mouse anti-human clone MIB-1	1:75	30 min [†]	2 x 3 min [‡] TrisEDTA buffer pH = 9	EnVision + System-HRP, Mouse (DAB)*

*Dako, Glostrup, Denmark.

[†]Incubation in a humid chamber at room temperature.

[‡]Antigen retrieval in a microwave oven, 650 W.

[§]Ventana, Tucson, Arizona, USA.

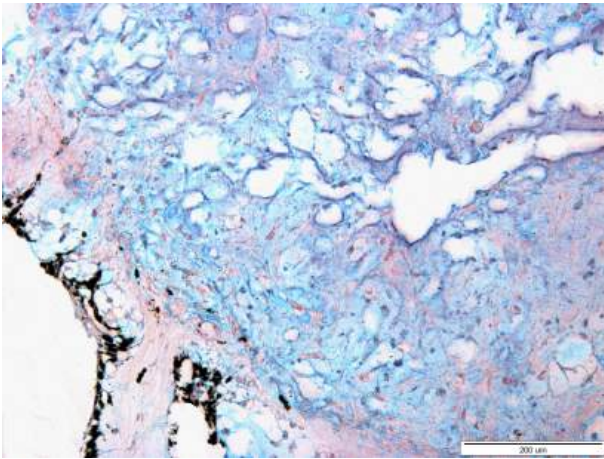


Fig. 2. Ciliary body, rabbit. Poorly vascularized stroma rich in low acidity mucins characteristic of cartilage. Alcian blue, x200.

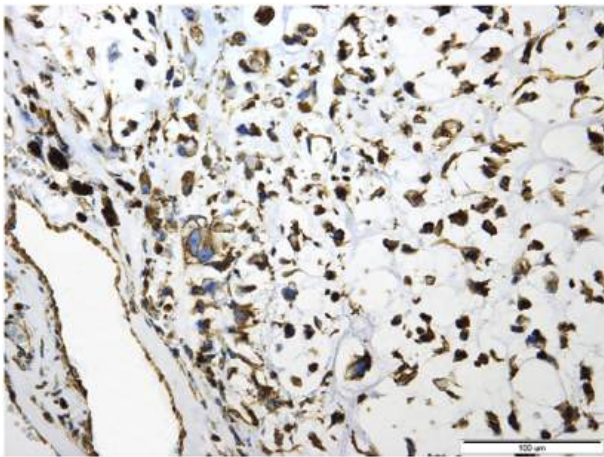


Fig. 3. Ciliary body, rabbit. Strong immunolabelling of vimentin in neoplastic cells. IHC, x400.

features are indicative of intraocular chondrosarcoma.

Three days after surgery, the rabbit became depressed and anorectic; plasma concentrations of urea and creatinine were elevated as was activity of alanine transaminase, aspartate transaminase and CK (Supplementary Table 1). Seven days after surgery, the rabbit became acutely dyspnoeic. Ultrasound examination of the thoracic cavity revealed hydrothorax and a mass, approximately 3.3 cm in diameter, was seen in the right caudal lobe of the lung (Supplementary Fig. 1). The animal was euthanised one month after enucleation because of severe dyspnoea and unfavourable prognosis. Necropsy was not permitted by the owner.

Reports of intraocular sarcomas in rabbits are rare and include only spindle cell sarcoma and lymphoma.

In these cases, previous trauma, lens rupture or chronic intraocular inflammation were considered as causes (McPherson *et al.*, 2009; Dickinson *et al.*, 2013; Keller *et al.*, 2019). Intraocular chondrosarcoma has not previously been reported in rabbits but has been documented in cats as a variant of post-traumatic intraocular sarcoma (Dubielzig and Zeiss, 2004; Moreira *et al.*, 2018). In this case, there was no evidence of previous ocular trauma. However, inflammation caused by *E. cuniculi* infection could possibly have predisposed to development of the tumour.

The differential diagnoses of protein precipitate in the anterior chamber, uveitis and associated corneal disease in rabbits include *E. cuniculi*-induced phacoclastic uveitis, *Pasteurella* spp. infection and intraocular neoplasm (McPherson *et al.*, 2009; Dickinson *et al.*, 2013; Keller *et al.*, 2019). In this case, the IFA test indicated *E. cuniculi* infection. However, as many animals can be infected subclinically, a positive serological titre does not mean that *E. cuniculi* has caused clinical signs (Csokai *et al.*, 2009). Although chronic intraocular inflammation is a likely risk factor in the development of intraocular sarcoma in cats and rabbits (McPherson *et al.*, 2009; Wood and Scott, 2019), whether or not the infection in this case was related to the chondrosarcoma is speculative.

The diagnosis of intraocular chondrosarcoma was based on the characteristic histopathological and immunohistochemical features, which indicated a mesenchymal origin. A stroma rich in low acidity (carboxylated) carbohydrate characteristic of cartilage, as indicated by alcian blue staining (Layton and Bancroft, 2012), is also characteristic of this neoplasm. No microscopic evidence of *E. cuniculi* organisms was seen but this could have been the result of previous antiparasitic treatment. Haemosiderophages, observed within the tumour, indicate chronic bleeding, which could have originated from trauma or chronic inflammation.

The metastatic potential of intraocular sarcomas is considered to be low, although there are reports of metastatic disease in cats (Dubielzig *et al.*, 1990; Barrett *et al.*, 1995; Moreira *et al.*, 2018). In cats, intraocular chondrosarcoma metastases were seen in lungs and thorax (Moreira *et al.*, 2018) and intraocular spindle cell sarcoma metastases were observed in the optic nerve near the chiasma (Barrett *et al.*, 1995). Reports of metastatic intraocular sarcomas in cats are sparse and include only one report of lymph node metastasis, which involved an intraocular lymphoma (Keller *et al.*, 2019). In the present case, the dyspnoea and lung mass identified radiographically suggest the possibility of metastasis, but the lack of post-mortem examination means that this cannot be

confirmed. The Ki67 index was 5.5%, which corresponds with grade I (low malignancy) in humans (Nawa *et al.*, 1996; Scully *et al.*, 1997). The Ki67 index is negatively correlated with disease-free survival in human chondrosarcomas (Nawa *et al.*, 1996; Scully *et al.*, 1997) and in canine soft tissue sarcomas (Ettinger *et al.*, 2006). However, as this appears to be the only report of intraocular chondrosarcoma in animals, the prognostic value of the Ki67 index is unknown.

Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2020.06.013>.

References

- Barrett PM, Merideth RE, Alarcon FL (1995) Central amaurosis induced by an intraocular, posttraumatic fibrosarcoma in a cat. *Journal of the American Animal Hospital Association*, **31**, 242–245.
- Csokai J, Joachim A, Gruber A, Tichy A, Pakozdy A *et al* (2009) Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, **163**, 18–26.
- Dickinson R, Bauer B, Gardhouse S, Grahn B (2013) Intraocular sarcoma associated with ruptured lens in a rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Ophthalmology*, **16**, 168–172.
- Dubielzig RR, Everitt J, Shaddock JA, Albert DM (1990) Clinical and morphologic features of post-traumatic ocular sarcomas in cats. *Veterinary Pathology*, **27**, 62–65.
- Dubielzig RR, Ketrang KL, McLellan GJ, Albert DM (2010) Non-surgical trauma. In: *Veterinary Ocular Pathology. A Comparative Review*, Elsevier-Saunders, Edinburgh, pp. 81–114.
- Dubielzig RR, Zeiss C (2004) Feline post-traumatic ocular sarcoma: three morphologic variants and evidence that some are derived from lens epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **45**, 3562.
- Ettinger SN, Scase TJ, Oberthaler KT, Craft DM, McKnight JA *et al* (2006) Association of argyrophilic nucleolar organizing regions, Ki-67, and proliferating cell nuclear antigen scores with histologic grade and survival in dogs with soft tissue sarcomas: 60 cases (1996–2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **228**, 1053–1062.
- Keller KA, Guzman DS, Reilly C, Valentine B, Duke Boyton FD *et al* (2019) Post-traumatic ocular lymphoma in three rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Exotic Pet Medicine*, **28**, 154–161.
- Künzel F, Gruber A, Tichy A, Edelhofer R, Nell B *et al* (2008) Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, **151**, 115–124.
- Layton C, Bancroft JD (2012) Carbohydrates. In: *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 7th Edit., SK Suvana, C Layton, JD Bancroft, Eds., Churchill Livingstone, London, pp. 215–238.
- Magi GE, Renzoni G, Piccionello AP, Rossi G (2013) Primary ocular chondrosarcoma in a discus (*Symphisodon aequifasciatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **44**, 225–231.
- McPherson L, Newman SJ, McLean N, McCain S, Vemulapalli R *et al* (2009) Intraocular sarcomas in two rabbits. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **21**, 547–551.
- Moreira MVL, de Andrade MC, Fulgêncio GO, Langohr IM, Ecco R (2018) Presumed post-traumatic ocular chondrosarcoma with intrathoracic metastases in a cat. *Veterinary Ophthalmology*, **21**, 535–538.
- Naranjo C, Dubielzig RR (2007) Round cell variant of feline post-traumatic sarcoma: 7 cases. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **48**, 3596.
- Nawa G, Ueda T, Mori S, Yoshikawa H, Fukuda H *et al* (1996) Prognostic significance of Ki67 (MIB1) proliferation index and p53 over-expression in chondrosarcomas. *International Journal of Cancer*, **69**, 86–91.
- Perlmann E, Morales A, Góes ACA, Dagli MLZ, Barros PSM (2013) Primary intraocular chondrosarcoma in a dog. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **65**, 1657–1659.
- Scully SP, Layfield LJ, Harrelson JM (1997) Prognostic markers in chondrosarcoma: evaluation of cell proliferation and of regulators of the cell cycle. *Sarcoma*, **1**, 79–87.
- Suter C, Müller-Doblies UU, Hatt J-M, Deplazes P (2001) Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits with fenbendazole. *Veterinary Record*, **148**, 478–480.
- Wilcock BP, Njaa BL (2016) Special senses. In: *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, 6th Edit., Vol. 1, MG Maxie, Ed., Elsevier, St. Louis, pp. 478–488.
- Wood C, Scott EM (2019) Feline ocular post-traumatic sarcomas: current understanding, treatment and monitoring. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, **21**, 835–842.
- Zeiss CJ, Johnson EM, Dubielzig RR (2003) Feline intraocular tumors may arise from transformation of lens epithelium. *Veterinary Pathology*, **40**, 355–362.

[Received, March 13th, 2020]
[Accepted, June 24th, 2020]

**Dokumentacja potwierdzająca
wykazywanie się istotną
aktywnością naukową albo
artystyczną realizowaną w więcej
niż jednej uczelni, instytucji
naukowej lub instytucji kultury**

Lublin, dn. 31.10.2019 r.

Zaświadczenie

Niniejszym zaświadczam, że dr n. wet. Mateusz Mikiewicz odbył staż naukowy w Zakładzie Patomorfologii i Weterynarii Sądowej Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w dniach 01.08.-31.10.2019 r. Podczas stażu wykonywał oznaczenia histo- i immunohistochemiczne, a także uczestniczył w badaniach diagnostycznych z zakresu diagnostyki sekcyjnej i mikroskopowej.

KIEROWNIK
Zakładu Patomorfologii i Weterynarii Sądowej

dr hab. Wojciech Łopaszyński
profesor uczelni



Dokumentacja potwierdzająca uzyskanie projektów badawczych



DECYZJA
DYREKTORA NARODOWEGO CENTRUM NAUKI
Nr DEC-2021/05/X/NZ4/00037

Na podstawie art. 33 ust. 1 ustawy z dnia 30 kwietnia 2010 r. o Narodowym Centrum Nauki (t.j. Dz.U. z 2019 r. poz. 1384) po rozpatrzeniu wniosku nr rejestracyjny 2021/05/X/NZ4/00037, który złożył/a/o: Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie w ramach konkursu MINIATURA 5 na działanie naukowe

przyznaję

podmiotowi będącemu wnioskodawcą:

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

REGON: 510884205

środki finansowe w wysokości: **49 060 zł** (słownie: czterdzieści dziewięć tysięcy sześćdziesiąt zł),

na realizację działania naukowego

nr rejestracyjny 2021/05/X/NZ4/00037

pt. Charakterystyka wybranych białek prognostycznych i predykcyjnych we włókniamięsakach poiniekcyjnych u kotów.

Działanie naukowe realizować będzie Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, **Wydział Medycyny Weterynaryjnej.**

Osobą realizującą działanie będzie Pan **dr Mateusz Mikiewicz.**



UNIwersytet
WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE

REKTOR

dr hab. Jerzy A. PRZYBOROWSKI, prof. UWM

Olsztyn, dnia 29.11.2024 r.

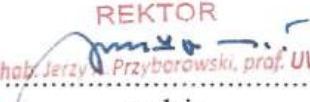
Pan
dr wet. Mateusz Mikiewicz
Katedra Anatomii Patologicznej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej

**Decyzja w sprawie przyznania finansowania projektu badawczego
„Naukowy Grant Rektora” – edycja III**

Działając na podstawie § 3 ust. 2 pkt. 8 Regulaminu konkursu na Naukowy Grant Rektora – edycja III, wprowadzonego Zarządzeniem Nr 72/2024 Rektora Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z dnia 23 sierpnia 2024 roku i w związku z rekomendacją Komisji ds. oceny Naukowych Grantów Rektora, przyznaję Panu finansowanie projektu badawczego pt.: „Ocena ekspresji wybranych cytokin i białek regulatorowych we włókniakomięsach poiniekcyjnych u kotów - badania wstępne” w wysokości 40 000 zł (słownie: czterdzieści tysięcy złotych).

Podstawą realizacji projektu badawczego są zapisy Regulaminu konkursu na Naukowy Grant Rektora – edycja III, dostępne na stronie <https://bip.uwm.edu.pl/artykuly/zarzadzenia-rektora/zarzadzenia-rektora-72-2024/>

Do ewidencjonowania kosztów finansowych zostało utworzone subkonto finansowe o nr 15.122.002-110

REKTOR

dr hab. Jerzy Przyborowski, prof. UWM
podpis

Do wiadomości otrzymują:

- 1) Dziekan Wydziału
- 2) Przewodniczący Rady Naukowej Dyscypliny

Dokumentacja uzyskania nagród i wyróżnień

Davis-Thompson DVM
Foundation
6241 Formoor Lane
Gurnee, IL 60031-4757 USA

1-847-367-4359
Fax: 847-247-1869
info@cldavis.org

29th August 2017

Dear Mateusz:

Congratulations on being awarded a Scholarship to attend the Davis-Thompson DVM Foundation European Division Symposium in Lyon, 29-30th August 2017.

The award takes the form of free registration for the meeting and €400 towards travel and accommodation.

This year we had one of our highest number of applications for the Scholarships and your application was judged by the European Board to be amongst the strongest.

Once again, many congratulations, and I hope you enjoy the meeting.



Dr Simon L Priestnall
Treasurer & Member of the Board
Davis-Thompson DVM Foundation, European Division



NAGRODA

ZESPOŁOWA

REKTORA

Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego
w Olsztynie

III STOPNIA

PRZYZNANA ZOSTAŁA

PANU

LEK. WET. MATEUSZOWI MIKIEWICZOWI

ZA OSIĄGNIĘCIA W DZIEDZINIE

NAUKOWEJ

Olsztyn, 1 grudnia 2018 roku

REKTOR

prof. dr hab. Ryszard J. Górecki

NAGRODA REKTORA

UNIWERSYTETU WARMIŃSKO-MAZURSKIEGO W OLSZTYNIE



PRZYZNANA PANU

DR. WET.

MATEUSZOWI MIKIEWICZOWI

ZA WYRÓŻNIAJĄCE SIĘ PUBLIKACJE
NAUKOWE WYDANE W 2023 ROKU

Z wyrazami szacunku,

REKTOR

Jerzy A. Przyborowski

Olsztyn, 27.11.2024

Dane naukometryczne

Olsztyn, 26.03.2025 r.

dr wet. Mateusz Mikiewicz
Katedra Anatomii Patologicznej
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

**Analiza bibliometryczna dorobku naukowego autorstwa
dr. wet. Mateusza Mikiewicza
przygotowana w związku z postępowaniem habilitacyjnym**

1) Analiza cytowań:

Lp.	Rok	Tytuł publikacji / Źródło	Liczba cytowań w bazie Web of Science CC	Liczba cytowań w bazie Scopus
1	2023	Metallothionein expression in feline injection site fibrosarcomas <i>BMC Veterinary Research</i>	5	5
2	2023	Fatigue in Inflammatory Joint Diseases <i>International Journal of Molecular Sciences</i>	5	6
3	2023	Effects of Bee Pollen on Growth Performance, Intestinal Microbiota and Histomorphometry in African Catfish <i>Animals</i>	14	15
4	2022	Fatal Acute Heart Failure in the Course of Macrophage Activation Syndrome: Case Report and Literature Review <i>Journal of Clinical Medicine</i>	2	1
5	2022	Cutaneous and subcutaneous tumours of small pet mammal - retrospective study of 256 cases (2014-2021) <i>Animals</i>	14	15
6	2021	Mutations of p53 gene in canine sweat gland carcinomas probably associated with UV radiation <i>Journal of Veterinary Research</i>	1	2
7	2021	Effective Microorganisms (EM) Improve Internal Organ Morphology, Intestinal Morphometry and Serum Biochemical Activity in Japanese Quails Under Clostridium perfringens Challenge	2	2

		<i>Molecules</i>		
8	2020	Effect of feeding barbel larvae (<i>Barbus barbus</i> (L, 1758)) <i>Artemia</i> sp. nauplii enriched with PUFAs on their growth and survival rate, blood composition, alimentary tract histological structure and body chemical composition <i>Aquaculture Reports</i>	19	24
9	2019	Diagnostic immunohistochemistry for canine cutaneous round cell tumours - retrospective analysis of 60 cases <i>Folia Histochemica et Cytobiologica</i>	10	10
10	2019	Canine and Feline Oral Cavity Tumours and Tumour-like Lesions: a Retrospective Study of 486 Cases (2015-2017) <i>Journal of Comparative Pathology</i>	41	51
11	2019	Influence of simvastatin on hepatocytes - histopathological and immunohistochemical study <i>Polish Journal of Veterinary Sciences</i>	1	2
12	2018	<i>Dirofilaria repens</i> - an etiological factor or an incidental finding in cytologic and histopathologic biopsies from dogs <i>Veterinary Clinical Pathology</i>	7	11
13	2017	Effect of feed supplementation with kynurenic acid on the morphology of the liver, kidney and gills in rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i> Walbaum, 1792), healthy and experimentally infected with <i>Yersinia ruckeri</i> <i>Journal of Fish Diseases</i>	13	14
14	2017	Influence of long-term, high-dose dexamethasone administration on proliferation and apoptosis in porcine hepatocytes <i>Research in Veterinary Science</i>	14	14
15	2016	Epidemiological and histopathological analysis of 40 apocrine sweat gland carcinomas in dogs: a retrospective study <i>Journal of Veterinary Research</i>	2	3
16	2016	Prostaglandin E ₂ exerts the proapoptotic and antiproliferative effects on bovine NK cells <i>Research in Veterinary Science</i>	2	1
17	2016	I κ B kinase β inhibitor, IMD-0354, prevents allergic asthma in a mouse model through inhibition of CD4 ⁺ effector T cell responses in the lung-draining mediastinal lymph nodes <i>European Journal of Pharmacology</i>	11	12
18	2016	Histopathological studies of the heart in three lines of broiler chickens <i>British Poultry Science</i>	6	7
19	2016	Morphology and immunoreactivity of canine and feline extramedullary plasmacytomas <i>Polish Journal of Veterinary Sciences</i>	10	11
20	2016	Safety of the long-term application of QuikClot Combat Gauze, ChitoGauze PRO and Celox Gauze in a femoral artery injury model in swine - a preliminary study	15	17



		<i>Polish Journal of Veterinary Sciences</i>		
21	2015	<i>Effect of low-energy laser irradiation and antioxidant supplementation on cell apoptosis during skeletal muscle post-injury regeneration in pigs</i> <i>Polish Journal of Veterinary Sciences</i>	5	5
22	2015	Aggressive, solid variant of alveolar rhabdomyosarcoma with cutaneous involvement in a juvenile Labrador Retriever <i>Journal of Comparative Pathology</i>	6	9
Suma cytowań			205	237

Podsumowanie cytowań:

- Raport cytowań przeprowadzony w bazie **Web of Science Core Collection** w dniu 26.03.2025:

liczba prac cytowanych = 22	liczba cytowań = 205	liczba cytowań bez autocytowań = 198	Index Hirscha = 10
-----------------------------	----------------------	--------------------------------------	--------------------

- Raport cytowań przeprowadzony w bazie **Scopus** w dniu 26.03.2025:

liczba prac cytowanych = 22	liczba cytowań = 237	liczba cytowań bez autocytowań = 206	Index Hirscha = 10
-----------------------------	----------------------	--------------------------------------	--------------------

2) Punktacja:

Typ publikacji	Łączna liczba prac	Liczba prac z IF	Liczba prac z punktacją MNiSW	Łączna liczba prac z IF	Łączna wartość punktacji MNiSW
Abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat	8	0	0	0	0
Artykuł w czasopiśmie polskim	15	9	12	6.211	437
Artykuł w czasopiśmie zagranicznym	21	21	21	46.516	1740
Streszczenie w materiałach konferencyjnych (komunikat, poster)	5	0	0	0	0
Razem:	49	30	33	52.727	2177

3) Wykaz publikacji:

1.

IDT: 0000094429.

Rok: 2025

Autorzy: Mikiewicz Mateusz, Otrocka-Domagala Iwona

Tytuł oryginału: Immunohistochemical analysis of smooth muscle actin and CD31 in feline post-injection site fibrosarcomas: association with tumour grade, vascular density, and multinucleated giant cells

Czasopismo: BMC Veterinary Research

Opis fizyczny: 2025, 21, s. 1-9 ; bibliogr. 52 poz. ; nr art. 191

Adres url: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-025-04637-8>

p-ISSN: 1746-6148

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1186/s12917-025-04637-8

open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED

open-access-licence: CC-BY-NC-ND

open-access-release-time: AT_PUBLICATION

open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL

Data ukazania się publikacji: 2025.03.21

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Impact Factor: 2.300

Punkcja MNiSW: 140.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;zoo technika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: BMC Veterinary Research

Afiliacja: Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Otrocka-Domagala Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05

2.

IDT: 0000091150.

Rok: 2024

Autorzy: Nowosad Joanna, Kujawa Roman, Sherzada Shahid, Kucharczyk Dariusz, Mikiewicz Mateusz, Dryl Katarzyna, Kapusta Andrzej, Łuczyńska Joanna, Abdel-Latif Hany M.R.

Tytuł oryginału: Histomorphological and Dynamical Changes in Female River Lampreys during Maturation under Controlled Conditions as a Part of Lamprey Restoration Programs

Czasopismo: Animals

Opis fizyczny: 2024, 14 (17), s. 1-14 ; bibliogr. 60 poz. ; nr art. 2516

Adres url: <https://www.mdpi.com/2076-2615/14/17/2516>

p-ISSN: 2076-2615

Język publikacji: ENG

DOI: 10.3390/ani14172516

open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED

open-access-licence: CC-BY

open-access-release-time: AT_PUBLICATION

open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL

Data ukazania się publikacji: 2024.08.30

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 2.700

Punktacja MNiSW: 100.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: technologia żywności i żywienia;zootechnika i rybactwo;biotechnologia;nauki biologiczne;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Animals

Afiliacja: Nowosad Joanna [] 0000-0001-9491-0141 3976696;000;000, Kujawa Roman [*] 0000-0003-0925-1204 5e70921c878c28a0473900a5;411;01, Sherzada Shahid [];000;000, Kucharczyk Dariusz [*] 0000-0002-0889-0656 5e70921c878c28a0473900a3;993;01, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Dryl Katarzyna [];000;000, Kapusta Andrzej [] 1600935;000;000, Łuczyńska Joanna [*] 0000-0002-4865-683X 5e709217878c28a04738fd78;112;07, Abdel-Latif Hany M.R. [];000;000

3.

IDT: 0000091060.

Rok: 2024

Autorzy: Paździor-Czapula Katarzyna, Mikiewicz Mateusz, Fiedorowicz Joanna, Otrocka-Domagała Iwona

Tytuł oryginału: Mammary and reproductive tract tumours and tumour-like lesions of 286 small pet mammals: a retrospective study

Czasopismo: Journal of Comparative Pathology

Opis fizyczny: 2024, 213, s. 46-58 ; bibliogr. 88 poz.

p-ISSN: 0021-9975

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1016/j.jcpa.2024.07.002

open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED

open-access-licence: CC-BY

open-access-release-time: AT_PUBLICATION

open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL

Data ukazania się publikacji: 2024.08.21

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 0.800

Punktacja MNiSW: 100.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki medyczne;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY

Afiliacja: Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Fiedorowicz Joanna [*] 0000-0002-4857-9491 634a1b297523402e3412716e;997;05, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05

4.

IDT: 0000090679.

Rok: 2024

Autorzy: Mikiewicz Mateusz, Paździor-Czapula Katarzyna, Fiedorowicz Joanna, Otrocka-Domagała Iwona

Tytuł oryginału: Expression of programmed cell death protein 1 and programmed cell death ligand 1 in feline injection site fibrosarcomas

Czasopismo: Research in Veterinary Science

Opis fizyczny: 2024, 176, s. 1-9 ; bibliogr. 53 poz. ; nr art. 105350

Adres url: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528824002169?via%3Dihub>

p-ISSN: 0034-5288

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1016/j.rvsc.2024.105350

Data ukazania się publikacji: 2024.07.15

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Scopus ; Web of Science Core Collection

Impact Factor: 2.200

Punktacja MNiSW: 100.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: nauki farmaceutyczne;zootechnika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE

Afiliacja: Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Fiedorowicz Joanna [*] 0000-0002-4857-9491

634a1b297523402e3412716e;997;05, Otrocka-Domagala Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05

5.

IDT: 0000082605.

Rok: 2023

Autorzy: Nowosad Joanna, Jasiński Szymon, Arciuch-Rutkowska Martyna, Abdel-Latif Hany M.R., Wróbel Marcin, Mikiewicz Mateusz, Zielonka Łukasz, Kotsyumbas Ihor Y., Muzyka Victor P., Brezryn Oksana M., Dietrich Grzegorz, Kucharczyk Dariusz

Tytuł oryginału: Effects of Bee Pollen on Growth Performance, Intestinal Microbiota and Histomorphometry in African Catfish

Czasopismo: Animals

Opis fizyczny: 2023, 13 (1), s. 1-16 ; bibliogr. 77 poz. ; art. nr 132

Adres url: <https://www.mdpi.com/2076-2615/13/1/132>

p-ISSN: 2076-2615

Język publikacji: ENG

DOI: 10.3390/ani13010132

open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED

open-access-licence: CC-BY

open-access-release-time: AT_PUBLICATION

open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL

Data ukazania się publikacji: 2022.12.29

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection Scopus

Impact Factor: 2.700

Punktacja MNiSW: 100.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: technologia żywności i żywienia;zootechnika i rybactwo;biotechnologia;nauki biologiczne;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Animals

Afiliacja: Nowosad Joanna [] 0000-0001-9491-0141 3976696;000;000, Jasiński Szymon [*];993;01, Arciuch-Rutkowska Martyna [*] 0000-0003-0603-4474 602e27249543c7410626ed68;411;01, Abdel-Latif Hany M.R. [];000;000, Wróbel Marcin [*];997;05,

Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Zielonka Łukasz [*] 0000-0003-0983-5592

5e70921b878c28a04738ffa6;082;05, Kotsyumbas Ihor Y. [];000;000, Muzyka Victor P. [];000;000, Brezryn Oksana M. [];000;000,

Dietrich Grzegorz J. [];000;000, Kucharczyk Dariusz [*] 0000-0002-0889-0656 5e70921c878c28a0473900a3;993;01

6.

IDT: 0000083385.

Rok: 2023

Autorzy: Mikiewicz Mateusz, Paździor-Czapula Katarzyna, Fiedorowicz Joanna, Gesek Michał, Otrocka-Domagala Iwona

Tytuł oryginału: Metallothionein expression in feline injection site fibrosarcomas

Czasopismo: BMC Veterinary Research

Opis fizyczny: 2023, 19 (1), s. 1-8 ; bibliogr. 47 poz. ; nr art.: 42

Adres url: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-023-03604-5>

p-ISSN: 1746-6148

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1186/s12917-023-03604-5

open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED

open-access-licence: CC-BY

open-access-release-time: AT_PUBLICATION

open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL

Data ukazania się publikacji: 2023.02.14

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 2.300

Punktacja MNiSW: 140.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;zootechnika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: BMC Veterinary Research

Afiliacja: Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Fiedorowicz Joanna [*] 0000-0002-4857-9491

634a1b297523402e3412716e;997;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05

7.

IDT: 0000085595.

Rok: 2023

Autorzy: Chmielewski Grzegorz, Majewski Michał S., Kuna Jakub, Mikiewicz Mateusz, Krajewska-Włodarczyk Magdalena

Tytuł oryginału: Fatigue in Inflammatory Joint Diseases

Czasopismo: International Journal of Molecular Sciences

Opis fizyczny: 2023, 24 (15), s. 1-16 ; bibliogr. 108 poz. ; nr art. 12040

Adres url: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/15/12040>

p-ISSN: 1422-0067

Język publikacji: ENG

DOI: 10.3390/ijms241512040

open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED

open-access-licence: CC-BY

open-access-release-time: AT_PUBLICATION

open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL

Data ukazania się publikacji: 2023.07.31

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 4.900

Punktacja MNiSW: 140.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;inżynieria chemiczna;inżynieria materiałowa;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o kulturze fizycznej;nauki o zdrowiu;nauki leśne;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;zootechnika i rybactwo;biotechnologia;nauki biologiczne;nauki chemiczne;nauki fizyczne;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES

Afiliacja: Chmielewski Grzegorz [*] 0000-0003-4498-7532 5f896e44085dcb410a25f0b6;355;23, Majewski Michał S. [*] 0000-0001-6304-0673 5e70921c878c28a047390128;336;23, Kuna Jakub [*] 0000-0002-4216-9731 5e709435878c28a0473b829e;479;23, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Krajewska-Włodarczyk Magdalena [*] 0000-0002-7857-347X 5e709409878c28a0473b53c6;479;23

8.

IDT: 0000081714.

Rok: 2022

Autorzy: Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, Fiedorowicz Joanna, Mikiewicz Mateusz, Piotrowska Agnieszka, Gesek Michał

Tytuł oryginalny: Cutaneous and subcutaneous tumours of small pet mammal - retrospective study of 256 cases (2014-2021)

Czasopismo: Animals

Opis fizyczny: 2022, 12 (8), s. 1-16 ; bibliogr. 42 poz. ; art. nr 965

Adres url: <https://www.mdpi.com/2076-2615/12/8/965>

p-ISSN: 2076-2615

Język publikacji: ENG

DOI: 10.3390/ani12080965

open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED

open-access-licence: CC-BY

open-access-release-time: AT_PUBLICATION

open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL

Data ukazania się publikacji: 2022.04.08

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca kazuistyczna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 3.000

Punktacja MNiSW: 100.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: technologia żywności i żywienia;zootechnika i rybactwo;biotechnologia;nauki biologiczne;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Animals

Afiliacja: Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Fiedorowicz Joanna [*] 0000-0002-4857-9491 634a1b297523402e3412716e;997;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Piotrowska Agnieszka [*];997;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05

9.

IDT: 0000080356.

Rok: 2022

Autorzy: Kuna Jakub, Chmielewski Grzegorz, Gruchała Marcin, Mikiewicz Mateusz, Ręcki Przemysław, Krajewska-Włodarczyk Magdalena

Tytuł oryginalny: Fatal Acute Heart Failure in the Course of Macrophage Activation Syndrome: Case Report and Literature Review

Czasopismo: Journal of Clinical Medicine

Opis fizyczny: 2022, 11 (14), s. 1-9 ; bibliogr. 12 poz. ; nr art. 4208

Adres url: <https://www.mdpi.com/2077-0383/11/14/4208>

p-ISSN: 2077-0383

Język publikacji: ENG

DOI: 10.3390/jcm11144208

open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED

open-access-licence: CC-BY

open-access-release-time: AT_PUBLICATION

open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL

Data ukazania się publikacji: 2022.07.21

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca przeglądowa

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 3.900

Punktacja MNiSW: 140.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o kulturze fizycznej;nauki o zdrowiu;nauki o rodzinie;technologia żywności i żywienia;biotechnologia;nauki chemiczne;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Journal of Clinical Medicine

Afiliacja: Kuna Jakub [*] 0000-0002-4216-9731 5e709435878c28a0473b829e;355;23, Chmielewski Grzegorz [*] 0000-0003-4498-7532 5f896e44085dcb410a25f0b6;355;23, Gruchała Marcin [];000;000, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Ręcki Przemysław [];000;000, Krajewska-Włodarczyk Magdalena [*] 0000-0002-7857-347X 5e709409878c28a0473b53c6;479;23

10.

IDT: 0000078022.

Rok: 2021

Autorzy: Jasik Agnieszka, Kycko Anna, Olech Monika, Wyróstek Krzysztof, Śmiech Anna, Łopuszyński Wojciech, Otrocka-Domagała Iwona, Mikiewicz Mateusz, Dolka Izabella

Tytuł oryginału: Mutations of p53 gene in canine sweat gland carcinomas probably associated with UV radiation

Czasopismo: Journal of Veterinary Research

Opis fizyczny: 2021, 65 (4), s. 519-526 ; bibliogr. 66 poz.

Adres url: <https://www.sciendo.com/article/10.2478/jvetres-2021-0070>

p-ISSN: 2450-7393

Język publikacji: ENG

DOI: 10.2478/jvetres-2021-0070

open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED

open-access-licence: CC-BY-NC-ND

open-access-release-time: AFTER_PUBLICATION

open-access-months: 1

open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL

Data ukazania się publikacji: 2022.01.03

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 2.058

Punktacja MNiSW: 140.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: technologia żywności i żywienia;zootechnika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Journal of Veterinary Research

Afiliacja: Jasik Agnieszka [];000;000, Kycko Anna [];000;000, Olech Monika [];000;000, Wyróstek Krzysztof [];000;000, Śmiech Anna [];000;000, Łopuszyński Wojciech [];000;000, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Dolka Izabella [];000;000

11.

IDT: 0000074407.

Rok: 2021

Autorzy: Michalska Korina, Gesek Michał, Sokół Rajmund, Murawska Daria, Mikiewicz Mateusz, Chłódowska Agnieszka

Tytuł oryginalu: Effective Microorganisms (EM) Improve Internal Organ Morphology, Intestinal Morphometry and Serum Biochemical Activity in Japanese Quails Under Clostridium perfringens Challenge

Czasopismo: Molecules

Opis fizyczny: 2021, 26 (9), s. 1-17 ; bibliogr. 36 poz. ; nr art. 2786

p-ISSN: 1420-3049

Język publikacji: ENG

DOI: 10.3390/molecules26092786

open-access-text-version: FINAL_PUBLISHED

open-access-licence: CC-BY

open-access-release-time: AFTER_PUBLICATION

open-access-months: 1

open-access-article-mode: OPEN_JOURNAL

Data ukazania się publikacji: 2021.05.10

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 4.927

Punktacja MNiSW: 140.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna; inżynieria chemiczna; inżynieria materiałowa; biologia medyczna; nauki farmaceutyczne; nauki medyczne; nauki o zdrowiu; nauki leśne; rolnictwo i ogrodnictwo; technologia żywności i żywienia; biotechnologia; nauki biologiczne; nauki chemiczne; nauki fizyczne; weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: MOLECULES

Afiliacja: Michalska Korina [*] 0000-0001-8788-4934 5e7093e1878c28a0473b27e3;997;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Sokół Rajmund [*] 0000-0001-6087-2351 5e70921b878c28a04738ffbc;081;05, Murawska Daria [*] 0000-0002-4667-3185 5e709217878c28a04738fc57;011;01, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Chłódowska Agnieszka [*];997;05

12.

IDT: 0000069866.

Rok: 2020

Autorzy: Prusińska Maja, Nowosad Joanna, Jarmołowicz Sylwia, Mikiewicz Mateusz, Duda Arkadiusz, Wiszniewski Grzegorz, Sikora Mateusz, Biegaj Mateusz, Samselska Agnieszka, Arciuch-Rutkowska Martyna, Targońska Katarzyna, Otrocka-Domagala Iwona, Kucharczyk Dariusz

Tytuł oryginalu: Effect of feeding barbel larvae (Barbus barbus (L, 1758)) Artemia sp. nauplii enriched with PUFAs on their growth and survival rate, blood composition, alimentary tract histological structure and body chemical composition

Czasopismo: Aquaculture Reports

Opis fizyczny: 2020, 18, s. 1-8 ; bibliogr. 59 poz. ; art. nr 100492

Adres url: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352513420305822>

p-ISSN: 2352-5134

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1016/j.aqrep.2020.100492

Data ukazania się publikacji: 2020.10.01

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 3.216

Punktacja MNiSW: 100.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria środowiska, górnictwo i energetyka; technologia żywności i żywienia; zootechnika i rybactwo; biotechnologia; nauki biologiczne; weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Aquaculture Reports

Afiliacja: Prusińska Maja [];000;000, Nowosad Joanna [*] 0000-0001-9491-0141 3976696;881;08, Jarmołowicz Sylwia [];000;000, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Duda Arkadiusz [];000;000, Wiszniewski Grzegorz [];000;000, Sikora Mateusz [*];438;26, Biegaj Mateusz [*];438;26, Samselska Agnieszka [];000;000, Arciuch-Rutkowska Martyna [] 0000-0003-0603-4474 602e27249543c7410626ed68;000;000, Targońska Katarzyna [*] 0000-0002-6273-2587 5e70921c878c28a0473900b6;411;01, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Kucharczyk Dariusz [*] 0000-0002-0889-0656 5e70921c878c28a0473900a3;993;01

13.

IDT: 0000069022.

Rok: 2020

Autorzy: Mikiewicz Mateusz, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Dziubińska-Bartylak Paula, Otrocka-Domagała Iwona

Tytuł oryginału: Intraocular chondrosarcoma in a rabbit

Czasopismo: Journal of Comparative Pathology

Opis fizyczny: 2020, 179, s. 41-44 ; bibliogr. 21 poz.

p-ISSN: 0021-9975

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1016/j.jcpa.2020.06.013

Data ukazania się publikacji: 2020.08.01

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Scopus ; Web of Science Core Collection

Impact Factor: 1.311

Punktacja MNiSW: 100.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki medyczne;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY

Afiliacja: Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Dziubińska-Bartylak Paula [];000;000, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05

14.

IDT: 0000064976.

Rok: 2019

Autorzy: Paździor-Czapula Katarzyna, Mikiewicz Mateusz, Gesek Michał, Zwoliński Cezary, Otrocka-Domagała Iwona

Tytuł oryginału: Diagnostic immunohistochemistry for canine cutaneous round cell tumours - retrospective analysis of 60 cases

Czasopismo: Folia Histochemica et Cytobiologica

Opis fizyczny: 2019, 57 (3), s. 146-154 ; bibliogr. 40 poz.

p-ISSN: 0239-8508

Język publikacji: ENG

DOI: 10.5603/FHC.a2019.0016

Data ukazania się publikacji: 2020.01.10

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Scopus ; Web of Science Core Collection

Impact Factor: 0.854

Punktacja MNiSW: 70.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;zooteknika i rybactwo;biotechnologia;nauki biologiczne;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: FOLIA HISTOCHEMICA ET CYTOBIOLOGICA

Afiliacja: Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Zwoliński Cezary [*];993;01, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05

15.

IDT: 0000064977.

Rok: 2019

Autorzy: Mikiewicz Mateusz, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Lemishevskiy V., Otrocka-Domagała Iwona

Tytuł oryginału: Canine and Feline Oral Cavity Tumours and Tumour-like Lesions: a Retrospective Study of 486 Cases (2015-2017)

Czasopismo: Journal of Comparative Pathology

Opis fizyczny: 2019, 172, s. 80-87 ; bibliogr. 49 poz.

p-ISSN: 0021-9975

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1016/j.jcpa.2019.09.007

Data ukazania się publikacji: 2020.01.10

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca przeglądowa

Inne bazy podające opis: Scopus ; Web of Science Core Collection

Impact Factor: 0.994

Punktacja MNiSW: 100.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki medyczne;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY

Afiliacja: Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Lemishevskiy V. [];000;000, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05

16.

IDT: 0000058684.

Rok: 2019

Autorzy: Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagała Iwona, Gesek Michał, Mikiewicz Mateusz, Pawlik Marek

Tytuł oryginału: Expression of Ki67 in canine cutaneous histiocytoma

Czasopismo: Journal of Comparative Pathology

Opis fizyczny: 2019, 166, s. 123-123

Uwagi: ESVP, ESTP and ECVP Proceedings 2017

Adres url: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997518303815>

p-ISSN: 0021-9975

Język publikacji: ENG

Data ukazania się publikacji: 2019.01.22

Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat

Charakt. merytoryczna: varia

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki medyczne;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY

Afiliacja: Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Pawlik Marek [*];071;05

17.

IDT: 0000058685.

Rok: 2019

Autorzy: Otrocka-Domagała Iwona, Mikiewicz Mateusz, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał

Tytuł oryginalu: Extraskeletal myxoid-type chondrosarcoma in a rat

Czasopismo: Journal of Comparative Pathology

Opis fizyczny: 2019, 166, s. 148-148

Uwagi: ESVP, ESTP and ECVF Proceedings 2017

Adres url: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997518304687>

p-ISSN: 0021-9975

Język publikacji: ENG

Data ukazania się publikacji: 2019.01.22

Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat

Charakt. merytoryczna: varia

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki medyczne;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY

Afiliacja: Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05

18.

IDT: 0000064980.

Rok: 2019

Autorzy: Mikiewicz Mateusz, Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna

Tytuł oryginalu: Influence of simvastatin on hepatocytes - histopathological and immunohistochemical study

Czasopismo: Polish Journal of Veterinary Sciences

Opis fizyczny: 2019, 22 (2), s. 263-270 ; bibliogr. 23 poz.

p-ISSN: 1505-1773

Język publikacji: ENG

DOI: 10.24425/pjvs.2019.127095

Data ukazania się publikacji: 2019.12.30

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Scopus ; Web of Science Core Collection

Impact Factor: 0.516

Punktacja MNiSW: 100.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;zooteknika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: POLISH JOURNAL OF VETERINARY SCIENCES

Afiliacja: Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05

19.

IDT: 0000045264.

Rok: 2018

Autorzy: Gesek Michał, Stenzel Tomasz, Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, Mikiewicz Mateusz, Michalska Korina, Koncicki Andrzej

Tytuł oryginalu: Immunohistochemical characterization and proliferation activity of cutaneous leiomyosarcoma with multiple

visceral metastases in a fantail pigeon

Czasopismo: Journal of Comparative Pathology

Opis fizyczny: 2018, 158, s. 145-145

Uwagi: 3rd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, 35th Meeting of the ESVP, 15th Meeting of the ESTP, 28th Meeting of the ECVP. 30th August - 2nd September 2017, Lyon, France

p-ISSN: 0021-9975

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1016/j.jcpa.2017.10.157

Liczba arkuszy: 0.05

Data ukazania się publikacji: 2018.01.30

Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat

Charakt. merytoryczna: varia

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki

medyczne;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY

Afiliacja: Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Stenzel Tomasz [*] 0000-0001-6268-9841 5e70921b878c28a04738ffa0;074;05, Otrocka-Domagala Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Michalska Korina [*] 0000-0001-8788-4934 5e7093e1878c28a0473b27e3;997;05, Koncicki Andrzej [*] 0000-0001-5809-9320 5e70921b878c28a04738ff8c;074;05

20.

IDT: 0000045263.

Rok: 2018

Autorzy: Mikiewicz Mateusz, Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagala Iwona, Gesek Michał, Myrdek Patrycja

Tytuł oryginału: Oral cavity lesions in dogs: a retrospective study of 136 cases

Czasopismo: Journal of Comparative Pathology

Opis fizyczny: 2018, 158, s. 122-122

Uwagi: 3rd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, 35th Meeting of the ESVP, 15th Meeting of the ESTP, 28th Meeting of the ECVP. 30th August - 2nd September 2017, Lyon, France

p-ISSN: 0021-9975

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1016/j.jcpa.2017.10.085

Liczba arkuszy: 0.05

Data ukazania się publikacji: 2018.01.30

Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat

Charakt. merytoryczna: varia

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki

medyczne;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY

Afiliacja: Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Otrocka-Domagala Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Myrdek Patrycja [*];997;05

21.

IDT: 0000041838.

Rok: 2018

Autorzy: Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagala Iwona, Gesek Michał, Mikiewicz Mateusz

Tytuł oryginału: Canine oral cavity T-cell lymphoma- histopathological and immunohistochemical study

Czasopismo: Medycyna Weterynaryjna

Opis fizyczny: 2018, 74 (1), s. 70-72 ; bibliogr. 6 poz.

p-ISSN: 0025-8628

Język publikacji: ENG

DOI: 10.21521/mw.5826

Data ukazania się publikacji: 2018.01.05

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca kazuistyczna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 0.280

Punkcja MNiSW: 15.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: nauki medyczne;technologia żywności i żywienia;zooteknika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Medycyna Weterynaryjna-Veterinary Medicine-Science and Practice

Afiliacja: Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Otrocka-Domagała Iwona [*]

0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068

5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05

22.

IDT: 0000045254.

Rok: 2018

Autorzy: Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagała Iwona, Myrdek Patrycja, Mikiewicz Mateusz, Gesek Michał

Tytuł oryginału: Dirofilaria repens - an etiological factor or an incidental finding in cytologic and histopathologic biopsies from dogs

Czasopismo: Veterinary Clinical Pathology

Opis fizyczny: 2018, 47 (2), s. 307-311 ; bibliogr. 24 poz.

p-ISSN: 0275-6382

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1111/vcp.12597

Data ukazania się publikacji: 2018.02.28

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Scopus ; Web of Science Core Collection

Impact Factor: 0.948

Punkcja MNiSW: 35.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: zooteknika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: VETERINARY CLINICAL PATHOLOGY

Afiliacja: Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Otrocka-Domagała Iwona [*]

0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Myrdek Patrycja [*];997;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-

2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05

23.

IDT: 0000029670.

Rok: 2017

Autorzy: Kaczorek Edyta, Terech-Majewska Elżbieta, Szarek Józef, Mikiewicz Mateusz, Schulz Patrycja, Małaczewska Joanna, Wójcik Roman M., Pajdak Joanna, Siwicki Andrzej K.

Tytuł oryginału: The influence of feed supplementation with kynurenine acid (KYNA) on the gills in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) infected experimentally with Yersinia ruckeri

Czasopismo: Journal of Comparative Pathology

Opis fizyczny: 2017, 156 (1), s. 93

p-ISSN: 0021-9975

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1016/j.jcpa.2016.11.120

Data ukazania się publikacji: 2017.01.31

Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat

Charakt. merytoryczna: varia

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki medyczne;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY

Afiliacja: Kaczorek-Łukowska Edyta [*] 0000-0002-9962-0917 5e70945e878c28a0473bb93c;997;05, Terech-Majewska Elżbieta [*] 0000-0001-9093-0049 5e70921b878c28a04738ff71;076;05, Szarek Józef [*] 905116;084;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Schulz Patrycja [*];997;05, Małaczewska Joanna [*] 0000-0002-9693-6692 5e70921b878c28a04738ff8e;080;05, Wójcik Roman M. [*] 0000-0002-7405-6328 5e70921b878c28a04738ffaa;080;05, Pajdak-Czaus Joanna [*] 0000-0003-2289-2241 5e7092d5878c28a04739daa4;997;05, Siwicki Andrzej K. [*] 0000-0002-7372-2181 5e70921b878c28a04738ff8b;080;05

24.

IDT: 0000025693.

Rok: 2017

Autorzy: Kaczorek Edyta, Szarek Józef, Mikiewicz Mateusz, Terech-Majewska Elżbieta, Schulz Patrycja, Małaczewska Joanna, Wójcik Roman M., Siwicki Andrzej K.

Tytuł oryginału: Effect of feed supplementation with kynurenic acid on the morphology of the liver, kidney and gills in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), healthy and experimentally infected with *Yersinia ruckeri*

Czasopismo: Journal of Fish Diseases

Opis fizyczny: 2017, 40 (7), s. 873-884 ; bibliogr. 39 poz.

p-ISSN: 0140-7775

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1111/jfd.12567

Data ukazania się publikacji: 2016.09.30

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Scopus ; Web of Science Core Collection

Impact Factor: 2.004

Punktacja MNiSW: 35.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: zootechnika i rybactwo;biotechnologia;nauki biologiczne;nauki chemiczne;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF FISH DISEASES

Afiliacja: Kaczorek-Łukowska Edyta [*] 0000-0002-9962-0917 5e70945e878c28a0473bb93c;997;05, Szarek Józef [*] 905116;084;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Terech-Majewska Elżbieta [*] 0000-0001-9093-0049 5e70921b878c28a04738ff71;076;05, Schulz Patrycja [*];997;05, Małaczewska Joanna [*] 0000-0002-9693-6692 5e70921b878c28a04738ff8e;080;05, Wójcik Roman M. [*] 0000-0002-7405-6328 5e70921b878c28a04738ffaa;080;05, Siwicki Andrzej K. [] 0000-0002-7372-2181 5e70921b878c28a04738ff8b;080;05

25.

IDT: 0000045242.

Rok: 2017

Autorzy: Mikiewicz Mateusz, Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, Rotkiewicz Tadeusz

Tytuł oryginału: Influence of long-term, high-dose dexamethasone administration on proliferation and apoptosis in porcine hepatocytes

Czasopismo: Research in Veterinary Science

Opis fizyczny: 2017, 112, s. 141-148 ; bibliogr. 46 poz.

p-ISSN: 0034-5288

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1016/j.rvsc.2017.03.018

Data ukazania się publikacji: 2017.06.30

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 1.616

Punktacja MNiSW: 35.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: nauki farmaceutyczne; zootechnika i rybactwo; biotechnologia; weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE

Afiliacja: Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Rotkiewicz Tadeusz [*];071;05

26.

IDT: 0000069399.

Rok: 2016

Autorzy: Kaczorek Edyta, Terech-Majewska Elżbieta, Szarek Józef, Mikiewicz Mateusz, Schulz Patrycja, Małaczewska Joanna, Wójcik Roman M., Pajdak Joanna, Siwicki Andrzej K.

Tytuł oryginału: The influence of feed supplementation with kynurenine acid (KYNA) on the gills in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected experimentally with *Yersinia ruckeri*

Tytuł całości: Abstract Book : 34th ESVP Meeting of the European Society of Veterinary Pathology : 27th ECVP Meeting of the European College of Veterinary Pathology : Bologna (Italy), September 7th-10th, 2016

Adres wydawniczy, liczba stron: Bologna : ESVP, 2016, s.182 ; nr abstr. 74

Uwagi: CD-ROM

Adres url: <http://opac.tib.eu/DB=5/LNG=EN/CLK?IKT=12&TRM=1006389385>

Konferencja/zjazd - tytuł: 34th ESVP Meeting of the European Society of Veterinary Pathology : 27th ECVP Meeting of the European College of Veterinary Pathology, ESVP, ECVP

Konferencja/zjazd - miejsce i data: Bologna, IT, 2016.09.07, 2016.09.10

Język publikacji: ENG

Liczba arkuszy: 0.05

Data ukazania się publikacji: 2016.12.15

Charakt. formalna: streszczenie w materiałach konferencyjnych (komunikat, poster)

Charakt. merytoryczna: varia

Afiliacja: Kaczorek-Lukowska Edyta [*] 0000-0002-9962-0917 5e70945e878c28a0473bb93c;997;05, Terech-Majewska Elżbieta [*] 0000-0001-9093-0049 5e70921b878c28a04738ff71;076;05, Szarek Józef [*] 905116;084;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Schulz Patrycja [*];997;05, Małaczewska Joanna [*] 0000-0002-9693-6692 5e70921b878c28a04738ff8e;080;05, Wójcik Roman M. [*] 0000-0002-7405-6328 5e70921b878c28a04738ffaa;080;05, Pajdak-Czaus Joanna [*] 0000-0003-2289-2241 5e7092d5878c28a04739daa4;997;05, Siwicki Andrzej K. [*] 0000-0002-7372-2181 5e70921b878c28a04738ff8b;080;05

27.

IDT: 0000011876.

Rok: 2016

Autorzy: Gesek Michał, Otrocka-Domagała Iwona, Sokół Rajmund, Paździor-Czapula Katarzyna, Lambert Barry D., Wiśniewska Anna, Żechowicz Maciej, Mikiewicz Mateusz, Korzeniowska Patrycja

Tytuł oryginału: Histopathological studies of the heart in three lines of broiler chickens

Czasopismo: British Poultry Science

Opis fizyczny: 2016, 57 (2), s. 219-226 ; bibliogr. 30 poz.

p-ISSN: 0007-1668

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1080/00071668.2016.1154505

Data ukazania się publikacji: 2016.03.01

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Scopus ; Web of Science Core Collection

Impact Factor: 0.884

Punktacja MNiSW: 30.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;technologia żywności i żywienia;zooteknika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: BRITISH POULTRY SCIENCE

Afiliacja: Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Sokół Rajmund [*] 0000-0001-6087-2351 5e70921b878c28a04738ffbc;081;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Lambert Barry D. [] ;000;000, Wiśniewska Anna [*] 0000-0001-7076-5445 5e70921c878c28a0473900cf;120;08, Żechowicz Maciej [*] 0000-0003-2841-0565 5e70921c878c28a047390131;232;17, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Korzeniowska Patrycja [*];997;05

28.

IDT: 0000011875.

Rok: 2016

Autorzy: Maślanka Tomasz, Otrocka-Domagała Iwona, Zuśka-Prot Monika, Mikiewicz Mateusz, Przybysz Jagoda, Jasiecka Agnieszka, Jaroszewski Jerzy J.

Tytuł oryginalu: IkB kinase β inhibitor, IMD-0354, prevents allergic asthma in a mouse model through inhibition of CD4⁺ effector T cell responses in the lung-draining mediastinal lymph nodes

Czasopismo: European Journal of Pharmacology

Opis fizyczny: 2016, 775, s. 78-85 ; bibliogr. 37 poz.

p-ISSN: 0014-2999

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.02.023

Data ukazania się publikacji: 2016.03.15

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 2.896

Punktacja MNiSW: 30.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;nauki o zdrowiu;nauki leśne;technologia żywności i żywienia;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY

Afiliacja: Maślanka Tomasz [*] 0000-0002-3807-0149 5e70921b878c28a04738ff91;077;05, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Zuśka-Prot Monika [*] 0000-0002-6682-629X;997;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Przybysz Jagoda [*];997;05, Jasiecka-Mikołajczyk Agnieszka [*] 0000-0002-7012-758X 5e709431878c28a0473b7ef1;997;05, Jaroszewski Jerzy J. [*] 0000-0001-8031-1869 5e70921b878c28a04738ff7b;077;05

29.

IDT: 0000012824.

Rok: 2016

Autorzy: Pajdak Joanna, Mikiewicz Mateusz, Schulz Patrycja, Kaczorek Edyta, Terech-Majewska Elżbieta
Tytuł oryginału: Histopathological lesions associated with metabolic bone disease in the central bearded dragon (*Pogona vitticeps*)
Czasopismo: Journal of Comparative Pathology
Opis fizyczny: 2016, 154 (1), s. 97
p-ISSN: 0021-9975
Język publikacji: ENG
DOI: 10.1016/j.jcpa.2015.10.098
Data ukazania się publikacji: 2016.01.01
Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat
Charakt. merytoryczna: varia
Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki medyczne;biotechnologia;weterynaria
Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY
Afiliacja: Pajdak-Czaus Joanna [*] 0000-0003-2289-2241 5e7092d5878c28a04739daa4;997;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Schulz Patrycja [*];997;05, Kaczorek-Łukowska Edyta [*] 0000-0002-9962-0917 5e70945e878c28a0473bb93c;997;05, Terech-Majewska Elżbieta [*] 0000-0001-9093-0049 5e70921b878c28a04738ff71;076;05

30.

IDT: 0000047318.

Rok: 2016

Autorzy: Kycko Anna, Jasik Agnieszka, Bocian Łukasz, Otrocka-Domagała Iwona, Mikiewicz Mateusz, Śmiech Anna, Łopuszyński Wojciech, Dolka Izabella, Nowak Marcin, Madej Janusz

Tytuł oryginału: Epidemiological and histopathological analysis of 40 apocrine sweat gland carcinomas in dogs: a retrospective study

Czasopismo: Journal of Veterinary Research

Opis fizyczny: 2016, 60 (1), 331-337 ; bibliogr. 19 poz.

Uwagi: do Vol. 59/2015 r. czasop. ukazywało się pod tyt.: Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy

p-ISSN: 2450-7393

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1515/jvetres-2016-0050

Data ukazania się publikacji: 2016.12.15

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Scopus ; Web of Science Core Collection

Punkcja MNiSW: 15.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: technologia żywności i żywienia;zooteknika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Journal of Veterinary Research

Afiliacja: Kycko Anna [];000;000, Jasik Agnieszka [];000;000, Bocian Łukasz [];000;000, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Śmiech Anna [];000;000, Łopuszyński Wojciech [];000;000, Dolka Izabella [];000;000, Nowak Marcin [];000;000, Madej Janusz [];000;000

31.

IDT: 0000047105.

Rok: 2016

Autorzy: Mikiewicz Mateusz, Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał

Tytuł oryginału: Morphology and immunoreactivity of canine and feline extramedullary plasmacytomas

Czasopismo: Polish Journal of Veterinary Sciences

Opis fizyczny: 2016, 19 (2), s. 345-352 ; bibliogr. 28 poz.

p-ISSN: 1505-1773

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1515/pjvs-2016-0042

Data ukazania się publikacji: 2016.05.30

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 0.697

Punktacja MNiSW: 20.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;zooteknika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: POLISH JOURNAL OF VETERINARY SCIENCES

Afiliacja: Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05

32.

IDT: 0000029908.

Rok: 2016

Autorzy: Otrocka-Domagała Iwona, Jastrzębski Paweł, Adamiak Zbigniew, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Mikiewicz Mateusz, Rotkiewicz Tadeusz

Tytuł oryginału: Safety of the long-term application of QuikClot Combat Gauze, ChitoGauze PRO and Celox Gauze in a femoral artery injury model in swine - a preliminary study

Czasopismo: Polish Journal of Veterinary Sciences

Opis fizyczny: 2016, 19 (2), s. 337-343 ; bibliogr. 20 poz.

p-ISSN: 1505-1773

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1515/pjvs-2016-0041

Data ukazania się publikacji: 2016.02.01

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 0.697

Punktacja MNiSW: 20.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;zooteknika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: POLISH JOURNAL OF VETERINARY SCIENCES

Afiliacja: Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Jastrzębski Paweł [] 0000-0002-0994-7044 5e709233878c28a047391a67;000;000, Adamiak Zbigniew [*] 0000-0001-8350-0198 5e70921b878c28a04738ff76;073;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;071;05, Rotkiewicz Tadeusz [*];071;05

33.

IDT: 0000014461.

Rok: 2016

Autorzy: Maślanka Tomasz, Chrostowska Małgorzata, Otrocka-Domagała Iwona, Snarska Anna, Mikiewicz Mateusz, Zuśka-Prot Monika, Jasiecka Agnieszka, Ziółkowski Hubert, Markiewicz Włodzimierz, Jaroszewski Jerzy J.

Tytuł oryginału: Prostaglandin E₂ exerts the proapoptotic and antiproliferative effects on bovine NK cells

Czasopismo: Research in Veterinary Science

Opis fizyczny: 2016, 107, s. 80-87 ; bibliogr. 33 poz.

p-ISSN: 0034-5288

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.05.009

Data ukazania się publikacji: 2016.08.01

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 1.298

Punktacja MNiSW: 35.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: nauki farmaceutyczne;zootechnika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE

Afiliacja: Maślanka Tomasz [*] 0000-0002-3807-0149 5e70921b878c28a04738ff91;077;05, Chrostowska Małgorzata [];000;000, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Snarska Anna [*] 0000-0001-6867-929X 5e70921b878c28a04738ffab;075;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Zuśka-Prot Monika [*] 0000-0002-6682-629X;997;05, Jasiecka-Mikołajczyk Agnieszka [*] 0000-0002-7012-758X 5e709431878c28a0473b7ef1;077;05, Ziółkowski Hubert [*] 0000-0002-9314-8666 5e7093bf878c28a0473b01fb;077;05, Markiewicz Włodzimierz [*] 0000-0003-2324-852X 5e70921b878c28a04738ff65;077;05, Jaroszewski Jerzy J. [*] 0000-0001-8031-1869 5e70921b878c28a04738ff7b;077;05

34.

IDT: 0000011874.

Rok: 2016

Autorzy: Mikiewicz Mateusz, Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Mikołajczyk Anna, Blacha Agnieszka

Tytuł oryginału: Immunohistochemical evaluation of canine and feline Merkel cell tumors - a report of two cases

Czasopismo: Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences

Opis fizyczny: 2016, 40 (1), s. 124-129 ; bibliogr. 20 poz.

p-ISSN: 1300-0128

Język publikacji: ENG

DOI: 10.3906/vet-1505-65

Data ukazania się publikacji: 2016.01.05

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca kazuistyczna

Inne bazy podające opis: Scopus ; Web of Science Core Collection

Impact Factor: 0.449

Punktacja MNiSW: 15.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: technologia żywności i żywienia;zootechnika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: TURKISH JOURNAL OF VETERINARY & ANIMAL SCIENCES

Afiliacja: Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Mikołajczyk Anna [*];071;05, Blacha Agnieszka [*];997;05

35.

IDT: 0000020843.

Rok: 2016

Autorzy: Kaczorek Edyta, Terech-Majewska Elżbieta, Szarek Józef, Mikiewicz Mateusz, Schulz Patrycja, Małaczewska Joanna, Wójcik Roman M., Siwicki Andrzej K.

Tytuł oryginalny: Ocena wpływu suplementacji paszy kwasem kynureinowym na obraz histopatologiczny wątroby u pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) przed oraz po zakażeniu eksperymentalnym *Yersinia ruckeri*

Tytuł równoległy: Influence of dietary administration of kynurenic acid on the morphological evaluation of the liver in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after experimental trial with *Yersinia ruckeri*

Tytuł całości: XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych : Lublin, 22-24 września 2016 : Per scientiam ad salutem animalium et hominum : materiały kongresowe

Adres wydawniczy, liczba stron: Lublin : Wydawnictwo MORPOL s.c., 2016, s. 166

Konferencja/zjazd - tytuł: XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych

Konferencja/zjazd - miejsce i data: Lublin, PL, 2016.09.22, 2016.09.24

p-ISBN: 978-83-940360-2-7

Język publikacji: POL

Liczba arkuszy: 0.05

Data ukazania się publikacji: 2016.09.22

Charakt. formalna: streszczenie w materiałach konferencyjnych (komunikat, poster)

Charakt. merytoryczna: varia

Afiliacja: Kaczorek-Łukowska Edyta [*] 0000-0002-9962-0917 5e70945e878c28a0473bb93c;997;05, Terech-Majewska Elżbieta [*] 0000-0001-9093-0049 5e70921b878c28a04738ff71;076;05, Szarek Józef [*] 905116;084;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Schulz Patrycja [*];997;05, Małaczewska Joanna [*] 0000-0002-9693-6692 5e70921b878c28a04738ff8e;080;05, Wójcik Roman M. [*] 0000-0002-7405-6328 5e70921b878c28a04738ffaa;080;05, Siwicki Andrzej K. [*] 0000-0002-7372-2181 5e70921b878c28a04738ff8b;080;05

36.

IDT: 0000024750.

Rok: 2016

Autorzy: Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagała Iwona, Gesek Michał, Mikiewicz Mateusz, Rapacz-Leonard Anna

Tytuł oryginalny: Biopsja i ocena histopatologiczna endometrium w diagnostyce niepłodności u kłacz

Tytuł równoległy: The endometrial biopsy and histopathological evaluation as diagnostic procedure for mare infertility

Czasopismo: Życie Weterynaryjne

Opis fizyczny: 2016, 91 (6), s. 435-439 ; bibliogr. 14 poz.

p-ISSN: 0137-6810

Język publikacji: POL

Data ukazania się publikacji: 2016.10.10

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Punktacja MNiSW: 4.000

Uwaga dot. automatycznej identyfikacji: Niezidentyfikowano na wykazie dyscyplin

Afiliacja: Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Rapacz-Leonard Anna [*] 0000-0002-6595-5153 5e70921b878c28a04738ffb3;085;05

37.

IDT: 0000005580.

Rok: 2015

Autorzy: Otrocka-Domagała Iwona, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Koda Mariusz, Mikiewicz Mateusz, Mikołajczyk Anna

Tytuł oryginalny: Aggressive, solid variant of alveolar rhabdomyosarcoma with cutaneous involvement in a juvenile Labrador

Retriever

Czasopismo: Journal of Comparative Pathology

Opis fizyczny: 2015, 152 (2-3), s. 177-181 ; bibliogr. 12 poz.

p-ISSN: 0021-9975

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1016/j.jcpa.2014.11.004

Data ukazania się publikacji: 2014.12.01

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie zagranicznym

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Scopus ; Web of Science Core Collection ; Science Direct

Impact Factor: 1.173

Punktacja MNiSW: 25.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki

medyczne;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY

Afiliacja: Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*]

0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068

5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Koda Mariusz [] 1893574;000;000, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032

5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Mikołajczyk Anna [*];071;05

38.

IDT: 0000011768.

Rok: 2015

Autorzy: Mikiewicz Mateusz, Otrocka-Domagała Iwona, Gesek Michał, Paździor-Czapula Katarzyna, Rotkiewicz Tadeusz

Tytuł oryginału: Immunohistochemical and histopathological evaluation of malignant pheochromocytoma: a case study

Czasopismo: Medycyna Weterynaryjna

Opis fizyczny: 2015, 71 (7), s. 453-457 ; bibliogr. 16 poz.

p-ISSN: 0025-8628

Język publikacji: ENG

Data ukazania się publikacji: 2015.07.01

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection

Impact Factor: 0.195

Punktacja MNiSW: 15.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: nauki medyczne;technologia żywności i

żywienia;zooteknika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Medycyna Weterynaryjna-Veterinary Medicine-Science and Practice

Afiliacja: Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-

0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05,

Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Rotkiewicz Tadeusz [*];071;05

39.

IDT: 0000011769.

Rok: 2015

Autorzy: Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagała Iwona, Gesek Michał, Mikiewicz Mateusz, Rotkiewicz Tadeusz,

Mikulska-Skupień Elżbieta

Tytuł oryginału: Kaposi-like vascular tumor of the cardiac muscle in a dog: morphological and immunohistochemical study

Czasopismo: Medycyna Weterynaryjna

Opis fizyczny: 2015, 71 (8), s. 513-517 ; bibliogr. 13 poz.

p-ISSN: 0025-8628

Język publikacji: ENG

Data ukazania się publikacji: 2015.08.01

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 0.195

Punktacja MNiSW: 15.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: nauki medyczne;technologia żywności i żywienia;zooteknika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: Medycyna Weterynaryjna-Veterinary Medicine-Science and Practice

Afiliacja: Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ff1;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Rotkiewicz Tadeusz [*];071;05, Mikulska-Skupień Elżbieta [*] 5e70921b878c28a04738ff98;076;05

40.

IDT: 0000011770.

Rok: 2015

Autorzy: Otrocka-Domagała Iwona, Mikołajczyk Anna, Paździor-Czapula Katarzyna, Gesek Michał, Rotkiewicz Tadeusz, Mikiewicz Mateusz

Tytuł oryginału: Effect of low-energy laser irradiation and antioxidant supplementation on cell apoptosis during skeletal muscle post-injury regeneration in pigs

Czasopismo: Polish Journal of Veterinary Sciences

Opis fizyczny: 2015, 18 (3), s. 523-531 ; bibliogr. 34 poz.

p-ISSN: 1505-1773

Język publikacji: ENG

DOI: 10.1515/pjvs-2015-0068

Data ukazania się publikacji: 2015.07.01

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Inne bazy podające opis: Web of Science Core Collection ; Scopus

Impact Factor: 0.719

Punktacja MNiSW: 20.000

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: inżynieria biomedyczna;biologia medyczna;nauki farmaceutyczne;nauki medyczne;rolnictwo i ogrodnictwo;technologia żywności i żywienia;zooteknika i rybactwo;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: POLISH JOURNAL OF VETERINARY SCIENCES

Afiliacja: Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Mikołajczyk Anna [*];071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ff1;071;05, Rotkiewicz Tadeusz [*];071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05

41.

IDT: 0000013819.

Rok: 2015

Autorzy: Pajdak Joanna, Mikiewicz Mateusz, Schulz Patrycja, Kaczorek Edyta, Terech-Majewska Elżbieta

Tytuł oryginału: Histopathological lesions associated with metabolic bone disease (MBD) in the central bearded dragon (Pogona vitticeps)

Tytuł całości: The 33rd Annual Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the 26th Annual Meeting of the

European College of Veterinary Pathologists, 2-5 september 2015, Helsinki, Finland

Adres wydawniczy, liczba stron: Helsinki : University of Helsinki, 2015, s. 91

Język publikacji: ENG

Data ukazania się publikacji: 2015.12.01

Charakt. formalna: streszczenie w materiałach konferencyjnych (komunikat, poster)

Charakt. merytoryczna: varia

Afiliacja: Pajdak-Czaus Joanna [*] 0000-0003-2289-2241 5e7092d5878c28a04739daa4;997;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Schulz Patrycja [*];997;05, Kaczorek-Łukowska Edyta [*] 0000-0002-9962-0917 5e70945e878c28a0473bb93c;997;05, Terech-Majewska Elżbieta [*] 0000-0001-9093-0049 5e70921b878c28a04738ff71;076;05

42.

IDT: 0000014713.

Rok: 2014

Autorzy: Otrocka-Domagała Iwona, Rękawek Wojciech, Paździor Katarzyna, Gesek Michał, Mikiewicz Mateusz, Rotkiewicz Tadeusz

Tytuł oryginalu: Congenital cardiac rhabdomyosarcoma in a calf

Czasopismo: Journal of Comparative Pathology

Opis fizyczny: 2014, 150 (1), s. 107

Uwagi: Proceedings of the 31st Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the Annual Meeting of the European College of Veterinary Pathologists, London, United Kingdom, 5-7th September, 2013 Abstracts

p-ISSN: 0021-9975

Język publikacji: ENG

Data ukazania się publikacji: 2014.01.01

Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat

Charakt. merytoryczna: varia

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki medyczne;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY

Afiliacja: Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Rękawek Wojciech [*] 652608a940e3ff22d34a6b2f;997;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Rotkiewicz Tadeusz [*];997;05

43.

IDT: 0000014714.

Rok: 2014

Autorzy: Otrocka-Domagała Iwona, Paździor Katarzyna, Gesek Michał, Mikiewicz Mateusz, Rotkiewicz Tadeusz

Tytuł oryginalu: Immunophenotype of neoplastic and bystander cells in canine cutaneous mast cell tumours (CCMCTS)

Czasopismo: Journal of Comparative Pathology

Opis fizyczny: 2014, 150 (1), s. 106

Uwagi: Proceedings of the 31st Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the Annual Meeting of the European College of Veterinary Pathologists, London, United Kingdom, 5-7th September, 2013 Abstracts

p-ISSN: 0021-9975

Język publikacji: ENG

Data ukazania się publikacji: 2014.01.01

Charakt. formalna: abstrakt, komunikat, streszczenie, plakat

Charakt. merytoryczna: varia

Dyscypliny czasopisma na podstawie wykazu MNiSW z 2024.01.05: biologia medyczna;nauki medyczne;biotechnologia;weterynaria

Tytuł czasopisma w wykazie MNiSW z 2024.01.05: JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY

Afiliacja: Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Rotkiewicz Tadeusz [*];997;05

44.

IDT: 0000011765.

Rok: 2014

Autorzy: Przyborowska Paulina, Kołodziejska-Sawerska Anna, Mikiewicz Mateusz

Tytuł oryginału: Przypadek gruczolaka ślinianki podżuchwowej u świnki morskiej

Tytuł równoległy: A case of submandibular salivary gland adenoma in a guinea pig

Czasopismo: Weterynaria

Opis fizyczny: 2014 (7-8), s. 46-50, 53 ; bibliogr. 14 poz.

p-ISSN: 2300-5114

Język publikacji: POL

Data ukazania się publikacji: 2014.08.01

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Uwaga dot. automatycznej identyfikacji: Niezidentyfikowano na wykazie dyscyplin

Afiliacja: Przyborowska-Zhalniarovich Paulina [*] 0000-0002-5054-4888;997;05, Kołodziejska-Sawerska Anna [];000;000, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05

45.

IDT: 0000011766.

Rok: 2014

Autorzy: Przyborowska Paulina, Kołodziejska-Sawerska Anna, Mikiewicz Mateusz, Szcześniak Anna

Tytuł oryginału: Przypadek nasieniaka jądra u świnki morskiej

Tytuł równoległy: Case of testicular seminoma in guinea pig

Czasopismo: Weterynaria

Opis fizyczny: 2014 (10), s. 30-34, 37-38 ; bibliogr. 23 poz.

p-ISSN: 2300-5114

Język publikacji: POL

Data ukazania się publikacji: 2014.10.01

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Uwaga dot. automatycznej identyfikacji: Niezidentyfikowano na wykazie dyscyplin

Afiliacja: Przyborowska-Zhalniarovich Paulina [*] 0000-0002-5054-4888;997;05, Kołodziejska-Sawerska Anna [];000;000, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Szcześniak Anna [*];997;05

46.

IDT: 0000011767.

Rok: 2014

Autorzy: Przyborowska Paulina, Kołodziejska-Sawerska Anna, Mikiewicz Mateusz

Tytuł oryginału: Przypadek torbielowatości jajników i mięśniaka gładkokomórkowego macicy u świnki morskiej

Tytuł równoległy: Case of polycystic ovarian disease and leiomyoma in guinea pig

Czasopismo: Weterynaria

Opis fizyczny: 2014 (6), s. 56-63 ; bibliogr. 27 poz.

p-ISSN: 2300-5114

Język publikacji: POL

Data ukazania się publikacji: 2014.06.01

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Uwaga dot. automatycznej identyfikacji: Niezidentyfikowano na wykazie dyscyplin

Afiliacja: Przyborowska-Zhalniarovich Paulina [*] 0000-0002-5054-4888;997;05, Kołodziejska-Sawerska Anna [*];997;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05

47.

IDT: 0000007999.

Rok: 2014

Autorzy: Paździor-Czapula Katarzyna, Otrocka-Domagała Iwona, Gesek Michał, Mikiewicz Mateusz, Rotkiewicz Tadeusz

Tytuł oryginalny: Guzy histiocytarne u psów i kotów

Tytuł równoległy: Canine and feline histiocytic neoplasia

Czasopismo: Weterynaria w Praktyce

Opis fizyczny: 2014, 11 (5), s. 89-93 ; bibliogr. 20 poz.

p-ISSN: 1732-1999

Język publikacji: POL

Data ukazania się publikacji: 2014.05.01

Charakt. formalna: artykuł w czasopiśmie polskim

Charakt. merytoryczna: praca oryginalna

Punktacja MNiSW: 3.000

Uwaga dot. automatycznej identyfikacji: Niezidentyfikowano na wykazie dyscyplin

Afiliacja: Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ff1;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Rotkiewicz Tadeusz [*];071;05

48.

IDT: 0000014726.

Rok: 2013

Autorzy: Otrocka-Domagała Iwona, Rękawek Wojciech, Paździor Katarzyna, Gesek Michał, Mikiewicz Mateusz, Rotkiewicz Tadeusz

Tytuł oryginalny: Congenital cardiac rhabdomyosarcoma in a calf

Tytuł całości: 31st Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the European College of Veterinary Pathologists 4-7th September 2013

Adres wydawniczy, liczba stron: London, 2013 ; PP-66

Konferencja/zjazd - tytuł: 31st Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the European College of Veterinary Pathologists 4-7th September 2013

Konferencja/zjazd - miejsce i data: London, GB, 2013.09.04, 2013.09.07

Język publikacji: ENG

Data ukazania się publikacji: 2013.09.04

Charakt. formalna: streszczenie w materiałach konferencyjnych (komunikat, poster)

Charakt. merytoryczna: varia

Afiliacja: Otrocka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Rękawek Wojciech [*] 652608a940e3ff22d34a6b2f;997;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068 5e70921b878c28a04738ff1;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Rotkiewicz Tadeusz [*];997;05

49.

IDT: 0000014727.

Rok: 2013

Autorzy: Otrócka-Domagała Iwona, Paździor Katarzyna, Gesek Michał, Mikiewicz Mateusz, Rotkiewicz Tadeusz

Tytuł oryginału: Immunophenotype of neoplastic and bystander cells in canine cutaneous mast cell tumours (CCMCTS)

Tytuł całości: 31st Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the European College of Veterinary Pathologists 4-7th September 2013

Adres wydawniczy, liczba stron: London, 2013 ; PP-65

Konferencja/zjazd - tytuł: 31st Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the European College of Veterinary Pathologists 4-7th September 2013

Konferencja/zjazd - miejsce i data: London, GB, 2013.09.04, 2013.09.07

Język publikacji: ENG

Data ukazania się publikacji: 2013.09.04

Charakt. formalna: streszczenie w materiałach konferencyjnych (komunikat, poster)

Charakt. merytoryczna: varia

Afiliacja: Otrócka-Domagała Iwona [*] 0000-0002-3271-0408 5e70921b878c28a04738ff97;071;05, Paździor-Czapula Katarzyna [*] 0000-0002-7661-7993 5e70935e878c28a0473a8472;071;05, Gesek Michał [*] 0000-0002-8853-3068

5e70921b878c28a04738ffb1;071;05, Mikiewicz Mateusz [*] 0000-0002-3546-2032 5e7092d5878c28a04739da9e;997;05, Rotkiewicz Tadeusz [*];997;05

Osiągnięcia organizacyjne

CERTYFIKAT

Pan **Mateusz Mikiewicz**

Był(a) uczestnikiem Konferencji nt.:

WPŁYW MŁODYCH NAUKOWCÓW NA OSIĄGNIĘCIA POLSKIEJ NAUKI

VII Edycja - Nowe trendy w naukach przyrodniczych - **Kraków** - 6.12.2014

KONFERENCJA MŁODYCH NAUKOWCÓW

Organizator - CreativeTime

KONFERENCJA

*Wpływ Młodych Naukowców
na Osiągnięcia Polskiej Nauki*

VII Edycja - 2014/2015 rok

Kraków/Łódź/Zakopane/Wrocław
www.doktorant.com.pl

CREATIVETIME

Właściciel

Dr inż. Marcin Kuczera

Nauka i Biznes

CreativeTime, ul. Mehoffera 10, 31-322 Kraków,
e-mail: biuro@creativetime.pl, Numer telefonu: +48 660 200 859

CREATIVETIME

DAVIS THOMPSON DVM FOUNDATION

European Symposium, Lyon, 29-30 August, 2017

THIS CERTIFIES THAT

Mateusz Wikiewicz

has attended the Davis Thompson DVM European Symposium held in Lyon, 29-30 August, 2017, and is
therefore awarded this

PROFESSIONAL DEVELOPMENT CERTIFICATE

[Signature]

Signed

29/8/17

Date

The 13 hour programme provided 13 structured units of Continuing Professional Development

For further information contact Dr Liz McInnes, President, European Division of Davis Thompson DVM Foundation
Lizmcinnes50@gmail.com

THIS ACKNOWLEDGES THAT

Mateusz Mikiwicz

PARTICIPATED IN THE ECV/ESVP SUMMER SCHOOL IN
VETERINARY PATHOLOGY
IN BERLIN, GERMANY
18.7.16 - 29.7.16
(88 HOURS)

Dated this 29th day of July 2016

Chiara Brachente

DR CHIARA BRACHELENTE
CHAIRPERSON OF ECV/ESVP EDUCATION COMMITTEE

THIS ACKNOWLEDGES THAT

Mateusz Mikiwicz

PARTICIPATED IN THE ECV/ESVP SUMMER SCHOOL IN
VETERINARY PATHOLOGY
IN BERLIN, GERMANY
17.7.17 – 28.7.17
(88 HOURS)

Dated this 28th day of July 2017

Chiara Brachente

DR CHIARA BRACHELENTE
CHAIRPERSON OF ECV/ESVP EDUCATION COMMITTEE

THIS ACKNOWLEDGES THAT

Mateusz Mikiewicz

PARTICIPATED IN THE ECVP/ESVP SUMMER SCHOOL IN
VETERINARY PATHOLOGY
IN VALENCIA, SPAIN
16.7.18 – 27.7.18
(88 HOURS)



Chiara Brachente

Dated this 27th day of July 2018

DR CHIARA BRACHELENTE
CHAIRPERSON OF ECVP EDUCATION COMMITTEE

THIS ACKNOWLEDGES THAT

Mateusz Mikiewicz

PARTICIPATED IN THE ECVF/ESVP SUMMER SCHOOL IN
VETERINARY PATHOLOGY
IN VALENCIA, SPAIN
15.7.19 – 26.7.19
(88 HOURS)

Dated this 26th day of July 2019

Chiara Brachele

DR CHIARA BRACHELE
CHAIRPERSON OF ECVF EDUCATION COMMITTEE



Certificate of Participation

Third Joint Congress of the ESVP, ESTP and the ECVP

Lyon, France
30th August – 2nd September 2017

Mateusz Mikiewicz

Attended the third Joint Congress of the
European Society of Veterinary Pathology,
European Society of Toxicologic Pathology and the
European College of Veterinary Pathologists

which included 20 hours of continuing professional education.

Sibylle Gröters
ESTP Chairman

Wolfgang Baumgärtner
ESVP President

Anja Kipar
ECVP President

Cutting Edge Pathology
Lyon, 2nd September, 2017

Komisja do Spraw Specjalizacji Lekarzy Weterynarii
Weterynaryjne Centrum Kształcenia Podyplomowego



D Y P L O M

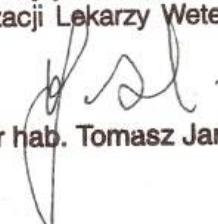
Nr. 10/105 / 2016 r.

Lekarz weterynarii Mateusz Chlikiewicz
urodzony(a) dnia 03.09 1987 r., po spełnieniu warunków
określonych w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej
z dnia 28 listopada 1994 r. w sprawie trybu i szczegółowych zasad uzyskania
tytułu specjalisty przez lekarza weterynarii (Dz. U. Nr 131, poz. 667), na
podstawie uchwały nr 7/11/3/2016 Komisji do Spraw Specjalizacji
Lekarzy Weterynarii z dnia 10.12.2016 r. uzyskał(a) tytuł-

specjalisty

Choroby zwierząt nieudomowionych
(w dziedzinie)

Przewodniczący Komisji do Spraw
Specjalizacji Lekarzy Weterynarii


prof. dr hab. Tomasz Janowski

Puławy, dnia 10.12 2016 r.

Polskie Towarzystwo Nauk o Zwierzętach Laboratoryjnych

Polish Laboratory Animal Science Association

ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa, tel. +48-22 644-86-83, www.pollasa.pl

CERTYFIKAT

Nr 1423/2015

Zaświadcza się, że Pan *Mateusz Mikiewicz* urodzony 02.09.1987 w Białymstoku

ukończył prowadzone w dniach 12.10 – 16.10.2015r. szkolenia w zakresie:

- szkolenia dla osób odpowiedzialnych za planowanie procedur i doświadczeń oraz za ich przeprowadzenie
- szkolenia dla osób wykonujących procedury
- szkolenia dla osób uśmiercających zwierzęta wykorzystywane w procedurach



Członek Zarządu Pollasa ds. szkoleń

K. Miron
dr inż. Katarzyna Kisiel

Warszawa 30.10.2015



*Rada Samorządu Doktorantów
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie*

Olsztyn, 28 września 2015 r.

Pan

Lek. wet. Mateusz Mikiewicz

Szanowny Panie,

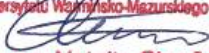
Serdecznie dziękuję za poświęcony czas, niezawodny udział i aktywną pracę w Radzie Samorządu Doktorantów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, reprezentowanie społeczności doktoranckiej naszego Uniwersytetu w Odwoławczej Komisji Dyscyplinarnej ds. doktorantów oraz Uczelnianej Odwoławczej Komisji Stypendialnej, w roku akademickim 2014/2015.

Życzę sukcesów w dalszej pracy naukowej i samorządowej.

Z poważaniem

Przewodnicząca Rady Samorządu Doktorantów
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

PRZEWODNICZĄCA
Rady Samorządu Doktorantów
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie


mgr inż. Natalia Chodkowska

Wykaz osiągnięć naukowych albo artystycznych, stanowiących znaczny wkład w rozwój określonej dyscypliny

Informacje zawarte w poszczególnych punktach tego dokumentu powinny uwzględniać podział na okres przed uzyskaniem stopnia doktora oraz po jego uzyskaniu.

I. WYKAZ OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH ALBO ARTYSTYCZNYCH, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1. PKT 2 USTAWY

1. Monografie naukowe, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2a ustawy; lub
BRAK
2. Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy; lub

Lp.	Publikacja	Punktacja MNiSW/MNiE	IF
Cykl powiązanych ze sobą tematycznie artykułów naukowych			
1.	Mateusz Mikiewicz, Katarzyna Paździor-Czapula, Joanna Fiedorowicz, Michał Gesek, Iwona Otrocka-Domagała. Metallothionein expression in feline injection site fibrosarcomas. BMC Vet. Res. 2023;19: 42. DOI: 10.1186/s12917-023-03604-5 Mój wkład w powstanie w tej publikacji polegał na stworzeniu koncepcji oraz metodyki badań, uzyskaniu finansowania z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura 5 (Nr DEC-2021/05/X/NZ4/00037), zebraniu próbek do wykonania badania, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, wykonaniu rycin, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 80%.	140	2,3
2.	Mateusz Mikiewicz, Katarzyna Paździor-Czapula, Joanna Fiedorowicz, Iwona Otrocka-Domagała. Expression of programmed cell death protein 1 and programmed cell death ligand 1 in feline injection site fibrosarcomas. Res. Vet. Sci. 2024;176:105350. DOI: 10.1016/j.rvsc.2024.105350 Mój wkład w powstanie w tej publikacji polegał na stworzeniu koncepcji oraz metodyki badań, uzyskaniu finansowania z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura 5 (Nr DEC-2021/05/X/NZ4/00037), zebraniu próbek do wykonania badania, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, wykonaniu rycin, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 85%.	100	2,4

Lp.	Publikacja	Punktacja MNiSW/MNiE	IF
3.	Mateusz Mikiewicz, Iwona Otrocka-Domagała. Immunohistochemical analysis of smooth muscle actin and CD31 in feline post-injection site fibrosarcomas: association with tumour grade, vascular density, and multinucleated giant cells. BMC Vet. Res. 2025;21:191. Mój wkład w powstanie w tej publikacji polegał na stworzeniu koncepcji oraz metodyki badań, uzyskaniu finansowania z Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Miniatura 5 (Nr DEC-2021/05/X/NZ4/00037), zebraniu próbek do wykonania badania, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, wykonaniu rycin, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 95%.	140	2,3

3. Zrealizowane oryginalne osiągnięcia projektowe, konstrukcyjne, technologiczne lub artystyczne, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2c ustawy;

BRAK

4. Inne, niż wymienione w pkt. I.1-3, osiągnięcia naukowe lub artystyczne.

W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich zaleca się złożenie oświadczenia przez habilitanta oraz współautorów wskazujące na ich merytoryczny (a NIE procentowy) wkład w powstanie każdej pracy [np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań (np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet, itp.), wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu, i inne]. Określenie wkładu danego autora, w tym habilitanta, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Lp.	Publikacja	Punktacja MNiSW/MNiE	IF
Inne osiągnięcie, o którym mowa art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)			
1.	Mikiewicz M., Otrocka-Domagała I., Gesek M., Paździor-Czapula K., Rotkiewicz T. (2015) <i>Immunohistochemical and histopathological evaluation of malignant pheochromocytoma: a case study</i>. Med. Weter. 71: 453-457. Mój wkład w powstanie w tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 53%.	15	0,195

Lp.	Publikacja	Punktacja MNiSW/MNiE	IF
2.	Mikiewicz M. , Otrocka-Domagała I., Paździor-Czapula K., Gesek M., Mikolajczyk A., Blacha A. (2016) <i>Immunohistochemical evaluation of canine and feline Merkel cell tumours-a report of two cases</i> . Turk. J. Vet. Anim. Sci. 40: 124-129. Mój wkład w powstanie w tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 53%.	20	0,449
3.	Mikiewicz M. , Otrocka-Domagała I., Paździor-Czapula K., Gesek M. (2016) <i>Morphology and immunoreactivity of canine and feline extramedullary plasmacytomas</i> . Pol. J. Vet. Sci. 19: 345-352. Mój wkład w powstanie w tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 60%.	20	0,697
4.	Mikiewicz M. , Paździor-Czapula K., Gesek M., Lemishevskyi V., Otrocka-Domagała I. (2019) <i>Canine and Feline Oral Cavity Tumours and Tumour-like Lesions: a Retrospective Study of 486 Cases (2015-2017)</i> . J. Comp. Pathol. 172: 80-87. Mój wkład w powstanie w tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 84%.	100	0,994
5.	Mikiewicz M. , Paździor-Czapula K., Gesek M., Dziubińska-Bartylak P., Otrocka-Domagała I. (2020) <i>Intraocular chondrosarcoma in a rabbit</i> . J. Comp. Pathol. 179: 41-44. Mój wkład w powstanie w tej publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaplanowaniu i wykonaniu analiz laboratoryjnych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, przygotowaniu manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję. Mój udział procentowy szacuję na 60%.	100	1,311
Prace oryginalne przed uzyskaniem stopnia doktora			
1.	Przyborowska P., Kołodziejska-Sawerska A., Mikiewicz M. , Szcześniak A. (2014) <i>Przypadek nasieniaka jądra u świnki morskiej</i> . Weterynaria 10: 30-34.	-	-
2.	Przyborowska P., Kołodziejska-Sawerska A., Mikiewicz M. (2014) <i>Przypadek gruczolaka ślinianki podżuchwowej u świnki morskiej</i> . Weterynaria 7-8: 46-50.	-	-
3.	Przyborowska P., Kołodziejska-Sawerska A., Mikiewicz M. (2014) <i>Przypadek torbielowatości jajników i mięśniaka gładkokomórkowego macicy u świnki morskiej</i> . Weterynaria 6: 56-63	-	-
4.	Paździor-Czapula K., Otrocka-Domagała I., Gesek M., Mikiewicz M. , Rotkiewicz T. (2014) <i>Guzy histiocytarne u psów i kotów</i> . Weterynaria w Praktyce 11: 89-93.	3	-
5.	Otrocka-Domagała I., Paździor-Czapula K., Gesek M., Koda M., Mikiewicz M. , Mikolajczyk A. (2015) <i>Aggressive, solid variant of alveolar rhabdomyosarcoma with cutaneous involvement in a juvenile Labrador Retriever</i> . J. Comp. Pathol. 152: 177-181.	25	1,173
6.	Paździor-Czapula K., Otrocka-Domagała I., Gesek M., Mikiewicz M. , Rotkiewicz T., Mikulska-Skupien E. (2015) <i>Kaposi-like vascular tumor of the cardiac muscle in a dog: morphological and immunohistochemical study</i> . Med. Weter. 71: 513-517.	15	0,195

Lp.	Publikacja	Punktacja MNiSW/MNiE	IF
7.	Otrocka-Domagała I., Mikołajczyk A., Paździor-Czapula K., Gesek M., Rotkiewicz T., Mikiewicz M. (2015) <i>Effect of low-energy laser irradiation and antioxidant supplementation on cell apoptosis during skeletal muscle post-injury regeneration in pigs</i> . Pol. J. Vet. Sci. 18: 523-531.	20	0,719
8.	Kycko A., Jasik A., Bocian Ł., Otrocka-Domagała I., Mikiewicz M. , Śmiech A., Łopuszyński W., Dolka I., Nowak M., Madej J. (2016) <i>Epidemiological and histopathological analysis of 40 apocrine sweat gland carcinomas in dogs: a retrospective study</i> . J. Vet. Res. 60 : 331-337.	15	-
9.	Maślanka T., Otrocka-Domagała I., Zuśka-Prot M., Mikiewicz M. , Przybysz J., Jasiecka A., Jaroszewski J.J. (2016) <i>IK B kinase inhibitor, IMD-0354, prevents allergic asthma in a mouse model through inhibition of CD4+ effector T cell responses in the lung-draining mediastinal lymph nodes</i> . Czasopismo: Eur. J. Pharmacol. 775: 78-85.	30	2,896
10.	Gesek M., Otrocka-Domagała I., Sokół R., Paździor-Czapula K., Lambert B.D., Wiśniewska A., Żechowicz M., Mikiewicz M. , Korzeniowska P. (2016) <i>Histopathological studies of the heart in three lines of broiler chickens</i> . Br. Poult. Sci. 57: 219-226.	30	0,884
11.	Otrocka-Domagała I., Jastrzębski P., Adamiak Z., Paździor-Czapula K., Gesek M., Mikiewicz M. , Rotkiewicz T. (2016) <i>Safety of the long-term application of QuikClot Combat Gauze, ChitoGauze PRO and Celox Gauze in a femoral artery injury model in swine - a preliminary study</i> . Pol. J. Vet. Sci. 19: 337-343.	20	0,697
12.	Maślanka T., Chrostowska M., Otrocka-Domagała I., Snarska A., Mikiewicz M. , Zuśka-Prot M., Jasiecka A., Ziółkowski H., Markiewicz W., Jaroszewski J.J. (2016) <i>Prostaglandin E₂ exerts the proapoptotic and antiproliferative effects on bovine NK cells</i> . Res. Vet. Sci. 107: 80-87.	35	1,298
13.	Paździor-Czapula K., Otrocka-Domagała I., Gesek M., Mikiewicz M. , Rapacz-Leonard A. (2016) <i>Biopsja i ocena histopatologiczna endometrium w diagnostyce niepłodności u klaczy</i> . Życie Weterynaryjne 91: 435-439.	4	-
14.	Kaczorek E., Szarek J., Mikiewicz M. , Terech-Majewska E., Schulz P., Małaczewska J., Wójcik R.M., Siwicki A.K. (2017) <i>Effect of feed supplementation with kynurenic acid on the morphology of the liver, kidney and gills in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792), healthy and experimentally infected with Yersinia ruckeri</i> . J. Fish Dis. 40: 873-884.	35	2,004
15.	Paździor-Czapula K., Otrocka-Domagała I., Myrdek P., Mikiewicz M. , Gesek M. (2018) <i>Dirofilaria repens - an etiological factor or an incidental finding in cytologic and histopathologic biopsies from dogs</i> . Vet. Clin. Pathol. 47: 307-311.	35	0,937
16.	Paździor-Czapula K., Otrocka-Domagała I., Gesek M., Mikiewicz M. (2018) <i>Canine oral cavity T-cell lymphoma- histopathological and immunohistochemical study</i> . Med. Weter. 74: 70-72.	15	0,197
Prace oryginalne po uzyskaniu stopnia doktora			
1.	Paździor-Czapula K., Mikiewicz M. , Gesek M., Zwoliński C., Otrocka-Domagała I. (2019) <i>Diagnostic immunohistochemistry for canine cutaneous round cell tumours - retrospective analysis of 60 cases</i> . Folia Histochem Cytobiol. 57: 146-154.	70	0,854
2.	Prusińska M., Nowosad J., Jarmołowicz S., Mikiewicz M. , Duda A., Wiszniewski G., Sikora M., Biegaj M., Samselska A., Arciuch-Rutkowska M., Targońska K., Otrocka-Domagała I., Kucharczyk D. (2020) <i>Effect of feeding barbel larvae (Barbus barbus (L, 1758)) Artemia sp. nauplii enriched with PUFAs on their growth and survival rate, blood composition, alimentary tract histological structure and body chemical composition</i> . Aquac. Rep. 18:1-8.	100	3,216

Lp.	Publikacja	Punktacja MNiSW/MNiE	IF
3.	Michalska K., Gesek M., Sokół R., Murawska D., Mikiewicz M. , Chłódowska A. (2021) <i>Effective Microorganisms (EM) Improve Internal Organ Morphology, Intestinal Morphometry and Serum Biochemical Activity in Japanese Quails Under Clostridium perfringens Challenge</i> . Molecules 26: 1-17.	140	4,927
4.	Jasik A., Kycko A., Olech M., Wyrostek K., Śmiech A., Łopuszyński W., Otrocka-Domagala I., Mikiewicz M. , Dolka I. (2021) <i>Mutations of p53 gene in canine sweat gland carcinomas probably associated with UV radiation</i> . Czasopismo: J. Vet. Res. 65: 519-526.	140	2,058
5.	Nowosad J., Jasiński Sz., Arciuch-Rutkowska M., Abdel-Latif H.M.R., Wróbel M., Mikiewicz M. , Zielonka Ł., Kotsyumbas I.Y., Muzyka V.P., Brezvyin O.M., Dietrich G., Kucharczyk D.(2023) <i>Effects of Bee Pollen on Growth Performance, Intestinal Microbiota and Histomorphometry in African Catfish</i> . Animals 13: 1-16.	100	2,7
6.	Nowosad J., Kujawa R., Sherzada S., Kucharczyk D., Mikiewicz M. , Dryl K., Kapusta A., Łuczyńska J., Abdel-Latif H.M.R.(2024) <i>Histomorphological and Dynamical Changes in Female River Lampreys during Maturation under Controlled Conditions as a Part of Lamprey Restoration Programs</i> . Animals.17: 1-14.	100	2,7
7.	Paździor-Czapula K., Mikiewicz M. , Fiedorowicz J., Otrocka-Domagala I. (2024) <i>Mammary and reproductive tract tumours and tumour-like lesions of 286 small pet mammals: a retrospective study</i> . J. Comp. Pathol. 213: 46-58.	100	0,8
Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej			
1.	Mikiewicz M. , Otrocka-Domagala I., Paździor-Czapula K., Rotkiewicz T. (2017) <i>Influence of long-term, high-dose dexamethasone administration on proliferation and apoptosis in porcine hepatocytes</i> . Res. Vet. Sci. 112: 141-148.	35	1,616
2.	Mikiewicz M. , Otrocka-Domagala I., Paździor-Czapula K. (2019) <i>Influence of simvastatin on hepatocytes - histopathological and immunohistochemical study</i> . Pol. J. Vet. Sci. 22: 263-270.	100	0,516
Publikacje przeglądowe po uzyskaniu stopnia doktora			
1.	Otrocka-Domagala I., Paździor-Czapula K., Fiedorowicz J., Mikiewicz M. , Piotrowska A., Gesek M. (2022) <i>Cutaneous and subcutaneous tumours of small pet mammal - retrospective study of 256 cases (2014-2021)</i> . Animals 12: 1-16.	100	3
2.	Kuna J., Chmielewski G., Gruchała M., Mikiewicz M. , Ręcki P., Krajewska-Włodarczyk M. (2022) <i>Fatal Acute Heart Failure in the Course of Macrophage Activation Syndrome: Case Report and Literature Review</i> . J. Clin. Med. 14: 1-9.	140	3,9
3.	Chmielewski G., Majewski M.S., Kuna J., Mikiewicz M. , Krajewska-Włodarczyk M. (2023) <i>Fatigue in Inflammatory Joint Diseases</i> . Int. J. Mol. Sci. 24: 1-16.	140	4,9
Opublikowane streszczenia pokonferencyjne w recenzowanych czasopismach naukowych			
1.	Otrocka-Domagala I., Paździor K., Gesek M., Mikiewicz M. , Rotkiewicz T. (2014) <i>Immunophenotype of neoplastic and bystander cells in canine cutaneous mast cell tumours (CCMCTS)</i> . J. Comp. Pathol. 150: 106.	-	-
2.	Otrocka-Domagala I., Rękawek W., Paździor K., Gesek M., Mikiewicz M. , Rotkiewicz T. (2014) <i>Congenital cardiac rhabdomyosarcoma in a calf</i> . J. Comp. Pathol. 150: 107.	-	-
3.	Pajdak J., Mikiewicz M. , Schulz P., Kaczorek E., Terech-Majewska E. (2016) <i>Histopathological lesions associated with metabolic bone disease in the central bearded dragon (Pogona vitticeps)</i> . J. Comp. Pathol. 154: 97.	-	-

Lp.	Publikacja	Punktacja MNiSW/MNiE	IF
4.	Kaczorek E., Terech-Majewska E., Szarek J., Mikiewicz M. , Schulz P., Małaczewska J., Wójcik R.M., Pajdak J., Siwicki A.K. (2017) <i>The influence of feed supplementation with kynurenine acid (KYNA) on the gills in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) infected experimentally with Yersinia ruckeri</i> . J. Comp. Pathol. 156: 93.	-	-
5.	Mikiewicz M. , Paździor-Czapula K., Otrocka-Domagala I., Gesek M., Myrdek P. (2018) <i>Oral cavity lesions in dogs: a retrospective study of 136 cases</i> . J. Comp. Pathol. 158: 122.	-	-
6.	Gesek M., Stenzel T., Otrocka-Domagala I., Paździor-Czapula K., Mikiewicz M. , Michalska K., Koncicki A. (2018) <i>Immunohistochemical characterization and proliferation activity of cutaneous leiomyosarcoma with multiple visceral metastases in a fantail pigeon</i> . J. Comp. Pathol. 158: 145.	-	-
7.	Otrocka-Domagala I., Mikiewicz M. , Paździor-Czapula K., Gesek M. (2019) <i>Extraskeletal myxoid-type chondrosarcoma in a rat</i> . J. Comp. Pathol. 166: 148.	-	-
8.	Paździor-Czapula K., Otrocka-Domagala I., Gesek M., Mikiewicz M. , Pawlik M. (2019) <i>Expression of Ki67 in canine cutaneous histiocytoma</i> . J. Comp. Pathol. 166: 123.	-	-

II. WYKAZ AKTYWNOŚCI NAUKOWEJ ALBO ARTYSTYCZNEJ

- Wykaz członkostwa w redakcjach naukowych monografii.

BRAK

- Wykaz wystąpień na krajowych lub międzynarodowych konferencjach naukowych lub artystycznych, z wyszczególnieniem przedstawionych wykładów na zaproszenie i wykładów plenarnych.

Lp.	Doniesienia na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych
1.	Otrocka-Domagala I., Paździor K., Gesek M., Mikiewicz M. , Rotkiewicz T. <i>Immunophenotype of neoplastic and bystander cells in canine cutaneous mast cell tumours (CCMCTS)</i> . The 31st Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the European College of Veterinary Pathologists 4-7th September 2013, Londyn, Wielka Brytania
2.	Otrocka-Domagala I., Rękawek W., Paździor K., Gesek M., Mikiewicz M. , Rotkiewicz T. <i>Congenital cardiac rhabdomyosarcoma in a calf</i> . The 31st Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the European College of Veterinary Pathologists 4-7th September 2013, Londyn, Wielka Brytania.
3.	Paździor-Czapula K., Otrocka-Domagala I., Rotkiewicz T., Gesek M., Mikiewicz M. <i>Expression of metallothioneins in canine cutaneous histiocytic tumors</i> . Current approaches to health and diseases in animals and humans, 19-20.09.2014, Lublin, Polska.
4.	Mikiewicz M. , Otrocka-Domagala I., Paździor-Czapula K., Gesek M. <i>Przypadek guza z komórek Merkla u psa i kota</i> . 6.12.2014, Kraków, Polska.
5.	Pajdak J., Mikiewicz M. , Schulz P., Kaczorek E., Terech-Majewska E. <i>Histopathological lesions associated with metabolic bone disease (MBD) in the central bearded dragon (Pogona vitticeps)</i> . The 33rd Annual Meeting of the European Society of Veterinary Pathology and the 26th Annual Meeting of the European College of Veterinary Pathologists, 2nd-5th September 2015, Helsinki, Finlandia.
6.	Kaczorek E., Terech-Majewska E., Szarek J., Mikiewicz M. , Schulz P., Małaczewska J., Wójcik R.M., Siwicki A.K. <i>Ocena wpływu suplementacji paszy kwasem kynureinowym na obraz histopatologiczny wątroby u pstrąga tęczowego (Oncorhynchus mykiss) przed oraz po zakażeniu eksperymentalnym Yersinia ruckeri</i> . XV Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych: Per scientiam ad salutem animalium et hominum. 22-24 września 2016, Lublin, Polska

Lp.	Doniesienia na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych
7.	Kaczorek E., Terech-Majewska E., Szarek J., Mikiewicz M. , Schulz P., Małaczewska J., Wójcik R.M., Pajdak J., Siwicki A.K. <i>The influence of feed supplementation with kynurenine acid (KYNA) on the gills in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) infected experimentally with Yersinia ruckeri.</i> The 34th ESVP Meeting of the European Society of Veterinary Pathology: 27th ECVP Meeting of the European College of Veterinary Pathology, September 7th-10th, 2016, Bolonia, Włochy.
8.	Mikiewicz M. , Paździor-Czapula K., Otrocka-Domagala I., Gesek M., Myrdek P. <i>Oral cavity lesions in dogs: a retrospective study of 136 cases.</i> The 3rd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, 35th Meeting of the ESVP, 15th Meeting of the ESTP, 28th Meeting of the ECVP. 30th August - 2nd September 2017, Lyon, Francja.
9.	Gesek M., Stenzel T., Otrocka-Domagala I., Paździor-Czapula K., Mikiewicz M. , Michalska K., Koncicki A. <i>Immunohistochemical characterization and proliferation activity of cutaneous leiomyosarcoma with multiple visceral metastases in a fantail pigeon.</i> The 3rd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, 35th Meeting of the ESVP, 15th Meeting of the ESTP, 28th Meeting of the ECVP. 30th August - 2nd September 2017, Lyon, Francja.
10.	Otrocka-Domagala I., Mikiewicz M. , Paździor-Czapula K., Gesek M. <i>Extraskkeletal myxoid-type chondrosarcoma in a rat.</i> The 3rd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, 35th Meeting of the ESVP, 15th Meeting of the ESTP, 28th Meeting of the ECVP. 30th August - 2nd September 2017, Lyon, Francja.
11.	Paździor-Czapula K., Otrocka-Domagala I., Gesek M., Mikiewicz M. , Pawlik M. <i>Expression of Ki67 in canine cutaneous histiocytoma.</i> The 3rd Joint European Congress of the ESVP, ESTP and ECVP, 35th Meeting of the ESVP, 15th Meeting of the ESTP, 28th Meeting of the ECVP. 30th August - 2nd September 2017, Lyon, France.
12.	Mikiewicz M. , Otrocka-Domagala I., Paździor-Czapula K. <i>Wpływ deksametazonu i simwastatyny na morfologię komórek wątrobowych z wykorzystaniem modelu świni.</i> XXI Zjazd Polskiego Towarzystwa Patologów, 26-28.09.2019, Lublin, Polska.
13.	Durska M., Paździor-Czapula K., Mikiewicz M. , Szadurska-Noga M., Otrocka-Domagala I. <i>Choriocarcinoma in a cat – a case study.</i> XVII Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych „Sanitas animalium pro salute homini”, 19-21.09.2024, Olsztyn, Polska.

3. Wykaz udziału w komitetach organizacyjnych i naukowych konferencji krajowych lub międzynarodowych, z podaniem pełnionej funkcji.

BRAK

4. Wykaz uczestnictwa w pracach zespołów badawczych realizujących projekty finansowane w drodze konkursów krajowych lub zagranicznych, z podziałem na projekty zrealizowane i będące w toku realizacji, oraz z uwzględnieniem informacji o pełnionej funkcji w ramach prac zespołów.

Lp.	Wykaz uczestnictwa w projektach badawczych
Zakończone	
1.	Kierownik projektu badawczego Miniatura 5 pt. „Charakterystyka wybranych białek prognostycznych i predykcyjnych we włókniakomięsach poiniekcyjnych u kotów” (Nr DEC-2021/05/X/NZ4/00037) 31.08.2021-30.08.2022 (49 060 zł).
Trwające	
1.	Naukowy Grant Rektora – edycja III: projekt badawczy pt. „Ocena ekspresji wybranych cytokin i białek regulatorowych we włókniakomięsach poiniekcyjnych u kotów – badania wstępne” (wartość projektu 40 000 zł).

5. Wykaz członkostwa w międzynarodowych lub krajowych organizacjach i towarzystwach naukowych wraz z informacją o pełnionych funkcjach.

Lp.	Członkostwo w krajowych i międzynarodowych organizacjach i towarzystwach naukowych
1.	Członek Polskiego Towarzystwa Patologów
2.	Członek Polskiego Towarzystwa Reumatologów
3.	Członek European Society of Veterinary Pathology (ESVP)

6. Wykaz staży w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru.

Lp.	Wykaz staży w instytucjach naukowych lub artystycznych, w tym zagranicznych, z podaniem miejsca, terminu, czasu trwania stażu i jego charakteru
1.	Staż naukowy w Zakładzie Patomorfologii i Weterynarii Sądowej Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych Zwierząt Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w dniach 01-08.-31.10.2019 r.

7. Wykaz członkostwa w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej, itp.).

Lp.	Wykaz członkostwa w komitetach redakcyjnych i radach naukowych czasopism wraz z informacją o pełnionych funkcjach (np. redaktora naczelnego, przewodniczącego rady naukowej, itp.)
1.	Guest Editor w wydaniu Specjalnym „Stomatology of Companion Animals” w <i>Animals</i> (IF 2,7) 29.11.2022-31.12.2024.

8. Wykaz recenzowanych prac naukowych lub artystycznych, w szczególności publikowanych w czasopismach międzynarodowych.

Lp.	Recenzowana publikacja	IF
1.	Lisjak A., Lopes B., Pilla R., Nemec A., Suchodolski J.S., Tozon N. <i>Comparison of Oral Microbiota between Healthy Dogs and Dogs with Oral Tumors. Animals</i> 2023.	2,7
2.	Alves R.F., Lopes C., Rocha E., Madureira T.V. <i>A step forward in the characterization of primary brown trout hepatocytic spheroids as experimental models. Animals</i> 2023.	2,7
3.	Silva J., Azevedo T., Aires I., Medeiros C., Neuparth M.J., Seixas F., Ferreira R., Faustino-Rocha A.I., Oliveira P.A., Duarte J.A. <i>Effects of ladder-climbing exercise on mammary cancer: data from a rat model chemically-induced. Veterinary Science</i> , 2025.	2
4.	Maylina L., Kambayashi S., Baba K., Masaru Okuda M. <i>Simultaneous Analysis of the p16 Gene and Protein in Canine Lymphoma Cells and their Correlation with pRb Phosphorylation. Veterinary Science</i> , 2025.	2
5.	Eshetu E.M., Hagos A.D., Dimsu G.G., Tola M.A., Musa A.H., Hirpesa S.W., Hailu C.B., Tullu B.L. <i>Acute and Subacute Oral Toxicity Study of Herbal Tea of Moringa stenopetala and Mentha spicata Leaves Formulation in Rats. Applied Sciences</i> , 2022.	2,5
6.	Khoi C-S., Chen J-H., Lin T-Y., Chiang C-K., Hung K-Y. <i>Ochratoxin A-induced nephrotoxicity: Up to date evidence. International Journal of Molecular Sciences</i> , 2021.	4,9

Lp.	Recenzowana publikacja	IF
7.	Saad A.B., Vauthier V., Lapalus M., Mareux E., Bennana E., Durand-Schneider A-M., Bruneau A., Delaunay J-L., Gonzales E., Housset C., Aït-Slimane T., Guillonnet F., Jacquemin E., Falguières T. <i>RAB10 interacts with ABCB4 and regulates its intracellular traffic. International Journal of Molecular Sciences</i> , 2021.	4,9
8.	Xi Q., Liu C-S., Chen T., Chen X-p., Zhu Y-L., Wang S., Shu G., Jiang Q-y., Sun J., Zhang Y-l. <i>Exploration of miRNAs related to IGF-1 regulation in primary porcine hepatocytes. International Journal of Molecular Sciences</i> , 2019.	4,9
9.	Hoonpo P., Ayudhaya T.I.N., Chaichoun K., Sangsuriya P, Mamom T; Suwannaprapha P. <i>Enhancing the cytodiagnostic values of canine gingival masses through a powerful combination of micronuclei assay, argyrophilic nucleolar organizer region staining technique, and cytomorphometric analysis. The Veterinary Journal</i> , 2024.	2,3
10.	Ito H., Ito S.; Kondo H. <i>Canine oral papillary squamous cell carcinoma with lymph node metastasis in a dog. The Canadian Veterinary Journal</i> , 2025	1,261
11.	Yang, Y; Go D-M.; Jung J-H; Seo D., Hwang S-H.; Kim D-Y.; Kim Y. <i>Calcifying aponeurotic fibroma on the paw in a dog. The Canadian Veterinary Journal</i> , 2021	1,261
12.	Furuta K., Nishi K., Park, C-H., Maeda K., Iwai S., Sakonjyu I. Saigami K. Okano S. <i>A case of papillary squamous cell carcinoma in the mandible of a young French bulldog. The Canadian Veterinary Journal</i> , 2021	1,261
13.	Mei P., Yanting N., Songyuan X., Weisi L., Wen Z., Yali D., Ling Y., Xiaoxue L., Yang Z., Jinyu L., Xihong Z., Song J., Yilin L., Yiling D. <i>MeCP2 inhibits SFRP4 to mediate the immune microenvironment by activating CD8 T cells in preeclampsia. Biology of Reproduction</i> , 2024.	3,1
14.	Gradner G., Janssen J., Oevermann A., Tichy A., Kummer S., Burger S., Walter I. <i>Immunohistochemical staining properties of osteopontin and ki-67 in feline meningiomas. BMC Veterinary Research</i>	2,3
15.	Wang L. <i>Primary oral amelanotic malignant melanoma: a rare non-pigmented case report. Cancer Management and Research</i> , 2023.	2,5
16.	Suzuki L.Y., Waterloo M.M.L, Consalter A., Ferreira A.M.R., Leite J. <i>Use of histochemical techniques for accurate diagnosis of melanocytic neoplasms in dogs. Veterinary Research Communications</i> , 2023.	1,8
17.	Karakurt E., Coskun N., Aydin U., Dag S., Beytut E., Ataseven V.S., Yilmaz V., Dogan F., Nuhoglu H., Ermutlu C.S., Yildiz A. <i>Cell Proliferation, p53 and the Apoptosis Index in Canine Oral Papillomatosis. Archive of Microbiology</i> , 2023.	2,3
18.	Soltero-Rivera M., Del Toro Quinones M.P., Boaz Arzi B., Vapniarsky N. <i>Clinicopathologic characterization of oral eosinophilic lesions in 38 cats (1997 to 2022). JAVMA – Journal of the American Veterinary Medical Association</i> , 2023.	1,6
19.	Nr manuskryptu: CR-2019-0890. <i>Progressive histiocytosis of dendritic cells non-epitheliotropic in a feline. Ciencia Rural</i> , 2019.	0,8
20.	Nr manuskryptu: CR-2021-0025. <i>Primary extranodal T-Cell lymphoma of the trachea in a dog. Ciencia Rural</i> , 2021.	0,8
21.	Abdrabou A., El-Attar Y., Alshenawy H.A., Hawwam S. <i>Immunohistochemical Evaluation of Tryptase and Chymase as Mast Cell Markers in Benign and Malignant Melanocytic Lesions. Dermatology Research and Practice</i>	1,5
22.	Ahmed I., Sozmen M. <i>PDGF-A, PDGFRA, Integrin subunit alpha v and Selectin E show increased expression in canine cutaneous fibrosarcomas. Biotechnic&Histochemistry</i> , 2020.	1,6
23.	Ramírez G.A., de Los Monteros A.E. <i>Study on the Role of Histochemical Stains in Identifying Merkel Cells in Dogs. The Anatomical Record</i> , 2019.	1,8

9. Wykaz uczestnictwa w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych.

Lp.	Wykaz uczestnictwa w programach europejskich lub innych programach międzynarodowych
1.	Uczestnictwo w Szkole Letniej Patologów Weterynaryjnych organizowanej przez ECVP-ESVP 18-29.07.2016, Berlin, Niemcy.
2.	Uczestnictwo w Szkole Letniej Patologów Weterynaryjnych organizowanej przez ECVP-ESVP 17-28.07.2017, Berlin, Niemcy.
3.	Uczestnictwo w Szkole Letniej Patologów Weterynaryjnych organizowanej przez ECVP-ESVP 16-27.07.2018, Walencja, Hiszpania.
4.	Uczestnictwo w Szkole Letniej Patologów Weterynaryjnych organizowanej przez ECVP-ESVP 15-26.07.2019, Walencja, Hiszpania.

10. Wykaz udziału w zespołach badawczych, realizujących projekty inne niż określone w pkt. II.4.

BRAK

11. Wykaz uczestnictwa w zespołach oceniających wnioski o finansowanie badań, wnioski o przyznanie nagród naukowych, wnioski w innych konkursach mających charakter naukowy lub dydaktyczny.

BRAK

III. WSPÓLPRA Z OTOCZENIEM SPOŁECZNYM I GOSPODARCZYM

1. Wykaz dorobku technologicznego.

BRAK

2. Współpraca z sektorem gospodarczym.

BRAK

3. Wykaz uzyskanych praw własności przemysłowej, w tym uzyskanych patentów krajowych lub międzynarodowych.

BRAK

4. Wykaz wdrożonych technologii.

BRAK

5. Wykaz wykonanych ekspertyz lub innych opracowań wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców.

Lp.	Wykaz wykonanych ekspertyz lub innych opracowań wykonanych na zamówienie instytucji publicznych lub przedsiębiorców
1.	Prowadzenie działalności diagnostycznej jako patomorfolog, obejmującej wykonywanie specjalistycznych ekspertyz histopatologicznych i sądowo-weterynaryjnych na zlecenie podmiotów sektora prywatnego, policji oraz prokuratury.

6. Wykaz udziału w zespołach eksperckich lub konkursowych.

BRAK

7. Wykaz projektów artystycznych realizowanych ze środowiskami pozaartystycznymi.

BRAK

IV. DANE NAUKOMETRYCZNE

- Impact Factor (w dziedzinach i dyscyplinach, w których parametr ten jest powszechnie używany jako wskaźnik naukometryczny): **52,833**
- Liczba cytowań publikacji wnioskodawcy, z oddzielnym uwzględnieniem autocytowań: **Web of Science (Core Collection): 204/197**
- Indeks Hirscha: **Web of Science (Core Collection): 10**

Informacje zawarte w pkt. IV powinny wskazywać również na bazę danych, na podstawie której zostały podane.

Przy wyborze tej bazy należy zwracać uwagę na specyfikę dziedziny i dyscypliny naukowej, w której kandydat ubiega się o nadanie stopnia doktora habilitowanego.

Rada Doskonałości Naukowej informuje, że podawanie danych naukometrycznych – w opinii Rady Doskonałości Naukowej – jest wskazane i zalecane, wynika to także ze stosowanej powszechnie praktyki przez samych kandydatów ubiegających się o awans naukowy. Należy jednak podkreślić, że podane we wnioskach o wszczęcie postępowania awansowego dane naukometryczne nie mogą stanowić kryterium oceny dorobku naukowego Kandydata dla podmiotów doktoryzujących, habilitujących oraz samej Rady Doskonałości Naukowej, organów prowadzących postępowania w sprawie nadania stopnia lub tytułu. Zadaniem tych organów jest przede wszystkim ocena ekspercka dorobku naukowego Kandydata ubiegającego się o awans naukowy, zaś decyzja o nadaniu stopnia lub tytułu nie powinna być uzależniona od podania tych danych.

Maciej Mikrosy
.....

(podpis wnioskodawcy)