



UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU  
Wydział Lekarski  
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Katedra Histologii i Embriologii  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy  
ul. Karłowicza 24, 85-092 Bydgoszcz  
tel. 52 585 37 25

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpl. data	13 -06- 2023
L. dz. RN-BM/	906

Uniwersytet Medyczny  
we Wrocławiu  
  
RPW/9528/2023 P  
Data:2023-06-12

Bydgoszcz, dn. 5.06.2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Rola ekspresji testyny w niedrobnokomórkowych rakach płuc”**

**autorstwa lek. Macieja Ornata**

realizowana w Katedrze Morfologii i Embriologii Człowieka  
Zakładzie Histologii i Embriologii

Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

**promotor: prof. dr hab. Piotr Dzięgiel**

VIDI  
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE  
Przewodnicząca  
A. Halon  
prof. dr hab. Agnieszka Haloń

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska na stopień doktora nauk medycznych pt. „Rola ekspresji testyny w niedrobnokomórkowych rakach płuc” porusza niezwykle ciekawe merytorycznie i potrzebne w dziedzinie nauk medycznych zagadnienia dotyczące poszukiwania potencjalnych markerów rokowniczych, a ściślej powiązanie ich ekspresji z wybranymi parametrami kliniczno-patologicznymi pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc. Warto podkreślić, że badania ujęte w rozprawie doktorskiej lek. Macieja Ornata zostały sfinansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (obecnie Ministerstwo Edukacji i Nauki) w ramach uzyskanego przez Doktoranta grantu naukowego pn. „Diamentowy Grant” (nr 0121/DIA/2017/46) na kwotę 219 890 zł, który był realizowany na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu.

Rozprawa autorstwa lek. Macieja Ornata ma typowy i właściwy układ dla rozprawy na stopień doktora nauk medycznych o charakterze eksperymentalnym. Obejmuje 111 stron maszynopisu i została podzielona na następujące rozdziały: „Wstęp”, „Uzasadnienie podjęcia tematu”, „Cele pracy”, „Materiały i metody”, „Wyniki przeprowadzonych badań”, „Omówienie wyników i dyskusja”, „Silne i słabe strony przeprowadzonych badań”, „Wnioski” i „Bibliografia”. Rozprawę kończy „Streszczenie w języku polskim” i „Streszczenie w języku angielskim”. Do rozprawy dołączono opinię Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu wyrażającą zgodę na przeprowadzenie badań. Praca została



napisana w sposób przejrzysty i zrozumiały. Język rozprawy jest poprawny i obejmuje właściwą i aktualnie używaną terminologię. Sposób edycji pracy jest prawidłowy do zakresu i przedmiotu rozprawy. Odnotowałem jedynie kilka błędów stylistycznych i literowych, które nie wpływają na merytoryczną ocenę rozprawy.

Wstęp do pracy jest oparty o poprawnie dobrane i aktualne piśmiennictwo z zakresu tematyki badawczej. Rozdział ten jest zrozumiały i daje dobre podstawy do lektury dalszych części rozprawy. Wskazuje na wiedzę Doktoranta w zakresie obranej tematyki badawczej i uwzględnia związką charakterystykę i rolę białek (tj. testyny, surwiwiny i Ki-67), śmierci na drodze apoptozy oraz nowotworów płuc ze szczególnym uwzględnieniem raków niedrobnokomórkowych, w tym ich klasyfikację, epidemiologię, objawy, leczenie i etiopatogenezę.

Cel badawczy został poprzedzony przez Doktoranta rozdziałem „Uzasadnienie podjęcia tematu”, w którym przedstawiona została istota badań związana epidemiologią oraz potencjalna rola testyny w patogenezie różnych typów nowotworów w kontekście funkcji supresorowych i braku przeprowadzonych szczegółowych badań dotyczących poziomu ekspresji testyny w niedrobnokomórkowych rakach płuc z wykorzystaniem materiału klinicznego uzyskanego w wyniku resekcji guzów. Cel przeprowadzonych badań został poprawnie sformułowany i obejmował (1) ocenę lokalizacji ekspresji testyny w komórkach niedrobnokomórkowych raków płuc, (2) ocenę nasilenia ekspresji testyny, surwiwiny oraz Ki-67 w niedrobnokomórkowych rakach płuc, (3) ocenę związku pomiędzy poziomem ekspresji wyżej wymienionych białek a danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów z uwzględnieniem analizy przeżycia, (4) ocenę indeksu apoptotycznego w niedrobnokomórkowych rakach płuc (ocenianego przy pomocy analizy ekspresji kaspazy-3) oraz jego korelacja z danymi kliniczno-patologicznymi oraz poziomem ekspresji badanych białek.<sup>2</sup>

Rozprawa doktorska lek. Macieja Ornata została dobrze zaplanowana, a dobrane przez Doktoranta techniki badawcze, opisane w rozdziale „Materiały i metody”, pozwoliły na zrealizowanie wszystkich założonych celów badawczych.

Zasadniczą część badań ujętych w przedstawionej do recenzji rozprawie doktorskiej przeprowadzono na materiale tkankowym, który stanowił łącznie 203 przypadki niedrobnokomórkowych raków płuc (w tym 83 przypadki raka typu płaskonabłonkowego oraz



120 przypadki raka typu gruczołowego). Do przeprowadzenia badań wykorzystano materiał kliniczny uzyskany od pacjentów operowanych z powodu niedrobnokomórkowych raków płuc w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej przy Dolnośląskim Centrum Chorób Płuc we Wrocławiu. Badania poprzedzono poprzez ocenę wstępnych założeń dotyczących ekspresji testyny na komórkach fibroblastów ludzkich (linii IMR-90) oraz raków płuc typu płaskonabłonkowego (linii NCI-H1703 i NCI-H522) i typu gruczołowego (linii A549). Materiał kliniczny zatopiony w parafinie oceniano immunohistochemicznie wobec testyny, surwiwiny, Ki-67 oraz kaspazy-3 na wcześniej utworzonych mikromacierzach tkankowych. Ekspresję testyny na poziomie białka oceniano przy użyciu techniki Western blot, natomiast na poziomie mRNA metodą RQ-PCR po uprzednim wykorzystaniu techniki mikrodysekcji laserowej. Uzyskane w toku przebiegu procesu badawczego dane liczbowe poddano analizie statystycznej z użyciem właściwych testów.

Badania podjęte przez Doktoranta zostały opisane w rozdziale „Wyniki przedstawionych badań”. Doktorant wykazał zróżnicowaną ekspresję testyny na poziomie mRNA w liniach komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuc. Wobec fibroblastów linii IMR90 zaobserwowano obniżony poziom ekspresji w komórkach linii NCI-H1703 oraz NCI-H522, natomiast wyższą w linii A549. Ocena intensywności fluorescencji testyny na mikroskopowych obrazach konfokalnych wykazała jej wyższą fluorescencję wobec fibroblastów linii IMR90 w komórkach NCI-H552 oraz A549, natomiast porównywalną w komórkach linii NCI-H1703. Ta część badań okazała się sprzeczna z pierwotnymi założeniami o niższej ekspresji testyny w komórkach nowotworowych. Doktorant nie wskazał w swojej analizie, czy opisane zmiany w ekspresji testyny w komórkach hodowanych *in vitro* były statystycznie istotne. W dalszej części badań ocenił nasilenie ekspresji testyny w rakach niedrobnokomórkowych płuc w odniesieniu do prawidłowych tkanek z marginesu cięcia chirurgicznego. Wykazano istotnie statystyczny wzrost jej ekspresji w stosunku do tkanek prawidłowych. Ponadto istotnie wyższą ekspresją charakteryzowała się grupa raków typu gruczołowego w odniesieniu do grupy raków płaskonabłonkowych, stąd słusznie w dalszej analizie postanowiono utrzymać podział na typy histologiczne niedrobnokomórkowego raka płuc. W obrębie grupy raków płaskonabłonkowych Doktorant wykazał, że silna ekspresja testyny wiązała się z istotnie krótszym czasem przeżycia, większą średnicą guza oraz większym nasileniem apoptozy. Ponadto, u pacjentów z silną ekspresją testyny istotnie częściej



stwierdzono zaawansowane stadium choroby nowotworowej. Podobnie, w obrębie grupy raków typu gruczołowego, silna ekspresja testyny wiązała się z większą średnicą guza oraz nasileniem apoptozy. Zgodnie z tekstem rozprawy, nie zaobserwowano istotności statystycznej wobec innych analizowanych parametrów oraz danych kliniczno-patologicznych. Jednakże w tabeli nr 7 wskazano, że silna ekspresja testyny w raku gruczołowym płuc istotnie związana była również z silną ekspresją Ki-67. W przypadku surwiwiny, jej ekspresja również była istotnie statystycznie wyższa wobec prawidłowych tkanek z marginesu cięcia chirurgicznego, jednak nie wykazano jej istotnie statystycznego zróżnicowania w obrębie ocenianych typów histologicznych raka płuc. Stąd postanowiono przeanalizować jej ekspresję wobec danych kliniczno-patologicznych łącznie. Istotnie statystycznie różnice pomiędzy ekspresją surwiwiny odnotowano jedynie wobec nikotynizmu. Opierając się na danych literaturowych sugerujących zmienność funkcji surwiwiny w zależności od jej lokalizacji, Doktorant postanowił również ocenić zależności pomiędzy lokalizacją ekspresji surwiwiny (cytoplazmatycznej i jądrowej/mieszanej) oraz nasileniem jej ekspresji jądrowej a wybranymi danymi kliniczno-patologicznymi. Wykazano, że jądrowa/mieszana ekspresja surwiwiny wiąże się z wyższym stadium zaawansowania choroby nowotworowej, większą średnicą guza, większym obszarem martwicy w obrębie guza, częstszym zajęciem węzłów chłonnych oraz silniejszą ekspresją Ki-67. W tabeli nr 9, co nie zostało wspomniane w tekście rozprawy, odnotowana została istotność statystyczna również wobec indeksu apoptotycznego. Umiarkowana i silna jądrowa ekspresja surwiwiny wiązała się ze wzrostem średnicy oraz wielkości guza. W tabeli nr 10 wskazano również istotność statystyczną wobec nikotynizmu. Doktorant ocenił także stopień nasilenia ekspresji Ki-67 w zależności od typu histologicznego niedrobnokomórkowego raka płuc. Wykazał jego istotnie wyższą ekspresję wobec prawidłowych tkanek z marginesu cięcia chirurgicznego oraz istotnie wyższą ekspresję w rakach płaskonabłonkowych niż w rakach gruczołowych, stąd słusznie dokonał dalszej analizy z podziałem na typy histologiczne niedrobnokomórkowego raka płuc. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że silna ekspresja Ki-67 w rakach płaskonabłonkowych wiązała się z większą średnicą guza, większym obszarem martwicy w obrębie guza, jak również wyższym poziomem ekspresji kaspazy-3. Natomiast w rakach typu gruczołowego jedynie z wyższym poziomem ekspresji kaspazy-3. Podobnie jak w przypadku Ki-67, kaspaza-3 wykazywała istotnie wyższą ekspresję wobec prawidłowych tkanek z marginesu cięcia chirurgicznego oraz istotnie wyższą ekspresję w rakach płaskonabłonkowych niż w rakach gruczołowych. W grupie chorych na raka



płaskonabłonkowego, silna ekspresja kaspazy-3 wiązała się jedynie z wyższym stadium zaawansowania choroby. Natomiast w rakach gruczołowych z większą średnicą oraz wielkością guza. Kolejnym krokiem badawczym była ocena ekspresji testyny z wykorzystaniem badań molekularnych. Doktorant do tego celu wykorzystał technikę Western blot i RQ-PCR. Wykazano istotnie wyższą ekspresję białka testyny w rakach płaskonabłonkowych w odniesieniu do tkanek z marginesu cięcia chirurgicznego. Nie wykazano istotności statystycznej pomiędzy poszczególnymi typami histologicznymi niedrobnokomórkowego raka płuc, jak również pomiędzy rakami gruczołowymi a tkankami z marginesu cięcia chirurgicznego. Jednakże zamieszczone przez doktoranta reprezentatywne obrazy prążków wskazują na wyższą ekspresję testyny w obrębie guza. W przypadku pomiarów ekspresji testyny na poziomie mRNA, nie zaobserwowano jej istotnych statystycznie zmian wobec typów histologicznych niedrobnokomórkowego raka płuc oraz w stosunku do tkanek z marginesu cięcia chirurgicznego. Jednakże, bardziej szczegółowa analiza wskazała trend związany z niższą ekspresją u pacjentów w wyższym stadium zaawansowania choroby, z wyższym stopniem złośliwości histologicznej i wyższą wielkością guza. Co więcej, analiza krzywej przeżycia z uwzględnieniem mediany jako punktu odcięcia wykazała, że poziom ekspresji jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w niedrobnokomórkowych rakach płuc. W dalszej części pracy Doktorant pokazał ocenę wzajemnej korelacji badanych białek, tłumacząc tym samym słuszność posługiwania się skalą H-Score w zakresie oceny ekspresji surwiwiny i testyny oraz wykazując jej zgodność z wynikami uzyskanymi w skali IRS. Analiza wzajemnej korelacji badanych białek wykazała dodatnią korelację pomiędzy ekspresją testyny i Ki-67, testyny i kaspazy-3, testyny i surwiwiny zarówno w rakach płaskonabłonkowych, jak i gruczołowych, dodatnią korelację poziomu ekspresji kaspazy-3 z Ki-67 oraz Ki-67 z surwiwiną w rakach płaskonabłonkowych, a także dodatnią korelację Ki-67 z kaspazą-3 w rakach gruczołowych. W toku procesu badawczego Doktorant przeprowadził również analizę przeżycia pacjentów w zależności od poziomu ekspresji badanych białek mierzonego w oparciu o technikę immunohistochemiczną. Nie wykazano istotnych statystycznie zmian w przeżyciu pacjentów w zależności od poziomu ekspresji testyny. W związku z czym Doktorant przeprowadził dodatkową analizę z przyjęciem wieku 75 lat w momencie diagnozy jako punktu odcięcia. Korekta wieku skutkowała wykazaniem istotnie krótszego czasu pacjentów z rakiem gruczołowym, którzy charakteryzowali się silną ekspresją testyny w stosunku do pacjentów z jej umiarkowaną i słabą ekspresją. Analiza przeżycia pacjentów w zależności od nasilenia



ekspresji surwiwiny wykazała, że jej umiarkowana i silna ekspresja może wskazywać na niekorzystne rokowanie pacjentów, a jej jądrowa umiarkowana i silna ekspresja prowadzi do istotnego skrócenia czasu przeżycia pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc. Z kolei analizy przeżycia pacjentów w zależności od odsetka komórek z pozytywną ekspresją Ki-67 albo od poziomu ekspresji kaspazy-3 nie wykazały żadnych różnic w czasie przeżycia pacjentów zarówno w grupie raków płaskonabłonkowych, jak i gruczołowych. Część badawczą pracy oceniam bardzo wysoko. Jednakże z obowiązku recenzenta, oprócz ujętych powyżej drobnych nieścisłości, zobowiązany jestem do wskazania innych, ale niezwykle istotnych elementów wpływających na przejrzystość zaprezentowanych wyników oraz prowadzących do zachowania czytelnej formy ich prezentacji. Wobec przeprowadzonej analizy wskazującej rozkład wieku pacjentów w momencie zachorowania wobec ich czasu przeżycia, można by pokusić się o konsekwentną analizę wyników dla pozostałych białek poprzez uwzględnienie korekty wieku. Niezwykle ciekawym podejściem badawczym byłaby ocena czasu przeżycia pacjentów względem ekspresji badanych białek przy użyciu statystycznych i graficznych metod optymalizacji punktów odcięcia, które umożliwiają rozwarstwienie populacji na dwie grupy. Warto byłoby również zestawzić wyniki ujęte w rozprawie doktorskiej z danymi pochodzącymi z publicznie otwartych baz danych ekspresyjnych. Powyższe uwagi należy traktować jako wskazówkę i nawet w najmniejszym stopniu nie umniejszają one wartości merytorycznej rozprawy.

Otrzymane wyniki zostały omówione przez Doktoranta w kontekście doniesień literaturowych w rozdziale „Omówienie wyników i dyskusja”. Rozdział ten jest napisany rzeczowo, merytorycznie i w sposób krytyczny wobec otrzymanych rezultatów badań. Obejmuje wszystkie niezbędne aspekty związane z zakresem merytorycznym rozprawy. Krytyczność wobec uzyskanych wyników w kontekście braku zgodności uzyskanych rezultatów z danymi literaturowymi oraz wynikami uzyskanymi przez badaczy z innych ośrodków Doktorant przedstawił również w rozdziale „Silne i słabe strony przeprowadzonych badań”. Nie mogę jednak zgodzić się, że niezgodność wyników w kontekście innych grup badawczych stanowi słabą stronę przeprowadzonych badań. Moim zdaniem jest to bardzo silna strona przeprowadzonych badań i uprawnia do podjęcia szerszej dyskusji naukowej, a także otwartej, interdyscyplinarnej i uzasadnionej możliwości kontynuacji podjętego tematu badawczego.



Część merytoryczną pracy kończy pięć wniosków: (1) Nasilona ekspresja testyny wiąże się z wyższym zaawansowaniem choroby nowotworowej w grupie pacjentów z NSCLC, zwłaszcza w typie SCC. (2) Analiza poziomu ekspresji testyny nie znajduje zastosowania w ocenie rokowania pacjentów z NSCLC. (3) Zmiana nasilenia ekspresji testyny może mieć związek z rozwojem NSCLC. (4) Dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją testyny oraz surwiwiny i Ki-67 wskazuje na zmienioną funkcję badanego białka w NSCLC. (5) Jądrowa ekspresja surwiwiny, w przeciwieństwie do ekspresji cytoplazmatycznej, jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w NSCLC.

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że ujęte w rozprawie doktorskiej wyniki są spójne i przydatne z punktu widzenia podjętej problematyki badawczej. Doktorant pokazał, że potrafi samodzielnie sformułować i rozwiązać problem naukowy, wykorzystać dostępny warsztat badawczy oraz szeroko analizować wyniki. Potrafi również przeprowadzić dyskusję swoich wyników z wynikami innych grup badawczych. Stąd jednoznacznie stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Macieja Ornata pt. „Rola ekspresji testyny w niedrobnokomórkowych rakach płuc” spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r.

o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Dlatego wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Macieja Ornata do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Ponadto, z uwagi na wysoką wartość poznawczą pracy, jakość przeprowadzonych badań oraz ich sfinansowanie ze źródeł zewnętrznych, wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej autorstwa lek. Macieja Ornata.

dr hab. n. med. i n. o zdr. Maciej Gagat, prof. UMK