



dr hab. Agnieszka Gizak, prof. UWr

Wrocław, 07.07.2023

## OCENA

### Rozprawy doktorskiej lek med. Krzysztofa Kurnola

#### pt. „Ekspresja tesminy w raku żołądka”

Mimo iż częstość zachorowań na raka żołądka w Polsce powoli spada, rak ten jest czwartą najczęstszą przyczyną zgonów z powodu chorób nowotworowych na świecie. Dodatkowo, rosnąca wraz z wiekiem liczba zachorowań może sugerować, że w szybko starzejących się społeczeństwach ta tendencja spadkowa nie zostanie utrzymana. Co istotne, nie odkryto dotychczas markera białkowego swoistego dla raka żołądka, a to skutkuje częstym rozpoznawaniem tej choroby dopiero w wysokim stadium zaawansowania, które utrudnia lub uniemożliwia całkowite wyleczenie.

Recenzowana rozprawa doktorska powstała po opiece prof. dr. hab. Piotra Dziegiela w Katedrze Morfologii i Embriologii Człowieka Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Badania prowadzone przez zespół Pana Profesora od lat skupiają się na poszukiwaniu nowych markerów procesów nowotworzenia. Białek, które mogłyby nie tylko stać się markerami rokowniczymi i czynnikami ułatwiającymi rozpoznanie stadium zaawansowania nowotworu, ale też celami terapii przeciwnowotworowych. Jednym z takich białek może być tesmina, swoiste dla jąder białko podobne do metalotionein, kodowane przez gen *MTL5*. Ekspresja tego genu u człowieka - poza tkanką gonad - wydaje się być niska, a jej podwyższenie obserwuje się w stanach patologicznych, w tym w nowotworach złośliwych. Jako białko wiążące metale (np. cynk), tesmina może wpływać na aktywność czynników transkrypcyjnych oraz enzymów wykorzystujących te metale jako kofaktory, i tym samym wpływać na procesy podziałowe oraz metabolizm komórki.

Zatem celem recenzowanej rozprawy doktorskiej było: a) określenie nasilenia ekspresji



ZAKŁADY WNB  
ZAKŁAD FIZJOLOGII I NEUROBIOLOGII MOLEKULARNEJ  
ul. H. Sienkiewicza 21  
50-335 Wrocław  
tel. +48 71 375 40 56 | +48 71 375 40 53  
zfnm@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

tesminy na poziomie mRNA (przy użyciu real-time PCR) oraz białka (immunohistochemia z wykorzystaniem macierzy tkankowych) i jej wewnątrzkomórkowej lokalizacji w rakach żołądka i w tkance zdrowej; b) ocena związku między powyższymi parametrami z danymi kliniczno-patologicznymi pacjentów (w tym z całkowitym czasem przeżycia chorego). Poza tym, choć nie zostało o tym wspomniane w rozdziale "Cele pracy" – subkomórkową lokalizację tesminy skorelowano z obecnością w jądrach komórek białka Ki67, uważanego za marker podziałów komórkowych.

Mimo iż opis stawianych sobie przez Autora rozprawy celów brzmi nieskomplikowanie, to nie można zaprzeczyć, że rozprawa podejmuje niezwykle istotny temat badawczy – z punktu widzenia pacjenta, ale i społeczeństwa ponoszącego koszty leczenia osób z chorobą nowotworową. Przeprowadzenie eksperymentów nie na ustalonych liniach komórek rakowych (które przecież jako wzorzec „prawdziwych” komórek rakowych są dalekie od doskonałości), a na tkance pobranej od pacjentów, podnosi wartość tej pracy. Badania przeprowadzono na 85 przypadkach ludzkiego raka żołądka (45 zarchiwizowanych w bloczkach parafinowych i 40 pobranych podczas operacji) oraz na 38 przypadkach zdrowej tkanki żołądka uzyskanej z zachowanego marginesu cięcia chirurgicznego. Badania uzyskały odpowiednią zgodę komisji bioetycznej.

Rozprawa nie epatuje wstępem w rozmiarze podręcznika, lecz skupia się na opisie zagadnień istotnych dla zrozumienia jej celów oraz uzyskanych wyników. Metodyka doświadczeń dobrana jest prawidłowo, a wyniki doświadczeń są szczegółowo analizowane. Pokazują one jak skomplikowana jest biologia nowotworów i jak trudne może być interpretowanie wyników, jeśli nie ocenia się ich "hurtowo", ale z uwzględnieniem danych kliniczno-patologicznych pacjentów, jak zrobił to Autor recenzowanej rozprawy. Zbadał on szereg zależności między poziomem mRNA i/lub białka tesminy a stopniem złośliwości i stopniem zaawansowania nowotworu, typem nowotworu wg klasyfikacji Laurena, danymi dotyczącymi wieku, płci i czasu przeżycia pacjenta, jak również stężeniem w surowicy markerów nowotworowych Ca 19-9 i CEA. Na podstawie wyników tych analiz Autor rozprawy wnioskuje, że:



ZAKŁADY WNB  
ZAKŁAD FIZJOLOGII I NEUROBIOLOGII MOLEKULARNEJ  
ul. H. Sienkiewicza 21  
50-335 Wrocław  
tel. +48 71 375 40 56 | +48 71 375 40 53  
zfnm@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

- podwyższona ekspresja mRNA oraz białka tesminy w komórkach raka żołądka w porównaniu z komórkami zdrowymi może świadczyć o udziale tesminy w powstawaniu raka żołądka,  
- wyższa ekspresja mRNA tesminy w rakach o stopniu złośliwości G1 w porównaniu do stopnia G2 i G3 oraz dłuższy czas przeżycia pacjentów z wyższą ekspresją białka tesminy mogą sugerować supresorową rolę tesminy w raku żołądka oraz świadczyć o jej potencjalnej roli jako pozytywnego czynnika prognostycznego w tej chorobie. W rozdziale Dyskusja wyciągnięte wnioski omówione zostały przez Autora w kontekście istniejącej wiedzy na temat tesminy i metalotionein. Po przeczytaniu całości mogą stwierdzić, że cenny materiał badawczy nie został zmarnowany.

Rolą recenzenta jest jednak krytyczne czytanie rozprawy doktorskiej. Zatem poniżej przedstawiam listę znalezionych błędów oraz komentarze i zastrzeżenia do przeczytanego tekstu.

Autor rozprawy nie uniknął literówek oraz błędów stylistycznych i gramatycznych, wynikających prawdopodobnie z wielokrotnych prób udoskonalania tekstu. Nie będę ich tu wymieniać, skupiając się tylko na poważniejszych uchybieniach.

1. W rozprawie dwukrotnie mowa jest o wirusie Epsteina Barra, gdy tymczasem to wirus odkryty przez Michaela Epsteina i Yvonne Barr, zatem poprawna polska nazwa to wirus Epsteina Barr. Mowa jest także o teście Kołomorowa, zamiast Kołomogorowa (co jest literówką, ale istotną, bo w nazwisku).

2. Na stronie 10 mowa jest o „linii komórkowej fibroblastów uzyskanych z nerki małpy afrykańskiej”. Nie ma takiego gatunku, jest to opisowe określenie wszystkich małp występujących na tym kontynencie. Ponieważ w języku polskim nie ma rozróżnienia między „monkey”, a „ape”, czytelnik nawet w przybliżeniu nie może stwierdzić, o jaki gatunek małpy chodziło autorowi tekstu.

3. Białko czy mRNA mają masę, nie „wagę”, a takie określenie pojawia się na str. 10 i 42.

4. Uważam, że terminy „ekspresja IHC białka” czy „jądrowa/cytoplazmatyczna ekspresja białka” to zdecydowanie zbyt duże skróty myślowe – chodzi przecież o lokalizację białka, a nie miejsce jego syntezy w komórce.



ZAKŁADY WNB  
ZAKŁAD FIZJOLOGII I NEUROBIOLOGII MOLEKULARNEJ  
ul. H. Sienkiewicza 21  
50-335 Wrocław  
tel. +48 71 375 40 56 | +48 71 375 40 53  
zfrm@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

5. Podobnie, określenia: chemioterapia „wydłuża przeżycia chorych”, czy zbieranie „danych dotyczących przeżyć” byłyby nawet zabawne, gdyby nie dotyczyły dramatu ludzkiego, a tak są po prostu żargonem medycznym, którego warto unikać w pracach naukowych, co – jako współautor kilku publikacji naukowych indeksowanych w PubMed – Autor rozprawy powinien wiedzieć.
6. W opisie metod podkreślanie, że coś zajmowało „czas 5 minut” nie ma sensu: nikt nie spodziewa się minut kątowych czy świetlnych w opisie długości trwania np. inkubacji.
7. Na stronie 39 mowa jest o „mysich przeciwciałach antyludzkich anti-Ki-67”.
8. W opisie metod można przeczytać: „wykonano próbę kontrolną z użyciem skrawków tkanki jądra ludzkiego”, jednak w Materiałach nie wspomniano o tym, skąd pochodziła ta tkanka ani czy uzyskano zgodę na jej wykorzystanie do badań.
9. Strona 40: w tekście można przeczytać o ilorazie intensywności reakcji IHC oraz odsetka komórek o pozytywnej ekspresji antygeny, gdy tabela pokazuje, że chodzi o iloczyn.
10. I dalej na tej stronie: „W celu określenia ekspresji tesminy na obszarze jądra komórkowego komórek raka zastosowano półilościową skalę punktową opisującą odsetek komórek nowotworowych wykazujących pozytywną ekspresję antygeny tesminy w stosunku do ogółu komórek nowotworowych widocznych w zakresie badanego fragmentu tkanki”. Chyba chodziło o odsetek komórek wykazujących *jądrową* obecność tesminy?
11. Str. 45: „W celu określenia ekspresji mRNA *MTL5* przeprowadzono reakcje RT-PCR w grupie 38 przypadków”. Z opisu wyników można wywnioskować, że liczba 38 dotyczy tylko grupy kontrolnej – jest jeszcze 85 przypadków raków.
12. Na stronie 62 mowa o użyciu testu Mantela-Coxa, o którym nie wspomniano w podrozdziale Analiza statystyczna.
13. W rozdziale Dyskusja, omawiając wcześniej uzyskane wyniki innych badaczy Autor rozprawy pisze o zbieżności ich wyników z jego, choć w zasadzie powinno być odwrotnie.
14. We Wnioskach dwukrotnie pojawia się stopień G2, gdy powinno być: G2 i G3.
15. Tekst jest swoistą mieszanką formy bezosobowej („wykazano”) oraz osobowej („wykazałem”). O ile mogę zrozumieć, dlaczego Autor wybrał taką formę, pozwalającą na

ZAKŁADY WNB  
ZAKŁAD FIZJOLOGII I NEUROBIOLOGII MOLEKULARNEJ  
ul. H. Sienkiewicza 21  
50-335 Wrocław  
tel. +48 71 375 40 56 | +48 71 375 40 53  
zfnm@uwr.edu.pl | www.uni.wroc.pl

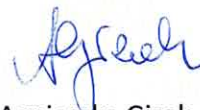
odróżnienie badań cudzych od jego własnych, to nie rozumiem, dlaczego czasem obie formy pojawiają się zamiennie, gdy mowa o oryginalnych wynikach Autora (np. podpis pod ryc. na str. 53).

Mam też kilka pytań:

- Czy wiadomo, dlaczego rak żołądka występuje częściej u mężczyzn? Czy związane jest to z trybem życia, czy też może to być wpływ androgenów?
- Czy istnieją prace sugerujące, że tesmina jest białkiem nieustrukturyzowanym (co sugeruje rycina 1)? Czy wiadomo coś o strukturze jej izoform?
- Autor rozprawy sugeruje supresorową rolę tesminy w raku żołądka, mimo iż inni autorzy sugerują pozytywną korelację poziomu ekspresji tego białka i agresywności nowotworów. Jak to pogodzić?

Mimo, iż tesmina dzieli cechy budowy z metalotioneinami, których poziom w raku żołądka jest zaburzony, jej rola w procesach nowotworzenia jest słabo zbadana. Nieźle odzwierciedla to bibliografia rozprawy, która obejmuje zaledwie 67 pozycji literaturowych (a przecież większość z nich wcale nie dotyczy tesminy, tylko nowotworzenia ogólnie). Wyniki przedstawione w recenzowanej rozprawie sugerują, że tesmina może pełnić rolę supresora rozwoju raka żołądka i być traktowana jako pozytywny czynnik prognostyczny. Nie mam zatem wątpliwości, że Autor rozprawy dołożył nietrywialną pulę informacji do naszego zrozumienia procesów toczących się w transformowanych nowotworowo tkankach.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) oraz stawiam wniosek o dopuszczenie lek. med. Krzysztofa Kurnola do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Agnieszka Gizak, prof. UWr