

Dr hab. n. med. prof. IGiChP, Małgorzata Szolkowska  
Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc,  
Zakład Patomorfologii  
ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa  
[m.szolkowska@gmail.com](mailto:m.szolkowska@gmail.com)

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej lekarza Jakuba Kobeckiego pod tytułem: „Rola wybranych nektyn jako czynników prognostycznych w raku jelita grubego” przygotowanej pod kierunkiem dr hab. n. med. Mariusza Chabowskiego jako promotora oraz dr n. med. Pawła Gajdzisia jako promotora pomocniczego.**

Doktorant w swojej rozprawie zajął się nowym, ciekawym i ważnym tematem badań nad diagnostyką raka jelita grubego, który jest trzecim co do częstości zachorowań nowotworem złośliwym u mężczyzn i czwartym u kobiet w Polsce.

Nektyny to cząstki adhezyjne znajdujące się na powierzchni komórek nowotworowych i/lub zdrowych i które we współpracy z innymi cząsteczkami odpowiedzialne są za interakcje międzykomórkowe oraz za szereg procesów komórkowych takich jak polaryzacja i poruszanie się komórek, proliferacja albo apoptoza. Nektyny i cząstki nektyno-podobne zaangażowane są w organogenezę wielu narządów np. struktur układu nerwowego, w regulację spermatogenezy albo angiogenezy a także w regulację odpowiedzi immunologicznej wobec komórek nowotworowych. W ostatnim czasie wzrasta zainteresowanie nektyną 4 również jako markerem predykcyjnym. Przeciwno temu antygenowi nowotworowemu powstał konjugat przeciwciało-lek (*antibody-drug conjugate, ADC*) łączący enfortumab z wedotyną, zaaprobowany przez FDA w leczeniu raka urotelialnego. Mimo szerokiego zaangażowania nektyn w szereg procesów fizjologicznych i w patogenezę wielu chorób nowotworowych i nienowotworowych, publikacji na temat znaczenia nektyn w diagnostyce lub leczeniu raka jelita grubego jest jeszcze bardzo niewiele. Wyniki bieżącego badania przeprowadzonego przez Doktoranta na pewno nie zamkną tematu, ale, moim zdaniem, pozwolą w pewien sposób wypełnić tę lukę.

Praca ma charakter monografii o typowym układzie na który składa się dość rozbudowany *Wstęp*, ponadto *Założenia i Cele Pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja i Wnioski* a także *Streszczenie w języku polskim i angielskim, Opinia Komisji Bioetycznej, Zgoda Komendanta 4 Wojskowego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu, Piśmiennictwo, Spis Tabel i Rycin*.

We **WSTĘPIE** Doktorant omówił historię leczenia raka jelita grubego na świecie, bardzo szczegółowo przedstawił anatomie i fizjologię jelita grubego a następnie epidemiologię raka jelita w Polsce i na świecie, najważniejsze zaburzenia genetyczne prowadzące do rozwoju tej choroby, czynniki ryzyka, kliniczne metody diagnostyczne, ocenę stopnia zaawansowania wg TNM oraz metody leczenia chirurgicznego i onkologicznego. Szczegółowo i ciekawie została również omówiona rola nektyn 2, 3 i 4 ze

szczególnym uwzględnieniem aktualnej wiedzy na temat ich występowania i znaczenia w prawidłowych tkankach jelita grubego oraz w raku tego narządu.

Natomiast zabrakło choćby krótkiego, kilkuzdaniowego podrozdziału przedstawiającego najważniejsze informacje na temat histopatologii raka jelita grubego, tj. jaki jest najczęstszy a jakie rzadkie typy histologiczne raka, jakie są najważniejsze, obecnie znane, mikroskopowe czynniki prognostyczne (Doktorant analizował kolejne potencjalne czynniki prognostyczne), jakie są podstawowe założenia klasyfikacji genomowej raka oraz na czym opiera się tzw. "grading" czyli stopień histologicznej złośliwości (parametr, który Doktorant uwzględnił w swojej analizie i w wynikach). Informacje te są łatwo dostępne w najnowszej klasyfikacji histologicznej WHO dla chorób układu pokarmowego. Wiele z nich przewija się w pracy przy okazji różnych tematów, ale zabrakło krótkiego, zbiorczego przedstawienia choroby, którą Doktorant się zajmował. Przy okazji chciałabym zwrócić uwagę, że aktualna klasyfikacja WHO wyróżnia tylko dwa stopnie histologicznej złośliwości raka jelita grubego: „low-grade” (niski stopień złośliwości) i „high-grade” (wysoki stopień złośliwości), natomiast nie wymienia stopnia G3 jak podano w pracy (str. 42).

**ZAŁOŻENIA I CELE PRACY** zostały przedstawione w sposób zwarty i jasny. Stanowią one spójną i logiczną całość. Celem pracy była:

- ocena ekspresji nektyn 2, 3 i 4 w resekowanych rakach jelita grubego,
- analiza czasu przeżycia pacjentów z rakiem jelita w zależności od stopnia ekspresji badanych nektyn, czyli ocena wartości prognostycznej ekspresji wymienionych nektyn,
- a także analiza ekspresji nektyn w zależności od różnych czynników socjo-demograficznych i klinicznych.

W **MATERIAŁACH I METODZIE** opisano, że badanie było retrospektywne i włączono do niego 92 pacjentów z rakiem jelita grubego, którzy byli operowani w latach 2013-2014. Moim zdaniem wybrana grupa badana jest dobrze dobrana i pozwala na prześledzenie przebiegu choroby po resekcji guza przez wystarczająco długi czas, aby wnioskować na temat wartości prognostycznej markerów badanych w komórkach nowotworowych. Niestety podane kody chorób wg klasyfikacji ICD-10 nie pozwalają na zorientowanie się w typach histologicznych, stąd pytanie: czy były to wyłącznie przypadki raka gruczołowego?

Ocena ekspresji nektyn była wykonywana przy użyciu metody immunohistochemicznej, która jest jedną z podstawowych technik identyfikacji antygenów komórkowych w badaniu patomorfologicznym. Prawidłowo podano wszystkie niezbędne parametry stosowanych przeciwciał, tj. nazwę i klon przeciwciała, nazwę producenta, stosowane rozcieńczenie, rodzaj zastosowanej dodatkowej kontroli zewnętrznej a także charakter dodatkowej reakcji immunohistochemicznej (reakcja błonowa lub błonowo-cytoplazmatyczna). Takie szczegóły są ważne w pracach oryginalnych opartych na testach immunohistochemicznych, ponieważ pozwalają na łatwe odtworzenie metody badania i porównanie wyników.

Do oceny ekspresji nektyn Doktorant zaproponował dwie metody - ilościową, w której punktem odcięcia było 50% komórek dodatnich niezależnie od intensywności reakcji oraz system IRS (*Immunoreactive score*), w którym uwzględniono zarówno odsetek komórek dodatnich jak i intensywność reakcji. Ponieważ nie istnieją rekomendacje dotyczące oceny ekspresji nektyn w nowotworach, Doktorant miał prawo zaproponować własną technikę. Zastosowany przez Doktoranta system IRS lub bardzo

podobny do niego system H-score są często spotykane w piśmiennictwie, ponieważ pozwalają na bardziej obiektywną ocenę reakcji immunohistochemicznych.

Z dużym zainteresowaniem obejrzałam obrazy mikroskopowe przykładowych ekspresji badanych nektyn w różnych guzach. Różnice między guzami bez ekspresji i ze słabą ekspresją są wprawdzie mało czytelne, ale myślę, że wynika to po prostu z jakości wydruku. Nie ukrywam, że chętnie zobaczyłabym również ekspresję badanych nektyn w tkankach kontrolnych oraz tkankach nienowotworowych i zachęcałabym do dodania takich zdjęć do przyszłej publikacji, która, mam nadzieję, powstanie. Zagadnienie ekspresji nektyn w raku jelita grubego jest nowe i niedużo jest dostępnej literatury na ten temat, taka dokumentacja mikroskopowa byłaby znakomitym punktem odniesienia dla innych badaczy.

Lista czynników włączonych do analizy przedstawiona w metodyce wymaga pewnej korekty redaktorskiej, np. zdublowano stopień zaawansowania wg AJCC/UICC w punkcie 8, a także przedstawiono skalę punktacji dla odsetka komórek wykazujących ekspresję oraz intensywności ekspresji w punkcie 24. Zainteresowało mnie zagadnienie - dlaczego na liście uwzględnione jest pytanie na temat przebytej cholecystektomii? Jakie znaczenie ma ten parametr dla pracy?

Doktorant w swojej pracy uzyskał bardzo ciekawe **WYNIKI**, które zobrazował kilkunastoma tabelami i wykresami. Dodatnią ekspresję nektyny 2, 3 i 4 stwierdził odpowiednio w 58%, 62,6% oraz w 87,9% raków jelita grubego. Wykazał, że obecność ekspresji nektyny 4 w komórkach raka wiązała się z niższym odsetkiem przeżyć 5-letnich i całkowitych pacjentów oraz z wyższym stężeniem CEA w surowicy i stopniem zaawansowania choroby, natomiast w przypadku nektyny 3, odwrotnie, to brak ekspresji korelował z gorszym odsetkiem przeżyć pacjentów, wyższym stężeniem CEA, większym wymiarem guza, stopniem zaawansowania raka i obecnością przerzutów odległych. W ten sposób Doktorant wykazał, że obecność ekspresji nektyny 4 lub brak ekspresji nektyny 3 były czynnikami rokowniczo niekorzystnymi. Z wartości odsetkowych wynika, że w pewnej grupie guzów musiała wystąpić ko-ekspresja obu nektyn. Jak wyglądały przeżycia pacjentów w tej grupie?

Bardzo interesujące jest spostrzeżenie, że brak lub obecność ekspresji nektyny 2 zależała od lokalizacji guza - raki prawej połowy jelita grubego zwykle wykazywały ekspresję nektyny, a raki lewej połowy nieco częściej były ujemne dla tego antygenu. Innym bardzo ciekawym spostrzeżeniem jest stwierdzenie odwrotnej zależności pomiędzy ekspresją nektyny 4 w komórkach raka a stopniem złośliwości histologicznej. Doktorant zaobserwował, że guzy o niskim stopniu złośliwości („low-grade”), czyli wyżej dojrzałe a więc, wydawałoby się, lepiej rokujące, znacznie częściej wykazywały ekspresję nektyny 4 co było czynnikiem rokowniczo niekorzystnym. Czy Doktorant ma pomysł jak można byłoby wytłumaczyć te dwa ciekawe spostrzeżenia?

Natomiast niezrozumiałe jest dla mnie dołączenie do prezentowanych wyników analizy zależności czasów przeżycia pacjentów od poszczególnych składowych TNM, lokalizacji guza lub zastosowanej techniki operacyjnej. W analizach tych Doktorant w żaden sposób nie odniósł się do ekspresji nektyn, nie widać żadnego związku pomiędzy tymi wynikami a celem i założeniami pracy, dlatego, moim zdaniem, nie ma uzasadnienia ich prezentacji a następnie omawiania w dyskusji.

W **DYSKUSJI** Doktorant wyczerpująco i logicznie komentuje uzyskane przez siebie wyniki dla każdej z nektyn oddzielnie i porównuje je z doniesieniami z piśmiennictwa poświęconego nie tylko rakowi jelita grubego, ponieważ takich publikacji jest niewiele.

Doktorant zwraca uwagę, że największą trudnością jaką napotkał w swoim badaniu, był brak wystandaryzowanej metody oceny ekspresji nektyn w nowotworach, nie tylko w raku jelita grubego. Rzeczywiście, piśmiennictwo jest bardzo skąpe w tym zakresie, poza tym autorzy stosują różne sposoby oceny ekspresji oraz różne punkty odcięcia dla wyników pozytywnych i negatywnych. W związku z tym Doktorant miał prawo zaproponować własny sposób oceny a dwie metody, które przyjął są dopuszczalne. Oczywiście brak standardów oceny utrudnia porównanie uzyskanych wyników z wynikami innych autorów, co doktorant wyraźnie i rzetelnie opisał i skomentował. Warto dodać, że porównując własne wyniki reakcji immunohistochemicznych z literaturą trzeba wziąć pod uwagę nie tylko metodę oceny reakcji, ale wszystkie parametry dotyczące zastosowanych przeciwciał (nazwa i rodzaj klonu - przeciwciało mono lub poliklonalne, rozcieńczenie, producent) a nawet rodzaj platformy używanej do testów. Wszystkie te elementy mogą mieć wpływ na czułość i swoistość reakcji i również powinny być porównane z piśmiennictwem i uwzględnione w dyskusji. Zachęcałabym do zwrócenia na to uwagi, gdy wyniki będą szykowane do publikacji.

Krótką uwagę - w metodyce Doktorant wspomina, że przeciwciała przeciwko nektynom, których używał w swoim badaniu były poliklonalne, tymczasem w Dyskusji zostało użyte określenie „przeciwciała monoklonalne”. Jest to zapewne wyłącznie przejęzyczenie, ale zwracam na to uwagę, ponieważ pojęcia te znaczą co innego.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant przedstawił **WNIOSKI**, które są zgodne z Załoženiami i Celem pracy. Doktorant wykazał m.in., że:

1. Ponad połowa przebadanych raków jelita grubego wykazała ekspresję każdej z badanych nektyn.
2. Wyższa ekspresja nektyny 4 w komórkach raka oraz brak ekspresji nektyny 3 były czynnikami prognostycznie niekorzystnymi. Natomiast brak było statystycznie istotnej różnicy pomiędzy odsetkami przeżyć pacjentów z obecnością lub brakiem ekspresji nektyny 2 w komórkach guzów.
3. Istniała dodatnia korelacja pomiędzy ekspresją nektyny 4 a stężeniem CEA i stopniem zaawansowania raka oraz ujemna korelacja pomiędzy ekspresją nektyny 3 i wymienionymi parametrami a także wielkością guza i obecnością przerzutów odległych.
4. Guzy prawej połowy jelita grubego statystycznie częściej, w porównaniu do guzów lewej połowy, wykazywały ekspresję nektyny 2.

**PIŚMIENICTWO** obejmuje 183 publikacje, w większości anglojęzyczne z ostatnich lat, związane z tematyką pracy.

**Uwagi językowe i redaktorskie** (bez wpływu na wartość merytoryczną pracy):

1. W wielu miejscach pracy: określenie „na przestrzeni (...) lat” - powinno być „w ciągu (...) lat”. Według słownika języka polskiego dopuszczalne jest jedynie „na przestrzeni dziejów” lub „na przestrzeni wieków”.

2. Proszę sprawdzić znaczenie słowa „implikować”. W pracy zostało użyte kilkakrotnie i nie zawsze prawidłowo.
3. Zgony (pacjentów) oraz przypadki RJG to rzeczowniki policzalne, więc powinno być „liczba zgonów/przypadków” a nie „ilość”.
4. Według słownika języka polskiego wyraz „komponent” ma tylko rodzaj męski a więc powinno być „komponent śluzowy” (str. 51).
5. Na stronie 49 zwraca uwagę urwane zdanie: „W trakcie oceniania preparatów histopatologicznych”.
6. Numeracja rycin w tekście wymaga korekty i uzupełnienia. Zamiast „Rycina X” (str. 22) powinno być Rycina 2 lub 3. Na stronie 28 w tekście jest odwołanie do Ryciny 4., z kontekstu wynika, że powinno być do Ryciny 5.
7. W wynikach we wszystkich tabelach zamiast skrótu SD dla odchylenia standardowego użyty jest skrót SE.
8. Każda tabela powinna być dokładnie opisana, wszystkie oznaczenia i skróty powinny być wyjaśnione.
9. W podpisach pod wieloma wykresami możemy przeczytać, że przedstawiają one np. „przeżycie dla nektyny 2” albo „przeżycie dla 4-stopniowej skali ekspresji nektyny 2”. Są to niezbyt eleganckie skróty myślowe. Przeżycia odnoszą się do pacjentów a nie do wspomnianych parametrów.
10. Podobny niefortunny skrót myślowy można znaleźć w dyskusji: „kohorta pacjentów poddana badaniom IHC w kierunku ekspresji nektyny 4”. To nie pacjenci byli poddani badaniom IHC, ale materiał tkankowy pochodzący z guzów nowotworowych.
11. Sugerowałabym sprawdzenie numeracji tabel. Na stronie 59 z kontekstu wynikałoby, że chodzi o tabelę nr 11 a nie 14. Niejasny jest też opis w tekście odnoszący się do tej tabeli, w którym stwierdzono, że zostały w niej „zaprezentowane analizowane częstości”, podczas gdy Doktorant żadnych częstości nie analizował. Proponowałabym zmienić wyrażenie np. na „analizowane parametry”.
12. Proponowałabym ujednoczyć opisy w tabelach - czasem dla wyrażenia braku ekspresji używane jest określenie „brak”, a innym razem „ekspresja zerowa”. W innych przypadkach (np. w tabeli nr 16) wymieszane są bez wyraźnej przyczyny określenia polskie i angielskie (Tumor size, Stage).
13. Brak wyjaśnienia czym jest parametr (B) w tabeli nr 15 (str. 64).
14. Dwie różne tabele oznaczone są numerem 28.
15. Zwraca uwagę kilka niefortunnych przekształceń z języka angielskiego lub łaciny na język polski. Np. zamiast „tkanka neoplastyczna” (str. 11) powinno być „tkanki nowotworu” lub „tkanki nowotworowe”. „Metazoa” (str. 14) można było elegancko przetłumaczyć na „organizmy wielokomórkowe”. Określenie „zachęcanie badanej populacji do większej partycypacji” (str. 38) znacznie lepiej brzmiałoby jako „zachęcanie do większego udziału”. „Zmiany metastatyczne” (str. 96) to po prostu „zmiany przerzutowe”.
16. W Dyskusji w akapicie drugim, w podrozdziale Nektyna 4 (str. 90), najwyraźniej zabrakło przeczenia. Z kontekstu poprzednich zdań wynikałoby, że powinno być „Nektyna 4 (...) praktycznie NIE występuje w dojrzałych ludzkich tkankach”.
17. W tekście oraz podpisach rycin można znaleźć dość liczne literówki.

## **PODSUMOWANIE RECENZJI**

Rozprawę doktorską oceniam pozytywnie i nie mam zastrzeżeń do części merytorycznej, metodyki, prezentacji wyników oraz komentarza. Doktorant wykazał się nie tylko imponującą wiedzą teoretyczną w prezentowanym temacie, ale również umiejętnością zaplanowania i stworzenia spójnej pracy naukowej i logicznego formułowania wniosków. Pewne niedociągnięcia językowe lub redaktorskie nie mają wpływu na wartość merytoryczną monografii.

Praca doktorska lekarza Jakuba Kobeckiego spełnia warunki określone w art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. 2018 poz. 1668). Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie lekarza Jakuba Kobeckiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Małgorzata Szólkowska

