



Prof. dr hab. Arkadiusz Miązek
Katedra Biochemii i Biologii Molekularnej
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

Wrocław, 2023-12-27

Recenzja

rozprawy doktorskiej lekarza medycyny Adriana Czekaja pt. „Ekspresja podoplaniny oraz jej wartość prognostyczna w raku urotelialnym pęcherza moczowego” zrealizowanej w Zakładzie Histologii i Embriologii Katedry Morfologii i Embriologii Człowieka Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Dzięgiela.

1. Ocena formalna:

Podstawą wykonania niniejszej recenzji jest uchwała nr 1001/IX/2023 Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z dnia 28 września 2023 roku. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska składa się z 79 numerowanych stron maszynopisu oraz dodatkowych 7 nienumerowanych stron załączników obejmujących kopię decyzji komisji bioetycznej Nr KB-532/2018 o wyrażeniu zgody na wykonanie badań z zakresu niniejszej pracy doktorskiej, informację dla osób uczestniczących w badaniu naukowym, wzory oświadczeń badanych pacjentów o wyrażeniu zgód na udział w badaniu i przyjęciu warunków ubezpieczenia oraz informację o przyznaniu finansowania wewnętrznego dla projektu badawczego o tytule tożsamym z tytułem przedstawionej do recenzji rozprawy. Tekst rozprawy jest podzielony na następujące części: spis treści (s. 4), wykaz skrótów (s. 5-7), wstęp (s. 8-26), cel pracy (s. 27), materiały i metodyka badań (s. 28-32), wyniki (s. 33-50), dyskusja (s. 51-56), wnioski (s.57), piśmiennictwo (s.58-69), streszczenie (s. 70-71), summary (s. 72-73), aneks (s. 74-78), załączniki (s. 79). Układ rozprawy, proporcje pomiędzy rozdziałami oraz ich kolejność są typowe dla monografii doktorskich. Praca napisana jest dobrą polszczyzną. Autor swobodnie posługuje się specjalistycznym słownictwem naukowym, chociaż zamienne użycie w tekście rozprawy wielu zwyczajowych nazw podoplaniny niekiedy utrudnia zrozumienie tekstu. Na przykład w zdaniu na stronie 23: „Ekspresję podoplaniny stwierdzono w wielu prawidłowych tkankach..[...].gdzie potwierdzono rolę D2-40 w adhezji...” recenzent może odnieść wrażenie, że opisywane są nie jedna ale dwie różne cząsteczki. Lepszą praktyką jest definicja jednego skrótu dla cząsteczki podoplaniny, np. często używanym w piśmiennictwie angielskim jest skrót PDPN i konsekwentne jego stosowanie w całym tekście rozprawy. Poza tym, tekst dysertacji jest starannie edytowany, dostrzegłem jedynie nieliczne literówki. Układ graficzny 28 rycin



i 8 tabel jest czytelny i pomocny w śledzeniu wywodu. Legendy rycin i tabel klarownie przedstawiają zawartą w nich treść. Autor każdorazowo zamieszcza odnośniki do źródeł internetowych lub prac oryginalnych z których pochodzi wykorzystana w rycinach grafika. Przypisy bibliograficzne do 182 pozycji literaturowych, w większości wydanych po roku 2000 są używane prawidłowo. Podsumowując, strona formalna ocenianej pracy świadczy o opanowaniu przez Autora sztuki prezentacji wyników badań naukowych w formie monografii oraz spełnia kryteria zwyczajowo przyjęte dla rozprawy doktorskiej.

2. Ocena merytoryczna:

Przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej jest ocena ekspresji podoplaniny (PDPN) w wycinkach tkanek pobieranych podczas zabiegów przecewkowej elektroresekcji guzów pęcherza moczowego (TURBT) w celu oceny jej ewentualnej wartości diagnostycznej i prognostycznej w raku urotelialnym pęcherza moczowego nienaciekającego błonę mięśniową pęcherza moczowego.

Cząsteczka PDPN jest glikobiałkiem silnie związanym z rozwojem oraz utrzymaniem integralności śródbłonna naczyń limfatycznych. Ulega ona także ekspresji na powierzchni komórek nabłonka pęcherzykowego płuc, podocytów nerek oraz w ośrodkowym układzie nerwowym. Kluczowa fizjologiczna rola PDPN w rozwoju serca, płuc, układu chłonnego i krwionośnego została poznana dzięki analizie myszy z nokautem genowym *Pdpm*, skutkującym zależną od tła genetycznego śmiertelnością zarodkową lub okołoporodową myszy wynikającą głównie z niedorozwoju serca, niedodmy płuc oraz braku separacji naczyń krwionośnych i limfatycznych. Mechanistycznie, najlepiej poznanym ligandem dla PDPN jest receptor C-lektynowy CLEC-2 występujący na powierzchni płytek krwi, komórek dendrytycznych oraz megakariocytów. Oddziaływanie PDPN/CLEC-2 promuje tworzenie i utrzymanie integralności naczyń limfatycznych oraz organizacji węzłów chłonnych i śledziony wpływając na funkcjonowanie układu odporności.

Patologiczna ekspresja białka PDPN opisywana jest także na powierzchni komórek nowotworowych oraz fibroblastów związanych z nowotworami (CAFs). W większości opisywanych nowotworów, w tym w inwazyjnym raku pęcherza moczowego, silna ekspresja PDPN związana jest z wyższym potencjałem do przerzutowania oraz gorszym rokowaniem. Jak się przypuszcza, jest to konsekwencja wiązania oraz aktywacji płytek krwi przez wyrażające PDPN komórki nowotworowe. Agregaty aktywowanych płytek krwi w powyższym modelu mogą stanowić fizyczną barierę ochronną dla komórek nowotworowych oraz poprzez wydzielane cytokiny (np. PDGF lub TGF β) mogą hamować aktywność cytotoksyczną limfocytów wobec tych komórek. Istnieją jednak przykłady nowotworów (np.



gruczolakorak jelita grubego lub rak szyjki macicy) w których wysoka ekspresja PDPN w komórkach nowotworowych lub CAFs jest korzystnym czynnikiem rokowniczym związanym z rzadszym występowaniem przerzutów, co stawia pod znakiem zapytania powyższe modele aktywności pro-nowotworowej PDPN. W tym kontekście, oznaczenie wartości diagnostycznej i prognostycznej ekspresji PDPN w raku pęcherza moczowego nienaciekającego błony mięśniowej ściany pęcherza moczowego wydaje się być nie tylko zasadne, ale także bardzo interesujące z punktu widzenia ewentualnych modulacji ekspresji PDPN w rakach pęcherza moczowego o różnych stopniach zaawansowania miejscowego.

We wstępie rozprawy doktorskiej dokonano wyczerpującego przeglądu aktualnej literatury dotyczącej epidemiologii, czynników ryzyka, klasyfikacji histopatologicznej, oceny stopnia zaawansowania klinicznego i zróżnicowania histologicznego raka pęcherza moczowego oraz aktualnych metod diagnostyki i leczenia tego schorzenia. Omówiono także zagadnienia składu komórkowego i funkcji mikrośrodowiska nowotworowego, w tym fibroblastów związanych z nowotworem (CAF's). Przedstawiono informacje o budowie i wzorze ekspresji podoplaniny w nowotworach oraz jej związku z markerami angiogenezy. Całość tego rozdziału stanowi dobre wprowadzenie do lepszego zrozumienia wyników pracy. Tekst wstępu jest napisany zwięźle i merytorycznie. Wyczuwa się duże zaangażowanie Doktoranta w opracowanie i przekazanie najnowszej wiedzy merytorycznej na temat raka pęcherza moczowego.

Cel pracy jest w mojej ocenie sformułowany jasno. Wyszczególniono główny obszar badań, tj. ocenę poziomu ekspresji PDPN w komórkach raka pęcherza oraz CAF's oraz skorelowanie ekspresji PDPN z danymi kliniczno-patologicznymi. Wyróżniono także cele uzupełniające którymi były ocena porównawcza ekspresji PDPN w guzach nienaciekających i naciekających błonę mięśniową pęcherza moczowego oraz korelacja ekspresji PDPN z markerami naczyń krwionośnych oraz proliferacji komórkowej.

W rozdziale „Materiał i metodyka badań” scharakteryzowano sposób pozyskania materiału klinicznego oraz sposób prowadzenia obserwacji onkologicznej pacjentów. Opisano także metody tworzenia mikromacierzy tkankowych, protokoły barwień immunohistochemicznych, kryteria i skale oceny reakcji immunohistochemicznych oraz metody analizy statystycznej danych. Zaprezentowana w rozprawie metodyka badań spełnia kryteria dobrej praktyki laboratoryjnej i pozwala na wyciągnięcie miarodajnych wniosków.



Rozdział „Wyniki” został podzielony na dwie części. W pierwszej z nich dokonano charakterystyki kliniczno-patologicznej przypadków nieinwazyjnego raka urotelialnego pęcherza moczowego, w drugiej zaś zebrano wyniki oceny reakcji immunohistochemicznych oraz ich korelacje z danymi kliniczno-patologicznymi. W badaniach nieinwazyjnego raka urotelialnego (NIMBC) stwierdzono 100% ekspresję podoplaniny w CAF's (Tabela 8), które wykazywały ponad trzykrotnie wyższą średnią ekspresję PDPN w porównaniu do komórek nowotworowych. Co ciekawe na Ryc. 19 pokazano, że poziomy ekspresji PDPN w CAF's w raku inwazyjnym (MIBC) oraz nieinwazyjnym (NIMBC) są zbliżone, natomiast poziom ekspresji PDPN w komórkach raka inwazyjnego jest istotnie niższy, co w świetle wyżej wzmiankowanej hipotezy o promującym przerzutowanie oddziaływaniu komórek nowotworowych z płytkami krwi poprzez cząsteczki PDPN/CLAC-2 może wydawać się przeciwnintuicyjne. Można byłoby oczekiwać, że rak inwazyjny będzie wyrażał PDPN znacznie mocniej niż rak nieinwazyjny, tymczasem jest odwrotnie. Obserwacja wzmożonej ekspresji PDPN na komórkach raka NIMBC była podstawą do ostrożnego sformułowania (z zastrzeżeniem małej liczby przebadanych pacjentów) jednego z ważnych wniosków z przeprowadzonych przez Autora badań, (s. 57) że wysoki poziom ekspresji PDPN w komórkach NIMBC może być potencjalnym markerem dłuższego przeżycia wolnego od wznowy. Dodatkowo jednak, Autor postuluje w kolejnych wnioskach (s. 57), że wysoki poziom PDPN w komórkach raka NIMBC oraz CAF's promowałby tworzenie nowych mikronaczyń (CD34+) co z kolei wiązałoby się z przebudową tkanki nowotworowej związaną ryzykiem progresji do raka o wyższym stopniu zaawansowania miejscowego. Czy nie ma tu sprzeczności logicznej? Szczególnie, że sam Autor w dyskusji na s. 54 zaznacza, że „nie zaobserwowałem natomiast, żeby ekspresja podoplaniny (D2-40) w komórkach nowotworowych jak i CAF's była związana z ryzykiem progresji raka pęcherza moczowego”. Proszę o komentarz Doktoranta.

W dyskusji Autor w sposób wyważony i kompetentny konfrontuje uzyskane własne wyniki badań z wynikami dostępnymi w literaturze. Wskazuje na możliwe przyczyny rozbieżności w uzyskiwanych wynikach badań pomiędzy różnymi zespołami badawczymi, zaznaczając zarówno ważny wpływ technik chirurgicznych używanych do pobierania skrawków do badań histopatologicznych jak i odmienne skale oceny poziomu ekspresji markerów immunohistochemicznych. Autor jest także świadomy ograniczeń badań opartych jedynie na technikach immunohistochemicznych podkreślając w zakończeniu dyskusji na s. 56, że badania z zastosowaniem metod biologii molekularnej (qPCR, Western-blot, mikradysekcja laserowa) pozwoliłyby na uzyskanie bardziej jednoznacznych wyników. Taka postawa Doktoranta, autora bardzo cennych poznawczo oraz długotrwałych, z racji obserwacji klinicznej pacjentów, badań jest dowodem Jego godnej pochwały dojrzałości naukowej.





3. Podsumowanie:

Podsumowując, przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, stanowi oryginalne rozwiązanie istotnego problemu naukowego, wykazuje ogólną wiedzę Doktoranta oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia przez Niego badań naukowych. Wartość naukowa prezentowanych badań stanowi cenne uzupełnienie istniejącej wiedzy o wartości diagnostycznej i prognostycznej podoplaniny jako markera nieinwazyjnego i inwazyjnego raka pęcherza moczowego, co w mojej opinii przyczynia się do postępu w dyscyplinie naukowej reprezentowanej przez Doktoranta.

4. Wniosek końcowy:

W mojej ocenie przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Dlatego przedkładam wysokiej Radzie Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu wniosek o dopuszczenie lekarza medycyny Adriana Czekała do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Arkadiusz Miązek