

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu BIURO RADY DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE	
wpł. dnia	17-08-2021
L. dz. RN-BM/	1426/2021

dr hab. n. med. Michał Kukła, prof. UJ

Klinika Chorób Wewnętrznych i Geriatrii

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

Zakład Endoskopii

Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie

Kraków 05.08.2021

VIDI
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
RADA DYSCYPLINY NAUKI MEDYCZNE
Przewodniczący
prof. dr hab. Anna Beata Haber
17-08-2021

Recenzja

rozprawy doktorskiej lekarza Mirosława Fica pt.: „**Ekspresja metalotioneiny-3 w guzach pierwotnych i przerzutach do węzłów chłonnych gruczolakoraka jelita grubego**”.

Rak jelita grubego jest chorobą o zasięgu ogólnoswiatowym. Według analiz i zestawień statystycznych największą zapadalność i chorobowość obserwuje się w krajach wysokorozwiniętych, najmniejszą w krajach o niskim stopniu rozwoju gospodarczego. Pomimo postępu nauk medycznych i wysokich nakładów ponoszonych przez systemy opieki zdrowotnej na wczesną diagnostyką i leczenie raka jelita grubego pozostaje on, niestety, jedną z głównych przyczyn zgonów na nowotwory.

Etiologia raka jelita grubego jest wieloczynnikowa. Zidentyfikowano wiele uwarunkowań wpływających na ryzyko rozwoju choroby, zarówno w sposób negatywny jak i pozytywny. Przyjęty jest ogólny podział wyżej wymienionych czynników na dwie grupy – powiązane ze środowiskiem życia oraz uwarunkowane genetycznie.

Szybkość progresji choroby i rokowanie co do wyleczenia i przeżycia pacjentów zależą głównie od stopnia zaawansowania w momencie wykrycia, typu histopatologicznego oraz stopnia złośliwości nowotworu.

Szczególnie ważne jest aby wykrywać zmiany przed przemianą nowotworową, czemu bez wątplenia służy badanie endoskopowe (kolonoskopia), a w mniejszym stopniu inne badania obrazowe. Badanie endoskopowe pozwala jednocześnie na usunięcie zmian, o potencjalnym ryzyku przemiany w nowotwór złośliwy. Co więcej, możliwe jest także endoskopowe leczenie w niektórych przypadkach wczesnych postaci nowotworów.

W przypadku postaci bardziej zaawansowanych podstawowym sposobem leczenia raka jelita grubego jest radykalny zabieg operacyjny. Postaci zaawansowane wymagają często obok leczenia operacyjnego zastosowania chemio- lub/i radioterapii.

Pomimo ogromnego postępu w diagnostyce i leczeniu nowotworów, coraz głębszej wiedzy na temat patogenezы choroby, rozwoju badań genetycznych wciąż brakuje skutecznego i łatwego do oznaczenia markera pozwalającego na wczesne wykrycie raka jelita grubego, a więc postaci całkowicie wyleczalnej. Brakuje także markera, który byłby przydatny w monitorowaniu skuteczności leczenia i prognozowaniu przeżywalności pacjentów z rakiem jelita grubego po zabiegu operacyjnym. Pomocnym w prognozowaniu u pacjentów z rakiem jelita grubego jest antygen Ki-67. Jest on obecny w komórce w podczas faz czynnych cyklu komórkowego (G1, S, G2 i mitozы), nie stwierdza się jego obecności w fazie spoczynkowej (G0). Liczba komórek, w których stwierdza się ekspresję Ki-67 obrazuje pulę komórek dzielących się, co pozwala na zastosowanie tego antygenu jako wykładnika aktywności proliferacyjnej nowotworu.

Metalotioneiny (MT) są niskocząsteczkowymi białkami o masie 6-7 kDa. Ze względu na różnice w budowie i funkcji wyróżnia się cztery podstawowe izoformy metalotionein – MT-1, MT-2, MT-3 i MT-4. MT można wykryć w komórkach (zarówno w jądrze jak i w cytoplazmie) oraz pozakomórkowo, na poziomie mRNA lub w postaci białek. Podstawową i najwcześniej poznaną funkcją MT jest ich wpływ na homeostazę komórkową metali. Wiążąc jony kadmu, ołowiu, rtęci lub miedzi tworzą nieaktywne kompleksy, które chronią komórkę przed uszkodzeniem wolnymi jonami tych metali. Kolejną ważną funkcją jest udział w obrocie komórkowym jonów cynku. Wiele enzymów uczestniczących w replikacji DNA, transkrypcji, translacji i procesach energetycznych komórki wykorzystuje jony Zn, co sprawia, iż MT mogą być traktowane jako ich regulatory. Wydaje się zatem, że mogą one odgrywać bardzo ważną rolę w kontrolowaniu prawidłowego namnażania się, wzrostu i różnicowania komórek, a zaburzenia ich ekspresji, mogą wiązać się z zaburzeniem cyklu komórkowego i zwiększonym ryzykiem kancerogenezy. Ekspresja MT w komórkach nowotworowych może być także związana z typem progresji choroby, ryzykiem przerzutowania, ale także wrażliwością na leczenie, w tym chemioterapię. W kilku przeprowadzonych do tej pory badaniach próbowano skorelować nasilenie ekspresji MT na poziomie mRNA lub białka z danymi kliniczno-patologicznymi w celu określenia ich ewentualnej funkcji rokowniczej u pacjentów z rakiem jelita grubego. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów są jednak niejednoznaczne. Część doniesień wskazuje, że niska ekspresja MT wiąże się z gorszym rokowaniem u pacjentów, podczas gdy inne badania wykazują, że mała ekspresja jest korzystnym czynnikiem prognostycznym, a dodatkowo duża ekspresja MT koreluje z krótszym przeżyciem pacjentów z rakiem jelita grubego. Dostępna literatura dotyczy głównie form MT-1 i MT-2. Nie analizowano natomiast zmian ekspresji i stężenia formy MT-3 w raku jelita grubego.

MT-3 uczestniczy w sekwestracji, przemieszczaniu oraz unieszkodliwianiu jonów metali, czyli funkcjach spełnianych przez pozostałe izoformy metalotionein. Istotne różnice w budowie izoformy 3 na tle całej grupy wspomnianych białek powodują, że MT-3 może mieć również potencjalną zdolność modulacji przewodnictwa glutaminergicznego, GABA-ergicznego i zależnego od katecholamin. Badania wykazały, w komórkach nowotworowych opornych na chemioterapię, w tym cisplatynę i jej pochodne, wyższą ekspresję MT-3.

Zatem znalezienie prostego w oznaczeniu markera pozwalającego na ocenę progresji choroby, skuteczności leczenia, ryzyka zgonu, przeżywalności, wznowy ma bardzo istotne znaczenie w przypadku chorób nowotworowych. Biorąc pod uwagę fakt, że pomimo potencjalnie dostępnych badań profilaktycznych od wielu lat obserwuje się wzrost zapadalności na raka jelita grubego, który w większości krajów rozwiniętych stanowi drugą lub trzecią przyczynę zgonów z powodu nowotworów i jedną z wiodących przyczyn ogólnej śmiertelności niezbędne jest poszukiwanie markera o znaczeniu prognostycznym i przydatnego w diagnostyce i terapii. Szczególnie obiecujące wydają się białka biorące udział w regulacji namnażania się, różnicowania i dojrzewania komórek oraz regulujące procesy mogące wpływać na uszkodzenie materiału genetycznego, do których należą metalotioneiny.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa liczy 67 stron i ma formę niepublikowanego opracowania komputerowego w twardej oprawie. W spisie treści poszczególne rozdziały posiadają oznaczenia numeryczne. Rozprawa składa się z 9 rozdziałów (wykaz skrótów Autor zaliczył jako oddzielny **Rozdział 1**) poprzedzonych spisem treści. Brak wykazu zawartych w rozprawie pięciu tabel i ośmiu rycin. Dysertacja nie zawiera także streszczenia w języku polskim ani angielskim.

We „*Wstępie*” liczącym 28 stron, który stanowi **Rozdział 2** monografii, Autor wprowadza czytelnika w problematykę będącą przedmiotem dysertacji. Kolejno w formie podrozdziałów we „*Wstępie*” omawia czynniki epidemiologiczne, etiologię i profilaktykę, klasyfikację morfologiczną, skale zaawansowania oraz sposoby leczenia choroby. Na końcu rozdziału w sposób zwięzły i przejrzysty, ale zarazem wyczerpujący przedstawia informację na temat metalotionein, omawiając kolejno ich budowę, funkcje i związek z niektórymi chorobami, w tym chorobami nowotworowymi. W ostatnim podrozdziale omawia szczegółowo MT-3, która jest przedmiotem przedstawionej mi do recenzji dysertacji oraz związany z aktywnością proliferacyjną nowotworów antygen Ki-67. W „*Wstępie*” szczególnie istotne jest zwięzłe i klarowne przedstawienie uwarunkowań środowiskowych i genetycznych rozwoju raka jelita grubego, mechanizmów molekularnych i sposobów profilaktyki choroby, co zdecydowanie ułatwia dalszą lekturę rozprawy i łatwiejszą analizę otrzymanych przez Autora wyników badania i postawione wnioski.

W **Rozdziale 3 „Cele pracy”** Autor przedstawia 6 kolejnych celów pracy:

1. Ocena poziomu ekspresji mRNA dla MT-3 w guzach pierwotnych gruczolaka jelita grubego oraz prawidłowej tkance jelita grubego,
2. Ocena stopnia ekspresji MT-3 w ognisku pierwotnym gruczolaka jelita grubego, przerzutach do węzłów chłonnych oraz prawidłowej tkance jelita grubego,
3. Analiza poziomu ekspresji MT-3 w zależności od stopnia zaawansowania gruczolaka jelita grubego wg klasyfikacji Dukesa,
4. Analiza poziomu ekspresji MT-3 w zależności od stopnia złośliwości histologicznej guza pierwotnego gruczolaka jelita grubego,
5. Ocena korelacji ekspresji MT-3 w ognisku pierwotnym guza, przerzutach do węzłów chłonnych i prawidłowej tkance jelita grubego, ekspresji antygenu proliferacyjnego Ki-67 w ognisku pierwotnym oraz danych klinicznych,
6. Ocena przeżywalności pacjentów w zależności od stopnia ekspresji MT-3.

Cele te są jasno sformułowane, pod kątem ewentualnego wykorzystania uzyskanych wyników w praktyce klinicznej.

Rozdział 4 „Materiał” zawiera charakterystykę badanej populacji, w tym ocenę zaawansowania choroby wg skali Dukeasa, stopnia złośliwości histopatologicznej i typu zastosowania leczenia uzupełniającego (chemii- i radioterapia).

W **Rozdziale 5 „Zastosowane metody”** Autor na początku omawia technikę zastosowaną do badań immunohistochemicznych, sposób oceny natężenia reakcji uzyskanych w tym badaniu oraz przedstawia ryciny z przykładami ekspresji dla MT-3 i Ki-67 w komórkach raka jelita grubego i w prawidłowym jelicie grubym. Następnie omawia technikę izolacji i oceny ekspresji RNA w badanych tkankach. Na końcu rozdziału przedstawia zastosowane metody statystyczne.

W **Rozdziale 6 „Wyniki”** Autor w pierwszej kolejności omawia poziom ekspresji mRNA dla MT-3 w tkance guza i zdrowego jelita. Nie wykazał różnicy w pomiędzy tkanką nowotworową a zdrowym jelitem. Następnie przedstawia wyniki oceniające badanie IHC. Ekspresja tkankowa MT-3 była istotnie wyższa w tkance guza pierwotnego i przerzutów do węzłów chłonnych w porównaniu do tkanki prawidłowego jelita. W kolejnym etapie Autor wykazał wyższą ekspresję tkankową MT-3 w najbardziej zaawansowanych postaciach raka określonych w skali Dukeasa. Co ciekawe ekspresja IHC nie różniła się w guzach o różnym stopniu złośliwości histologicznej. Analiza korelacji pomiędzy ekspresją MT-3 a niektórymi parametrami klinicznymi i demograficznymi oraz ekspresją Ki-67 nie wykazały istotności statystycznej. Pozytywna korelacja wystąpiła jedynie pomiędzy nasileniem ekspresji MT-3 w guzie pierwotnym i węzłach przerzutowych. Na końcu rozdziału Autor ocenił przydatność oceny ekspresji MT-3 jako parametru rokowniczego przeżywalności. Ekspresja MT-3 nie miała wpływu na przeżywalność pacjentów.

Wszystkie omawiane wyniki zostały także przedstawione w postaci rycin lub wykresów.

Rozdział 7 rozprawy stanowi „**Dyskusja**”. Autor w sposób rzeczowy i krytyczny analizuje uzyskane wyniki oraz konfrontuje wyniki badań własnych z wynikami innych badaczy. Lektura tego rozdziału wskazuje na dobrą znajomość trudnego obszaru badań oraz przemyślany sposób analizy tematu stanowiącego przedmiot rozprawy doktorskiej. Autor zwraca uwagę, że określenie prostych, skutecznych, łatwo dostępnych i wiarygodnych metod diagnostycznych stwarzałoby możliwość szerszej diagnostyki i rozpoznawania, jak również profilaktyki raka jelita grubego. Podkreśla, że prace dotyczące oceny ekspresji MT-3 w nowotworach przewodu pokarmowego ograniczały się do tej pory, do raka przełyku oraz żołądka, ale uzyskane wyniki były jednak niejednoznaczne. Wyniki uzyskane w przeprowadzonym badaniu różniły się od tych stwierdzonych w raku żołądka i przełyku. Ze względu na brak badań dotyczących MT-3

u pacjentów z rakiem jelita grubego, Autor odniósł się do wyników oceny ekspresji innych izoform MT. Wyniki te były jednak niejednoznaczne. W części badań zawartość wszystkich MT wzrasta nie tylko ze stopniem zaawansowania raka, ale również z wraz progresją utkania kosmkowego w gruczolakach jelita grubego. Dodatkowo, podobnie jak w ocenianej pracy stopień ekspresji MT był najwyższy w najbardziej zaawansowanych przypadkach - stadium D wg Duke'a. Z kolei inne badania wykazały, że wraz z transformacją nowotworową i wzrostem guza dochodzi do postępującego spadku ekspresji metalotionein ocenianych łącznie, bez uwzględniania poszczególnych izoform. Brak jednoznacznych wyników, różnice w metodyce, ocena bez wyszczególnienia poszczególnych izoform, a wreszcie indywidualnej oceny izoformy MT-3 w innych badaniach, dodatkowo utrudnia dyskusję i ustosunkowanie się do otrzymanych wyników.

Następnie, Autor omawia ekspresję mRNA zawartego w ogniskach pierwotnych gruczolakoraka jelita grubego i w zdrowej tkance. Ponownie, ze względu na brak wcześniejszych badań dotyczących wyłącznie MT-3, zmusza Autora do odniesienia się do badań w przypadku innych nowotworów lub oceniających pozostałe izoformy MT na poziomie genu *MT* i białka. Wyniki tych badań są bardzo niejednoznaczne. Omówione zostały także potencjalne czynniki mogące wpływać na ekspresję mRNA dla MT-3 u pacjentów z rakiem jelita grubego. Zróżnicowanie wyników w omawianych pracach i szereg czynników modyfikujących ekspresję MT dodatkowo utrudniają wyjaśnienie obserwowanych odmierności.

Ekspresja MT-3 w guzie pierwotnym korelowała z nasileniem ekspresji w przerzutowych węzłach chłonnych. W następnej części „*Dyskusji*” Autor ustosunkował się co do przeżywalności pacjentów w zależności od nasilenia ekspresji MT-3 w guzie pierwotnym. Nasilenie ekspresji MT-3 nie wiązało się z ryzykiem śmiertelności u tych pacjentów.

Autor zaznacza, że wyższa ekspresja MT-3 w tkankach guzów w porównaniu z tkanką niezmienną nowotworowo może świadczyć o roli tego białka w procesie kancerogenezy i dalszym rozwoju choroby, podobnie jak ma to miejsce w procesach rozrostowych innych narządów. Podkreśla, że na podstawie przeprowadzonego badania nie udało się jednak udowodnić, że poziom ekspresji MT-3 może być niezależnym czynnikiem rokowniczym w raku jelita grubego.

Rozdział 6 „Wnioski” obejmuje trzy kolejno przedstawione wnioski:

1. Wzrost ekspresji MT-3 w guzach pierwotnych oraz przerzutach do węzłów chłonnych gruczolakoraka jelita grubego może świadczyć o jej roli w procesie transformacji nowotworowej oraz progresji choroby.

2. Poziom ekspresji MT-3 w komórkach gruczolakoraka jelita grubego może mieć znaczenie w określeniu stopnia zaawansowania nowotworu.
3. Nasilenie ekspresji MT-3 nie jest czynnikiem prognostycznym w gruczolakoraku jelita grubego.

Wnioski odpowiadają częściowo na postawione w kolejnych celach pytania.

Rozdział VII „Piśmiennictwo”, zawiera 140 poprawnie, tematycznie dobranych pozycji literaturowych.

Pomimo ciekawego i ambitnego celu badawczego, jaki Autor postawił sobie w rozprawie doktorskiej, dużego znaczenia praktycznego pracy i poprawności językowej z obowiązku recenzenta pozwolę sobie na kilka uwag dotyczących dysertacji.

Uwagi merytoryczne

1. Autor w swojej rozprawie doktorskiej nie przeanalizowała ograniczeń, które mogły mieć wpływ na uzyskane wyniki. Należą do nich m. in. stosunkowo mała grupa badanych pacjentów, brak informacji na temat leków stosowanych z powodu innych chorób, ograniczona informacja na temat parametrów klinicznych i biochemicznych, brak pacjentów z niezaawansowanymi postaciami nowotworu wg Dukesa.
2. Brak ściśle określonych kryteriów włączenia i wyłączenia.
3. W rozdziale „*Cele pracy*” wskazane byłoby, aby cele zostały poprzedzone przez jasno sformułowane założenia(e), które wynikają z treści tego rozdziału.
4. Autor formułuje sześć celów pracy. Jednocześnie w podsumowanie opiera się o trzy wnioski. Ilość wniosków powinna odpowiadać ilości sformułowanych celów. Wydaje się, że w cele powinny bardziej skupiać się na porównaniu wyników uzyskanych w poszczególnych tkankach i typach nowotworów oraz ocenie związków pomiędzy analizowanymi zmiennymi, czy wpływie na patogenezę choroby, a nie jedynie na izolowanej ocenie badanych parametrów, co szczególnie dotyczy celów 1-4. Pozwoliłoby to połączenie celów 1-4, co ułatwiłoby interpretację uzyskanych wyników. Ponadto sprawia to, że treść wniosków nie do końca odpowiada treści celów badania, gdyż jest ona właśnie sformułowana bardziej jako odpowiedź na pytanie o związek pomiędzy ocenianymi parametrami, ich udział w patogenezie choroby i przydatność w praktyce klinicznej.
5. Wniosek 2 wymaga zmiany. Autor stwierdza, że nasilenie ekspresji MT-3 może mieć znaczenie w określaniu stopnia zaawansowania nowotworu, tymczasem nasilenie to wynika ze stopnia zaawansowania nowotworu, określonego na podstawie skal lub/i klasyfikacji.

6. Zarówno w tekście omawiającym przeżywalność pacjentów z rakiem jelita grubego w zależności od ekspresji tkankowej MT-3, jak i na Rycinie 8 brak wartości mediany służącej za punkty odcięcia. Na rycinie umieszczone są jedynie sformułowania „<mediana i >mediana”.

Uwagi redakcyjne dotyczą braku streszczeń w języku polskim i angielskim. Ich obecność pozwoliłaby czytelnikowi na syntetyczną analizę uzyskanych wyników. Brak także spisu tabel i rycin.

W tekście rozdziału 5.1.1 na stronie 42. brak wytłumaczenia skrótu IRS - ang. *immunoreactive score* - wynik reakcji immunologicznej. Skrót wyjaśniony jest jedynie w wykazie skrótów.

W omawianych wynikach, w wartościach liczbowych występuje różna ilość miejsc po przecinku, co wymaga ujednoczenia.

W podrozdziale „*Analiza statystyczna*” użyto nazwy testu „Kołomorowa Smirnowa”. Właściwa nazwa to test „Kołomogorowa-Smirnowa”.

Przedstawione powyżej uwagi nie umniejszają jednak wartości merytorycznej pracy, jak również możliwości wykorzystania wyników w praktyce klinicznej. Reasumując uważam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska lekarza Mirosława Fica, pt. „*Ekspresja metalotioneiny-3 w guzach pierwotnych i przerzutach do węzłów chłonnych gruczolaka jelita grubego*” w sposób klarowny i przejrzysty analizuje związek pomiędzy ekspresją MT-3 zarówno na poziomie białkowym jak i mRNA a rakiem jelita grubego, rokowaniem u tych pacjentów oraz przydatnością w diagnostyce i profilaktyce tego nowotworu. Uzyskane wyniki stanowią istotne uzupełnienie stanu wiedzy w tym obszarze i mogą być przydatne w codziennej praktyce klinicznej.

Autor dysertacji wykazał się skrupulatnością, wnikliwością i rzetelnością, jak również bardzo dobrą znajomością warsztatu badawczego i obecnego stanu wiedzy.

Biorąc pod uwagę powyższe, jak również fakt, iż praca spełnia wszystkie warunki określone w artykułe 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm) zwracam się do Wysokiej Rady Dyscypliny Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie Autora, lekarza Mirosława Fica do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Michał Kukła, prof. UJ

