

Wzrost 10.02.16
M. Podchorąża Okrętu

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu	
DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO	
wpl. dn.	10 LUT. 2016
Ldz. DU	N/462/2016
Znak sprawy DL-	

Prof. dr hab. med. Barbara Skrzydło-Radomańska
Katedra i Klinika Gastroenterologii
Uniwersytet Medyczny
w Lublinie

Lublin 2.02.2016

Ocena pracy na stopień doktora nauk medycznych
lek. med. Krzysztofa Rogali zatytułowanej:
„Ekspresja czynnika transkrypcyjnego SOX18 w
gruczolaku jelita grubego”

Rak jelita grubego aktualnie znajduje się na drugim miejscu w Polsce pod względem zachorowalności na nowotwory złośliwe zarówno u kobiet, jak i u mężczyzn. Jest najczęstszym nowotworem złośliwym w Europie i drugą co do częstości przyczyną zgonu chorych na nowotwory złośliwe w Europie i Stanach Zjednoczonych.

Problematyka dotycząca raka jelita grubego fascynuje i przyciąga uwagę badaczy, epidemiologów i klinicystów z powodu wzrastającej częstości występowania tego nowotworu, wciąż niezadowalających wyników jego leczenia w warunkach polskich, a przede wszystkim z powodu istnienia czynników umożliwiających poprawę jego wykrywania i diagnostyki na etapie zmian wczesnych oraz określania czynników rokowniczych warunkujących dobrane najbardziej oszczędzających sposobów leczenia a następnie właściwego nadzoru. Ponad 90% przypadków raka jelita grubego wywodzi się z jego gruczolaków, a najczęstszą formą raka wczesnego jest gruczolak z ogniskiem raka inwazyjnego.

W ostatnich latach jesteśmy świadkami olbrzymiego postępu jaki dokonuje się w odkrywaniu czynników leżących u podłoża tej choroby w dziedzinie nauk podstawowych, genetycznych i epidemiologicznych. Wciąż dotychczas niezadowalające wyniki leczenia raka jelita grubego wskazują na potrzebę dalszego poszukiwania markerów prognostycznych jak również potencjalnych celów terapeutycznych w tej ciężkiej chorobie. Do procesów mających ogromny wpływ na rozwój choroby nowotworowej należą angiogeneza i limfogeneza, które

są niezbędne do wzrostu guza nowotworowego, a także jego ekspansji i powstawania odległych przerzutów. Stosunkowo niedawno odkrytym czynnikiem transkrypcyjnym związanym właśnie z procesami angiogenezy i limfangiogenezy jest białko SOX18. Rodzina tych białek to konserwatywne polipeptydy posiadające sekwencję DNA homologiczną z genem SRY odpowiedzialnym za różnicowanie płciowe i pełniące rolę aktywatorów czynników transkrypcyjnych. Białko SOX18 (z podrodziny białek SOX F uczestniczy w procesie rozwoju układu sercowo-naczyniowego i limfatycznego w ontogenezie, ale także wskazuje się na jego udział w transformacji nowotworowej i proliferacji komórek nowotworów złośliwych, co opisywano w raku żołądka, trzustki, płuc, jajnika oraz sutka, lecz nie było dotąd przedmiotem rzetelnej analizy w gruczolakoraku jelita grubego.

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja stanowi więc kolejny krok poznawczy w dążeniu do poprawy skuteczności diagnostyki i terapii tej choroby.

Cele swojej ciekawej pracy lek. med. Krzysztof Rogala sformułował jasno i konkretnie jako:

- wykazanie ekspresji mRNA oraz białka SOX18 w komórkach raka jelita grubego w porównaniu z ekspresją tego białka w zmianach nienowotworowych jelita grubego
 - określenie stopnia ekspresji mRNA oraz białka SOX18 w gruczolakoraku jelita grubego w porównaniu ze zmianami nienowotworowymi, czyli nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit oraz z prawidłową błoną śluzową jelita grubego
 - ocenę związku ekspresji mRNA oraz białka SOX18 z wybranymi parametrami kliniczno-patomorfologicznymi, a także ich przydatności w diagnostyce różnicowej chorób jelita grubego
 - ocenę możliwości wykorzystania materiału endoskopowego do określenia nasilenia ekspresji mRNA oraz białka SOX18 w komórkach nowotworowych biopsji endoskopowych i chirurgicznych
- oraz
- porównanie ekspresji SOX18 z ekspresją antygenu proliferacyjnego Ki-67 za pomocą metody immunohistochemicznej w badanych stanach chorobowych oraz w kontroli.

W wyniku takiej inspiracji intelektualnej Autor zaplanował bardzo interesujące badanie, którego wyniki przedstawił w ocenianej dziś przeze mnie rozprawie doktorskiej. Praca zawarta na 73 stronach wydruku komputerowego składa się z 10 rozdziałów obejmujących: wykaz skrótów, wstęp, cele pracy, materiał i metody badań, ich wyniki, dyskusję, wnioski,

streszczenie w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo w ilości 55 pozycji. W tekście wkomponowanych jest 9 tabel i 11 rycin (bez osobnego wykazu, który mógłby ułatwiać powrót do ich treści podczas przemyśleń przy lekturze dyskusji), wśród nich dokumentacja fotograficzna preparatów ilustrujących jądrową pozytywną ekspresję antygenów SOX18 i Ki-67 w komórkach gruczolaka jelita grubego.

Podkreślić należy właściwe teoretyczne przygotowanie lek. med. Krzysztofa Rogali do realizacji zaplanowanych zadań, przedstawione w trzydziestostronicowym czyli nieco nadmiernie rozbudowanym wstępie. Autor zawarł w nim informacje na temat epidemiologii i etiologii raka jelita grubego z podrozdziałem poświęconym podstawom molekularnym transformacji nowotworowej, a następnie klasyfikację histopatologiczną i klasyfikację TNM oraz stopnie zaawansowania klinicznego choroby.

W dalszym ciągu wstępu opisane jest leczenie gruczolakoraka: chirurgiczne oraz chemio- i radioterapeutyczne (bez szkody dla jakości opracowania można skrócić wstęp m.in. o bardzo wnikliwie podany schemat chemioterapii (z dawkami i częstością podawania leków)). Bardzo interesujące informacje natomiast zawiera Autor w podrozdziale poświęconym rodzinie białek SOX i ich roli w chorobie nowotworowej. Nie sposób nie dostrzec istotnej zalety pracy, w której nowoczesne i rzetelne informacje przedstawione są w sposób przejrzysty i w dalszej części pracy również zwarty, według najnowszej literatury i bez zbędnego nadmiaru objętości.

Rozdziały dalszej części pracy zawierają informacje na temat grupy badanej i zastosowanych metod badawczych. Materiał do badań stanowiło: 25 biopatów endoskopowych raka jelita grubego oraz 50 preparatów chirurgicznych raka jelita grubego, zaś kontrolę – 9 endoskopowo uzyskanych biopsji ze zmian w przebiegu nieswoistych chorób zapalnych jelita grubego (NChZJ), 12 biopsji endoskopowych błony śluzowej jelita grubego bez zmian makroskopowych oraz 16 preparatów chirurgicznych bez zmian morfologicznych. W tym miejscu chcę skierować do Doktoranta pytanie, która z NChZJ dominowała w podgrupie (ch. Leśniowskiego – Crohna czy wrzodziejące zapalenie jelita grubego?).

Na skrawkach parafinowych przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom SOX18 i Ki-67 dla oceny stopnia ekspresji jądrowej tych białek. Określano też poziom ekspresji mRNA SOX18 (poziom transkryptu) za pomocą techniki Real-Time PCR. Uzyskane rezultaty analizowane były w powiązaniu z danymi klinicznymi i patomorfologicznymi (stopień złośliwości histologicznej G, skala zaawansowania Dukes'a w modyfikacji Astler/Collier, wiek, płeć, obecność martwicy).

Analiza statystyczna wyników przeprowadzona została za pomocą programu Prism 5.0. Przy użyciu testu Kołomorowa Smirnowa sprawdzano rozkład badanych zmiennych, a ponadto w przypadku kiedy uzyskane dane cechował rozkład nieparametryczny do analizy statystycznej różnicy badanej cechy w dwóch grupach wykorzystywano test U-Manna-Whitney'a. Ewentualny związek pomiędzy ekspresją badanych białek badano testem korelacji Spearmanna. Za istotne statystycznie uznawano $p < 0,05$.

W swych badaniach Autor wykazał ekspresję SOX18 w prawidłowej jak też objętej nieswoistym procesem zapalnym błonie śluzowej jelita grubego zarówno na poziomie mRNA jak i białka, ale ważnym okazało się, iż jądrowa ekspresja antygeny SOX18 jak i SOX18mRNA była istotnie statystycznie wyższa niż w tej kontroli – w komórkach nowotworowych raka jelita grubego oraz w śródbłonku naczyń podścieliska nowotworu. Może to świadczyć o udziale białka SOX18 w procesach transformacji nowotworowej w guzach jelita grubego. Należy podkreślić, że Doktorant posługiwał się w detekcji obecności mRNA czułą i dokładną ilościową metodą Real-time PCR. Ekspresja SOX18mRNA korelowała istotnie z białkiem SOX18 w raku, ale nie zostały stwierdzone istotne zależności ekspresji SOX18 na poziomie RNA oraz białka z ekspresją antygeny Ki-67 oraz ocenianymi danymi kliniczno-patologicznymi. Być może w raku gruczołowym jelita grubego wpływ tego czynnika transkrypcyjnego nie zaznacza się w tak istotnym stopniu na proces proliferacji komórek nowotworowych.

Na każdym etapie lektury rozprawy zwraca uwagę dbałość Autora o przejrzystość wypowiedzi. Znajduje to wyraz w formie prezentacji wyników popartych tabelami, sugestywnymi rycinami i jasnym komentarzem słownym, a nawet dokumentacją fotograficzną obrazu mikroskopowego. Brakuje jednak, zarówno w tekście jak w podpisach pod rycinami a przede wszystkim w wykazie skrótów – wyjaśnienia skrótu RQ SOX18, którego należy się domyślać, ale trzeba to uzupełnić przed ogłoszeniem pracy w druku. W ramach poprawki należy też skorygować sposób w jaki cytowane są pozycje piśmiennictwa od 30 do 34 zgodnie z wymaganym ujednoliconym sposobem pozostałych referencji.

Rzeczowa dyskusja szeroko i z właściwym dystansem omawia uzyskane wyniki w zestawieniu z rezultatami innych badań, bogata jest w informacje i przemyślenia o znaczeniu praktycznym w klinicznym postępowaniu, jak podkreślenie wykazanych porównywalnych zależności badanych ekspresji w materiale z (łatwiej dostępnych) biopsji endoskopowych i z klasycznych zabiegów laparatomijnych.

Wnioski z pracy zredagowane są prawidłowo i wynikają z przeprowadzonych badań.

Uważam, że lekarz medycyny Krzysztof Rogala w zaprezentowanej pracy na stopień doktora nauk medycznych zrealizował swoje cele badawcze uzyskując odpowiedzi na postawione pytania i potwierdzając umiejętność stworzenia i wykorzystania warsztatu badawczego z elementem nowatorskim.

Przedstawioną mi do recenzji ciekawą i rzetelną pracę lek. med. Krzysztofa Rogali oceniam bardzo pozytywnie i wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego uwieńczonych nadaniem Mu stopnia doktora nauk medycznych.

Barbara Skrzydło-Radomańska



Prof. dr hab.
Barbara Skrzydło-Radomańska
spec. chorób wewnętrznych
GASTROENTEROLOG
3761646