

Agnieszka Ziółkowska, dr hab.

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii

Uniwersytet Medyczny w Poznaniu

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu DZIEKANAT WYDZIAŁU LEKARSKIEGO
wpł. dn. 01 LUT. 2016
L.dz. DU 358/16
Znak sprawy DL-

RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ LEK. KRZYSZTOFA ROGALI

pt. „EKSPRESJA CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO SOX18 W GRUCZOLAKORAKU JELITA GRUBEGO”

Poznań, dnia 25.01.2016 r.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska jest częścią projektu Wrovasc – Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007-2013.

Autor podejmuje w swoich badaniach ważki temat patogenezy raka jelita grubego, będącego drugim pod względem zapadalności oraz umieralności nowotworem złośliwym w Polsce. Rak jelita grubego charakteryzuje się szybką dynamiką wzrostu, a angiogeneza towarzysząca temu procesowi jest kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za obraz kliniczny tego nowotworu.

W niniejszej pracy Autor skoncentrował się na analizie ekspresji genu SOX18 kierując się dwoma przesłankami. Po pierwsze produkt tego genu, podobnie jak inni przedstawiciele rodziny białek SOX F, odgrywa ważną rolę w waskulo- i angiogenezie w trakcie embriogenezy a mutacje w genach tej rodziny białek prowadzą do zaburzeń w rozwoju naczyń limfatycznych, endodermy jelita pierwotnego oraz mieszków włosowych. Drugą ważną przesłanką przeprowadzenia analizy ekspresji tego genu w raku jelita grubego jest występowanie nadekspresji genów z rodziny SOX w wielu typach nowotworów złośliwych. Wiadomo, iż gen SOX18 wykazuje nadekspresję w czerniaku złośliwym, raku piersi, jajnika,

macicy, żołądka i niedrobnokomórkowym raku płuc, brak jednak było dotąd zintegrowanych danych na temat poziomu ekspresji tego genu w gruczolakoraku jelita grubego.

Praca prezentuje klasyczny układ edytorski dysertacji doktorskiej i obejmuje 73 strony maszynopisu. Rozpoczyna się wstępem, w którym Autor w obszerny sposób wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z etapami transformacji nowotworowej komórki, kliniczną charakterystyką zmian nowotworowych jelita grubego i schematami leczenia, a także zaznajamia z rodziną białek SOX i ich rolą w kancerogenezie i związanej z nią angiogenezie. Wstęp poprzedzony jest wykazem skrótów użytych w pracy. W odrębnym rozdziale „Cele pracy” autor nawiązuje do informacji zawartych we wstępie i formułuje w pięciu podpunktach cele pracy, odnoszące się do potencjalnego udziału produktu genu *SOX18* w patogenezie raka jelita grubego. W rozdziale „Materiał i metody” została opisana grupa pacjentów i precyzyjnie przedstawione procedury badawcze przygotowania klasycznych preparatów histologicznych, oraz metody oceny ekspresji *SOX18* i Ki-67 na poziomie białka z użyciem reakcji immunohistochemicznej i ekspresji genu *SOX18* na poziomie mRNA (izolacja całkowitego RNA, odwrotna transkrypcji i RT-PCR). Przedstawione zostały także metody statystyczne użyte w pracy. W rozdziale „Wyniki” bogato ilustrowanym tabelami i wykresami, autor prezentuje liczne analizy korelacji wyników badań molekularnych z danymi klinicznymi pacjentów. W rozdziale „Dyskusja” Autor przedstawił uzyskane przez siebie wyniki w kontekście doświadczeń prowadzonych przez innych badaczy. W odrębnym rozdziale zaprezentował wnioski. Praca kończy się streszczeniem w języku polskim i angielskim i uzupełniona jest piśmiennictwem liczącym 55 aktualnych pozycji, prawidłowo cytowanych w tekście.

Badania będące przedmiotem rozprawy przeprowadzono z użyciem tkanek guzów jelita grubego pozyskanych od 61 pacjentów (łącznie w wyniku biopsji endoskopowej i zabiegów chirurgicznych). Materiał porównawczy stanowiły biopaty pozyskane w trakcie biopsji endoskopowych (9 biopatów nieswoistego zapalenia jelita grubego i 12 biopatów błony śluzowej jelita grubego pobranych z okolicy guza) oraz fragmenty ściany jelita grubego z pogranicza guza pozyskane w trakcie laparotomii (16). Materiał pozyskany od pacjentów został podzielony na poszczególne grupy na podstawie przeprowadzonej wcześniej oceny histopatologicznej. Prace badawcze przeprowadzone zostały za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu (KB 41/2013 i KB 363/2014).

Chociaż ekspresję antygenu Ki-67 i *SOX18* w jądrach komórek nowotworowych na poziomie białka wykazano w materiale wszystkich badanych grup, to w przypadku tkanek guza odsetek komórek z dodatnią reakcją immunohistochemiczną był znacznie wyższy. Na podstawie tych analiz wykazano, iż najlepszy materiał porównawczy stanowi nie zmieniona makroskopowo błona śluzowa jelita grubego pobrana z pogranicza guza w trakcie laparotomii, co Autor wykorzystał w dalszych analizach statystycznych. Warty podkreślenia jest fakt, iż poziom ekspresji genu *SOX18* na poziomie mRNA i białka był podobny w materiale pozyskanym z biopsji endoskopowej i tkankach guza pozyskanego w trakcie

laparotomii. Ponadto, poziom ekspresji genu *SOX18* na poziomie mRNA korelował z ekspresją na poziomie białka. Dodatnią reakcją immunohistochemiczną z przeciwciałem przeciwko białku *SOX18* wykazano w jądrach komórek śródbłonna zarówno podścieliska guza nowotworowego jak i niezmięnionej nowotworowo błony śluzowej.

Przeprowadzone analizy nie wykazały korelacji pomiędzy stopniem ekspresji białek Ki-67 i *SOX18* a stopniami skali klinicznego zaawansowania choroby wg klasyfikacji Dukes'a. Wykazały natomiast najwyższy stopień ekspresji genu *SOX18* na poziomie mRNA i białka w stopniu G2 skali złośliwości histologicznej. W wyniku analiz nie wykazano związku pomiędzy stopniem ekspresji białek Ki-67 i *SOX18* a wiekiem i płcią pacjentów. Również obecność martwicy w obrębie tkanek guza nie miała wpływu na poziom ekspresji badanych markerów.

W dyskusji Autor prowadzi krytyczną analizę uzyskanych przez siebie wyników odnosząc się do danych przytaczanych przez innych autorów. W ciekawy sposób komentuje rozbieżności wyników otrzymanych z zastosowaniem różnych modeli badawczych. Na końcu, opierając się na wynikach analiz formułuje trzy wnioski końcowe.

Rozprawa doktorska ma przejrzysty charakter, stanowi zwartą całość a przedstawiane wyniki prezentowane są w logicznej kolejności. Język publikacji i całej pracy jest zrozumiały, ryciny i tabele są adekwatne do treści, a opisy pod nimi umieszczone sprawiają, iż każda z nich stanowi indywidualną całość i jest czytelna. Autor skupia się na najważniejszych wątkach i przytacza aktualną literaturę.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż Autor podjął temat o dużym znaczeniu klinicznym. W swojej pracy nie uniknął jednak drobnych błędów, niezręcznych sformułowań i nieścisłości edytorskich.

Istnieje rozbieżność pomiędzy celami pracy postawionymi na początku rozprawy w stosunku do wniosków. Cele pracy zostały sformułowane w postaci 5 podpunktów. Pierwszy podpunkt jest tożsamy z punktem drugim. Ponadto w pierwszym z podpunktów zamiast słowa „wykazanie”, proponuję „zbadanie”, które nie sugeruje wyniku planowanych doświadczeń. Wniosek nr 1 sformułowany jest ogólnie, nie uwzględnia w pełni uzyskanych wyników. We wnioskach brakuje ponadto odniesienia do trzeciego celu pracy, którym było zbadanie korelacji poziomu ekspresji genu *SOX18* z wybranymi parametrami klinicznymi oraz do celu czwartego, którym było porównanie ekspresji genu *SOX18* w materiale pochodzącym z biopsji chirurgicznej i endoskopowej.

W opisie grupy badanej Autor podaje na stronie 34. iż w przypadku 14 pacjentów dysponował zarówno materiałem z biopsji endoskopowej jak i pozyskany w trakcie laparotomii, z tabeli nr 9 zamieszczonej na stronie 43. wynika, iż tych przypadków było 15.

Proponuję także zmienić tytuł podrozdziału 2.1.2 na „Podstawy molekularne rozwoju raka jelita grubego”.

Powyższe uwagi nie umniejszają wartości pracy doktorskiej.

Reasumując stwierdzam, iż przedstawiona mi praca doktorska spełnia wymogi formalne określone w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U.2014,1852 j.t.) stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych. Z związku z powyższym przedkładam wniosek do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Krzysztofa Rogali do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Andrzej Ziobowski