

wsow 8.09.2017

M. Podhorska-Okolow
Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
WYDZIAŁ LEKARSKI
Pracownik ds. Nauki



UNIwersytet Medyczny IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

dr hab. Marzenna Podhorska-Okolow

KATEDRA I ZAKŁAD HISTOLOGII I EMBRIOLOGII

dr hab. Marcin Ruciński

ul. Święcickiego 6
60-781 Poznań

tel. 061 8546445

fax 061 8546440

Poznań 06.08.2017

Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Piotra Rubisza pt. „Ekspresja białek proliferacyjnych MCM oraz antygenu Ki-67 w mięśniakach macicy

Nowotwory wywodzące się z komórek mięśni gładkich macicy należą do najczęściej występujących zmian chorobowych narządów rodnych. Z uwagi na powszechność występowania, a jednocześnie mnogość podtypów histopatologicznych guzów wywodzących się z mięśni gładkich macicy istnieje potrzeba poszukiwania nowych markerów molekularnych, wykorzystywanych w rutynowej diagnostyce histopatologicznej. Tym bardziej, iż brak jednoznacznych kryteriów różnicowania łagodnych zmian nowotworowych macicy od złośliwych oraz brak swoistych i czułych markerów proliferacji niejednokrotnie uniemożliwia właściwą diagnozę, prognozowanie oraz ocenę odpowiedzi na zastosowane leczenie. W tym kontekście rozprawa lek. Piotra Rubisza wpisuje się w nurt aktualnych i niezwykle istotnych badań.

Przedstawiona do oceny praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich, obejmuje 101 stron maszynopisu, w którym Autor zawarł: wykaz stosowanych skrótów, wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki badań własnych, dyskusję, wnioski oraz streszczenia w języku polskim i angielskim. Na końcu rozprawy umieszczono wykaz cytowanego piśmiennictwa. Znaczna część cytowanych prac została opublikowana w ostatnim dziesięcioleciu. Cytowane są również starsze pozycje literaturowe, kluczowe dla omawianego tematu.

Wstęp pracy składający się z dwóch głównych podrozdziałów – „Mięśniaki macicy” oraz „Białka MCM” został poprzedzony wykazem skrótów wykorzystywanych w rozprawie. Na początku Doktorant przedstawia definicję, epidemiologię oraz aktualną klasyfikację mięśniaków macicy. W kolejnym

podrozdziale została przedstawiona analiza literatury w zakresie czynników ryzyka predysponujących do rozwoju mięśniaków macicy. Autor zwraca uwagę na istotne czynniki predysponujące, takie jak czas wystąpienia pierwszej miesiączki, częstotliwość urodzeń, wiek w momencie pierwszej ciąży, masa ciała, palenie papierosów oraz picie alkoholu. Należy podkreślić, iż rozdział ten świadczy o dużej znajomości poruszanego tematu przez Doktoranta. Poza opisaniem czynników predysponujących rozwój choroby, Autor podejmuje próbę ustalenia w jaki sposób wspomniane czynniki mogą wpływać na rozwój nowotworzenia mięśniówki macicy, słusznie zwracając uwagę na rolę płciowych hormonów steroidowych w modulacji tego procesu. Rozdział ten w ocenie recenzenta stanowi trafne uzasadnienie później przyjętych założeń oraz zaproponowanej metodologii badawczej w odniesieniu do ocenianych wykładników klinicznych.

W kolejnym podrozdziale Doktorant przedstawia obecnie obowiązujące metody diagnostyki mięśniaków macicy. W tym kontekście opisuje również badania histopatologiczne, zwracając uwagę na znaczenie metody immunohistochemicznej w różnicowaniu opisywanych guzów. Został tu krótko opisany powszechnie stosowany immunohistochemiczny marker proliferacji komórkowej - Ki-67, wraz z przeglądem literaturowym dotyczącym jego przydatności w diagnostyce mięśniaków macicy. Zgadzam się ze stwierdzeniem, iż mimo szerokiego wykorzystania metod immunohistochemicznych w diagnostyce, potrzeba poszukiwania nowych bardziej czułych i specyficznych markerów jest nadal aktualna i bardzo istotna w odniesieniu do praktyki klinicznej. Owo stwierdzenie stanowi również uzasadnienie badań prowadzonych w ramach powyższej rozprawy doktorskiej.

Kolejny podrozdział wstępu dotyczy rodziny nowo poznanych białek MCM o aktywności helikazy DNA, uczestniczących w procesie replikacji DNA. Wiadomym jest, iż proces replikacji stanowi jeden z elementów cyklu komórkowego, którego regulacja jest bardzo precyzyjna, a zaburzenia tej regulacji mogą prowadzić do progresji nowotworowej. Autor dość dokładnie opisuje mechanizm replikacji DNA skupiając się na roli białek MCM w tym procesie. Następnie szczegółowo charakteryzuje poszczególne typy białek MCM wraz z ich implikacją kliniczną, szczególnie w kontekście procesu nowotworzenia. Co istotne, nie znalazłem tu żadnych informacji dotyczących roli białek MCM w patogenezie mięśniaków macicy. Przegląd danych literaturowych również nie wskazuje na obecność takich

publikacji (poza jedną pracą dotyczącą białka MCM7). Fakt ten świadczy o oryginalnym i pionierskim charakterze ocenianej rozprawy doktorskiej w której zagadnienie oceny ekspresji białek MCM w odniesieniu do mięśniaków macicy stanowi główny trzon rozprawy.

Celem pracy było określenie potencjału proliferacyjnego komórek patologicznej mięśniówki macicy w oparciu o ekspresję powszechnie oznaczanego antygenu proliferacyjnego Ki-67 oraz kilku białek rodziny MCM. Przeprowadzono ponadto ocenę ekspresji receptorów estrogenowych i progesteronowych wraz z korelacją uzyskanych wyników z ekspresją wyżej wymienionych markerów. Analizowano także ekspresję wszystkich badanych markerów w odniesieniu do zebranych danych kliniczno-patologicznych. Cele zostały jasno sprecyzowane oraz bezpośrednio wynikają z wcześniej opisanego wstępu pracy.

Rozdział materiały i metody rozpoczyna się od deklaracji uzyskania zgody komisji bioetycznej na przeprowadzone badania. Następnie Doktorant dokonuje szczegółowej charakterystyki pacjentek operowanych z powodu mięśniaków macicy. Charakterystyka ta została przeprowadzona w odniesieniu do wykładników wykorzystanych w późniejszych analizach statystycznych i dotyczyła: dzietności i rodności, występowaniu mięśniaków macicy u krewnych, krwawień miesięczkowych oraz innych cech jakościowych. Z obowiązku recenzenta chciałbym zwrócić uwagę na pewne drobne niedociągnięcia omawianego rozdziału. Proponowałbym zacząć ten rozdział od podania całkowitej liczby operowanych pacjentek. Dane te można znaleźć dopiero w podrozdziale „materiał tkankowy” po dokładnej charakterystyce pacjentek, do której całkowita liczebność populacji się odnosi. Dodatkowo nie znalazłem opisu kryteriów wykluczenia pacjentek z grupy badawczej. Czy takie kryteria były określone?

Kolejny podrozdział dotyczy badań immunohistochemicznych. Na podkreślenie zasługuje wykorzystanie nowatorskiego podejścia w histologii jakim jest transformacja materiału biologicznego do formatu mikromacierzy tkankowych. Metoda ta umożliwia pobranie interesujących fragmentów wcześniej zatopionych w parafinie wycinków narządów oraz umieszczeniu ich w formacie macierzy na jednej kostce parafinowej. Takie podejście, poza redukcją objętości zastosowanych odczynników, umożliwia przeprowadzenie późniejszych reakcji na jednym szkiełku, dokładnie w tych samych warunkach, przez co czyni ocenianą reakcję immunohistochemiczną wysoce wiarygodną oraz porównywalną między

poszczególnymi próbkami. Sam opis przeprowadzenia reakcji immunohistochemicznej oraz analiza obrazów mikroskopowych napisany jest przejrzysto i nie budzi zastrzeżeń. Drobne uwagi polemiczne dotyczą rozdziału analiza statystyczna. Rozumiem, że test Shapiro-Wilka do oceny zgodności rozkładu z rozkładem normalnym przeprowadzono celem ewentualnego zastosowania testu parametrycznego T-studenta. Podejście takie ma sens, gdyż test T-studenta jest testem silniejszym od wykorzystanego U Manna-Whitneya. Z drugiej strony test U Manna-Whitneya nie posiada ograniczeń testu T-studenta, dlatego też nie ma konieczności przeprowadzania testu zgodności rozkładu z rozkładem normalnym decydując się na test U Manna-Whitneya. Miarą tendencji centralnej dla tego testu nie jest średnia jak w przypadku testu T, a mediana, dlatego też uważam, że zdanie „Istotność różnic wartości średnich...” należałoby skorygować. Tym bardziej, że na wykresach wyniki zostały pokazane jako wartości mediany z rozkładem kwartylowym.

Uzyskane wyniki zostały przedstawione łącznie na dwudziestu dziewięciu stronach i zostały zaprezentowane w postaci: czterech tabel, siedmiu zdjęć mikroskopowych reakcji immunohistochemicznych, trzynastu wykresów pudełkowych oraz osiemnastu diagramów korelacyjnych. Wspominane wyniki przedstawione oraz opisane są w sposób klarowny. Wartość p istotna statystycznie została zaznaczona poprzez czerwoną czcionkę, co znacznie zwiększa czytelność oraz interpretację otrzymanych wyników. Drobne uwagi odnośnie tej części doktoratu dotyczą prezentacji wykresów korelacji oraz pewnych powtórzeń. Według wiedzy recenzenta, korelację dwóch zmiennych przedstawia się na prostym wykresie punktowym z wykreśleniem prostej wraz z wartością r (rho) oraz p . W ocenianej pracy dla każdej analizy korelacji Spearmana zostały przedstawione dwa wykresy korelacji oraz wykresy słupkowe. Zaprezentowane podejście być może jest prawidłowe, jednakże wymagałoby komentarza lub bardziej rozbudowanego opisu ryciny lub też opisu osi x i y samych wykresów. Uważam również, że pewne dane zostały niepotrzebnie powtórzone np. Doktorant opisuje wynik korelacji między MCM-3 i MCM-5 przedstawiając wartość współczynnika ρ oraz p , w późniejszym fragmencie rozprawy przedstawia korelację między MCM-5 i MCM-3, która z założenia daje te same wartości co wcześniej opisana korelacja i w takim rozumieniu stanowi ona powtórzenie.

Uzyskane wyniki Autor przedyskutował w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych, podkreślając ich oryginalność oraz nowatorstwo. Doktorant przedyskutował także znaczenie metody immunohistochemicznej do precyzyjnej charakterystyki guzów mięśniówki macicy. Ponadto uważam, że dyskusja jest trafna, rzetelna i obejmuje wszystkie aspekty uzyskanych wyników. Rozdział ten jest wartościowy merytorycznie i świadczy o głębokiej znajomości badanej problematyki, a także dojrzałości Autora dysertacji w formułowaniu i analizowaniu zagadnień badawczych. Wnioski są zdefiniowane prawidłowo, jasno wynikają ze stawianych celów rozprawy i znajdują potwierdzenie w przedstawionych wynikach pracy. W mojej opinii najważniejsze z nich to wnioski: 2 i 3, które wskazują na możliwość wykorzystania badanych białek MCM w diagnostyce guzów wywodzących się z komórek mięśni gładkich macicy.

Pomimo kilku, krytyczno-polemicznych uwag moja opinia o przedstawionej rozprawie jest bardzo dobra. Doktorant zrealizował wszystkie postawione przed sobą cele badawcze. Zaprezentowane badania są oryginalne i stanowią istotny wkład w nowoczesną metodologię badań nad poszukiwaniem nowych markerów różnicowania mięśniaków macicy. Praca napisana jest starannie, w dobrym stylu z nielicznymi błędami językowo—redakcyjnymi.

Podsumowując, przedstawiona do oceny dysertacja spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych z dyscypliny medycyna. Doktorant wykazał się dużą erudycją i umiejętnością przygotowania pracy naukowej oraz posiada bogaty warsztat badawczy oparty na nowoczesnej metodologii. Uważam, że Doktorant osiągnął stopień dojrzałości naukowej uprawniający Go o ubieganie się o stopień doktora i w związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Piotra Rubisza do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Mając na uwadze wysoką wartość merytoryczną ocenianej rozprawy wnoszę również o jej wyróżnienie.

Ryszard M...