

Prof. dr hab. n. med. Janusz Klatka
Klinika Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej
UM w Lublinie

Lublin dnia 5 maja 2017 r.

O C E N A

rozprawy doktorskiej lek. med. Marka Łuciuka

pt. „OCENA WYSTĘPOWANIA BIAŁKA CAŁKOWITEGO P53 I JEGO UFOSFORYLOWANYCH FORM W POZYCJI SERyna 15 I SERyna 20 W NOWOTWORACH JAMY USTNEJ: KORELACJA Z WYBRANYMI PARAMETRAMI KLINICZNO-PATOLOGICZNYMI”.

W roku 1874 John Erikson, szef słynnego Listera oświadczył : „chirurgia szybko zbliża się do osiągnięcia kresu perfekcji i doskonałości”. Od tego czasu upłynęło ponad 140 lat, które dość radykalnie zmieniły oblicze świata i stan nauki, w tym nauk medycznych. Staaliśmy w obliczu lawinowo narastającej zachorowalności na choroby nowotworowe, coraz lepiej zdając sobie sprawę, że nie do chirurga należy ostateczne rozwiązanie problemu raka, bez względu na to, jak dalece postąpi rozwój technik operacyjnych. Pomimo rozwoju jaki dokonał się w leczeniu chirurgicznym raka krtani w ostatnim dwudziestoleciu, zwłaszcza w zakresie tzw. operacji zachowawczych i rekonstrukcyjnych, który doprowadził do poprawy wyników czynnościowych, nie uzyskano zwiększenia odsetka 5-letniego okresu przeżycia u leczonych chorych. Dotychczasowe kryteria oceny guza oraz choroby nowotworowej, oparte jedynie na klasyfikacji TNM i wynikach badań histopatologicznych, bez uwzględnienia cech związanych z jego biologią, wydają się być niewystarczające w prognozowaniu i wyborze optymalnego postępowania terapeutycznego. Poznanie i właściwe wykorzystanie w praktyce klinicznej biologicznych cech nowotworu jest warunkiem dalszego postępu w racjonalnym wyborze metod leczenia raka krtani. Dlatego też podjęcie przez lek. med. Marka Łuciuka badań nad występowaniem białka całkowitego p53 i jego ufosforylowanych form w nowotworach jamy ustnej w korelacji z wybranymi parametrami kliniczno-patologicznymi uważam za celowe i w pełni uzasadnione.

Praca doktorska lek. med. Marka Łuciuka liczy 158 stron tekstu, w którym zawarto dokumentację naukową w postaci 41 tabel i 35 rycin oraz 268 pozycji piśmiennictwa. Poza tym rozprawa ma układ typowy.

Doktorant w 26-stronicowym wstępie przedstawił szczegółowo i wyczerpująco aktualny stan wiedzy z zakresu epidemiologii, etiologii i postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w raku jamy ustnej. W sposób jasny omówił aktualnie stosowany system klasyfikacji klinicznego zaawansowania nowotworów jamy ustnej. Scharakteryzował skalę G (Grade) wykorzystywaną do oceny stopnia zróżnicowania histologicznego raka jamy ustnej. Przedstawił zgodnie z klasyfikacją WHO podział raka jamy ustnej na poszczególne typy histologiczne.

Doktorant wskazał, że w wielu krajach Europy, zarówno wśród mężczyzn jak i kobiet obserwuje się stały wzrost zachorowalności i śmiertelności na raka gardła i jamy ustnej. Przytoczył dane zaprezentowane przez GLOBAN 2012, wg których Polska znajduje się na liście 20 państw europejskich o najwyższym współczynniku zachorowalności na raka jamy ustnej oraz na jednym z ostatnich miejsc w Europie pod względem wyleczalności, jeśli chodzi o nowotwory jamy ustnej.

Doktorant omawia bardzo szczegółowo etiologię raka jamy ustnej, która ma charakter wieloczynnikowy. Wymienia podstawowe czynniki zwiększające ryzyko zachorowania na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej, którymi są: ekspozycja błony śluzowej na wysokoprocentowy alkohol oraz palenie lub żucie tytoniu. Pozostałe czynniki rakotwórcze, na które zwraca uwagę Doktorant to m.in. drażnienie mechaniczne błony śluzowej, niewystarczająca higiena jamy ustnej, infekcja wirusem HPV (brodawczaka ludzkiego) w przypadku raka jamy ustnej i części ustnej gardła, zakażenie wirusem Epsteina-Barr w przypadku raka nosowej części gardła), czynniki genetyczne (naskórkowy czynnik wzrostu – EGFR). Doktorant opisuje dokładnie wygląd zmian nowotworowych rozwijających się w obrębie jamy ustnej ich lokalizację. Szczególnie wnikliwie omówił wszystkie współczesne metody diagnostyczne dotyczące nowotworów głowy i szyi. Podkreślił, że nowotwory jamy ustnej ze względu na swoje umiejscowienie i brak dolegliwości w początkowym stanie zaawansowania, rozwijają się skrycie, wywołują objawy niecharakterystyczne dla choroby nowotworowej a identyczne z towarzyszącymi zwykłym infekcjom dróg oddechowych. Zwrócił uwagę na wysoką przydatność w procesie diagnostyczno- terapeutycznym takich metod, jak tomografia komputerowa (TK), rezonans magnetyczny (MR), ultrasonografia (USG) czy badanie endoskopowe. Podkreślił istotność oceny węzłów chłonnych przy zastosowaniu biopsji cienkoigłowej pod kontrolą USG (BAC). Doktorant przystępnie omówił

klasyfikację stopnia zaawansowania klinicznego (TNM) i patomorfologicznego (pTNM) rekomendowaną przez *American Joint Committee on Cancer* (AJCC).

Omawiając leczenie raka jamy ustnej wskazuje na główne czynniki determinujące decyzje w tym zakresie takie jak : rozpoznanie i stopień zaawansowania histologicznego, lokalizację, klasyfikację i stopień zaawansowania klinicznego guza, głębokość naciekania raka oraz jego położenie anatomiczne. Do podstawowych metod leczenia raka jamy ustnej, Doktorant zalicza : zabieg chirurgiczny lub radioterapia stosowane samodzielnie lub łącznie. Czynniki wpływające na wybór metody leczenia (ustalenie planu leczenia) dzieli na zależne od guza, od stanu ogólnego pacjenta, doświadczenia zespołu i możliwości ośrodka.

Doktorant doskonale rozumie, że współczesne leczenie w zakresie raka jamy ustnej jest procesem interdyscyplinarnym. W skład zespołu lekarzy zajmujących się leczeniem pacjentów z rakiem jamy ustnej wchodzi wielu specjalistów jak np.: otolaryngolodzy, chirurdzy głowy i szyi, chirurdzy plastycy, mikrochirurdzy, chirurdzy szczękowo-twarzowi, specjaliści rehabilitacji i inni.

Doktorant wykazuje się również znajomością aktualnie prowadzonych badań z wykorzystaniem terapii celowanej, które wpływając na podłoże molekularne kancerogenezy mogą poprawić wyniki leczenia nowotworów złośliwych omawianego regionu. Wskazuje na możliwość zastosowania w przypadkach zaawansowanych raków płaskonabłonkowych głowy i szyi razem z jednoczasową radioterapią, cetuksymabu (przeciwciało monoklonalne przeciwko receptorowi naskórkowego czynnika wzrostu – EGFR, które hamuje wzrost komórek nowotworowych i wywołuje apoptozę uszkodzonej komórki).

W ostatnich podrozdziałach Wstępu Doktorant bardzo szczegółowo omawia budowę, funkcję i rolę białka p53 w komórce. Charakteryzuje proces apoptozy.

Podsumowując ocenę tej części pracy stwierdzam, że we wstępie przejrzystość i wyczerpująco zostały przedstawione współczesne metody diagnozowania i leczenia raka jamy ustnej. Doktorant wykazał się również znajomością aktualnych poglądów na temat czynników regulujących procesy proliferacji i apoptozy w nowotworach. Świadczy to o doskonałej orientacji Doktoranta w opracowywanym temacie. Wszystkie dane zostały poparte licznymi cytowaniami.

Celem pracy jest immunohistochemiczna ocena występowania białka p53 oraz jego ufosforylowanych form w pozycji seryna 15 i seryna 20 w nowotworach jamy ustnej

a także ich korelacja z cechami histopatologicznymi i parametrami kliniczno-patologicznymi u tych pacjentów. Autor jasno precyzuje cele swoich badań, zestawiając je w sześciu czytelnych punktach, które są konsekwentnie realizowane w dalszej części badań.

Materiał do badań stanowiły utrwalone w formaldehydzie i zatopione w parafinie fragmenty tkankowe. Zaplanowane badania Doktorant przeprowadził u 66 pacjentów z rozpoznaniem nowotworu złośliwego (raka) jamy ustnej. Grupę porównawczą stanowiło 20 przypadków chorych z nowotworem łagodnym błony śluzowej jamy ustnej.

Zbadano ekspresję całkowitego białka p53 oraz jego form p53ser15 i p53ser20 dla wszystkich przypadków. Oceniono ponadto zależności występujące pomiędzy ekspresją badanych markerów a wybranymi cechami kliniczno-patologicznymi. Elementem wzbogacającym pracę jest zbiór kolorowych fotografii z mikroskopu fluorescencyjnego.

Doktorant wykazał, że ekspresja białka całkowitego p53 ($p < 0,0001$) oraz p53ser20 ($p = 0,03$) była znacząco wyższa u chorych z nowotworem złośliwym w porównaniu z tymi wartościami w grupie kontrolnej. Odwrotną zależność stwierdzono dla białka p53ser15, gdzie wykazano znacznie wyższe wartości dla przypadków z chorobą nowotworową łagodną ($p < 0,0001$). W przypadku białka p53ser15 wykazano istotne statystycznie zależności w stosunku do stopnia zaawansowania klinicznego raka ($p = 0,011$).

Zależności istotne statystycznie stwierdzono pomiędzy ekspresją białka p53ser15 a czasem wolnym od choroby. Chorzy z grupy, w której ekspresja p53ser15 była obecna w tkance guza w ilości powyżej 40%, charakteryzują się częstszym występowaniem czasu wolnego od choroby powyżej 12 miesięcy. Grupę pacjentów, u których zakres immunoreaktywności dla p53ser15 wahał się w granicach do 40%, charakteryzowały czasy wolne od choroby krótsze niż 12 miesięcy ($p = 0,00146$).

W grupie pacjentów z nowotworem złośliwym jamy ustnej wykazujących poziom ekspresji białka p53ser15 poniżej 40% wykazano znamienne częstsze ryzyko wystąpienia zgonu w 3-letnim okresie obserwacji ($p = 0,05$). Odnotowano również zależność pomiędzy ekspresją białka p53ser15 a obecnością przerzutu w regionalnych węzłach chłonnych szyi. Niskie wartości białka p53ser15 (poniżej 40%) cechują grupę pacjentów z wysokim prawdopodobieństwem obecności przerzutu węzłowego w chwili rozpoznania. Wartość ekspresji p53ser15 wyższa niż 40% określa grupę chorych na raka płaskonabłonkowego jamy ustnej o znacznie niższym prawdopodobieństwie jednoczesnego posiadania przerzutu węzłowego ($p = 0,014$). W grupie pacjentów z dodatnią wartością białka p53 znamienne częściej wykrywano raka jamy ustnej o niskim (G3) stopniu zróżnicowania histopatologicznego ($p = 0,041$). Dla grupy chorych, u których nie wykazano obecności

całkowitego białka p53 w komórkach nowotworowych znamienne częściej rozpoznawano obecność raka o wysokim lub średnim stopniu zróżnicowania histopatologicznego (G1 lub G2).

W dyskusji autor umiejętnie porównuje wyniki własne do uzyskanych przez innych autorów. Wykazuje się dużą wiedzą, logicznie próbuje interpretować uzyskane wyniki, odbiegające czasami od wyników przedstawianych przez innych autorów. Wnikliwie analizuje stawiane przez innych autorów hipotezy. W dyskusji, jak i w pozostałych częściach pracy wykorzystuje i cytuje 268 pozycji piśmiennictwa, przeważnie angielskiego.

Całość pracy kończy się siedmioma wnioskami, znajdującymi swoje uzasadnienie w uzyskanych wynikach. Wnioski, stanowiące podsumowanie przeprowadzonych badań sformułowane są ostrożnie, co świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktoranta.

Po szczegółowym zapoznaniu się z każdą rozprawą doktorską przedstawianą mi do recenzji, zazwyczaj nasuwają mi się pewne uwagi krytyczne, które w związku z przysługującym mi prawem wskazuję w podsumowaniu recenzji. Z przyjemnością stwierdzam, że po lekturze tej pracy takich uwag nie mam.

Reasumując, w oparciu o przeprowadzone badania oraz wyniki uzyskane przy zastosowaniu nowoczesnych i wiarygodnych metod, głęboką wiedzę autora, jego samodzielność i swobodę poruszania się w temacie będącym przedmiotem badań, uważam, że omawiana rozprawa spełnia wszystkie warunki stawiane pracom doktorskim i na tej podstawie mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznej we Wrocławiu im. Piastów Śląskich wniosek o dopuszczenie lek. med. Marka Łuciuka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kierownik Katedry i Kliniki
Otolaryngologii i Onkologii Laryngologicznej
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Prof. dr hab. n. med. Janusz Klatka

