



ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY w Katowicach

Dr hab. n. med. Jarosław Markowski
Kierownik Katedry i Kliniki Laryngologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach
40 – 027 Katowice
ul. Francuska 20

Katowice, 25.04.2016r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. med. Anny Roszkowskiej - Nowickiej

pt.: „Analiza ekspresji białek: β -kateniny i E-kadheryny w gruczolaku wielopostaciowym ślinianki przyusznej”.

Choroba nowotworowa jest chorobą o podłożu genetycznym, wynikającą w większości przypadków z nabytych mutacji oraz ze zmian genetycznych, które wpływają na ekspresję genów. W jej rozwoju istotną rolę odgrywa również wpływ czynników środowiskowych. Zgodnie z tą tezą, największą obecnie rolę w badaniach nad biologią molekularną nowotworów odgrywa identyfikacja markerów genetycznych, jakich można użyć do precyzyjnego ustalenia rozpoznania, a następnie możliwości prognozowania przebiegu choroby.

Nowotwory ślinianek stanowią ok. 2 – 3% ogółu nowotworów regionu głowy i szyi. W ostatnim czasie częstość ich występowania wyraźnie wzrasta. Nowotwory gruczołów ślinowych są bardzo zróżnicowane pod względem budowy histologicznej. Większość z nich stanowią nowotwory pochodzenia nabłonkowego. Gruczolak wielopostaciowy jest zdecydowanie najczęściej występującym nowotworem tego narządu, stanowiącym aż ok. 80% ogółu nowotworów ślinianek przyusznych.

Mimo ciągłego doskonalenia diagnostyki i leczenia nowotworów ślinianki przyusznej, nadal nie jest dostatecznie poznane zagadnienie jego transformacji nowotworowej. Świadczy to o tym, iż obecnie stosowane wskaźniki kliniczne, radiologiczne i immunologiczne nie są wystarczające do ustalenia przebiegu tej choroby u indywidualnego chorego. Ciągłe poszukujemy nowych czynników, które ułatwiłyby zrozumienie patomechanizmu powstawania nowotworów ślinianek, mechanizmów ich transformacji nowotworowej i pozwoliły na spersonalizowaną terapię tych guzów. Uważa się, iż znaczącą rolę w tej transformacji odgrywają uwarunkowania genetyczne. Na przestrzeni ostatnich dekad rola czynnika genetycznego w rozwoju i przebiegu nowotworów łagodnych ślinianek została lepiej poznana dzięki postępom genetyki, biologii molekularnej i immunologii. Nie ma do dzisiaj uznanych markerów molekularnych, które można by z dużą dozą pewności stosować jako prognostyczne w zakresie potencjalnej transformacji nowotworowej gruczolaka wielopostaciowego ślinianki przyusznej.

Badania interdyscyplinarne łączące w sobie wiedzę i doświadczenie różnych dziedzin medycyny dają możliwość wykorzystania dorobku różnych specjalności i tym samym poznania istoty przebiegu schorzeń z wielu punktów widzenia. Badania takie stwarzają szansę nowego podejścia do zapobiegania i leczenia tych chorób z wykorzystaniem wiedzy z różnych dziedzin.

Rozprawa doktorska lek. Anny Roszkowskiej - Nowickiej jest właśnie takim przykładem badania schorzenia z wykorzystania wiedzy z różnych dziedzin, w tym przypadku z zakresu laryngologii, biologii molekularnej i immunocytochemii w diagnozowaniu i prognozowaniu przebiegu jednego z istotnych problemów w praktyce laryngologicznej jakim są nowotwory gruczołów ślinowych. Tak więc temat pracy doktorskiej jest bardzo

dobrze dobrany, gdyż jest aktualny i nowatorski oraz niesie aspekt nowości i innowacyjności, tak ważny w pracach młodych naukowców.

Celem tej dysertacji była immunohistochemiczna analiza ekspresji β -kateniny i E-kadheryny w tym nowotworze i ocena roli tych białek w procesie transformacji nowotworowej gruczolaka.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska została przygotowana pod opieką naukową prof. dr hab. n. med. Tomasza Kręcickiego, Kierownika Katedry i Kliniki Otolaryngologii, Chirurgii Głowy i Szyi Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Rozprawa doktorska liczy 103 strony maszynopisu i jest zredagowana w typowym układzie przyjętym dla prac doktorskich. Składa się z 9 rozdziałów ułożonych logicznie z zachowaniem odpowiednich proporcji oraz posiada czytelną oprawę graficzną (zawiera 9 tabel i 14 rycin), ułatwiającą zapoznanie się z zawartością pracy i uzyskanymi wynikami. Praca posiada 243 cytacje z pozycji literaturowych z uwzględnieniem wszystkich najważniejszych publikacji odnoszących się do tematu badawczego.

Praca zawiera 37 – stronicowy wstęp, w którym autorka dysertacji w kolejnych podrozdziałach omawia epidemiologię i etiologię guzów ślinianek z uwzględnieniem czynników środowiskowych i genetycznych, następnie anatomię i histologię ślinianki przyusznej oraz klasyfikację guzów tego narządu. W kolejnych podrozdziałach wstępu doktorantka w ciekawy sposób omawia diagnostykę, objawy i leczenie gruczolaka wielopostaciowego ślinianki przyusznej. Jest to znakomicie opracowany rozdział mogący być sam w sobie świetną pracą poglądową na temat współczesnych poglądów na gruczolaka wielopostaciowego ślinianki przyusznej. W ostatnich 4 podrozdziałach wstępu Doktorantka omawia rolę markerów nowotworowych w diagnostyce guzów ślinianek ze szczególnym uwzględnieniem udziału β -kateniny i E-kadheryny w procesie transformacji nowotworowej. Rozdział ten to swoisty aktualny „*state of the art*” w zakresie stanu wiedzy o roli tych białek w onkogenezie.

Autorka rozprawy sformułowała 4 cele badawcze swojej dysertacji a mianowicie: ocenę immunohistochemiczną ekspresji wybranych białek: β -kateniny i E-kadheryny w gruczolaku wielopostaciowym ślinianki przyusznej, ocenę zależności pomiędzy ekspresją wybranych białek a rozwojem oraz przebiegiem klinicznym gruczolaka wielopostaciowego ślinianki przyusznej w oparciu o uzyskane wyniki analizy immunohistochemicznej, próbę

oceny udziału białek adhezyjnych w procesie metaplastji gruczolaka wielopostaciowego ślinianki przyusznej na podstawie analizy ich ekspresji w poszczególnych grupach komórek komponenty nabłonkowej guza oraz ocenę przydatności E-kadheryny jako markera diagnostycznego w gruczolaku wielopostaciowym ślinianki.

Rozdział dotyczący materiału badawczego wykorzystanego w pracy oraz użytych metod i narzędzi badawczych autorka przedstawiła przejrzysto i szczegółowo. Grupę badaną stanowiło 47 pacjentów z rozpoznaniem gruczolaka wielopostaciowego ślinianki przyusznej leczonych operacyjnie w Katedrze i Klinice Otolaryngologii Chirurgii Głowy i Szyi we Wrocławiu. Ze względów etycznych w pracy brak grupy kontrolnej, bowiem nie ma możliwości pobrania tkanki gruczołu ślinowego od osoby zdrowej. Materiał do badań stanowiły tkanki nowotworów gruczołów ślinowych utrwalone w formalinie a następnie zatopione w blokach parafinowych. Dla oceny ekspresji określonych białek zastosowano badanie immunohistochemiczne, a badania wykonano w renomowanej Pracowni Immunocytochemii Katedry Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Wszystkie preparaty do badań były reprezentatywne ponieważ zawierały obie charakterystyczne dla gruczolaka wielopostaciowego komponenty: nabłonkową i mezenchymalną.

Ocenę ekspresji β -kateniny i E-kadheryny wykonano w oparciu o półilościową skalę IRS (*immunoreactive score*) wg Remelle i Stegnera polegającą na ocenie procentu wybarwionych komórek oraz stopnia intensywności ich zabarwienia. Ocenę preparatów z użyciem skali IRS Doktorantka wykonała dwukrotnie, a uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej. Tak kompleksowe podejście Autorki do metodyki badań molekularnych stanowi o ogromnej wartości merytorycznej tej rozprawy.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy zastosowaniu programu komputerowego Statistica 10.0 z wykorzystaniem odpowiednich testów. Do końcowych analiz, za znamienne statystycznie przyjęto wartości dla których poziom istotności testu wynosił $p < 0,05$.

Wyniki badań zostały przedstawione i omówione w odrębnym rozdziale w formie opisowej oraz przejrzystych tabel i rycin, przy których opracowaniu zastosowano właściwe metody analizy statystycznej. Wyniki badań i ich omówienie obejmują 5 podrozdziałów,

w których oceniono uzyskane wyniki w zakresie wszystkich celów rozprawy. Doktorantka wykazała się umiejętnością krytycznej i wyważonej oceny uzyskanych wyników oraz formułowania wniosków końcowych, zwłaszcza w sytuacji braku możliwości skonfrontowania ich z danymi z piśmiennictwa. Sformułowane przez Doktorantkę wnioski odpowiadają ustalonym celom pracy. Wykazanie, iż ekspresja β -kateniny i E-kadheryny w gruczolaku wielopostaciowym ślinianki przyusznej jest niejednorodna i zróżnicowana zarówno pod względem lokalizacji komórkowej jak i nasilenia reakcji oraz, że normotypowy charakter ekspresji β -kateniny w większości przypadków gruczolaka wielopostaciowego ślinianki przyusznej wskazuje na brak zależności pomiędzy lokalizacją i stopniem ekspresji białka a inicjacją rozwoju gruczolaka wielopostaciowego ślinianki przyusznej są oryginalnymi wnioskami Autorki, dotychczas nie znanymi i nie opisywanymi w piśmiennictwie poświęconym biologii gruczolaka wielopostaciowego.

Również dwa kolejne wnioski Autorki tzn. wykazanie, że brak ekspresji β -kateniny w jądrze komórkowym w większości przypadków może świadczyć o niezależnej od β -kateniny aktywacji onkogenów odpowiedzialnych z rozwój gruczolaka wielopostaciowego, a także może sugerować współistnienie dodatkowych innych niż szlak Wnt/ β -katenina mechanizmów komórkowych koniecznych do inicjacji i transformacji nowotworowej oraz, że silna korelacja pomiędzy ekspresją β -kateniny i E-kadheryny sugeruje ich ewentualną wzajemną zależność w procesie progresji gruczolaka wielopostaciowego ślinianki przyusznej są oryginalnym dorobkiem Doktorantki na polu poszukiwania nowych markerów molekularnych przebiegu gruczolaka wielopostaciowego.

Wniosek 5 mówiący, iż heterogenna ekspresja E-kadheryny powoduje, że białko to ma ograniczoną przydatność jako marker diagnostyczny w gruczolaku wielopostaciowym przyuszniczy są istotnym wkładem Autorki w proces poznawania biologii molekularnej gruczolaka wielopostaciowego i stanowi istotny naukowo, oryginalny autorski wkład Doktorantki do jednego z najważniejszych problemów współczesnej laryngologii – problemu nowotworów ślinianek przyusznych.

Końcowy, 6 wniosek podsumowuje uzyskane wyniki wskazując na potrzebę dalszych badań na większej grupie pacjentów w celu potwierdzenia udziału białek adhezyjnych w procesie transformacji gruczolaka wielopostaciowego ślinianki przyusznej oraz jego progresji do raka.

Należy podkreślić zastosowanie przez Doktorantkę nowoczesnych technik badawczych, a mianowicie wykonanie badań immunohistochemicznych w Pracowni Immunocytochemii Katedry Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Te nowoczesne metody badawcze tzn. ocena ekspresji białek przy użyciu przeciwciał monoklonalnych, wizualizacji przy użyciu firmy DAKO oraz ocena odsetka wybarwionych komórek przy pomocy czterostopniowej skali IRS wykonane w renomowanej Pracowni pozwoliło Doktorantce na zrealizowanie obszernego, pionierskiego programu badawczego i są istotną wartością dysertacji. Warsztat badawczy dysertacji jest na poziomie rozprawy habilitacyjnej.

Na podkreślenie zasługuje fakt, iż Doktorantka przeprowadziła badania nie mające dotąd odzwierciedlenia w literaturze. Występują tylko pojedyncze doniesienia w literaturze wskazujące na zależności między ekspresją β -kateniny i E-kadheryny w gruczolaku wielopostaciowym przyusznicy. W literaturze brakuje doniesień poświęconych tematyce związku między ekspresją białek adhezyjnych a przebiegiem gruczolaka wielopostaciowego.

W podsumowaniu stwierdzam, iż przedłożona mi do oceny praca doktorska lek. Anny Roszkowskiej – Nowickiej pt. „Analiza ekspresji białek β -kateniny i E-kadheryny w gruczolaku wielopostaciowym ślinianki przyusznej” ma charakter pionierski w dziedzinie badań nad czynnikami molekularnymi w etiopatogenezie gruczolaka wielopostaciowego. Po raz pierwszy określono rolę białek adhezyjnych β -kateniny i E-kadheryny w powstawaniu i przebiegu tego nowotworu. Stanowi to istotny naukowo, oryginalny autorski wkład Doktorantki do problematyki badań nad tym nowotworem. Nie wnoszę żadnych zastrzeżeń merytorycznych ani też uwag redakcyjnych.

Bardzo wysoko oceniam wartość naukową rozprawy doktorskiej lek. Anny Roszkowskiej-Nowickiej i w związku z tym mam zaszczyt wystąpić do Wysokiej Komisji Doktorskiej Rady Wydziału Lekarskiego Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu z wnioskiem o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wobec bardzo wysokich walorów merytorycznych rozprawy doktorskiej oraz biorąc pod uwagę pionierską koncepcję dysertacji lek. Anny Roszkowskiej-Nowickiej wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej.

Wnoszę również – o ile Doktorantka spełnia wymogi formalne – o zgłoszenie pracy do Nagrody im. Jana Miodońskiego – najbardziej prestiżowego wyróżnienia przyznawanego przez Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Otorynolaryngologów – Chirurgów Głowy i Szyi.

KIEROWNIK

Katedry i Kliniki Laryngologii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach



dr hab. n. med. Jarosław Markowski

Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Katedra i Klinika Laryngologii
40-027 Katowice, ul. Francuska 20/24
tel./fax. 32 256 43 09, 32 255 32 57