

Recenzja

rozprawy doktorskiej lekarza medycyny Mateusza Brożyny

„Analiza i rola SERPINY-E2 oraz wydzielniczego inhibitora proteiny leukocytarnej (SLPI) w patogenezie i progresji raka tarczycy”.

Promotor pracy: dr hab. n. med. Tomasz Stępień

Z Kliniki Chirurgii Endokrynologicznej, Ogólnej i Naczyniowej Wydziału Lekarskiego
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Zgodnie z uchwałą Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, powołującą mnie do wypełnienia obowiązków recenzenta w przewodzie doktorskim Pana Mateusza Brożyny, przedkładam recenzję rozprawy doktorskiej przygotowanej pod kierownictwem naukowym Pana dr hab. n. med. Tomasza Stępnia. Równocześnie stwierdzam co następuje:

1. Rozprawa doktorska lekarza med. Mateusza Brożyny pt. „Analiza i rola SERPINY-E2 oraz wydzielniczego inhibitora proteiny leukocytarnej (SLPI) w patogenezie i progresji raka tarczycy” stanowi oryginalne rozwiązanie przez Doktoranta zagadnienia naukowego;
2. W przedstawionej do oceny rozprawie lekarza Mateusz Brożyna wykazała dobrą wiedzę z zakresu biologii medycznej
3. Oceniana dysertacja potwierdza umiejętności Doktoranta do prowadzenia pracy naukowo-badawczej
4. Przedstawiona przez Doktoranta dysertacja odpowiada kryteriom wynikającym z ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym.

Uzasadnienie mojej oceny przedstawiają poniższe uwagi i spostrzeżenia merytoryczne dotyczące tej dysertacji.

Najczęstszymi nowotworami złośliwymi pochodzenia endokrynnego są raki tarczycy, głównie zróżnicowane, które stanowią ponad 90% wykrytych przypadków. Zgodnie ze statystycznymi danymi z 2019 r. dotyczącymi nowotworów, częstość wykrywania raków tarczycy istotnie wzrosła, co jest w dużej mierze konsekwencją coraz doskonalszych metod detekcji. Nowotwory złośliwe tarczycy mogą stanowić poważny problem medyczny ze względu na swoją heterogenność biologiczną, złożoną patogenezę i przebieg kliniczny. Mimo postępu w diagnostyce molekularnej i obrazowej histopatologicznej wciąż poszukuje się nowym markerów nowotworzenia, które wspomagałyby rutynową diagnostykę raków tarczyc. Szczególnie ważne jest poszukiwanie markerów pozwalających na wczesne wykrywanie i różnicowanie zmian łagodnych od nowotworowych w gruczole tarczowym.

W ostatnich latach w obszarze zainteresowań onkologii jest białko SLPI - wydzielniczy inhibitor proteaz serynowych leukocytów (antyleukoproteinaza) charakteryzujący się działaniem plejotropowym w wielu tkankach i narządach. Najistotniejszą funkcją SLPI jest hamowanie działania przeciwdrobnoustrojowego, kontrola stanu zapalnego, działania przeciwproteazowego i immunomodulacyjnego. Badania sugerują na jego udział nie tylko w rozwoju nowotworów, ale także w procesie przerzutowania. Drugim białkiem jest Serpina-E2/PN-1, należąca do bardzo licznej rodziny inhibitorów proteaz, którą również charakteryzuje szerokie działanie plejotropowe, w tym sugerowana aktywność w procesie nowotworzenia. Ponadto, oba białka mają silne działanie antykoagulacyjne, i jak wykazały liczne badania, są zaangażowane w angiogenezę nowotworową z wyraźną mimikrą naczyńiową.

Rola tych białek w procesach nowotworowych nie była całościowo badana w rakach tarczycy (od raków zróżnicowanych, poprzez raki niskozróżnicowane, anaplastyczne i raki rdzeniaste). Z tego względu uważam temat podjęty przez doktoranta za interesujący i ważny z punktu widzenia klinicznego i otwierający szersze spojrzenie na proces rozwijania się raka tarczycy.

Oceniana przeze mnie rozprawa doktorska lekarza Mateusza Brożyny posiada typowy układ klasycznej dysertacji. Praca liczy 116 stron i składa się z 9 rozdziałów, zawiera 3 tabele, 27 rycin, spis skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz odwołuje się do 186

pozycji piśmiennictwa, głównie angielskojęzycznego, dotyczącego omawianego zagadnienia i uporządkowanego w kolejności cytowani.

Dobór piśmiennictwa jest trafny zawiera wystarczającą liczbę pozycji pozwalającą na omówienie tematu rozprawy.

Wstęp jest bardzo rozbudowany i stanowi ponad 40% objętości całej pracy. Wprowadza czytelnika w problemy związane z jej tematem. Zawiera szerokie opracowanie dotyczące anatomii i fizjologii gruczołu tarczowego, epidemiologii raka tarczycy, w którym wskazuje na istotny wzrost zachorowalności na zróżnicowanego raka tarczycy w ostatnich latach. Następnie doktorant przedstawia aktualnie stosowaną klasyfikację histopatologiczną raków tarczycy i kolejno omawia cztery główne nowotwory tarczycy: brodawkowaty, pęcherzykowy, anaplastyczny i rdzeniasty. W kolejnych podrozdziałach Autor omawia markery immunohistochemiczne i molekularne aktualnie stosowane w diagnostyce raka tarczycy i potrzebę szukania dodatkowych markerów diagnostycznych. W kolejnych podrozdziałach przedstawia, w sposób wnikliwy dwa białka SLPI i Serpiny, w szczególności Serpinę-E2/PN-1 oraz ich funkcje plejotropowe. W ostatnim podrozdziale Autor omówił proces inwazję nowotworów i udział w tym procesie angiogenezy, wskazując na istotną rolę SLPI i Serpiny-E2/PN-1 w tych procesach. Prezentowane w tej części omówienie oparte jest o współczesną bibliografię. Każdy z przedstawionych przez doktoranta podrozdziałów zawiera ryciny i tabele znacznie wzbogacające tekst. Rozważania powyższe stanowią pełne podsumowanie aktualnej wiedzy dotyczącej celu badania.

Rozdział świadczy o dobrej znajomości problemów związanych z przedstawionym zagadnieniem oraz o dobrej znajomości literatury związanej z tematem pracy. Wstęp jest opracowany poprawnie i nie mam znaczących uwag co do merytorycznej zawartości przedstawionych podrozdziałów.

Doktorant konsekwentnie w swoich rozważaniach zamierza do przedstawienia **celu pracy**, którym było określenie potencjalnej roli SLPI i Serpiny-E2 w patogenezie raka tarczycy, a także czy określony poziom obu białek w surowicy pacjentów z rozpoznaniem rakiem tarczycy może być rozpatrywany jako dodatkowy, do powszechnie stosowanych, czynnik diagnostyczny różnicujący pomiędzy guzami łagodnymi i złośliwymi. Cel pracy został jasno sformułowany i ma za zadanie określić przydatność kliniczną oznaczania SLPI i Serpiny-E2 jako potencjalnych markerów nowotworowych raków tarczyc, co odpowiada szeroko

obserwowanym trendom poszukiwania metod wspomagających rutynową diagnostykę i mający istotne znaczenie nie tylko z punktu widzenia naukowego, ale również praktycznego.

Kolejny rozdział — **materiał i metody** stosowane w pracy są dobrze i szczegółowo opisane. Badania przeprowadzono w grupie 86 pacjentów leczonych chirurgicznie w Klinice Chirurgii Endokrynologicznej WSS im M. Kopernika w latach 2015-2019. Choroba była rozpoznawana pomiędzy 18 a 83 rokiem życia, średnia wieku 55.5 lat; kobiety stanowiły 59.7% badanej grupy. Grupę kontrolną o zbliżonych parametrach (wiek i liczba kobiet) stanowili zdrowi ochotnicy. Materiałem do badania były próbki krwi pacjentów i grupy kontrolnej (wolontariusze). Poziom białka SLPI i Serpiny-E2 oznaczano metodą ELISA, a w analizie statystycznej uzyskanych wyników wykorzystano typowe oprogramowanie i standardowe testy statystyczne dla tego typu badań.

Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komitetu Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

W kolejnej części pracy autor na 20 stronach przedstawia **zawarte w tabelach i na wykresach** uzyskane **wyniki badań** i ich analizę statystyczną. Autor analizował stężenie obu badanych białek względem wieku pacjentów, średnie wartości w grupie kontrolnej, wolu guzowatym i rakach tarczycy, korelacje ekspresji SLPI i Serpiny-E2 w grupach pacjentów z rakami tarczycy dokumentując je czytelnie i starannie wykonanymi rycinami. Analiza statystyczna poziomu obu badanych białek została przeprowadzona dla każdego typu raka tarczycy, wszystkich raków tarczycy i pacjentów z rozpoznany wolem guzowatym. Wyniki przedstawiające poziom SLPI i Serpiny-E2 były korelowane z wybranymi parametrami takimi jak wiek pacjentów, typ raka tarczycy, czy zależność pomiędzy stężeniem obu białek w badanych grupach pacjentów. Wyniki wykazały jednoznacznie, że w surowicy pacjentów z rakami tarczycy obserwuje się znamienne zwiększony poziom obu badanych białek w porównaniu do grupy kontrolnej czy grupy pacjentów z wolem guzowatym obojętnym. Poziom obu badanych białek, jak wykazała analiza, charakteryzowały bardzo silne korelacje. Prezentowane przez doktoranta wyniki odpowiadają założonym celom.

Wyciągnięte wnioski są prawidłowe, znajdują pełne uzasadnienie w wynikach pracy i wskazują, że oznaczanie poziomu Serpiny-E2 i SLPI w surowicy pacjentów z guzami tarczycy może być dodatkowym czynnikiem różnicującym łagodne i złośliwe guzy tarczycy.

Obszerna dyskusja stanowi istotną część pracy dowodzącą o dojrzałości naukowej doktoranta. Autor bardzo systematycznie i bardzo szczegółowo omawia wyniki badań wielu

autorów, głównie zagranicznych, badających funkcje biologiczne SLPI i Serpiny-E2 w powszechnie występujących nowotworach u ludzi. Doktorant bardzo szczegółowo omawia wiele badań wykonanych na nowotworach ludzkich takich jak np. rak płuc, jajnika, żołądka, jelita grubego i innych, w których jednoznacznie wykazano znacznie podwyższoną, lub obniżoną ekspresję białka SLPI i jego udział w procesie nowotworzenia i inwazji, lub jej obniżeniu, w zależności od badanego raka. Podobnie bardzo szczegółowo Doktorant opisuje ekspresję i udział Serpiny-E2 w metabolizmie czerniaka, w rakach przewodu pokarmowego, czy glejakach i innych, które również sugerują, iż Serpina E-2 odgrywa istotną rolę w biologii tych nowotworów, który w sposób swoisty dla danego raka może działać jako czynnik zwiększający lub obniżający onkogenęz i rozsiew nowotworu. Opisane działanie SLPI i Serpiny-E2 wskazują lub sugerują na ich ważną rolę zarówno w kancerogenezie, jak i inwazji nowotworów, ale również w aktywności hamującej powyższe procesy, co wskazuje, iż mechanizm działania obu białek jest złożony i zależny od wielu czynników. W tym kontekście autor przedstawia swoje wyniki, które są zbieżne z danymi cytowanych publikacji, w kontekście ekspresji obu proteaz w tkankach prawidłowych i nowotworach, statystycznie istotnego wzrostu badanych proteaz u chorych z rakami tarczycy, co sugeruje kontynuację badań na większych grupach chorych i połączenie ich z badaniami molekularnymi.

Nie mam zbyt wielu uwag ani do części merytorycznej, czy do sposobu opracowania rozprawy doktorskiej. W tym miejscu z obowiązku recenzenta przedstawiam uwagi dotyczące drobnych uchybień edytorskich oraz własne zapytania i sugestie:

1. Proszę o wyjaśnienie, dlaczego włączył Pan do badania i analizy statystycznej raki rdzeniaste, które rozwijają się z komórek C (pochodzą z grzebienia nerwowego).
2. Drobne uchybienia edytorskie:

Str.26 „Metody leczenia powinno być FTC jest PTC

Str.51 „11 pacjentów z rakiem pęcherzykowym NTC zamiast FTC i dalej

Str. 53, 58 i 59 w opisach rycin, Tabeli 3, str.89 zamiast FTC jest NTC

Str.52 Wszystkie pomiary wykonano w dwóch egzemplarzach i uśredniono”

3. W opisie wyników używa Pan określenia grupa pacjentów z wolem guzowatym obojętnym (WGO) i grupa kontrolna. Na stronie 71 Ryc. 27 używa Pan sformułowania „w grupie pacjentów bez zdiagnozowanego raka tarczycy”. Rozumiem, że są to wyniki obu grup – kontrolnej i pacjentów z WGO

4. Grupy pacjentów są niezbyt liczne, szczególnie pacjentów z MTC, ale FTC i ATC są również dosyć skromne. Czy wyniki uzyskane ze znacznie większych liczebnie grup mogłyby być różne od uzyskanych przez Pana? Szczególnie że oznaczenia były wykonywane tylko w dwóch powtórzeniach. Sugeruje podobną analizę na liczniejszych grupach nowotworów tarczycy.
5. Uzyskane przez Doktoranta wyniki sugerują, podjęcie badań, które pozwolą na poznanie mechanizmów molekularnych, w tym ścieżek sygnalizacyjnych związanych z procesami komórkowymi, których wynikiem jest znaczny, i znamieny wzrost poziomu obu badanych białek w raku tarczycy.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych lekarza Mateusza Brożyny p.t. „*Analiza i rola SERPINY-E2 oraz wydzielniczego inhibitora proteiny leukocytarnej (SLPI) w patogenezie i progresji raka tarczycy*” stanowi samodzielny naukowy dorobek doktoranta i spełnia ustawowe (art.13 ustawy z dn. 14 marca 2013 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki- Dz.U. z 2003 r.nr. 65, poz.595; z późn. zm. Zwanej dalej Ustawą) i zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Tym samym wnoszę wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lekarza Mateusza Brożyny do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

