

prof. dr hab. n. med. Adam Maciejczyk
Kierownik Kliniki Radioterapii Katedry Onkologii
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich
we Wrocławiu

**Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza Justyny Wilczyńskiej zatytułowanej:
„Wybrane markery hipoksji w raku gruczołu krokowego” na zlecenie: Rady Nauk
Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.**

promotor pracy: prof. dr hab. n. med. Jacek Fijuth

Wartość prognostyczna hipoksji i jej wpływ na efektywność leczenia onkologicznego od wielu lat jest obiektem badań naukowych. W przedstawionej pracy bardzo interesującym aspektem oceny roli hipoksji w grupie chorych na raka gruczołu krokowego jest rozważenie możliwości zastosowania jej endogennych markerów jako negatywnych lub pozytywnych czynników prognostycznych. W raku gruczołu krokowego, pomimo dużej liczby potencjalnych klinicznych czynników prognostycznych i markerów choroby, nadal nie jest oczywiste, którzy pacjenci mogą zyskać na bardziej agresywnym podejściu terapeutycznym. Selekcja chorych należących do grupy wysokiego ryzyka, wymagających zindywidualizowanego wykorzystania uznanych metod postępowania terapeutycznego (leczenie chirurgiczne, radioterapia, hormonoterapia, leczenie skojarzone), jest niezwykle istotna. Poszukiwane są zatem wciąż nowe substancje i cząsteczki, które mogłyby samodzielnie służyć do oceny rokowania lub stanowić uzupełnienie poznanych już markerów choroby. Poznanie roli markerów hipoksji w kancerogenezie raka gruczołu krokowego może stanowić istotny wkład w wyjaśnienie mechanizmów progresji tego nowotworu i dać podstawę do rozwoju i zastosowania w przyszłości nowych metod terapeutycznych.

1. Charakterystyka i ocena formalna rozprawy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani Justyny Wilczyńskiej posiada układ typowy dla rozpraw doktorskich. Na początku manuskryptu przedstawiony jest spis treści, następnie właściwa treść rozprawy doktorskiej, która została podzielona na siedem rozdziałów (wstęp, cele pracy, hipotezy badawcze, materiał i metody, wyniki, dyskusja oraz wnioski). Na końcu pracy znajduje się piśmiennictwo, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis tabel i rycin oraz wykaz skrótów. Rozprawa obejmuje łącznie 126 stron wydruku, 33 tabel i 40 rycin umieszczonych chronologicznie w tekście. Bibliografia obejmuje łącznie 154 pozycji. Język recenzowanej rozprawy jest poprawny, używane pojęcia są merytoryczne i precyzyjne w ramach omawianej tematyki.

2. Charakterystyka i ocena merytoryczna rozprawy.

Tematyka rozprawy dotyczy oceny ekspresji wybranych endogennych markerów hipoksji, podjednostki α białka HIF-1 i VEGF u pacjentów z rakiem gruczołu krokowego. Poziom ekspresji powyższych białek został dodatkowo oceniony w zakresie korelacji z stwierdzonym u pacjenta stopniem zaawansowania klinicznego choroby, wyjściowy poziom PSA, stopień złośliwości histologicznej nowotworu oraz całkowity czas przeżycia pacjenta.

2.1. Trafność wyboru tematu i aktualność podjętej w dysertacji tematyki badawczej.

Doktorantka wprowadzając w tematykę dysertacji we *Wstępie* wyróżniła 5 podrozdziałów liczących łącznie 34 stron. W podrozdziale 1.1 *Wstępu* Doktorantka omówiła epidemiologię, etiologię, diagnostykę i leczenie raka gruczołu krokowego. Kolejne podrozdziały *Wstępu* poświęcone są opisowi przyczyn i rodzajów hipoksji. Doktorantka szeroko opisuje rolę hipoksji w procesie rozwoju choroby nowotworowej, ze szczególnym uwzględnieniem nowotworów urologicznych oraz przedstawia metody oceny jej wartości w komórkach nowotworu. Na szczególną uwagę zasługują podrozdziały opisujące mechanizmy promieniooporności komórek hipoksycznych oraz roli hipoksji w procesie angiogenezy nowotworów.

Ocena treści wprowadzenia do problematyki dysertacji wykazuje pełne przygotowanie teoretyczne Doktorantki do podejmowania procedur badawczych w zakresie diagnostyki i leczenia raka gruczołu krokowego

2.2 Sformułowany cel pracy.

Celem pracy było zbadanie ekspresji markerów hipoksji, podjednostki α białka HIF-1 i VEGF, za pomocą badań immunohistochemicznych w materiale histopatologicznym z blozków parafinowych

pochodzącym od pacjentów, którzy byli diagnozowani i leczeni z powodu raka gruczołu krokowego. W kontekście poziomów ekspresji powyższych białek ocenie został poddany ich wpływ na zaawansowanie kliniczne oraz inne znane czynniki prognostyczne tego nowotworu.

Sformułowane cele są poprawne pod względem formalnym oraz merytorycznym i odpowiadają tytułowi pracy.

2.3 Zastosowane metody i materiał badawczy.

W tkankach raka gruczołu krokowego pobranych od 83 pacjentów wykonano odczyn immunohistochemiczne na obecność badanych markerów hipoksji: HIF-1 α i VEGF. Do badania wyselekcjonowano grupę pacjentów w różnych stadiach zaawansowania nowotworu leczonych za pomocą prostatektomii lub radioterapii. Badania wykonane zostały w Zakładzie Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Analiza poziomu ekspresji HIF-1 α oraz VEGF w tkance raka gruczołu krokowego została przeprowadzona przy zastosowaniu półilościowej metody oceny barwień immunohistochemicznych. Analiza statystyczna przeprowadzona została przy użyciu programu Statistica. Rozdział *Materiał i metody* jest opisany merytorycznie i wyczerpująco w swoich treściach w odniesieniu do badanego problemu, grupy badanej i zastosowanych metod w pracy.

Przedstawiona wyżej charakterystyka dysertacji odnosząca się do *Celu pracy* oraz *Materiału i metod* świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu lek. Justyny Wilczyńskiej do prowadzenia działalności naukowo-badawczej w zakresie nauk medycznych. Należy podkreślić, że Doktorantka aktywnie uczestniczyła we wszystkich etapach pozyskiwania i przygotowywania materiału do badań, w tym w wykonywaniu i ocenie odczynów immunohistochemicznych.

2.4 Wyniki.

W przeprowadzonej analizie Doktorantka uzyskała wyniki, które potwierdziły korelację ekspresji HIF-1 α z wartościami indeksu Gleason'a oraz stężeniami iPSA. Analiza ekspresji HIF-1 α wykazała, że w przypadku pacjentów w podgrupie z indeksem Gleason'a poniżej 7 i w podgrupach ISUP 1-3, ekspresja ocenianego markera jest niższa. Podobnie porównanie grup rokowniczych wg d'Amico pokazało, że ekspresja HIF-1 α jest niższa w podgrupie średniego ryzyka w porównaniu do podgrupy wysokiego ryzyka. Kolejną interesującą zależnością wykazaną podczas analizy statystycznej wyników własnych jest niższa ekspresja HIF-1 α w przypadku większych guzów, których objętość oceniono pośrednio poprzez przypisanie do cechy T1/T2 w porównaniu z T3/T4. W pracy nie wykazano natomiast istotnej zależności między ekspresją VEGF a wartością indeksu Gleason'a. Nie wykazało również zależności między

ekspresją HIF-1 α a ekspresją VEGF. Wynik analizy przeżycia 10-letniego wskazały jednak na istotną zależność i ujemną korelację między przeżyciem a ekspresją VEGF.

Układ rozdziału opisującego wyniki pracy jest czytelny. Duży zasób informacji dotyczących określonej tematyki badawczej, został przez Doktorantkę opracowany i przedstawiony w sposób przejrzysty. Całość rozdziału jest wzbogacona bardzo licznymi tabelami i rycinami.

2.5 Dyskusja.

W liczącej 16 stron Dyskusji, wykorzystując zebrane piśmiennictwo, Doktorantka porównała wyniki badania własnego z wynikami badań innych autorów. Odnosząc się do zaobserwowanych różnic w wynikach cytowanych prac lek. Wilczyńska zwraca uwagę, że na ostateczny wynik badania immunohistochemicznego i jego zmienność składa się wiele czynników. Prawidłowe przygotowanie próbek, w tym prawidłowe pobranie, utrwalenie i przetwarzanie tkanki jest kluczowe dla uzyskania wiarygodnych wyników immunohistochemicznych. Zastosowanie immunohistochemicznej oceny endogennych markerów hipoksji raka gruczołu krokowego może prowadzić do różnych błędów i wyzwań interpretacyjnych. Interpretacja wyników badań immunohistochemicznych może również być subiektywna i zależy od doświadczenia oraz umiejętności osoby oceniającej preparaty. To może prowadzić do różnic w interpretacji między różnymi badaczami. Pomimo starannej procedury i odpowiedniego doboru przeciwciał, metoda ta może prowadzić do fałszywie pozytywnych lub fałszywie negatywnych wyników, co może wynikać z różnych czynników, takich jak specyficzność przeciwciał, stopień wyrażenia badanego antygeny, czy też techniczne aspekty procedury. Na pokreślenie zasługuje fakt, że wszystkie etapy badania immunohistochemicznego przeprowadzonego na potrzeby analizy klinicznej i statystycznej rozprawy zostały wykonane samodzielnie przez Doktorantkę, pod nadzorem wykwalifikowanego zespołu Zakładu Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Ocena markerów hipoksji została jednak oceniona jedynie z użyciem metod immunohistochemicznych, wartościowym potwierdzeniem zmienionej ich ekspresji byłoby dodatkowo wykonanie badań z pomocą metod biologii molekularnej (np. RT-PCR).

Dodatkowym utrudnieniem w interpretacji wyników badania jest fakt, że guzy nowotworowe, w tym raki gruczołu krokowego, są często heterogeniczne pod względem hipoksji, co oznacza, że mogą występować w nich zarówno obszary dobrze utlenowane jak i niedotlenowane. IHC może dostarczyć informacji tylko na temat hipoksji w konkretnych obszarach tkankowych, a nie uwzględnia całego guza. W tym zakresie problemów metodycznych badania molekularne nie mają przewagi, ponieważ one również opierają się na ocenie wybranych wycinków z guza. Mając to na uwadze, oraz biorąc pod uwagę

heterogenność molekularną w obrębie guza, Doktorantka słusznie podkreśla, że zarówno IHC, jak i metody molekularne nie są doskonałe w ocenie markerów hipoksji.

W Dyskusji lek. Justyan Wilczyńska konsekwentnie udowadnia, że skomplikowana sieć zależności poszczególnych elementów biorących udział w patogenezie raka gruczołu krokowego nie została jeszcze dogłębnie zbadana. Celem pracy było określenie znaczenia ekspresji wybranych endogennych markerów hipoksji (HIF-1 α , VEGF) w tkance nowotworowej pobranej od pacjentów z rozpoznaniem raka gruczołu krokowego. Uzyskane wyniki mają jednak znaczenie poznawcze, stanowiąc źródło wiedzy na temat potencjalnych nowych markerów prognostycznych raka stercza. Przedstawione wyniki badania wskazują na istnienie powiązania pomiędzy stopniem ekspresji endogennych markerów hipoksji a czynnikami prognostycznymi raka stercza. Mogą w przyszłości stanowić inspirację do badań nad terapiami celowanymi skierowanymi przeciwko HIF-1 α i VEGF.

Wydaje się jednak, że konieczne są dalsze obserwacje wyjaśniające rolę prognostyczno-kliniczną markerów hipoksji w raku gruczołu krokowego. Dotychczasowe wyniki badań poświęconych powyższej tematyce w raku gruczołu krokowego nie są jednoznaczne i wymagają wciąż dalszej weryfikacji.

2.6 Wnioski.

Zaprezentowane informacje w rozdziale *Wyniki* oraz ich krytyczna weryfikacja dokonana w *Dyskusji*, z posiłkowaniem się bibliografią krajową i zagraniczną pozwoliły Doktorantce sprecyzować następujące wnioski:

1. Wyższy poziom ekspresji HIF-1 α może być związany z bardziej agresywnym fenotypem raka gruczołu krokowego.
2. Ekspresja HIF-1 α może być związana z zaawansowaniem guza i potencjalnie zwiększonym ryzykiem występowania przerzutów.
3. Wyższy poziom ekspresji HIF-1 α może być związany z większym ryzykiem progresji raka gruczołu krokowego.
4. Ekspresja VEGF może być niezależna od stopnia złośliwości raka gruczołu krokowego.
5. Mimo braku bezpośredniej zależności między ekspresją HIF-1 α a VEGF, istnieje możliwość, że te dwa markery hipoksji współdziałają w procesach nowotworzenia.
6. Istnieje potencjalna wartość prognostyczna ekspresji HIF-1 α w ocenie przeżycia pacjentów.

7. Ekspresja HIF-1 α może być użytecznym wskaźnikiem prognostycznym w ocenie agresywności i przebiegu raka gruczołu krokowego.
8. Pacjenci z wyższym poziomem ekspresji VEGF mogą mieć gorsze rokowania i krótsze przeżycie.

Wnioski są odzwierciedleniem uzyskanych wyników własnego badania i korespondują z celami oraz tytułem dysertacji. Należy jednak podkreślić, że wyniki przeprowadzonych badań wymagają szerszej weryfikacji, natomiast wnioski zawarte w pracy nie mogą być przyjęte w praktyce bez potwierdzenia w analizie na większej grupie pacjentów.

2.7 Wykorzystanie i znajomość literatury.

W dysertacji Doktorantka wykorzystał różnorodne źródła bibliograficzne dotyczące obszaru wiedzy nauk medycznych wymagające dużego nakładu pracy i zaangażowania przy opanowaniu i opracowania zagadnienia. Należy podkreślić właściwy dobór piśmiennictwa oraz jego umiejętne interpretowanie i przytaczanie. Piśmiennictwo liczy 154 pozycji.

1. Podsumowanie i wniosek końcowy.

Reasumując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska lekarza **Justyny Wilczyńskiej** zatytułowana: „Wybrane markery hipoksji w raku gruczołu krokowego” stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, dowodzi posiadania wiedzy teoretycznej w dyscyplinie nauki medyczne oraz umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, spełniając w pełni formalne i merytoryczne warunki stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust. 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) .

Z pełnym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lekarza **Justyny Wilczyńskiej** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Recenzent

prof. dr hab. n. med. Adam Maciejczyk

Wrocław, 24 sierpnia 2024 roku.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Katedra Onkologii
KLINIKA RADIOTERAPII
Kierownik
prof. dr hab. n. med. Adam Maciejczyk