

Prof. dr hab. n. med. Piotr Milecki
Recenzent pracy doktorskiej
Lekarza Justyna Wilczyńska

Poznań, 09.09.2024 r.

RECENZJA

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

Wybrane markery hipoksji w raku gruczołu krokowego

Lekarz:

Justyna Wilczyńska

Promotor: prof. dr hab. n. med. Jacek Fijuth
Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Wydział Lekarski

1. Wprowadzenie i uzasadnienie badań

Doktorantka w swojej pracy doktorskiej zajęła się bardzo ciekawym tematem badawczym w którym łączy analizę naukową z codzienną praktyką kliniczną. Mianowicie autorka wzięła na warsztat naukowy analizę roli hipoksji u chorych na raka gruczołu krokowego i dalej dokonała potencjalnego wpływu stanu hipoksji na przeżycia chorych. Hipoksja jest szczególnie ważnym problemem w onkologii z dwóch względów. Po pierwsze, praktycznie już we wczesnym stadium choroby mamy do czynienia z jej obecnością w guzie nowotworowym, czyli jest stanem powszechnie występującym w nowotworach. Natomiast drugim powodem, dla którego tematyka hipoksji w raku gruczołu krokowego jest bardzo istotna wynika z tego, że jest to drugi najczęstszy na świecie diagnozowany nowotwór u mężczyzn stanowiąc około 20% zachorowań. Przeżycie 5-letnie chorych z rakiem gruczołu krokowego obecnie przekracza istotnie 90%, niemniej biorąc pod uwagę bardzo dużą zachorowalność liczba chorych wymagających leczenia oraz niestety zgonów jest nadal bardzo duża. Według danych GLOBOCAN w 2022 r. na świecie u 1,466,680 mężczyzn zdiagnozowano raka gruczołu krokowego, co skutkowało około 396 792 zgonami przy wyższej częstości występowania w krajach rozwiniętych. Polska niestety wpisuje się w ten obraz i według danych Krajowego Rejestru Nowotworów w Polsce, rak gruczołu krokowego jest pierwszym co do częstości występowania nowotworem u mężczyzn.

Patogeneza raka prostaty obejmuje szereg zmian molekularnych i komórkowych, które prowadzą do niekontrolowanego wzrostu i podziału komórek wewnątrz gruczołu krokowego. Większość przypadków raka stercza ma charakter sporadyczny i wynika z interakcji czynników genetycznych i środowiskowych. Autorka w swojej pracy dokonała analizy kluczowych czynników hipoksji jakimi są **czynnik indukowany przez hipoksję 1 (HIF-1)** i **czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF)**. Poszukiwanie nowych czynników prognostycznych oraz predykcyjnych, a zwłaszcza w sytuacji kiedy mogą się stać potencjalnymi celami w terapii przeciwnowotworowej jest wysoce pożądane i przedstawiona do oceny praca doktorska wpisuje się w ten bardzo potrzebny klinicystom kierunek badań.

1. Materiał źródłowy do przygotowania recenzji i jego strona formalna

Materiałem źródłowym do opracowania niniejszej recenzji jest opracowany maszynopis dysertacji doktorskiej pt. „Wybrane markery hipoksji w raku gruczołu krokowego”. Praca została napisana w strukturze 11 numerowanych rozdziałów ułożonych w sposób typowy dla

rozprawy doktorskiej na 124 stronach. Praca doktorska zawiera 33 tabel i 40 rycin. Poziom graficzny zarówno tabel jak i rycin jest na wysokim poziomie i w związku z tym pozwala na przystępne zapoznanie się z ich zawartością jak i przekazywaną treścią.

Układ poszczególnych rozdziałów w pracy jest logiczny i odpowiada klasycznej strukturze pracy doktorskiej.

2. Wstęp pracy

Przedmiot pracy ujęto w obszernym wprowadzeniu, które poświęcone zostało podstawowym danym dotyczącym epidemiologii, etiopatogenezie, objawom klinicznym i diagnostyce oraz metodom leczenia z uwzględnieniem przede leczenia operacyjnego i radioterapii.

W tej części pracy istotnym było omówienie zmian molekularnych i komórkowych, które prowadzą do niekontrolowanego wzrostu i podziału komórek wewnątrz gruczołu krokowego oraz oczywiście hipoksji w tkance nowotworowej. W literaturze naukowej istnieją doniesienia sugerujące istnienie związku między ekspresją endogennych markerów hipoksji a rokowaniem, przeżyciem pacjentów, zaawansowaniem procesu nowotworowego i innymi danymi kliniczno-patologicznymi. W niniejszej pracy została podjęta próba weryfikacji powyższych danych w odniesieniu do HIF-1 α i VEGF w raku gruczołu krokowego. Jest to o tyle istotne, że pomimo dużej liczby potencjalnych czynników prognostycznych i markerów choroby nadal nie jest oczywiste, którzy pacjenci mogą zyskać na bardziej agresywnym podejściu terapeutycznym. Klasyfikacja chorych do grupy bardzo i wysokiego ryzyka progresji choroby, wymagających zindywidualizowanego wykorzystania najbardziej efektywnych metod postępowania (leczenie chirurgiczne, radioterapia, hormonoterapia, leczenie skojarzone), jest niezwykle istotna. Poszukiwane są zatem wciąż nowe substancje i cząsteczki, które mogłyby samodzielnie posłużyć do oceny rokowania lub stanowić uzupełnienie poznanych już markerów choroby. Poznanie roli markerów hipoksji w karcynogenezie raka gruczołu krokowego może stanowić istotny wkład w wyjaśnienie mechanizmów progresji w tym nowotworze i dać podstawę do rozwoju i zastosowania w przyszłości nowych metod terapeutycznych. Wobec powyższego, w pracy doktorskiej postanowiono określić znaczenie kliniczne i prognostyczne ekspresji HIF-1 α i VEGF w przypadku raka gruczołu krokowego.

W mojej ocenie wspomniane zagadnienia zostały przedstawione w sposób logiczny i

konsekwentnie wprowadzają we właściwe zagadnienia pracy doktorskiej. W sposób wyczerpujący zostały przedstawione punkty dotyczące najistotniejszych aspektów wspomnianych zagadnień.

3. Cele pracy

Przedmiotem pracy jest ocena ekspresji wybranych endogennych markerów hipoksji, tj. podjednostki α białka HIF i VEGF za pomocą badań immunohistochemicznych w materiale histopatologicznym z bloczków parafinowych pochodzącym od pacjentów, którzy byli diagnozowani i leczeni z powodu raka gruczołu krokowego. W kontekście poziomów ekspresji powyższych białek ocenie zostały poddane: całkowity czas przeżycia, zaawansowanie kliniczne raka gruczołu krokowego (w oparciu o klasyfikację TNM z 2018r.), wyjściowe PSA, stopień złośliwości histologicznej (indeks Gleason'a i ISUP *grading group*).

Cele pracy zostały przez doktorantkę zaprezentowane w czterech poniżej wymienionych głównych punktach:

1. Zbadanie ekspresji HIF-1 α w tkance nowotworowej pobranej od chorych na raka gruczołu krokowego.
2. Zbadanie ekspresji VEGF w tkance nowotworowej pobranej od chorych na raka gruczołu krokowego.
3. Zbadanie związku ekspresji HIF-1 α z głównymi czynnikami kliniczno-patologicznymi chorych na raka gruczołu krokowego.
4. Zbadanie związku ekspresji VEGF z głównymi czynnikami kliniczno-patologicznymi chorych na raka gruczołu krokowego.

4. Materiał i metody badań

Przedmiotem retrospektywnej analizy przeprowadzonej przez doktorantkę było 83 bloczków parafinowych gruczolakoraków stercza pochodzących od pacjentów pozyskanych po pierwotnej prostatektomii oraz biopsji gruczołu krokowego. Badania wykonane zostały w

Zakładzie Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, a podkreślenia wymaga fakt, że autorka niniejszej rozprawy doktorskiej aktywnie uczestniczyła we wszystkich etapach pozyskiwania i przygotowywania materiału do badań, w tym w wykonywaniu i ocenie odczynów immunohistochemicznych. W pierwszym etapie, na podstawie oceny preparatów wybarwionych hematoksyliną-eozyną (H-E), autorka dokonała weryfikacji histopatologicznej przypadków i wyboru reprezentatywnych wycinków z guzów. Do badań zostały wykorzystane tkanki zatopione w blokach parafinowych, pobrane w trakcie biopsji gruczołu krokowego lub prostatektomii, na podstawie oceny których postawiono rozpoznanie choroby. W tkankach raka gruczołu krokowego wykonano odczyny immunohistochemiczne (IHC) ekspresji badanych markerów hipoksji: HIF-1 α i VEGF. Kontrolę pozytywną w badaniu, zgodnie z zaleceniami producenta przeciwciał, stanowiły wycinki z nienowotworowej tkanki raka piersi i raka jajnika (dla HIF-1 α) oraz tkanka ludzkiej nerki (dla VEGF). Analiza poziomu białek wybranych markerów hipoksji, HIF-1 α oraz VEGF, w tkance raka gruczołu krokowego została przeprowadzona przy zastosowaniu półilościowej metody oceny barwień immunohistochemicznych. Ocenę preparatów przeprowadzono pod ścisłą kontrolą dwóch lekarzy specjalistów z dziedziny patomorfologii. Na tej podstawie wyróżniono trzy poziomy ekspresji HIF-1 α oraz VEGF w tkance nowotworowej: Ekspresja słaba – przypadki guzów, które wykazywały słaby odczyn immunohistochemiczny (+), gdzie poniżej 50% komórek nowotworowych wykazywało dodatni odczyn immunohistochemiczny. Ekspresja silna – przypadki guzów, które wykazywały silny odczyn immunohistochemiczny (++), gdzie ponad 50% komórek nowotworowych wykazywało dodatni odczyn immunohistochemiczny. Brak ekspresji – przypadki, w których nie stwierdzono reakcji barwnej immunohistochemicznej.

Analiza statystyczna przeprowadzona została przy użyciu programu Statistica. W celu sprawdzenia występowania istotności statystycznej pomiędzy analizowanymi grupami wykorzystano testy Manna-Whitneya i Kruskala-Wallis.

Panel badawczy, w tym zaproponowane metody statystyczne są dobrane dobrze i pozwalają w pełni zrealizować cele jakie założono w pracy.

Pytania:

- a. Jakie czynniki – parametry decydowały o wyborze określonego miejsca do wyboru tkanek do analizy hipoksji?

- b. Brak informacji w tej części pracy dotyczący metodologii analizy przeżyć analizowanych chorych: mianowicie jak wyglądały obserwacje chorych, wykonywane badania diagnostyczne – ponieważ poza badanymi blozkami były także poddane analizie i korelacji danych klinicznych.

5. Wyniki badań

Wykazano dodatnią korelację między ekspresją HIF-1 α a głównymi czynnikami kliniczno- patologicznymi raka gruczołu krokowego. Analiza przeżycia 10-letniego wykazała istotne zależności związane z poziomem ekspresji VEGF.

6. Wnioski

Doktorantka na podstawie dokonanej analizy własnych wyników leczenia wysunęła następujące wnioski:

- Wyniki badania potwierdzają istnienie dodatniej korelacji pomiędzy poziomem ekspresji HIF-1 α a wartością indeksu Gleason'a oraz grupami stopni złośliwości według ISUP.
- Analiza statystyczna potwierdziła istotnie podwyższoną ekspresję HIF-1 α w przypadku guzów T3 i T4 według klasyfikacji TNM.
- Badanie wykazało dodatnią korelację między ekspresją HIF-1 α a poziomem wyjściowego PSA (iPSA).
- Analiza statystyczna nie wykazała istotnej zależności między ekspresją VEGF a wartością indeksu Gleason'a.
- Badanie nie wykazało istotnej statystycznie zależności między ekspresją HIF-1 α a ekspresją VEGF.
- Stwierdzono dodatnią korelację między ekspresją HIF-1 α a ważnymi czynnikami prognostycznymi, w tym wartością indeksu Gleason'a, grupami stopni złośliwości wg. ISUP i poziomem PSA.
- Wynik analizy przeżycia 10-letniego wskazuje na istotną zależność i ujemną korelację między przeżyciem a ekspresją VEGF.

Przedstawione wyniki i ich analiza przedstawiono we wnioskach są istotnym wkładem w pracę nad poszukiwaniem nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w raku gruczołu krokowego.

7. Dyskusja

Doktorantka w obszernej dyskusji porównała oraz odniosła wyniki własnych badań do głębokiej analizy piśmiennictwa przedmiotu. Poziom dyskusji wskazuje na bardzo dobrą znajomość tematyki pracy przez doktorantkę. Na podkreślenie w szczególności zasługuje wnikliwe odniesienie własnych wyników do zaprezentowanych w piśmiennictwie światowym.

8. Piśmiennictwo

W zbiorze 154 publikacji ujętych w rozdziale znajduje się aktualne piśmiennictwo przedmiotu pracy doktorskiej. Uważam, że dobór publikacji jest właściwy i został dobrze wykorzystany w pracy.

9. Konkluzja końcowa recenzenta

Rozprawa doktorska lekarza Justyny Wilczynskiej pt. „Wybrane markery hipoksji w raku gruczołu krokowego” jest bardzo interesującym opracowaniem naukowym traktującym o roli **czynnika indukowanego przez hipoksję 1 (HIF-1)** i **czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF)** w raku gruczołu krokowego. Praca jest cennym uzupełnieniem dotychczasowej wiedzy w tym zakresie dokonanej na gruncie populacji polskiej.

Rozprawa spełnia tym samym kryteria jakości określone w ustawie o tytułach i stopniach naukowych.

**W związku z powyższym z pełnym przekonaniem wnioskuję do
Rady Naukowej – Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi
o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego na
stopień doktora nauk medycznych.**

6471031 Prof. UM, dr hab. n.med. Piotr Milecki
specjalista radioterapii onkologicznej
specjalista medycyny paliatywnej
tel. 607-635-400

Poznań 09.09.2024 r.

