Dr hab. n med. Jolanta Zalejska-Fiolka
Katedra i Zakład Biochemii
Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Lekarsko-Dentystycznym
w Zabrzu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

Zabrze, 2017.07.01

OCENA

Rozprawy doktorskiej lek. Tomasza Guszcza pt.: Ocena wartości diagnostycznej katepsyny B i D w osoczu krwi i moczu chorych na raka przejściowokomórkowego pęcherza moczowego.

Zasadniczym przedmiotem badań Autora jest poznanie roli proteinaz, w szczególności katepsyn B i D, w rozwoju nowotworów pęcherza moczowego. Zdaniem Autora, może się to przyczynić do poprawy terapii przeciwnowotworowej oraz umożliwić w przyszłości wybór optymalnej metody leczenia, w tym odpowiedniej operacyjnej.

W mojej ocenie temat dysertacji doktorskiej jest aktualny, ponieważ rak pęcherza moczowego pozostaje ciągle centralnym problemem onkologii urologicznej. Według polskich danych epidemiologicznych w 2000 roku wykryto ponad 4500 nowych zachorowań na nowotwory pęcherza moczowego, z czego blisko 55 % chorych zmarło. Przyjmuje się, że w Polsce rak pęcherza moczowego pod względem zapadalności pośród wszystkich nowotworów złośliwych zajmuje 3 miejsce wśród mężczyzn i 15 wśród kobiet. Bezpośredni wpływ na niezadowalające wyniki leczenia ma zbyt późne rozpoznanie choroby, spowodowane nierzadko upływem nadmiernie długiego czasu od wystąpienia objawów do momentu zidentyfikowania guza. Jest to także powodem wysokiej śmiertelności wśród pacjentów. W tej sytuacji poszukiwanie nowych metod wczesnego rozpoznania tej choroby jest wysoce istotne, a wykazanie dodatniej korelacji pomiędzy aktywnością określonych parametrów biochemicznych, jak np. katepsyn B lub/i D we krwi lub moczu chorych a stopniem zaawansowania nowotworu mogłoby stanowić istotny parametr diagnostyczny w ręku lekarza.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska obejmuje 106 stron tekstu podzielonego prawidłowo na rozdziały: wstęp, założenia i cel pracy, materiały, odczynniki i metody oraz wyniki, ich omówienie i dyskusję, wnioski, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz piśmiennictwo. Autor zamieścił także na początku pracy alfabetyczny wykaz skrótów używanych w tekście rozprawy, niestety nie wszystkich. Brakuje np. oznaczeń z rycin (rozdział Wyniki) tj. LG i HG. Autor nie umieścił w pracy spisu rycin i tabel, co ułatwiłoby analizę przedstawionej mi pracy. W mojej ocenie, rozdział „Odczynniki" nie powinien stanowić odrębnego rozdziału a jedynie podrozdział w rozdziale „Materiały".

W dysertacji, Autor powołuje się na 140 pozycji piśmiennictwa, z czego jedynie 13,5 % stanowią pozycje z ostatnich 5 lat.

Na badania Autor uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Rozprawa została napisana poprawnie pod względem formalnym, językowym, stylistycznym i interpunkcyjnym. Nie jest jednak wolna od błędów edytorskich tj. pusta kartka w piśmiennictwie, różnice w formatowaniu poszczególnych pozycji piśmiennictwa. Autor nie ponumerował także pozycji piśmiennictwa i w pracy nie posługiwał się numerami a nazwiskiem autora publikacji i rokiem opublikowania pracy. Na stronie Uniwersytetu nie doszukałam się wzoru pisania dysertacji i mam nadzieję, że ten wybrany przez Autora spełnia wymagania edytorkskie.

Praca została prawidłowo zaplanowana. Autor przybliża zagadnienia fizjologii i patofizjologii pęcherza moczowego oraz diagnostyki raka pęcherza moczowego. Podaje także schematy leczenia nowotworów. W kolejnych rozdziałach Autor podaje wiadomości dotyczące przedmiotu swoich badań, mianowicie katepsyn. Wstęp stanowi dobrą podwalinę dalszej części rozprawy doktorskiej.

Założenia i cel pracy zostały sformułowane poprawnie. Autor w bardzo zwięzły sposób uzasadnia wybór oznaczanych parametrów. Za nadrzędny cel Autor przyjął oznaczenie stężeń katepsyn B i D w osoczu krwi i w moczu oraz cystatyny C – inhibitora katepsyny B. Autor nie podaje w jakim materiale biologicznym chce oznaczać stężenie cystatyny C. Można się jedynie domyślić (co znajduje potwierdzenie w dalszej części pracy), że także w osoczu i w moczu. Autor założył również oznaczenie aktywności katepsyn. Uważam, że to w tym miejscu Autor powinien wyjaśnić powód oznaczania zarówno stężeń jak i aktywności wybranych enzymów i ich inhibitorów, czyli zamieścić tutaj opis, który przytoczył w rozdziale I. 7.

W tym rozdziale Autor zastosował także niepożądany skrót myślowy. Napisał bowiem, że „Ich (katepsyn B i E) zwiększona ekspresja dodatnio koreluje z procesami inwazji guza". Ekspresja jest to proces, w którym informacja genetyczna zawarta w genie zostaje odczytana i przepisana na jego produkty, którymi w tym przypadku są katepsyny B i E, a nie synonim stężenia/aktywności.

W 2 ostatnich zdaniach tego rozdziału Autor napisał także, że ocenił korelację stężeń i aktywności badanych katepsyn z cechami klinicznymi nowotworu przed i po 6 tygodniach od zabiegu oraz, że ocenił wartości predykcyjne wybranych parametrów za pomocą krzywych ROC oraz regresji logistycznej. Uważam, że Autor powinien te informacje sformułować w postaci nadrzędnego celu pracy.

W pracy Autor posługuje się różnymi formami gramatycznymi, raz pisząc „oceniona została", „oznaczano", „inkubowano" itd. a w innym miejscu „oznaczałem", „pobierałem" itd. Powinno to zostać podczas publikowania wyników ujednolicone.

Materiał do badań stanowiły krew i mocz pacjentów Oddziału Urologii Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Białymstoku. W rozdziale tym brakuje dokładnej charakterystyki badanych grup. W tym miejscu Autor dokonał podziału na pacjentów:

1. z powierzchownym nowotworem poddanych leczeniu metodą przezcewkowej resekcji zmiany pęcherza moczowego (TURBT; 32 pacjentów),
2. rozpoznanym inwazyjnym guzem poddanych cystektomii lub cystoprostatektomii (22 pacjentów),
3. grupę kontrolną – bez rozpoznanej choroby nowotworowej lub procesu zapalnego (22 pacjentów).

Autor napisał jedynie, że grupy zawierały podobną liczbę mężczyzn i kobiet, co nie jest stwierdzeniem precyzyjnym. W rozdziale wyniki, zarówno w tabelach, jak i na rycinach Autor stosuje dokładniejsze opisy grup, powinien je dokładnie scharakteryzować i opisać, gdyż nie jest to czytelne. Nie dokonał także w Metodach podziału na przed i po 6 tyg. od zabiegu. A właśnie ten podział stanowi jedno z kryterium oceny uzyskanych wyników. Kolejnym kryterium jest stopień zaawansowania choroby lub średnica guza. Jest to istotne, szczególnie, że Autor dokonuje analizy statystycznej porównawczej pomiędzy „podgrupami" tj. LG vs HG, powierzchowny vs naciekający (wyniki, tabele). Niestety ta część pracy jest mało precyzyjna a przecież od właściwego zrozumienia zależy właściwa interpretacja uzyskanych wyników.

W pracy brakuje także informacji, czy Autor zastosował inne kryteria włączenia i wyłączenia pacjentów z badań. Kryteria takie powinny obejmować (jeśli uznać je za istotne i zasadne) m.in. choroby towarzyszące oraz ewentualne leczenie farmakologiczne, gdyż mogło to wpłynąć na uzyskane wyniki badań. Przy publikowaniu wyników, należy to uwzględnić i przedyskutować.

Przedłożony w rozprawie eksperyment został poprawnie zaplanowany, a przeprowadzenie badań wymagało wykorzystania technik spektrofotometrycznych oraz powierzchniowego rezonansu plazmonów imaging (SPRI). Zastosowane metody badawcze są w pełni dopracowane i poprawne analitycznie. W rozdziale „Metody" Autor bardzo szczegółowo opisuje zastosowane procedury analityczne. Zastosowane metody nie budzą zastrzeżeń, choć uważam za niepotrzebne przytaczanie dokładnych opisów rutynowo od wielu lat stosowanych metod oznaczania np. białka Lowrye'go. W treści podrozdziału a nie w tytułach podrozdziałów powinno się podawać cytację. Niejasno jest opisana metoda w rozdziale V.6. Autor powołuje się na Sasaki i wsp., 1977, a w treści na Minakata i wsp., 1982. Rozumiem, że jest to modyfikacja. Taki zapis nie jest precyzyjny. Sposób cytacji pracy [Gorodkiewicz i wsp., 2010] str. 40 pkt.3. także nie jest precyzyjny. Może z takiego zapisu wynikać, że to Gorodkiewicz i wsp. dokonali oznaczeń, a nie Autor w oparciu o ich metodę. W rozdz. V.1. Oznaczanie stężenia białka w osoczu krwi metodą Lowry – poprawnie powinno być Lowry'go.

Analiza statystyczna służąca weryfikacji uzyskanych wyników została wykonana poprawnie.

W rozdziale „Wyniki" Autor zupełnie niepotrzebnie przedstawił uzyskane wyniki zarówno w tabelach, jak i na wykresach. Nie powinno się powtarzać w pracy tych samych wyników, generuje to niepotrzebnie strony a niczego nie wnosi w odbiór pracy. Ponadto, tabele/ryciny nie są opisane czytelnie. Autor dokonuje w tym miejscu podziału na typ nowotworu, płeć, wiek pacjentów. Czego nie zrobił dokładnie i czytelnie w rozdziale Materiał. Autor używa skrótów LG i HG, nie zamieszczając ich wyjaśnień. Należało napisać, że skróty oznaczają: LG – low grade/małą złośliwość; HG – high grade/wysoką złośliwość.

W rozdziale VI. 15. Autor przedstawia wyniki stężeń i aktywności enzymów w aspekcie wznowy i progresji nowotworu przed upływem 12 miesięcy od zabiegu. Jest to bardzo istotne, jednak nie zostało ujęte w celu pracy. Dlaczego?

Za najistotniejsze uważam wyniki przestawione w rozdziale VI. 16. i 17. Ukazujące odpowiednio wartości predykcyjne badanych parametrów i analizę wieloczynnikową zmiennych przy zastosowaniu regresji logistycznej. Informacje, które wynikają z tej analizy są bardzo cenne. Powinny zostać szczególnie podkreślone w pracy.

Należy podkreślić, iż pomimo nieścisłości w przedstawieniu, uzyskane wyniki stanowiły solidną podwalinę do przeprowadzonej dyskusji, w której Doktorant dokonał przeglądu piśmiennictwa w zakresie roli katepsyn w procesie nowotworzenia oraz wnikliwie przedyskutował wyniki swoich badań w odniesieniu do badań innych autorów. Świadczy to dojrzałości naukowej Autora. Dokonał on także pewnych podsumowań, które pozwoliły odpowiedzieć na założenia pracy. Przedstawił w tej części dysertacji tabele, w których zaprezentował stężenia i aktywności katepsyn D i B oraz inhibitora katepsyny B w osoczu krwi i w moczu przed i po zabiegu. Jeśli dobrze zrozumiałam intencje Autora, zaprezentował w tych tabelach (XXVI, XXVII) wartości średnie, bez podziału na cechy kliniczne guza, rokowanie itd. Należałoby się zastanowić nad celowością lub/i miejscem prezentowania tych wyników. W moim odczuciu, Autor powinien uprzednio przeanalizować dokładnie uzyskane wyniki i w pracy zamieścić ich ostateczną, syntetyczną wersję w rozdziale „Wyniki", pomagającą w prosty sposób odpowiedzieć na postawione cele pracy. Mam też pytanie dlaczego w dyskusji Autor nie powołuje się na swoje opublikowane wyniki badań? („Aktywność katepsyn D i B w osoczu chorych na raka przejściowokomórkowego pęcherza moczowego" Guszcz T., Święczkowska M., Milewska E., Gorodkiewicz E., Kozłowski R., Roszkowska-Jakimiec W. Pol. Merk. Lek., 2014, XXXVI, 216, 386). Jest to szczególnie istotne gdyż prac z tego zakresu w najnowszym piśmiennictwie jest bardzo niewiele.

Autor nie ustrzegł się i w tej części pracy od drobnych błędów. Opisując zmiany w stężeniach lub aktywnościach, nie powinno używać się sformułowania „spadek" np. stężenia a powinno „obniżenie" stężenia.

W podsumowaniu dyskusji Autor napisał, że przeprowadzone badania wskazują na potencjalne znaczenie enzymów proteolitycznych w procesie nowotworzenia. Uważam, że nie jest to jedynie

znaczenie potencjalne, a raczej już udowodnione. Zgadzam się natomiast ze stwierdzeniem, że dokładna analiza określająca wzajemne współzależności stężeń oznaczanych katepsyn z rozwojem procesu nowotworzenia może stanowić istotny aspekt wcześniejszego wykrywania i skuteczniejszego leczenia nowotworów pęcherza moczowego.

Na podstawie przeprowadzonych badań oraz szczegółowej analizy uzyskanych wyników Doktorant przedstawił uzasadnione wnioski, które uważam za dojrzałe i w pełni uzasadnione.

W podsumowaniu stwierdzam, iż wykazane błędy/uchybienia Autora nie wpływają na merytoryczną wartość pracy a uzyskane wyniki badań posiadają charakter nowatorski, poznawczy, a co najważniejsze duży potencjał aplikacyjny. Reasumując, pracę **lek. Tomasza Guszcza pt.: Ocena wartości diagnostycznej katepsyny B i D w osoczu krwi i moczu chorych na raka przejściowokomórkowego pęcherza moczowego** oceniam bardzo pozytywnie. Praca stanowi wartościowe, prawidłowo zaplanowane i zrealizowane opracowanie naukowe, a uzyskane wyniki są podstawą do dalszych badań, jak również pozwalają mieć nadzieję, na skuteczną i szybką diagnostykę i skuteczniejsze leczenie nowotworów pęcherza moczowego.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595, z pózn. zm.).

Z pełnym przekonaniem przedstawiam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek **o dopuszczenie lek. Tomasza Guszcza** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jolanta Zalejska-Fiolka

Zalejska-Fiolka Jolanta