

Bydgoszcz 09.11.2022.

dr hab. n. med. Agnieszka Żuryń, prof. UMK
Katedra Histologii i Embriologii,
Collegium Medicum w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu



**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. Grzegorza Łapucia
pt.: Ekspresja wybranych genów w różnych typach
histologicznych niedrobnokomórkowego raka płuca**

1. OCENA MERYTORYCZNA PRACY

1.1. Trafność podjętej problematyki badawczej i jej oryginalność

Tematem recenzowanej rozprawy doktorskiej jest monografia pt.: „*Ekspresja wybranych genów w różnych typach histologicznych niedrobnokomórkowego raka płuca*”. Niedrobnokomórkowy rak płuca stanowi około 80 % pierwotnych nowotworów płuca. W ostatnich latach nastąpił intensywny rozwój terapii antynowotworowych skierowanych na konkretne cele molekularne stąd istniejący podział nabłonkowych nowotworów płuca na raki drobnokomórkowe (DRP) i niedrobnokomórkowe (NDRP) poszerzono o bardziej precyzyjną charakterystykę histopatologiczną NDRP na raki płaskonabłonkowe i gruczołowe. Wciąż poszukuje się nowych biomarkerów wykorzystywanych jako narzędzie diagnostyczne przy klasyfikacji podtypów NDRP. Analiza ekspresji genów wykonana w Zakładzie Klinicznej Biologii Molekularnej UMB wykazała specyficzne wzory ekspresyjne, które wyraźnie różniły się pomiędzy rakami gruczołowymi i płaskonabłonkowymi. Opracowano 53-genową sygnaturę różnicującą raki płaskonabłonkowe i gruczołowe. Największy potencjał różnicujący wykazało sześć genów, KRT5, KRT6A, PPKNEFD, DSG3, SERPINB5 i MIR205HG, co umożliwiło sformułowanie następujących celów pracy:

1. Analiza ekspresji wyselekcjonowanych genów: KRT5, KRT6A, PPKNEFD, DSG3, SERPINB5 i MIR205HG na poziomie mRNA w guzach pierwotnych u chorych we wczesnych stadiach zaawansowania NDRP z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym.
2. Badanie zależności pomiędzy ekspresją wyselekcjonowanych genów, a parametrami klinicznymi i patologicznymi takimi jak: wiek, płeć, typ histologiczny NDRP, status regionalnych węzłów chłonnych, stopień zaawansowania nowotworu wg klasyfikacji TNM.
3. Ocena znaczenia poziomów ekspresji wyselekcjonowanych genów w aspekcie różnicowania podtypów NDRP.
4. Opracowanie testu molekularnego różnicującego podtypy histologiczne NDRP oraz ocena jego przydatności jako dodatkowego narzędzia diagnostycznego.

Grupę badaną stanowiło 140 pacjentów Kliniki Chirurgii Klatki Piersiowej UM w Białymstoku chorujących na NDRP. Od chorych pobrano podczas operacji skrawki z guza oraz z miejsc bez nacieku na nowotwór. Analiza poziomów ekspresji 6-ciu wyselekcjonowanych transkryptów mRNA obejmowała następujące etapy: ocenę mikroskopową, izolację całkowitego RNA ze świeżo mrożonych tkanek guza, ocenę stężenia, czystości i jakości roztworów RNA, reakcję odwrotnej transkrypcji (RT), wykonanie reakcji PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR), normalizację wyników analiz, ocenę znormalizowanych wartości ekspresji genów.

1.2. Uzyskane rezultaty i ich znaczenie dla nauki i praktyki

Badaniem objęto 140 chorych na NDRP w stadium zaawansowania TNM I – IIIA. Materiałem do badań molekularnych były wycinki z guza nowotworowego pobrane podczas zabiegu chirurgicznego. W każdym wycinku oceniano ekspresję wybranych genów na poziomie mRNA, techniką Real-Time PCR.

Analiza ekspresji wyselekcjonowanych genów wykazała występowanie istotnych statystycznie różnic pomiędzy gruczolakorakiem (ADC), a rakiem płaskonabłonkowym płuca (SqCC). Różnice te były niezależne od danych kliniczno-patologicznych. Istotnie statystycznie wyższy poziom ekspresji wykazywały wszystkie analizowane geny w grupie SqCC w porównaniu do grupy ADC. Stosując model drzewa decyzyjnego określono wartość diagnostyczną analizowanych zmiennych, pod kątem różnicowania podtypów histologicznych raka płuca na ADC i SqCC. Uzyskane wyniki wykazały, że jedyną zmienną klasyfikującą jest

ekspresja genu DSG3. Przydatność diagnostyczną badanego modelu oceniono wykreślając krzywą ROC, która wskazała na kliniczną użyteczność analizowanego predyktora. Czulość opracowanego modelu diagnostycznego wynosiła 100%, a swoistość 70,8%.

Przeprowadzone badania wykazały, że poziomy względnej ekspresji analizowanych genów w guzach płuca, nie korelowały z czynnikami kliniczno-patologicznymi, takimi jak: wiek, płeć, stadium klasyfikacji TNM oraz status wznowy choroby nowotworowej po zabiegu operacyjnym. DSG3 może być nowym, obiecującym biomarkerem, przydatnym w diagnostyce różnicowej podtypów histologicznych raka płuca.

Poziom ekspresji genów MIR205HG, KRT5, KRT6A, PPKNEFD, SERPINB5 i DSG3 może posłużyć jako dodatkowe narzędzie diagnostyczne do różnicowania raka płaskonabłonkowego i gruczołowego płuca w aspekcie kwalifikacji chorych do terapii spersonalizowanej.

1.3. Poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna

Praca napisana jest poprawną polszczyzną. Użyte w tekście środki językowe są zgodne z panującymi normami leksykalnymi, znaczeniowymi oraz stylistycznymi. W dysertacji zdarzają się pojedyncze błędy literowe i interpunkcyjne.

2. OCENA METODOLOGICZNA PRACY:

2.1. Dobór literatury, umiejętność wykorzystania źródeł

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska posiada 177 pozycji piśmiennictwa. Przytoczone piśmiennictwo jest właściwie dobrane oraz wykorzystane. Obejmuje współczesną wiedzę z zakresu tematyki pracy.

2.2. Poprawność formułowania problemów i hipotez (założeń badawczych)

Doktorant poprawnie formułuje problemy i hipotezy badawcze. Założenia badawcze w przedstawionej do oceny pracy nie budzą zastrzeżeń.

2.3. Trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania

Metody i narzędzia badawcze zastosowane w ocenianej dysertacji zostały właściwie dobrane oraz umiejętnie wykorzystane. Materiał do badań stanowiły wycinki z guza nowotworowego pobrane podczas zabiegu chirurgicznego od 140 chorych na NDRP w stadium

zaawansowania TNM I -IIIA. Analiza poziomów ekspresji 6-ciu wyselekcjonowanych transkryptów mRNA obejmowała następujące etapy: ocenę mikroskopową, izolację całkowitego RNA ze świeżo mrożonych tkanek guza, ocenę stężenia, czystości i jakości roztworów RNA, reakcję odwrotnej transkrypcji (RT), reakcję PCR w czasie rzeczywistym (RT-PCR), normalizacja wyników analiz, ocenę znormalizowanych wartości ekspresji genów.

2.4. Prawdliwość układu pracy i struktury podziału treści

Przedstawiona do oceny rozprawa podzielona została na następujące rozdziały: Wstęp, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki badań, Dyskusja, Wnioski, Streszczenie, Abstrakt, Piśmiennictwo, Spis tabel i rycin. Dodatkowo poza rozdziałami zamieszczono: Wykaz stosowanych skrótów.

Układ pracy jest prawidłowy i nie budzi zastrzeżeń. Całość rozprawy liczy 80 stron.

2.5. Uwagi i propozycje

Nie mam żadnych uwag do ocenianej rozprawy doktorskiej.

3. WNIOSEK KOŃCOWY

Temat ocenianej dysertacji uważam za bardzo interesujący i posiadający duże znaczenie poznawcze. Zaprezentowane wyniki badań przedstawiają przemyślaną, starannie zaplanowaną oraz szczegółową ocenę ekspresji wybranych genów w różnych typach histologicznych niedrobnokomórkowego raka płuca. Cele, które sformułował w pracy Doktorant zostały przez Niego zrealizowane, a metody badawcze właściwie dobrane. Analiza ekspresji wyselekcjonowanych genów wykazała występowanie istotnych statystycznie różnic pomiędzy gruczolakorakiem (ADC), a rakiem płaskonabłonkowym płuca (SqCC). Różnice te były niezależne od danych kliniczno-patologicznych. Istotnie statystycznie wyższy poziom ekspresji wykazywały wszystkie analizowane geny w grupie SqCC w porównaniu do grupy ADC.

Pragnę podkreślić, że tematyka badawcza oraz sposób jej realizacji wskazują jak wartościowe prace powstają w trzech, współpracujących ze sobą jednostkach UM w Białymstoku: w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej, w Zakładzie Histologii i Embriologii oraz w Zakładzie Klinicznej Biologii Molekularnej.

W mojej opinii przedstawiona rozprawa odpowiada warunkom określonym w art. 13. Ust. z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017r., poz. 1789) oraz art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca

2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r. poz. 1669). W związku z powyższym, z głębokim przekonaniem, zwracam się do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku z prośbą o kontynuowanie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk medycznych Panu lekarzowi Grzegorzowi Łapuciowi.

Agnieszka Żurys