Śląski Uniwersytet
Medyczny w Katowicach

Katedra i Zakład Chemii Klinicznej i Diagnostyki Laboratoryjnej

Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu

41-200 Sosnowiec
ul. Jedności 8
www.sum.edu.pl

Profesor SUM badawczo-dydaktyczny
dr hab. n. med. Katarzyna Winsz-Szczotka
winsz@sum.edu.pl

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 364 11 50
fax: (+48 32) 364 11 57
chem_klin@sum.edu.pl

Sosnowiec / 25.11.2020 r.

R E C E N Z J A

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych
mgr Ali Litman-Zawadzkiej
Pracownika
Zakładu Diagnostyki Chorób Neurozwyrodnieniowych
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku
Tytuł pracy: ***Znaczenie chemokiny CXCL8 i jej receptora CXCR2 w rozwoju raka trzustki***
Promotor: ***Prof. dr hab. n. med. Barbara Mroczko***

Rak trzustki (PC, pancreatic cancer) stanowi jeden z najbardziej letalnych guzów narządów litych, którego częstość występowania stopniowo wzrasta, zaś niski wskaźnik przeżycia 5-letniego pacjentów nie zmienia się od dziesięcioleci. Powyższe wynika z faktu, że większość przypadków choroby ujawnia się późno, tj. w stanie zaawansowanych miejscowo zmian nowotworowych. Stąd też, istnieje potrzeba opracowanie markerów przedinwazyjnych pozwalających na wczesne wykrycie i rozpoznanie choroby. Co więcej, lepsze zrozumienie mechanizmów molekularnych leżących u podstaw rozwoju raka trzustki może w znacznym stopniu przyczynić się do odkrycia przełomowych strategii terapeutycznych. Stąd też, badania, pod wspólną nazwą: „*Znaczenie chemokiny CXCL8 i jej receptora CXCR2 w rozwoju raka trzustki*", prowadzone przez Panią magister Alę Litman-Zawadzką, pod opieką Pani Prof. dr hab. n. med. Barbary Mroczko, wpisujące się w powyższy nurt badań naukowych, uważam za niezwykle interesujące, zarówno ze względów naukowych, jak i potencjalnie klinicznych.

Rozprawa doktorska mgr Ali Litman-Zawadzkiej, której celem było ustalenie czy krążące we krwi: chemokina CXCL8 i receptory chemokin (CXCR2 i CXCR4) mogą być wykorzystane jako potencjalne biomarkery diagnostyczne i prognostyczne w PC, na wzór klasycznych markerów nowotworowych, tj.: CA 19-9 (cancer antigen 19-9; antygen nowotworowy towarzyszący nowotworom przewodu pokarmowego) i CEA (carcinoembrionic antygen; antygen karcynoembrionalny), została przygotowana na podstawie monotematycznego cyklu trzech publikacji. Prace te, z których dwie mają charakter prac oryginalnych, zaś jedna jest pracą poglądową, zostały opublikowane w latach: 2018 r., 2019 r. oraz 2020 r. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, zaś pozostali współautorzy wyrazili zgodę na przedłożenie tych prac przez Panią mgr Alę Litman-Zawadzką, jako część Jej rozprawy doktorskiej, przygotowanej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów.

Należy podkreślić, że wszystkie omawiane prace zostały opublikowanych w czasopismach naukowych, indeksowanych w interdyscyplinarnej bazie JCR, o łącznej wartości wskaźnika oddziaływania (IF, impact factor) wynoszącym 10,008 (punkty MNiSW = 270), co wskazuje, że zostały już wcześniej rzetelnie i pozytywnie zrecenzowane.

Nadrzędny, wspomniany wyżej, cel pracy doktorskiej został osiągnięty przez Autorkę poprzez realizację kolejnych, logicznie powiązanych celów podrzędnych, obejmujących: • oznaczenie stężeń chemokiny CXCL8 oraz receptorów CXCR2 i CXCR4 we krwi osób chorych na raka trzustki oraz osób zdrowych; • ocenę związku CXCL8, CXCR2 i CXCR4 z cechami kliniczno-patologicznymi nowotworu; • ocenę związku CXCL8, CXCR2 i CXCR4 z wybranymi, rutynowo oznaczanymi w procesie diagnostycznym markerami nowotworowymi, tj. CA 19-9 i CEA oraz wskaźnikiem stanu zapalnego – białkiem C-reaktywnym (CRP); • wyznaczenie parametrów oceniających użyteczność kliniczną analizowanych markerów.

Na przeprowadzenie badań, stanowiących powyższe cele pracy, wyraziła zgodę Lokalna Komisja Etyki (R-I-002/65/2017) Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Pierwsza publikacja pt.: „Novel potential biomarkers for pancreatic cancer – a systematic review" (Advances in Medical Sciences, 2019 r.), o charakterze przeglądowym, pełni rolę wstępu, będącego doskonałym wprowadzeniem do tematyki badań naukowych Pani mgr Ali Litman-Zawadzkiej, a przedstawionych w poniżej opisanych pracach. Wielkim wyzwaniem medycyny przyszłości, zdaniem Doktorantki, jest poznanie nieinwazyjnych biomarkerów, które poddane ocenie ilościowej i/lub jakościowej w płynach biologicznych, takich jak krew lub mocz, za pomocą łatwych do wykonania, tanich i dokładnych metod, pozwoliłby na wykrycie przedklinicznych zmian nowotworowych trzustki. Wiadomo bowiem, że PC charakteryzuje się bardzo wysoką umieralnością, która najczęściej stanowi efekt wykrycia choroby już w stadium znacznego zaawansowania, często na etapie przerzutów do otaczających węzłów chłonnych i narządów odległych.

Doktorantka, w zwięzły sposób, w oparciu o dane z 71 pozycji literaturowych, w tym i prac powstałych w macierzystej Jednostce Uczelni, opisała rolę wybranych mediatorów procesu zapalnego, jako ogniw patogenetycznego łańcucha zmian prowadzących do rozwoju PC, oraz możliwość ich zastosowania w procesach wykrywania, określania stopnia zaawansowania czy oceny skuteczności przebiegu terapii omawianego nowotworu. W sposób szczególny Autorka skupiła się na ewentualnym pełnieniu powyższych funkcji przez chemokiny i ich specyficzne receptory, interleukinę-6, białko C-reaktywne, hematopoetyczne czynniki wzrostu, w tym – czynniki różnicujące komórki w kierunku linii granulocytarnej czy monocytarnej, metaloproteinazy macierzowe (MMP, matrix metallopeptidases), w tym – MMP-9, MMP-2 i ich inhibitora tkankowego 1 (TIMP-1, tissue inhibitor metaloproteinases 1).

Pomimo iż, liczba badań naukowych nad nowymi biomarkerami diagnostycznymi PC, w ciągu ostatniej dekady, znacząco wzrosła, to nie znaleziono markerów biochemicznych, cechujących się wysoką czułością i swoistością, których zastosowanie w badaniach przesiewowych pacjentów z PC, pozwoliłoby na wykrycie zmiany nowotworowej we wczesnym stadium zaawansowania klinicznego. Wśród potencjalnych markerów tych ostatnich procesów Doktorantka wymienia chemokiny i ich receptory.

Stąd też, w drugiej pracy, o charakterze oryginalnym, pt.: "Serum chemokine CXCL8 as a better biomarker for diagnosis and prediction of pancreatic cancer than its specific receptor CXCR2, C-reactive protein, and classic tumor markers CA 19-9 and CEA" (Polish Archives of Internal Medicine, 2018 r.), Autorka oceniła przydatność kliniczną krążącej chemokiny CXCL8 i jej specyficznego receptora – CXCR2 w diagnostyce i prognozowaniu PC, w porównaniu z klasycznymi, rutynowo stosowanymi w procesie diagnostycznym omawianej patologii, markerami nowotworowymi, tj.: CA 19-9 i CEA oraz wskaźnikiem procesu zapalnego, tj.: CRP. Ilościowej oceny wymienionych związków Doktorantka dokonała metodami odpowiednio: CXCL8 i CXCR2 – metodą immunoenzymatyczną (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay), CA 19-9 i CEA – metodą immunochemiczną z użyciem mikrocząsteczek i znacznika chemiluminescencyjnego (CMIA, chemiluminescence immunoassay), zaś CRP – metodą immunoturbidymetryczną, we krwi pozyskanej od 34 osób zdrowych (14 kobiet i 20 mężczyzn) oraz od 42 pacjentów (17 kobiet i 25 mężczyzn) z zdiagnozowanym – na podstawie objawów klinicznych, wyników badań obrazowych oraz histopatologicznej oceny próbek tkankowych – rakiem trzustki, o różnym stopniu zaawansowania klinicznego. Pacjenci leczeni byli w II Klinice Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Przeprowadzona przez Doktorantkę ocena statystyczna uzyskanych wyników pozwoliła na stwierdzenie znacząco wyższych stężeń zarówno CXCL8 i CXCR2, jak również CA 19-9, CEA i CRP we krwi osób chorych, szczególnie u tych z obecnymi przerzutami w węzłach chłonnych lub w narządach odległych, w porównaniu do stężeń ocenianych związków we krwi osób zdrowych. Co więcej, istotne różnice stwierdziła pomiędzy stężeniami CXCL8 we krwi pacjentów z zajęciem węzłów chłonnych a surowiczymi stężeniami cechującymi pacjentów bez przerzutów. Stężenia wymienionej chemokiny były związane nie tylko z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych, lecz także ze stężeniami CRP. Zdaniem Autorki, komórki PC są w stanie syntetyzować CXCL8, a podwyższone surowicze stężenia tej chemokiny, będące istotnym, niezależnym czynnikiem prognostycznym ryzyka wystąpienia gruczolakoraka trzustki, mogą służyć jako marker w ocenie progresji omawianego schorzenia. Powyższą tezę potwierdza wykazana dla oznaczeń stężeń CXCL8 wysoka – rzędu 98% – czułość diagnostyczna, oraz wysoka – rzędu 97% – wartość predykcyjna ujemna, które były najwyższe spośród wszystkich wartości wykazanych dla pozostałych analizowanych białek. Oznaczenia stężeń CXCL8 cechowały się także najwyższą, ocenioną na podstawie pola powierzchni pod krzywą ROC, mocą diagnostyczną. Ponadto Doktorantka

dowiodła, że łączna analiza CXCL8 z CXCR2, a także CXCL8 z CEA lub CA 19-9, zaś CXCR2 z CEA przyczynia się do wzrostu czułości diagnostycznej do 100%. Pomimo tak obiecujących wyników Doktorantka wskazała na konieczność dalszych badań, potwierdzających użyteczność kliniczną CXCL8, jako potencjalnego markera nowotworowego PC.

W kolejnej, oryginalnej publikacji, pt.: „Specific receptors for the chemokines CXCR2 and CXCR4 in pancreatic cancer" (International Journal of Molecular Sciences, 2020 r.), Doktorantka kontynuując wcześniejsze zainteresowania naukowe, ilościowo oceniła CEA (metodą CMIA), CRP (metodą immunoturbidymetryczną), oraz – jako potencjalne biomarkery diagnostyczne i prognostyczne w PC – CXCR4 i ponownie CXCR2 (metodami ELISA), we krwi zarówno 32 osób zdrowych (17 mężczyzn i 15 kobiet) jak i 32 pacjentów (20 mężczyzn i 12 kobiet) z nieleczonym gruczolakorakiem przewodowym trzustki o różnym stopniu klincznego zaawansowania, hospitalizowanych w II Klinice Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. W cytowanej pracy Autorka wykazała, istotnie wyższe stężenia zarówno „klasycznego" markera nowotworowego, tj. CEA, jaki i CXCR4 i CXCR2 we krwi pacjentów z PC, szczególnie u tych z zaawansowanymi postaciami raka, w porównaniu ze stężeniami charakteryzującymi osoby zdrowe. Stężenia CXCR4 istotnie korelowały ze stężeniami CXCR2 i CRP, podczas gdy stężenia CRP korelowały ze stężeniami CXCR2 i CEA.

Przeprowadzona ponadto przez Doktorantkę ocena użyteczności klinicznej analizowanych markerów, będąca przedmiotem opisywanej pracy, pozwoliła na stwierdzenie, że CXCR4 w surowicy jest lepszym potencjalnym markerem diagnostycznym PC w porównaniu do CXCR2, podczas gdy ten ostatni (podobnie jak CRP i wiek pacjenta) wydaje się być istotnym czynnikiem predykcyjnym ryzyka omawianej patologii. Co więcej, połączona ocena CXCR4 i dobrze ugruntowanego w procesie diagnostycznym markera nowotworowego, tj.: CEA, lub CRP może być, zadaniem mgr Ali Litman-Zawadzkiej bardziej przydatna w diagnostyce PC w porównaniu z pomiarem pojedynczego biomarkera, bowiem połączenie poprawiła czułość diagnostyczną do 100%.

W trakcie lektury recenzowanej dysertacji poprzedzającej analizę – stanowiących cykl – publikacji, można było dostrzec nieliczne nieścisłości, bądź kwestie budzące pewne wątpliwości, w tym –

1. w rozdziałach: 4 (Cel pracy), 6 (Wyniki), 7 (Podsumowanie wyników badań), 8 (wnioski) zabrakło informacji dotyczących CXCR4;
2. należałoby ujednolicić pisownię CXCL-8 z CXCL8 czy CXCR-2 z CXCR2, jak również użycie „wielkich liter" w tytułach publikacji;
3. jaki był cel powtórnej ilościowej oceny CXCR2 w pracy w 2020 r.;
    a. mylące dla czytelnika jest użycie przez Panią Mgr w pracy: Int J Mol Sci. 2020 Sep; 21(17): 6193, zwrotu …"According to our knowledge, this paper is the first study concerning the

assessment of serum CXCR4 and CXCR2 in PC patients in relation to the well-established marker for this malignancy", bowiem ilościową ocenę CXCR2 opisała Pani wcześniej, tj. w pracy: Polish Archives of Internal Medicine 2018; 128 (9).

W podsumowaniu oświadczam, że przedłożona mi do recenzji dysertacja doktorska pt.: „Znaczenie chemokiny CXCL8 i jej receptora CXCR2 w rozwoju raka trzustki" jest oryginalnym, samodzielnym dorobkiem naukowym Kandydatki. Autorka dowiodła, iż opanowała „warsztat" pracy naukowej, jak i posiadła umiejętność wyboru odpowiedniej tematyki badań. Magister Ala Litman-Zawadzka wykazała bardzo dobre przygotowanie teoretyczne, opanowanie nowoczesnego warsztatu badawczego i umiejętność krytycznej analizy uzyskanych wyników. Rezultaty pracy poszerzają dotychczasową wiedzę na temat możliwości wykorzystania chemokiny CXCL8 i receptorów CXCR2 i CXCR4, jako biomarkerów PC.

Jednocześnie potwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Ali Litman-Zawadzkiej pt.: pt.: „Znaczenie chemokiny CXCL8 i jej receptora CXCR2 w rozwoju raka trzustki" spełnia warunki Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. 2003 Nr 65 poz.595 z późn.zm.).

Z pełnym przekonaniem przedkładam Szanownym Członkom Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie mgr Ali Litman-Zawadzkiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katarzyna Winsz-Szczotka

dr hab. n. med. Katarzyna Winsz-Szczotka, prof. SUM