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 naukowo-badawczy
dr hab. n. med. Katarzyna Winsz-Szczotka, prof. SUM
winsz@sum.edu.pl

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

Sosnowiec / 02.08.2021 r.

R E C E N Z J A

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu

mgr Sary Julity Pączek

Doktorantki

Zakładu Diagnostyki Biochemicznej

Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Tytuł pracy: ***Chemokina CXCL8 i jej specyficzny receptor CXCR2 jako markery raka jelita grubego***

Promotor: ***dr hab. n. med. Marta Łukaszewicz-Zając***

Kierownik Zakładu: *prof. dr hab. n. med. Barbara Mroczko*

Rak jelita grubego (CRC, *colorectal cancer*), obok raka płuca, jest najczęściej rozpoznawanym schorzeniem nowotworowym w populacji polskiej, stanowiąc jedną z głównych onkologicznych przyczyn zgonów. Odsetek 5-letnich przeżyć zależy m.in. od obecności lub braku przerzutów odległych, i waha się od 90% dla wczesnego stadium choroby bez przerzutów odległych lub regionalnych, do 10% dla raka zaawansowanego z przerzutami odległymi. Z uwagi na powyższe oraz na fakt, że zapadalność i śmiertelność związana z CRC, rozpoznanym u pacjentów w wieku poniżej 50 lat, stale rośnie, procedury diagnostyczne i terapeutyczne dedykowane CRC są obecnie niezaspokojoną potrzebą kliniczną. Stąd też, badania, pod wspólną nazwą: „*Chemokina CXCL8 i jej specyficzny receptor CXCR2 jako markery raka jelita grubego*", prowadzone przez Panią magister Sarę Julitę Pączek, pod opieką Pani dr hab. n. med. Marty Łukaszewicz-Zając, wpisujące się w powyższy nurt badań naukowych, uważam za niezwykle interesujące, zarówno ze względów naukowych, jak i potencjalnie klinicznych.

Rozprawa doktorska mgr Sary Julity Pączek, której celem było ustalenie czy krążące we krwi chemokina CXCL8 i jej specyficzny receptor – CXCR2 mogą być wykorzystane jako potencjalne biomarkery diagnostyczne i prognostyczne w CRC, na wzór klasycznego markerera 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 2020 – 2021, na łamach czasopism: International Journal of Molecular Sciences, Anticancer Research oraz Cancer Control. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, w jednej z nich jest także autorem

Korespondencyjnym. Pozostali współautorzy – zgodnie z zamieszczonymi oświadczeniami – wyrazili zgodę na przedłożenie tych prac przez Panią mgr Sarę Julitę Pączek, jako części składowych Jej rozprawy doktorskiej, przygotowanej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów.

Należy podkreślić, że wszystkie omawiane prace zostały opublikowanych w wymienionych wyżej, prestiżowych czasopismach naukowych, indeksowanych w interdyscyplinarnej bazie JCR, o łącznej wartości wskaźnika oddziaływania (IF, impact factor) wynoszącym 9,653 (punkty MNiSW = 310,00). Powyższe wskazuje, że przedmiotowe prace, będące podstawą ubiegania się o stopień naukowy doktora, zostały wcześniej poddane wysoce wymagającym procesom recenzji i spełniły wymagania stawiane w światowych, renomowanych czasopismach naukowych.

Co więcej, oceniana rozprawa doktorska została przygotowana w Zakładzie Diagnostyki Biochemicznej UMB, która pod kierownictwem Pani Prof. Barbary Mroczko, jest wiodącym w Polsce podmiotem naukowo-badawczym, zajmującym się między innymi oceną potencjalnych markerów nowotworowych układu pokarmowego, a zatem w ośrodku o znacznym doświadczeniu w zakresie podjętych przez Doktorantkę zagadnień.

Nadrzędny, wspomniany wyżej, cel pracy doktorskiej został osiągnięty przez Autorkę poprzez realizację kolejnych, logicznie powiązanych celów podrzędnych, obejmujących: • oznaczenie stężeń chemokiny CXCL8 oraz receptora CXCR2 we krwi zarówno osób chorych na raka jelita grubego, jak i osób zdrowych; • ocenę związku CXCL8 i CXCR2 ze stopniem zaawansowania nowotworu oraz z jego cechami kliniczno-patologicznymi; • ocenę związku stężeń CXCL8 i CXCR2 ze stężeniami zarówno rutynowo oznaczanego w procesie diagnostycznym markera nowotworowego, tj. CEA jak i wskaźnika stanu zapalnego – białka C-reaktywnego (CRP); • wyznaczenie parametrów oceniających użyteczność kliniczną analizowanych markerów.

Na przeprowadzenie badań, stanowiących powyższe cele pracy, wyraziła zgodę Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (R-I-002/65/2017, pismem z dnia 30.01.2020 r.).

Pierwsza publikacja pt.: „Chemokines-what is their role in colorectal cancer?" (Cancer Control, 2020 r.), o charakterze przeglądowym, pełni rolę wstępu, będącego doskonałym wprowadzeniem do tematyki badań naukowych Pani mgr Sary Julity Pączek, a przedstawionych w poniżej opisanych pracach oryginalnych. Wyzwaniem medycyny XXI wieku, zdaniem Doktorantki, jest poznanie nowych biomarkerów CRC i ich wprowadzenie do procesu diagnostyki i prognozowania omawianego nowotworu. Wiadomo bowiem, że wysoka umieralność charakteryzująca chorych z CRC stanowi pochodną 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 95 pozycji literaturowych, opisała zarówno etiopatogenezę raka jelita grubego, jak i markery stosowane w postępowaniu diagnostycznym, szczególnie we wczesnej fazie nowotworzenia, w tym – krążące DNA guza (ctDNA). W artykule przedstawiła także aktualną wiedzę na temat chemokin i ich specyficznych receptorów w progresji CRC. Zdaniem mgr Sary Julity Pączek, chemokiny i ich receptory, odgrywające kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych, w tym – angiogenezy czy rozwoju tkanki limfatycznej, stymulują rozwój i progresję nowotworów, a zwiększona ekspresja wybranych chemokin i/lub ich swoistych receptorów wiąże się z gorszym

rokowaniem i niskimi wskaźnikami przeżycia pacjentów z CRC. Wśród potencjalnych markerów tych ostatnich procesów Doktorantka wymienia chemokinę CXCL8 i jej specyficznego receptora – CXCR2, których ilościowa analiza oraz potencjalne związki z surowiczymi stężeniami CEA i CRP u pacjentów z CRC stanowiły cele kolejnych prac badawczych.

Stąd też, w drugiej pracy, o charakterze oryginalnym, pt.: „CXCL-8 in preoperative colorectal cancer patients: significance for diagnosis and cancer progression" (International Journal of Molecular Sciences, 2020 r.), Autorka oceniła przydatność kliniczną krążącej chemokiny CXCL8 w diagnostyce i prognozowaniu CRC, w porównaniu z klasycznym, rutynowo stosowanym w procesie diagnostycznym omawianej patologii, markerem nowotworowym, tj.: CEA oraz wskaźnikiem procesu zapalnego, tj.: CRP. Ilościowej oceny wymienionych związków Doktorantka dokonała metodami odpowiednio: CXCL-8 – metodą immunoenzymatyczną (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay, R&D Systems), CEA – metodą immunochemiczną z użyciem mikrocząsteczek i znacznika chemiluminescencyjnego (CMIA, chemiluminescence immunoassay, ARCHITECT 8200 ci Abbott Laboratories), zaś CRP – metodą immunoturbidymetryczną (ARCHITECT 8200 ci Abbott Laboratories), we krwi pozyskanej od 46 osób zdrowych (21 kobiet i 25 mężczyzn) oraz od 59 pacjentów (29 kobiet i 30 mężczyzn) z zdiagnozowanym – na podstawie objawów klinicznych, wyników badań obrazowych oraz histopatologicznej oceny próbek tkankowych – rakiem jelita grubego, o różnym stopniu zaawansowania klinicznego. Pacjenci leczeni byli w II Klinice Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku.

Przeprowadzona ocena statystyczna uzyskanych przez Doktorantkę wyników badań pozwoliła na stwierdzenie znacząco wyższych stężeń zarówno CXCL8, CEA i CRP we krwi osób chorych (szczególnie w IV stopniu zaawansowania zmian nowotworowych), w porównaniu do stężeń ocenianych związków cechujących osoby zdrowe. Podobnie jak w przypadku zmian stężeń CEA i CRP, istotne różnice w surowiczych stężeniach CXCL-8 stwierdzono pomiędzy pacjentami w stadium III i IV CRC. Co więcej, stężenia ocenianej chemokiny we krwi chorych były istotnie skorelowane z obecnością przerzutów odległych ($p=0,003$) oraz stężeniami CEA ($p=0,019$) i CRP ($p<0,001$), zaś nie były związane z występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych.

Doktorantka w oparciu o wyniki własnych badań oraz innych autorów zasugerowała, że komórki CRC są zdolne do biosyntezy CXCL-8, która może być nieswoistym biomarkerem CRC. Powyższą tezę potwierdzają wykazane dla oznaczeń stężeń CXCL8 – wyższe w stosunku do CEA – wartości czułości diagnostycznej (75%:49%), wartości predykcyjnej wyników ujemnych (NPV, 71%:60%) i dokładności diagnostycznej (ACC, 76%:70%). Jednakże, najwyższą czułość diagnostyczną uzyskano dla połączonej analizy stężeń: CXCL-8 i CRP (98%). Ponadto, swoistość diagnostyczna była wyższa dla oceny stężeń CXCL-8 w surowicy krwi niż dla stężeń CRP (78%:70%). Ponadto AUC (area under the ROC curve, pole pod krzywą ROC) dla CXCL-8 (0,7775; $p<0,001$) było wyższe niż dla CEA (0,7579; $p<0,001$), zaś niższe niż dla CRP (0,9101; $p<0,001$) u pacjentów z CRC. Uzyskane wyniki, zdaniem Doktorantki, wskazują, że CXCL-8 jest lepszym diagnostycznym biomarkerem CRC niż obecnie stosowany marker nowotworowy CEA, którego stężenia, podobnie do CRP, są istotnym czynnikiem ryzyka wystąpienia raka jelita grubego.

W kolejnej, oryginalnej publikacji, pt.: „The clinical utility of serum CXCR-2 assessment in colorectal cancer (CRC) patients" (Anticancer Research, 2021 r.), Doktorantka kontynuując wcześniejsze zainteresowania naukowe, ilościowo oceniła CXCR-2 (metodą ELISA, EIAab Science INC) – jako potencjalny wskaźnik diagnostyczny i prognostyczny CRC – we krwi tych samych pacjentów hospitalizowanych w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym w Białymstoku, u których wcześniej dokonano, opisanej wyżej, oceny stężenia CXCL-8, CEA i CRP. W cytowanej pracy Autorka wykazała, że proces nowotworowy nie wpływa na przemiany CXCR-2, bowiem przeprowadzona analiza statystyczna nie pozwoliła na ujawnienie istotnych statystycznie różnic pomiędzy stężeniem ocenianego receptora we krwi wszystkich pacjentów z CRC, w porównaniu do surowiczego stężenia receptora charakteryzującego osoby zdrowe. Co więcej, nie wykazano istotnych różnic pomiędzy stężeniami CXCR-2 we krwi pozyskanej od pacjentów o różnym stopniu zaawansowania zmian nowotworowych oraz z odmiennymi cechami kliniczno-patologicznymi CRC. Ponadto, rezultaty kolejnych badań przeprowadzonych przez Doktorantkę pozwoliły jej na stwierdzenie wyższej czułości diagnostycznej dla oznaczeń CXCR-2 (53%) w stosunku do czułości cechującej CEA (49%). Doktorantka dowiodła, że łączna analiza CXCR2 i dobrze ugruntowanego w procesie diagnostycznym markera nowotworowego, tj.: CEA, lub wskaźnika procesu zapalnego, tj.: CRP, może być bardziej przydatna w diagnostyce CRC w porównaniu z pomiarem pojedynczego biomarkera, bowiem wspominane połączenie poprawiła czułość diagnostyczną, PPV, NPV i precyzję.

Doktorantka wskazała na konieczność dalszych badań, potwierdzających użyteczność kliniczną CXCL-8 oraz CXCR-2, jako potencjalnych markerów nowotworowych CRC, szczególnie przy łącznym ich oznaczaniu z uznanym markerem nowotworowym, tj. CEA.

Podsumowując, układ rozprawy doktorskiej Pani mgr Sary Julity Pączek jest zgodny z normami przyjętymi dla tego typu opracowań. Recenzowana dysertacja doktorska składa się z właściwych rozdziałów, tj.: wstępu, celu pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków, piśmiennictwa, streszczeń w języku polskim i angielskim cyklu, publikacji wchodzących w skład rozprawy, zgody komisji bioetycznej, oświadczeń współautorów oraz dorobku naukowego, w analizie których można było dostrzec nieliczne nieścisłości, bądź kwestie budzące pewne wątpliwości, w tym –

1. czy badania stanowiące cele poszczególnych prac zostały przeprowadzone w próbkach krwi pozyskanych od tych samych osób zdrowych i pacjentów z CRC? Z rozdziału P&M wynika, że są to te same osoby, zaś analiza przedstawionych rezultatów, w przypadku CEA i CRP, wskazuje że wyniki są nieco odmienne;
2. w jakim wieku byli pacjenci z CRC i gdzie byli leczeni (inna nazwa w publikacjach)? Wiek ma znaczący wpływ na ujawnienie się CRC;
3. w rozdziale 5.2.3, wskazano, że …"PPV oznaczeń stężeń CXCL8 (82%) była wyższa niż CXCR2 (62%)……". Gdzie w pracy pt. "CXCL-8 in preoperative colorectal cancer patients: significance for diagnosis and cancer progression", opisującej wskaźniki diagnostyczne dla pomiarów CXCL-8, można znaleźć powyższy wynik?

4. Doktorantka nie uniknęła błędów tekstowych, które w tego typu pracach są nieuniknionym elementem i nie obniżają wartości rozprawy, która jest znaczącym osiągnięciem badawczym Doktorantki, w tym –
    a. brak rozwinięć skrótów przy pierwszym ich stosowaniu;
    b. liczne, mało precyzyjne sformułowania, np:
        - str. 9, wers 4: …które wytwarzane są przez komórki tkankowe i leukocyty. Leukocyty też są komórkami płynnej tkanki łącznej;
        - str. 10, wers 2 pod ryciną: …Wielokierunkowość tych procesów….. należałoby wskazać jakich procesów;
        - str. 12, wers 19: ….rozpoznawanie jest stawiane na podstawie badania histopatologicznego, które jest zabiegiem inwazyjnym. Pobranie tkanki do badań histopatologicznych jest zabiegiem inwazyjnym;
        - str. 15, wers 4: surowicę rozdzielono na eppendorfy.

W podsumowaniu oświadczam, że przedłożona mi do recenzji dysertacja doktorska pt.: „Chemokina CXCL8 i jej specyficzny receptor CXCR2 jako markery raka jelita grubego" jest oryginalnym, samodzielnym dorobkiem naukowym Pani mgr Sary Julity Pączek, Kandydatki do stopnia naukowego doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu. W recenzowanej pracy Doktorantka podjęła bardzo aktualną i istotną – z punktu widzenia postępowania diagnostycznego w raku jelita grubego – tematykę, wykazała się znajomością warsztatu badawczego i umiejętnością krytycznej analizy uzyskanych wyników.

Jednocześnie potwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Sary Julity Pączek, pt.: „Chemokina CXCL8 i jej specyficzny receptor CXCR2 jako markery raka jelita grubego" 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 Pani mgr Sary Julity Pączek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katarzyna Winsz-Szczotka

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