CENTRUM ONKOLOGII – INSTYTUT
IM. MARII SKŁODOWSKIEJ-CURIE

WWW.COI.PL

Dr hab. n. med. Beata Kotowicz
Pracownia Markerów Nowotworowych
Zakładu Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej
Centrum Onkologii Instytutu
w Warszawie

Warszawa 19.12.2018

Ocena rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

mgr Sylwii Małgorzaty Kozłowskiej

pt. „Ocena przydatności diagnostycznej stężeń wybranych cytokin, metaloproteinaz (MMPs) i ich tkankowych inhibitorów (TIMPs) w osoczu chorych w małozaawansowanym stadium raka endometrium".

pod kierunkiem dr hab. n. med. Sławomira Ławickiego

Nowotwory złośliwe trzonu macicy są czwartą lokalizacją nowotworową wśród zachorowań u kobiet w Polsce i pierwszą wśród nowotworów narządu rodnego. Zachorowalność dotyczy głównie kobiet w wieku pomenopauzalnym. W schemacie leczenia chorych podstawą jest radykalny zabieg chirurgiczny, który może być uzupełniony radioterapią, hormonoterapią lub chemioterapią. W chwili obecnej istotnym problemem jest przedoperacyjna diagnostyka zaawansowania choroby oraz prognozowanie jej przebiegu, co wpływa na podejmowane decyzje terapeutyczne. Znaczącą rolę na tym etapie mogą odgrywać badania laboratoryjne. Chociażby oznaczanie stężeń markerów nowotworowych, łącznie z

marker w monitorowaniu leczenia raka jajnika. Jednak podobnie jak w przypadku innych markerów, we wczesnych stopniach zaawansowania klinicznego jego czułość diagnostyczna jest niezadowalająca, istnieje więc potrzeba poszukiwania nowych parametrów, które byłyby pomocne w szeroko pojętym procesie diagnostycznym. Wydaje się, że takie biomarkery jak cytokiny, czy metaloproteinazy, które są przedmiotem badań ostatnich lat mogą ogrywać istotną rolę u chorych na nowotwory o różnym umiejscowieniu. Przedstawiona do recenzji rozprawa wpisuje się w ten profil badań. Doktorantka podjęła próbę oceny stężeń wybranych cytokin (M-CSF, VEGF), metaloproteinaz (MMP-2, MMP-9) i ich tkankowych inhibitorów u chorych na raka endometrium. Praca liczy 138 stron i składa się z 6 rozdziałów: wstęp, cel pracy, materiały i metody, wyniki, dyskusja i wnioski. Na początku rozprawy Doktorantka zamieściła wykaz stosowanych skrótów i spis treści, a na koniec streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz piśmiennictwa. Układ pracy jest przejrzysty i zgodny z wymaganiami dotyczącymi rozpraw doktorskich.

We wstępie liczącym 47 stron, Doktorantka w sposób wyczerpujący wprowadza w temat rozprawy, wspierając się licznym piśmiennictwem, które jest uporządkowane w sposób alfabetyczny. W mojej opinii, układ piśmiennictwa zgodny z kolejnością cytowania jest bardziej przejrzysty. Autorka wprowadzając w temat rozprawy, krótko opisuje budowę narządu rodnego, a także zmiany i objawy chorobowe. Następnie na podstawie opracowań Krajowego Rejestru Nowotworów, przedstawia dane epidemiologiczne dotyczące nowotworów złośliwych u kobiet w Polsce, a szczególnie raka trzonu macicy. Wyczerpująco omawia także zagadnienia związane z etiopatogenezą raka endometrium przedstawiając w formie tabeli czynniki ryzyka rozwoju tego nowotworu i w interesujący sposób opisuje najistotniejsze z nich. W oparciu o piśmiennictwo Doktorantka przedstawia również w postaci czterech tabel podział nowotworów endometrium według: klasyfikacji WHO, stopnia zróżnicowania G, klasyfikacji

FIGO (Federacja Ginekologów i Położników) i klinicznej TNM. Przechodząc do części dotyczącej diagnostyki raka endometrium opisuje poszczególne etapy tego procesu, podkreślając znaczenie oceny histopatologicznej, szczegółowo omawia badania laboratoryjne, istotne w tym umiejscowieniu nowotworu. Dużo uwagi poświęca wybranym markerom nowotworowym, markerom molekularnym, receptorom, enzymom, w tym szczególnie metaloproteinazom (MMPs) i ich inhibitorom (TIMPs) oraz cytokinom. Jako, że powyższe biomarkery są przedmiotem niniejszej rozprawy, niezbędne jest w oparciu o dotychczasową wiedzę dokładne omówienia nie tylko ich budowy, funkcji czy też mechanizmów działania ale również ich znaczenia w patogenezie, diagnostyce, monitorowaniu leczenia i prognozowaniu chorych na raka endometrium. Właśnie te zagadnienia Autorka bardzo ciekawie przedstawia w ostatniej części wstępu, aczkolwiek pojawiają się tu niewielkie niedociągnięcia. Na stronie 25, pisząc o standardowej procedurze diagnostycznej wykonywanej w Polsce, Doktorantka cytuje pracę zagraniczną (46). W rozdziale 1.3.2 Autorka pisze, że w rutynowej diagnostyce raka endometrium stosuje się następujące markery: CA 125, CEA i CA 15.3, otóż w codziennej praktyce klinicznej jest oznaczany jedynie CA 125, który ma szerokie zastosowanie w ginekologii onkologicznej, aczkolwiek nie jest rekomendowany przez towarzystwa naukowe. Na stronie 31 Doktorantka słusznie podkreśla, że „ciągle trwają próby wykorzystania cytokin i metaloproteinaz w diagnostyce raka endometrium" cytując pracę z 2007 roku (22). Autorka we wstępie rozprawy zacytowała ponad 200 pozycji piśmiennictwa, moim zdaniem fragmenty, w których opisuje wyniki innych autorów dotyczące parametrów, które stanowiły część badawczą tej pracy, powinny znaleźć się w rozdziale Dyskusja, np. strony: 47-48 i 53-54.

Celem badań prezentowanej rozprawy doktorskiej była ocena stężeń oraz przydatności diagnostycznej wybranych cytokin (M-CSF, VEGF), metaloproteinaz (MMP-2, MMP-9), ich tkankowych inhibitorów (TIMP-1, TIMP-2) i porównawczo standardowego

markera nowotworowego CA 125 w osoczu chorych na raka endometrium.

W rozdziale „Materiały i metody" Doktorantka opisuje grupę chorych na raka endometrium i sposób kwalifikacji do badania oraz grupy kontrolne. Biorąc pod uwagę liczebność i mediany wieku wybranych grup badawczych stwierdzam, że zostały one dobrane idealnie; tj 80 chorych na raka endometrium w stopniach FIGO I+II i do porównań dokładnie tyle samo kobiet ze zmianami łagodnymi łącznie z osobami zdrowymi, wszystkie były w wieku postmenopauzalnym. Następnie w sposób wyczerpujący omawia metodykę oznaczeń wybranych biomarkerów, prezentując ciekawe schematy w formie rycin. Autorka szczegółowo, podając definicje i wzory, przedstawia wszystkie parametry związane z oceną przydatności diagnostycznej testu, a także stosowane metody statystyczne.

W rozdziale Wyniki liczącym 27 stron Doktorantka, w pierwszym etapie, dokonała oceny stężeń badanych parametrów i standardowego markera nowotworowego CA 125 u chorych na raka trzonu macicy we wczesnych stopniach zaawansowania klinicznego (FIGO I-II) i w grupach kontrolnych. Na tej podstawie wykazała między innymi, że stężenia badanych cytokin (VEGF i M-CSF) i metaloproteinaz (MMP-9 i MMP-2) były znamiennie wyższe u chorych, niż u osób zdrowych, podobnie jak markera CA 125, co jest bardzo istotne, ponieważ mogą być pomocne w diagnostyce różnicowej chorych na raka endometrium już w niskich stopniach zaawansowania. Ponadto wykazała istotnie wyższe stężenia VEGF, M-CSF i TIMP-2 w całej grupie chorych w porównaniu do ich stężeń u pacjentek ze zmianami łagodnymi. Na stronie 47 wystąpiła drobna pomyłka w wartości p dla M-CSF, która powinna być statystycznie istotna tj. $p<0,05$. Wszystkie wyniki dotyczące tej analizy Autorka zebrała w tabeli 11. Na stronie 69 Doktorantka opisuje istotne różnice w stężeniach VEGF, TIMP-2 i CA 125 pomiędzy grupą chorych ze zmianami łagodnymi i u osób zdrowych. Nie zaznaczyła jednak, jak wynika z danych zamieszczonych w tabeli 11, że stężenia TIMP-2, jako jedyne, były istotnie wyższe u

osób zdrowych. Co ciekawe mediany stężeń obu inhibitorów TIMP-1 i TIMP-2 były niższe u chorych na raka, niż w grupie osób zdrowych. Następnie, w dwóch obszernych tabelach (12 i 13) Doktorantka przedstawiła szczegółowe wyniki wzajemnych korelacji badanych biomarkerów u chorych oraz w grupach kontrolnych, i tak w grupie chorych VEGF korelował dodatnio ze wszystkimi parametrami, z wyjątkiem MMP-2, przy czym w grupach kontrolnych nie było takich korelacji. Kończąc część badawczą Rozprawy, Autorka przeprowadziła rzetelną analizę przydatności diagnostycznej badanych biomarkerów, w tym wyznaczyła własne punkty odcięcia dla wszystkich parametrów. Na podstawie oceny czułości, swoistości oraz dodatniej i ujemnej wartości predykcyjnej w grupie chorych, najwyższą przydatnością i mocą diagnostyczną, w oparciu o analizę krzywych ROC, cechowały się stężenia cytokiny proangiogennej VEGF, szczególnie w komplementarnych oznaczeniach z markerem CA 125. Wyniki te Doktorantka zaprezentowała graficznie w formie 16 -tu kolorowych rycin oraz trzech tabel. Badania dotyczące VEGF są bardzo istotne, ponieważ jak wiadomo, cytokina ta odgrywa kluczową rolę w procesie neoangiogenezy, co już jest wykorzystywane w terapii przeciwnowotworowej poprzez stosowanie leków blokujących jej aktywność.

W rozdziale Dyskusja Doktorantka w oparciu o właściwie dobrane piśmiennictwo, ściśle związane z tematem rozprawy, przeprowadziła ciekawą dyskusję analizując wyniki własne na tle doniesień innych autorów. Uzyskane przez nią wyniki po części były zgodne, jak i rozbieżne z obserwowanymi w literaturze. Autorka dokonała szczegółowej analizy a podejmując próby wyjaśniania mechanizmów oraz przyczyn uzyskania sprzecznych wyników, wykazała się dobrym warsztatem i dojrzałością badawczą. Na koniec dysertacji Doktorantka sformułowała 4 wnioski, w których podsumowała wyniki przeprowadzonych badań realizując w pełni założone cele pracy. W mojej opinii szczególnie interesujący jest wniosek czwarty, w którym Autorka sugeruje, że cytokiny VEGF i M-CSF mogą pełnić rolę markerów

nowotworowych, zwłaszcza oznaczane łącznie z CA 125, u chorych na raka endometrium nawet w niskich stopniach klinicznego zaawansowania, co znacznie zwiększa czułość testu. Mam jednak uwagę do 3 wniosku. Ponieważ Autorka w pracy wykazała istotne różniące także w stężenia pozostałych parametrów (z wyjątkiem TIMP-1) u chorych i w grupie osób zdrowych analizując uzyskane wyniki wydaje się, że nie tylko M-SCF może mieć znaczenie w diagnostyce różnicowej. W chwili obecnej, z uwagi na manualną metodykę oznaczania wybranych biomarkerów, badania te nie mają zastosowania w rutynowej praktyce klinicznej. Jednak biorąc pod uwagę postęp w dziedzinie diagnostyki laboratoryjnej z pewnością jest to możliwe. Zebrane piśmiennictwo obejmuje aż 271 pozycji, z przewagą publikacji ostatnich dziesięciu lat, które Doktorantka właściwie wykorzystała w swojej dysertacji.

Podsumowanie:

Przedłożona do recenzji dysertacja jest przemyślana, dobrze zaprojektowana, bardzo poprawnie napisana i zawiera wszystkie wymagane elementy związane z rozprawą doktorską. Wyniki badań przedstawione w sposób logiczny, rzetelny, przejrzysty i konsekwentny, potwierdzają umiejętność Doktorantki w projektowaniu i prowadzeniu prac badawczych. Drobne błędy i usterki redakcyjne nie ujmują wartości rozprawy.

Biorąc pod uwagę włożoną pracę i zaangażowanie Doktorantki, które przełożyło się na efekt końcowy, stwierdzam, że rozprawa ta spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim 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 późn. zm). W związku z powyższym praca autorstwa Pani Sylwii Małgorzaty Kozłowskiej pt. „Ocena przydatności diagnostycznej stężeń wybranych cytokin, metaloproteinaz (MMPs) i ich tkankowych inhibitorów (TIMPs) w osoczu chorych w małozaawansowanym stadium raka endometrium".

jest podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych, dyscyplina biologia medyczna. Przedstawiam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie Pani Sylwii Małgorzaty Kozłowskiej do dalszych części przewodu doktorskiego.

Sabe Kotowicz