RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ

Lek. med. Wojciecha Laudańskiego

pt. „Ocena ekspresji mRNA kinaz PLK1 i PLK3 w operacyjnym niedrobnokomórkowym raku płuca"

Rak płuca, z powodu najwyższego odsetka zachorowań i zgonów chorych nie tylko w Polsce ale i na świecie, stanowi jedno z najtrudniejszych, a zarazem priorytetowych zadań dla pracowników wszystkich obszarów medycznych, zarówno badawczych jak i klinicznych.

Według danych z 2012 roku zanotowano 1,8 mln przypadków zachorowań na raka płuca na całym świecie, co stanowi 13% wszystkich zachorowań na raka. Z danych Krajowego Rejestru Nowotworów za 2012 rok wynika, iż zachorowania na raka płuca stanowiły ponad 14% spośród 152 855 przypadków zachorowań na nowotwory złośliwe wśród polskich pacjentów. Ponad 80% wszystkich rozpoznanych nowotworów płuca należy do grupy niedrobnokomórkowych nowotworów płuca.

Do tej pory zidentyfikowano kilka głównych zmian komórkowych o podłożu genetycznym, które prowadzą do powstania niedrobnokomórkowego raka płuca takich jak mutacje w genie EGFR (10–35%) i KRAS (15–25%) czy reorganizacja w genie ALK (3–7%).

Najbardziej powszechnym czynnikiem ryzyka zachorowania na raka płuca jest palenie tytoniu. Na drugim miejscu klasyfikuje się kontakt z kancerogennymi substancjami chemicznymi i pierwiastkami promieniotwórczymi. Czynnikiem, który już w latach 80. ubiegłego stulecia zaczął być rozważany jako powodujący wzrost ryzyka zachorowania na raka płuca jest zanieczyszczenie środowiska, a przede wszystkim – powietrza. Pozostałymi czynnikami ryzyka zachorowania na raka płuca są: uwarunkowania genetyczne, wiek i wcześniej przebyte nowotwory.

W związku z tym, dużego znaczenia nabierają próby opracowania nowych metod terapeutycznych związanych z zablokowaniem istotnych dla komórek nowotworu procesów molekularnych np. zdolności do namnażania komórek. Do metod tych zaliczyć można analizę działania kinaz białkowych z rodziny Polo, które mają istotny wpływ na

proliferację komórek. Pomimo stwierdzenia zmian w ekspresji i aktywności tych kinaz w różnych komórkach nowotworowych niewiele spotkać można doniesień dotyczących ekspresji tych kinaz w przypadku nowotworów płuca.

Szczególnie klinicysta docenia każdy wkład badawczy zmierzający do zwiększenia efektywności leczenia raka płuca obarczonego tak dużym odsetkiem niepowodzeń. W świetle powyższych faktów wybór tematu rozprawy doktorskiej uważam za w pełni uzasadniony.

Przedłożona do recenzji dysertacja Pana lek. med. Wojciecha Laudańskiego ma zdecydowanie charakter poznawczy.

Badaniem objętych zostało 148 chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca leczonych operacyjnie od grudnia 2003 do maja 2010 roku w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Wszyscy pacjenci poddani byli badaniom podmiotowym i przedmiotowym ze szczególnym uwzględnieniem palenia tytoniu, narażenia zawodowego, chorób towarzyszących czy chorób nowotworowych w rodzinie. Wszyscy chorzy operowani byli metodą otwartą przez torakotomię przednio- lub tylno-boczną. Po operacji wszyscy pacjenci obserwowani byli przez okres co najmniej 5 lat pod kątem nawrotu choroby nowotworowej.

Materiał do badań stanowiły wycinki z guzów pierwotnych niedrobnokomórkowych nowotworów płuca oraz tkanki nienowotworowej otaczającej guz, oddalonej co najmniej o 3 cm od nowotworu. Izolacja całkowitego RNA z tkanek przeprowadzona została techniką magnetyczną, a wyizolowane z wycinków tkanek cząsteczki RNA zostały przepisane na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji.

Poziom mRNA genów PLK1 i PLK3 w badanych tkankach doktorant określił stosując standardową metodę analizy dynamiki zmian ilości produktu w czasie rzeczywistym zwaną Real Time PCR oraz metodę względnej oceny ilości matrycy zwanej również metodą $\Delta\Delta Ct$.

Całkowite przeżycie chorych zostało ustalone jako okres od daty operacji usunięcia guza pierwotnego do daty zgonu lub ostatniej wizyty kontrolnej. U wszystkich pacjentów został określony typ histologiczny raka płuca oraz stadium zaawansowania choroby. U chorych na gruczolakoraka płuca znany był również status mutacyjny genu *KRAS*.

W interpretacji wyników swoich badań Autor zastosował analizę statystyczną wykorzystując w tym celu pakiet statystyczny Stata/SE w wersji 11.1. W celu porównania poziomów ekspresji mRNA kinaz PLK1 i PLK3 w guzach i nienowotworowych tkankach płuca wykorzystał nieparametryczny *test Wilcoxona* dla par danych. Do analizy powiązań pomiędzy względną ekspresją badanych genów w guzach, a parametrami kliniczno-patologicznymi pacjentów zastosował *nieparametryczne testy Wilcoxona* i *Kruskala-Wallisa*. Natomiast do oceny wpływu badanych parametrów molekularnych na przeżycie pooperacyjne chorych *krzywe Kaplana-Mejera* i *log-rank test*. Ponadto oszacowanie znaczenia prognostycznego analizowanych

zmiennych przeprowadził stosując *wieloczynnikowy model oceny proporcjonalnych hazardów Coxa.* Za wyniki istotnie statystyczne przyjął wyniki na poziomie $p < 0.05$.

Analiza wpływu parametrów kliniczno-patologicznych na całkowite przeżycie pooperacyjne chorych na NDRP (z wykorzystaniem modelu Hazarda Coxa) nie pozwoliła na uchwycenie znamiennych statystycznie różnic w odniesieniu do czasu przeżycia. Prezentowane wyniki badań w odniesieniu do poszczególnych przekrojów badawczych wykazują jednak istotny walor naukowy.

Układ pracy zgodny jest z powszechnie przyjętymi zasadami budowania prac naukowych i dostosowany do omawianych problemów oraz sposobów ich rozwiązywania.

Praca liczy 96 stron, 6 tabel, 10 rycin, 233 pozycje piśmiennictwa, 2 załączniki, wykaz stosowanych skrótów oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Została podzielona na 5 części poprzedzonych wstępem, w którym Autor wprowadza w tematykę swoich badań. Pierwsza część stanowi tzw. część literaturową. Kolejne 4 części stanowią klasyczną część doświadczalną, na którą składają się cel pracy, metodyka badań. bardzo dokładna analiza wyników badań własnych oraz obszerna dyskusja wyników, która uzupełniona jest o Wnioski, Streszczenia i Piśmiennictwo. Na końcu umieszczony został również Wykaz najczęściej stosowanych skrótów i Załączniki.

W części literaturowej Autor wyczerpująco i dogłębnie zaznajamia ze stanem wiedzy dotyczącym raka płuca jak również szczegółowo omawia kinazy białkowe Polo i ich udział w transformacji nowotworowej komórek.

W dalszej części swojej dysertacji Doktorant przedstawia cel swojej pracy składający się z jednego problemu głównego oraz 4. problemów szczegółowych. Następnie przedstawia materiał badawczy, szczegółowy opis procedury badania oraz metody wykorzystane w analizie statystycznej wyników.

Kolejną częścią recenzowanej rozprawy jest analiza wyników badań własnych, na którą składa się wyznaczenie poziomu mRNA kinaz PLK1 i PLK3 w guzach płuca oraz 4. zależności związanych z poziomem ekspresji mRNA.

Na szczególną uwagę zasługuje dyskusja wyników, w której Doktorant wykazuje duże przygotowanie merytoryczne, jak również znajomość najnowszej literatury dotyczącej przedstawianego tematu.

Zebrane w siedmiu punktach wnioski końcowe poszerzają naszą wiedzę na temat raka płuca, którą można wykorzystać do efektywniejszej pomocy chorym na raka płuca. Dla przykładu badania przeprowadzone przez Doktoranta wykazały, że nasilenie zmian w aktywności genów kinaz z rodziny POLO w procesie kancerogenezy zależy od cech kliniczno-patologicznych, a poziom ekspresji PLK3 może mieć znaczenie rokownicze dla wyselekcjonowanych grup chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca.

Dobrze opracowane tabele, jak również przejrzyste ryciny znakomicie obrazują wyniki badań. W tym miejscu chciałabym zwrócić uwagę na pewne drobne błędy związane ze sposobem przedstawiania wyników. Przykładem niech będzie Rycina 4.7 na

stronie 53. Przedstawiona liczba danych powoduje, że na krzywej z wysoką ekspresją mRNA zaobserwować można niczym nie uzasadniony gwałtowny spadek przeżycia w 90. miesiącu od operacji. Autor nie ustrzegł się również także błędów literowych i interpunkcyjnych np. str. 9 – „*Rak* wielkokomórkowyktóry", czy również na tej stronie odnośnik literaturowy „[83R]". Oczywiście przedstawione powyżej uchybienia nie wpływają na merytoryczną wartość rozprawy.

Na szczególne uznanie zasługuje interpretacja wyników własnych oraz przeprowadzona nad nimi dyskusja na tle właściwie dobranego i aktualnego piśmiennictwa. Wyważona interpretacja wyników badań własnych w istotny sposób podnosi wartość pracy oraz świadczy o dojrzałości naukowej Doktoranta. Przekonywująco i z dużym umiarem dochodzi Doktorant do wniosków wynikających bezpośrednio z przeprowadzonych badań i odpowiadających założonym celom pracy.

Reasumując, w oparciu o duży materiał doświadczalny, uzyskany przy zastosowaniu nowoczesnych i wiarygodnych metod, głęboką wiedzę Doktoranta, uważam, że omawiana dysertacja w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom na stopień doktora nauk medycznych zawartych w ustawie z 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki Dz. U. z 2003 r. Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami. Pozwalam więc sobie postawić wniosek Wysokiej Radzie Naukowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. med. Wojciecha Laudańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Konsultant Wojewódzki
w dziedzinie onkologii klinicznej
Elżbieta Starosławska
prof. dr hab. med. Elżbieta Starosławska

Lublin, 30 maja 2017 r.