KATEDRA I ZAKŁAD PATOMORFOLOGII KLINICZNEJ UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO W LUBLINIE
Kierownik Prof. dr hab. n. med. Justyna Szumiło
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b, tel. (81) 448 65 30; 448 65 32 fax (81) 448 65 31
e-mail: patomorfologia@umlub.pl www.patomorfologia.lublin.pl

Ocena

rozprawy doktorskiej lekarz Magdaleny Małgorzaty Rokickiej

pt. ***Ocena ekspresji białek p16, p21, p53 oraz Ki67 i obecności hrHPV w neoplazji wewnątrznabłonkowej małego i dużego stopnia oraz rakach szyjki macicy***

wykonanej na Wydziale Lekarskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

promotor – dr hab. n. med. Joanna Reszeć

promotor pomocniczy – dr n. med. Piotr Szymon Bernaczyk

Rak szyjki macicy stanowi bardzo ważny problem medyczny i społeczny na świecie, zwłaszcza w krajach niższym statusie ekonomicznym. Powoduje ok. 13% zachorowań na nowotwory u kobiet na świecie i ok. 3,5% w Polsce. Najbardziej racjonalnym sposobem zmiany niekorzystnego trendu jest wdrażanie skutecznych programów profilaktycznych, pozwalających na wczesne wykrywanie zmian przedrakowych lub nowotworu we wczesnym stadium, a w ostatnim okresie także zakażeń wirusem brodawczaka ludzkiego, zwłaszcza szczepami o wysokim ryzyku onkogennym.

W nurt poszukiwań czynników wpływających na rozwój zmian prekursorowych i raka szyjki macicy wpisują się badania lekarz Magdaleny Małgorzaty Rokickiej.

Rozprawa jest monografią o typowy układzie, liczącą 123 strony wydruku komputerowego.

W 23. stronnicowym wstępie, Doktorantka przedstawia zagadnienia dotyczące etiopatogenezy raka szyjki macicy, koncentrując się na roli wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV), uwzględniając jego budowę i cykl życiowy. Opisuje także budowę i funkcję białek zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego tj. p16, p53, p21 i Ki-67, będących przedmiotem podjętych badań. Wstęp kończy podrozdział dotyczący programu profilaktycznego raka szyjki macicy, w którym wymienia stosowane metody diagnostyczne oraz podaje rekomendacje opiniotwórczych towarzystw naukowych i zmiany jakie w nich zachodziły

w związku z postępem badań. Wstęp uzupełniają trzy tabele i cztery ryciny, będące cytowanymi zapożyczeniami z innych publikacji.

Następny rozdział w dysertacji, to ten, którego nie ma, czyli sprecyzowany cel prowadzonych badań naukowych. Można się go oczywiście domyślać na podstawie tytułu rozprawy, jednak to za mało i trudno się na tej podstawie odnieść się w pełni do metodyki, uzyskanych wyników, a zwłaszcza wniosków.

Kolejny rozdział dotyczy materiału i metod. Nie budzą one większych zastrzeżeń. Badania zostały przeprowadzone na materiale pochodzącym od 65 pacjentek. Doktorantka nie podaje informacji o jednostkach, w których były diagnozowane i leczone pacjentki ani w jakim czasie gromadzono materiał badawczy. Opisuje zasady oceny histologicznej oraz metodykę wykonywania odczynów immunohistochemicznych na białka p53, p16, p21 i Ki-67, przy zastosowaniu komercyjnych przeciwciał. Odczyn na p16 przeprowadzała na aparacie Ventana Benchmark Ultra (Roche), natomiast pozostałe manualnie, z zastosowaniem typowych procedur. Dla każdego odczynu przeprowadzała odpowiednie kontrole. Doktorantka przedstawiła zasady oceny mikroskopowej poszczególnych odczynów. Nie podaje jednak, czy są one autorskie, czy w oparciu o literaturę przedmiotu. Brak informacji o zgodzie komisji bioetycznej na przeprowadzenie prac i użycie materiału ludzkiego, co może w przyszłości utrudnić publikację wyników badań.

Następnie prezentuje poszczególne etapy analizy obecności DNA wirusowego w wycinkach z szyjki macicy z użyciem zestawów komercyjnych. Uwzględnia izolację DNA z badanych skrawków tkankowych, amplifikację metodą PCR ze starterami, jak pisze Doktorantka, „małego i dużego ryzyka", hybrydyzację produktów reakcji PCR przy pomocy pasków *High i Low Papilloma Strip* (Operon) oraz analizę uzyskanych danych. W opisie Doktorantka nietypowo podchodzi do specyfikacji niektórych odczynnikówi ich producentów, podając je w nazwie dwóch podrozdziałów, stosuje też intrygujące określenie „*Genomic DNA from tkanka*". Tytuł pracy i nagłówek podrozdziału 2.4 sugerują, że oceniano tylko obecność wirusów o wysokim ryzyku (hrHPV), natomiast z treści metodyki wynika, że wykrywano także wirusy niskiego ryzyka. Gen kontrolny to nie GADPH ale GAPDH. Na końcu skrótowo przedstawia analizę statystyczną. Doktorantka nie podaje jednak nazwy programu komputerowego, z którego najpewniej korzystała, a odnośnik do tabeli 1 jest nieprawidłowy (powinno być: tabela 4).

Najistotniejszą częścią pracy lek. Magdaleny Rokickiej jest rozdział dotyczący wyników. Doktorantka zamieściła w nim dodatkowo czternaście rycin i jedną tabelę. Obszerną tabelę 5, znajdującą się bezpośrednio po dyskusji i zestaw fotografii barwnych należy również uznać za integralną część wyników. W badanej grupie 65 pacjentek (wiek 22-93 lata) raka gruczołowego

szyjki rozpoznano u 8, raka płaskonabłonkowego u 9, neoplazję śródnabłonkową dużego stopnia (HSIL) u 30, a małego stopnia (LSIL) u 18 kobiet.

Ekspresję p21 stwierdzono we wszystkich rakach zarówno płaskonabłonkowych, jak i gruczołowych, przy czym była ona silna (w >50% badanych komórek) we wszystkich rakach płaskonabłonkowych i w 5 z 8 gruczołowych. Także w neoplazji dużego stopnia stwierdzono silną ekspresję białka (w 22 na 30 przypadków). Natomiast najsłabsza ekspresja występowała w neoplazji małego stopnia (silna jedynie w 8 z 18 przypadków). Ekspresja była istotnie wyższa w raku płaskonabłonkowym w porównaniu z rakiem gruczołowym i neoplazjami.

Ekspresja białka p16 była najwyższa w raku płaskonabłonkowym i neoplazji dużego stopnia (silna ekspresja w 28 z 38 przypadków). W neoplazji śródnabłonkowej małego stopnia ekspresja p16 była bardzo zróżnicowana. Natomiast w raku gruczołowym stwierdzono silną ekspresję we wszystkich przypadkach.

Ekspresja Ki-67 w gruczolakoraku szyjki macicy wynosiła 10-30%, w raku płaskonabłonkowym – 30-40%, neoplazji śródnabłonkowej dużego stopnia 20-30%, a neoplazji małego stopnia – 10-20%.

Obecność DNA wirusa brodawczaka ludzkiego o wysokim ryzyku onkogennym stwierdzono we wszystkich przypadkach raka gruczołowego szyjki macicy, w 6 na 9 przypadków raka płaskonabłonkowego, w 22 na 30 neoplazji śródnabłonkowych dużego stopnia i w 9 na 18 neoplazji małego stopnia.

Doktorantka pominęła szczegółowy opis wyników dotyczących białka p53, chociaż zaprezentowała graficznie te informacje (ryciny 13-18).

Lek. Rokicka wykazała istotny statystycznie związek między ekspresją białka p16 a rozpoznaniem histopatologicznym – największa ekspresja występowała w raku płaskonabłonkowym i gruczołowym oraz neoplazji śródnabłonkowej dużego stopnia. Stwierdziła statystycznie istotny związek między ekspresją białka p16 i ekspresją białka p53, p21 i Ki-67 oraz obecnością hrHPV. Istotna zależność występowała również między rozpoznaniem histopatologicznym (rodzajem zmiany) i ekspresją białek p53, p21 i Ki-67. Wykazała silną korelację między ekspresją białka p53 a ekspresją pozostałych białek i obecnością hrHPV. Nie wykazała natomiast zależności między obecnością hrHPV i typem histologicznym zmian, jednak największy odsetek zmian HPV(+) stanowiły raki gruczołowe, płaskonabłonkowe i HSIL. W Tabeli 4 podsumowującej analizę statystyczną wyników opisy kolumn i wierszy są w języku angielskim oraz brakuje wyjaśnień skrótów i „gwiazdek".

Przy okazji rozdziału Wyniki należy wspomnieć, że Doktorantka – co prawda przedstawiła wybrane informacje kliniczno-patologiczne we wspomnianej wcześniej tabeli 5 – jednak nie podała żadnych danych „surowych" ani z wyników odczynów immunohistochemicznych

ani z analizy DNA HPV. Brak także informacji o stopniu zaawansowania raków szyjki macicy, chociaż w dyskusji Doktorantka odnosi się do tego parametru ze swoich badań.

W obszernej Dyskusji, liczącej 26 stron, Doktorantka prezentuje pokrótce wyniki licznych badań o tematyce identycznej lub zbliżonej do podjętej w badaniach własnych. Konfrontuje je z uzyskanymi przez siebie wynikami i stara się rzeczowo wyjaśnić ewentualne rozbieżności. Szczególnie wartościowe są tutaj dane dotyczące białka p21, które nie było zbyt intensywnie badane w neoplazji śródnabłonkowej szyjki. W mojej opinii dyskusja potwierdza dobrą znajomość przez Doktorantkę problematyki będącej tematem dysertacji.

Następnie lek. Magdalena Rokicka formułuje siedem wniosków:

1. Wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania neoplazji śródnabłonkowej szyjki macicy zwiększa się ekspresja białka p21, p53 i Ki-67.
2. Wraz ze wzrostem stopnia zaawansowania neoplazji śródnabłonkowej szyjki macicy zwiększa się znamiennie ekspresja białka p16.
3. Występuje istotna zależność pomiędzy wzrostem ekspresji białka p16 i Ki-67 w badanych zmianach.
4. Występuje znamienna zależność pomiędzy zwiększoną ekspresją białek p16, p21, p53 i Ki-67 a infekcją wirusem hrHPV w badanych zmianach.
5. W przypadkach, gdzie morfologicznie zmiana jest zaawansowana (HSIL), zaś ekspresja białka p16 jest niska, ekspresję białka p21 należy analizować wspólnie z ekspresją białka p53.
6. Zwiększona ekspresja białek p21 i p53 może występować niezależnie od infekcji hrHPV.
7. W grupie pacjentek hrHPV dodatnich, ocena ekspresji białek Ki-67, p21 i p53 pozwala przewidzieć, czy infekcja ulegnie regresji (samowyleczeniu) czy występuje w formie przetrwałej.

Ze względu na brak wyraźnego celu badań, nie można jednoznaczne określić czy wnioski z pracy spełniają wcześniejsze założenia. Niemniej jednak podsumowują podjęte badania a Doktorantka stara się podkreślić pewne aspekty praktyczne, np. możliwość przewidzenia regresji lub przetrwania infekcji HPV na podstawie uzyskanych odczynów. Uważam jednak, że bez szczegółowego zagłębiania się w wyniki, nie do końca jasny jest wniosek 5. i 7., które zdecydowanie wymagają doprecyzowania.

W skład dysertacji wchodzi także spis anglojęzycznego piśmiennictwa, które liczy 155 pozycji. Piśmiennictwo jest odpowiednio dobrane i zawiera także pozycje najnowsze. Niejasna jest jednak kolejność poszczególnych pozycji w spisie, ponieważ nie spełnia ona kryteriów ani kolejności alfabetycznej ani kolejności pojawiania się w tekście. W niektórych pozycjach

nie zastosowano skrótów nazw czasopism (np. #8, 11, 100), rok ukazania się pracy jest umieszczany dowolnie – po autorach lub po nazwie czasopisma a przy nazwiskach niektórych autorów pozostawiono odnośniki.

Ważnym elementem pracy jest dokumentacja fotograficzna. Doktorantka przedstawiła 22 przykładowe zdjęcia z preparatów barwionych rutynowo oraz z odczynów immunohistochemicznych. Zdjęcia są dobrej jakości i stanowią doskonałą wizualizację uzyskanych wyników. Brak zdjęć z przykładowych opisanych pasków *High* i *Low Papilloma Strip*.

Doktorantka umieściła w rozprawie także użytych skrótów zastosowanych oraz spisy rycin, fotografii i tabel, co ułatwia czytelnikowi odnalezienie interesujących informacji w tekście.

Mam także uwagi natury edytorskiej. Zgodnie z przyjętymi zwyczajami podpisy rycin i fotografii powinny się znajdować poniżej tychże a po podpisach należy umieścić kropkę. Doktorantka stosuje też czasami nieprecyzyjne lub błędne sformułowania i potoczne słownictwo np. chora tkanka (str. 74), ujemna ekspresja białka (str. 64, 69, 73), poziom zaawansowania nowotworu (str. 69), zmiany reaktywne śródbłonka (str. 57) lub zmiany przedrakowe śródbłonka szyjki macicy, chociaż opisy dotyczyły nabłonka (str. 59). Zarówno na końcu wstępu, jak i na końcu dyskusji brak krótkiego podsumowania wcześniejszych dywagacji.

Podsumowując, ważki temat podjęty w badaniach, wiarygodne metody oceny badanych parametrów, pewne aspekty praktyczne uzyskanych wyników i dobra znajomość prezentowanych zagadnień wykazana przez lekarz Magdalenę Małgorzatę Rokicką, upoważniają mnie do stwierdzenia, że oceniana dysertacja w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom na stopień doktora zawartych w ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r., poz. 1668 ze zm.). W związku z tym wnoszę do Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lekarz Magdaleny Małgorzaty Rokickiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, dnia 3 lutego 2020 r.

Prof. dr hab. n. med. Justyna Szumiło

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu
Patomorfologii Klinicznej
prof. dr hab. n. med. Justyna Szumiło