



Warszawa, dnia 16 maja 2022 r.

**Recenzja rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych  
i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne**

**Mgr. Marcina Nizioła**

**Pt. „Ocena immunohistochemiczna ekspresji białek adhezyjnych  
z rodziny tensyn w raku żołądka”.**

Rak żołądka stanowi istotny problem kliniczny ze względu na liczbę zachorowań (rocznie około miliona na całym świecie) jak i również na wyniki leczenia (większość chorych umiera, prawie 770 tysięcy rocznie). W Polsce pod względem częstości występowania zajmuje 6 miejsce u mężczyzn (w 2019 roku 3230 przypadków), rzadziej występuje u kobiet (1870 przypadków w 2019 roku) i był przyczyną zgonów odpowiednio u 3116 mężczyzn oraz 1716 kobiet.

Pod względem histopatologicznym najczęściej jest to rak gruczołowy. Natomiast najważniejsze czynniki odpowiedzialne za rozwój raka żołądka to: infekcja bakterią *Helicobacter pylori* (karcynogen typu I), codzienna dieta (duże ilości słonego, wędzonego, smażonego i grillowanego czerwonego mięsa – głównie chlorek sodu, związki N-nitrozowe), palenie papierosów, infekcja wirusem Epsteina-Barra, mutacja w genie *CDH1* (dziedziczny rozlany rak żołądka), zespół Lyncha, rodzinna polipowatość gruczołakowata, zespół Li-Fraumaniego, polipowatość młodzieńcza, polipowatość żołądka, zespół Peutza-Jeghersa.

W leczeniu radykalnym raka żołądka najważniejszą rolę odgrywa leczenie chirurgiczne poprzedzone przedoperacyjną, neoadiuwantową chemioterapią. W przypadku rozsiewu choroby nowotworowej zastosowanie ma głównie paliatywna chemioterapia oraz znacznie rzadziej immunoterapia (trastuzumab w rakach HER 2 dodatnich) czy pembrolizumab przy potwierdzeniu niestabilności mikrosatelitarnej lub wysokiego TMB (ang. tumor mutational burden).



Ważnym elementem rozwoju każdego nowotworu jest komunikacja pomiędzy komórkami a macierzą zewnątrzkomórkową w oparciu o wiązania adhezyjne. Stanowią one „klucz” dla różnicowania komórek, utrzymania struktury morfologicznej oraz ich prawidłowego wzrostu. Najważniejsze grupy białek adhezyjnych obejmują: integryny, kadheryny, selektyny, nadrodzina immunoglobulin oraz CD44, a ich obecność związana jest z procesami karcynogenezy (migracja, inwazja czy przerzutowanie).

Istotną grupę białek adhezyjnych stanowi rodzina tensyn, w skład której wchodzi cztery cząsteczki: tensyna 1 (TNS1), tensyna 2 (TNS2), tensyna 3 (TNS3) oraz tensyna 4 (TNS4/CTEN). Ich rola związana jest z tworzeniem mostków zwanych mostkami adhezji fokalnej pomiędzy włóknami aktynowymi a  $\beta$ -integrynami, umożliwiającymi transmisję sygnałów pomiędzy środowiskiem wewnątrzkomórkowym i zewnątrzkomórkowym oraz zaangażowaniem w szlaki przekazywania sygnałowego.

Białko TNS1 zlokalizowane w miejscach adhezji fokalnej oraz w połączeniach transbłonowych pomiędzy cytoszkieletem komórkowym a macierzą zewnątrzkomórkową i jest istotnym czynnikiem podczas prawidłowego procesu migracji komórkowej (posiada zdolność hamowania nowotworów poprzez kontrolę nadmiernej migracji komórek nowotworowych). Białko TNS2 również lokalizuje się w miejscach adhezji fokalnej, a jego nadekspresja przyczynia się do apoptozy oraz zahamowania proliferacji i ruchliwości komórek. Pełni ono także funkcję regulatora szlaku sygnałowego PI3K/Akt hamując rozwój nowotworu. Białko TNS3 jest również obecne w miejscach adhezji fokalnej i pełni ważną rolę w procesie powstawania nowotworu przyczyniając się do nabycia zdolności inwazyjnych przez komórki nowotworowe. TNS4 jest białkiem z rodziny tensyn o najmniejszej masie cząsteczkowej, a jego rola obejmuje procesy związane z motoryką komórek, apoptozą, homeostazą czynników wzrostowych i potencjałem onkogennym.

Mgr Marcin Nizioł określił precyzyjnie cele główne swojej pracy:

1. Ocena ekspresji białek adhezyjnych: TNS1, TNS2, TNS3 oraz TNS4 w raku żołądka w porównaniu do prawidłowej błony śluzowej.
2. Wykonanie korelacji pomiędzy ekspresją tych białek a wybranymi parametrami kliniczno-histopatologicznymi raka żołądka.
3. Wykonanie korelacji pomiędzy ekspresją tensyn a całkowitym przeżyciem pacjentów.



Pod względem formalnym rozprawa doktorska oparta jest na trzech publikacjach o łącznym współczynniku oddziaływania 8,197 oraz punktacji MNiSW 300 punktów:

1. **Nizioł Marcin**, Pryczynicz Anna. The role of tensins in malignant neoplasms. Archives of Medical Science. 2021. DOI: 10.5114/aoms/127085; IF: 3,318; MEiN: 100 pkt.
2. **Nizioł Marcin**, Zińczuk Justyna, Zaręba Konrad, Guzińska-Ustymowicz Katarzyna, Pryczynicz Anna. Immunohistochemical Analysis of the Expression of Adhesion Proteins: TNS1, TNS2 and TNS3 in Correlation with Clinicopathological Parameters in Gastric Cancer. Biomolecules. 2021; 11(5):640. DOI: 10.3390/biom11050640; IF: 4,879; MEiN: 100 pkt.
3. **Nizioł Marcin**, Zińczuk Justyna, Zaręba Konrad, Guzińska-Ustymowicz Katarzyna, Pryczynicz Anna. Increased tensin 4 expression is related to the histological type of gastric cancer. World Journal of Clinical Oncology. 2021; 12(12):1202-1214. DOI: 10.5306/wjco.v12.i12.1202; MEiN: 100 pkt.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach

W tym miejscu chciałbym podkreślić fakt interdyscyplinarności przeprowadzonych badań naukowych, co nadaje im praktycznego znaczenia i być może zastosowania.

Na projekt badawczy uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku nr: R-I-002/29/2019.

W publikacji pierwszej (**Nizioł Marcin**, Pryczynicz Anna. The role of tensins in malignant neoplasms. Archives of Medical Science. 2021; DOI: 10.5114/aoms/127085), która jest publikacją pogłówną Kandydat zgłębił swoją wiedzę na temat białek TNS1, TNS2, TNS3, TNS4 przygotowując się jednocześnie do postawienia hipotez badawczych oraz przeprowadzenia badań naukowych. Opisał on na podstawie aktualnej literatury anglojęzycznej strukturę 4 białek adhezyjnych: TNS1, TNS2, TNS3 oraz TNS4, a także określił ich rolę w procesach fizjologicznych i rozwoju nowotworów. Na podstawie dotychczasowych wyników dostępnych i wykonanych analiz naukowych wywnioskował, że nie można jednoznacznie uzyskać odpowiedzi jaką rolę odgrywają tensyny w nowotworach, co skłoniło go do dalszych badań i znaczenia innych białek adhezyjnych w rozwoju nowotworów. W przyszłości mogą one znaleźć zastosowanie w praktyce klinicznej np. jako biomarkery czy cele terapeutyczne nowych leków.

Kolejne dwie publikacje (**Nizioł Marcin**, Zińczuk Justyna, Zaręba Konrad, Guzińska-Ustymowicz Katarzyna, Pryczynicz Anna. Immunohistochemical Analysis of the Expression of Adhesion Proteins: TNS1, TNS2 and TNS3 in Correlation with Clinicopathological Parameters in Gastric Cancer. Biomolecules. 2021; 11(5):640. DOI: 10.3390/biom11050640 oraz **Nizioł Marcin**, Zińczuk Justyna, Zaręba Konrad, Guzińska-Ustymowicz Katarzyna,



Pryczynicz Anna. Increased tensin 4 expression is related to the histological type of gastric cancer. *World Journal of Clinical Oncology*; 2021; 12(12):1202-1214;  
DOI:10.5306/wjco.v12.i12.1202) dotyczą pracy badawczej oraz służą rozwiązaniu oryginalnych problemów naukowych.

Materiał badawczy ekspresji białek TNS1, TNS2, TNS3 oraz TNS4 stanowiła grupa 90 pacjentów z rozpoznaniem rakiem żołądka leczonych operacyjnie w II Klinice Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku w latach 2005-2015, którzy spełnili kryterium jakim było rozpoznany rak gruczołowy w każdym stadium zaawansowania. Natomiast kryteria wykluczające obejmowały: rozpoznany rak płaskonabłonkowy, inne nowotwory nienabłonkowe, przerzuty innych nowotworów do żołądka oraz brak dostępu pełnej dokumentacji medycznej. Z kolei tkankę kontrolną stanowiła prawidłowa błona śluzowa z otoczenia nowotworu.

Kolejne etapy prac badawczych zawierały: krojenie bloczków parafinowych na mikrotomie na skrawki o grubości ok. 4µm na szkiełka silanizowane, całonocną inkubację w cieplarni w temperaturze 60°C, odparafinowanie w roztworach ksylenów, uwodnienie w alkoholach o malejącym stężeniu (2 x 99,9%, 96%, 70%), odsłanianie antygenów w buforze cytrynowym o pH=6,0 w łaźni wodnej w temperaturze 97,5°C przez 20 minut, a następnie w temperaturze pokojowej przez 20 minut (dla białka TNS4 nie przeprowadzano odsłaniania antygenów, natomiast w kolejnym etapie zablokowano endogenną peroksydazę poprzez użycie 3% wody utlenionej przez 10 minut oraz niespecyficzne wiązanie przeciwciał używając surowicy końskiej anti Mouse/Rabbit serum produced in Horse, Vector Laboratories, Germany przez 20 minut), inkubację z poliklonalnymi przeciwciałami anti-TNS1, anti-TNS2, anti-TNS3 oraz anti-TNS4 w rozcieńczeniu odpowiednio: 1:200, 1:100, 1:250 oraz 1:75 przez 30 minut w temperaturze pokojowej, uwidocznienie miejsca wiązania przeciwciał za zastosowaniu zestawu ImmPress Universal Antibody Polymer Reagent - Vector Laboratories, Germany oraz chromogenu ImmPACT DAB (Vector Laboratories, Germany), podbarwienie jąder komórkowych hematoksyliną, odwodnienie w szeregu alkoholi o rosnącym stężeniu oraz prześwietlenie w roztworach ksylenów. W celu optymalizacji procedury barwienia białek TNS1, TNS2, TNS3 oraz TNS4 dalszy etap pracy doświadczalnej dotyczył przeprowadzenia kontroli pozytywnej i negatywnej poprzez przetestowanie wybranych rozcieńczeń przeciwciał pierwszorzędowych (1:50, 1:75, 1:100, 1:200, 1:250, 1:400) oraz wybrane czasy inkubacji (30 minut, 60 minut, 120 minut).



Zgodnie ze standardami światowymi preparaty zostały obejrzone oraz ocenione przez dwóch niezależnych patomorfologów w mikroskopie świetlnym Olympus BX41.

Ocena ekspresji błonowej jak i również cytoplazmatycznej białek TNS1, TNS2, TNS3 oraz TNS4 została dokonana pod powiększeniem 400x w 10 reprezentatywnych polach widzenia, w każdym polu widzenia  $\geq 100$  komórek nowotworowych. Za ekspresję pozytywną uznawano obecność białka TNS1 w  $>5\%$  komórek nowotworowych, TNS2 w  $>10\%$  komórek nowotworowych, TNS3 w  $\geq 20\%$  komórek nowotworowych a TNS4 w  $\geq 20\%$  komórek nowotworowych.

Użyte przez Doktoranta metody analiz statystycznych: test *t-studenta*, test Mana-Whitney'a dla dwóch grup oraz testu Kruskala-Wallisa dla 3 i więcej grup, post-hoc Dunn's Multiple Comparisons test (dla testu Kruskala-Wallisa), estymator Kaplana - Meiera zostały dobrane w sposób prawidłowy i zgodny z zasadami statystycznymi opracowania wyników także dla małych grup.

Mgr Marcin Nizioł w swojej pracy badawczej uzyskał następujące wyniki:

1. *Ekspresja białek TNS1, TNS2, TNS3 oraz TNS4 w próbkach raka żołądka*

W przedstawionej pracy wykazano, że ekspresja białek TNS1, TNS2, TNS3 oraz TNS4 była wyższa w komórkach nowotworowych w porównaniu do komórek prawidłowej błony śluzowej żołądka. W oparciu o analizę mikroskopową wykazano, że dodatnia ekspresja białek TNS1, TNS2, TNS3 oraz TNS4 w komórkach nowotworowych występowała odpowiednio u 7 na 90 pacjentów (7,78%), 4 na 90 pacjentów (4,44%), 32 na 90 pacjentów (35,56%) oraz 49 na 89 pacjentów (55,00%). W komórkach nowotworu ekspresję tych białek została zaobserwowana zarówno w błonie komórkowej jak i w cytoplazmie.

2. *Porównanie ekspresji białek TNS1, TNS2, TNS3 oraz TNS4 z parametrami kliniczno-patologicznymi raka żołądka*

W analizie statystycznej Doktorant wykazał, że białko TNS1 było częściej obecne w nowotworach niezróżnicowanych (u 17,24% pacjentów) w porównaniu do nowotworów niskozróżnicowanych (u 5,71% pacjentów) oraz nowotworów średniozróżnicowanych (u 0,00% pacjentów) ( $p=0,016$ ). Obecność tego białka była także częściej obserwowana w nowotworach przerzutujących (u 21,43% pacjentów) w odniesieniu do nowotworów bez przerzutów odległych (u 1,61% pacjentów) ( $p=0,001$ ). Z kolei białko TNS2 było częściej obecne w nowotworach średniozróżnicowanych (u 11,54% pacjentów) w porównaniu do nowotworów niskozróżnicowanych (u 2,86% pacjentów) czy niezróżnicowanych (u 0,00% pacjentów) ( $p=0,041$ ). Ekspresja TNS2 była również częściej obserwowana w nowotworach



z obecnym zapaleniem okołoguzowym (u 9,52% pacjentów) w porównaniu do guzów bez otaczającego zapalenia (u 0,00% pacjentów) ( $p=0,041$ ) oraz z towarzyszącą infekcją *H. pylori* (u 13,64% pacjentów) niż w nowotworach bez tej infekcji (u 1,61% pacjentów) ( $p=0,023$ ). Natomiast białko TNS3 było częściej obecne w nowotworach średnioróżnicowanych (u 53,85% pacjentów) niż w nowotworach niskoróżnicowanych (u 31,43% pacjentów) i nowotworach niezróżnicowanych (u 24,14% pacjentów) ( $p=0,023$ ). Analizując ekspresję białka TNS4 stwierdził on, że występowała częściej w nowotworach żołądka o średnicy  $\geq 5$ cm (60,56% pacjentów z dodatnią ekspresją) w porównaniu do nowotworów o średnicy  $< 5$ cm (33,33% pacjentów) ( $p=0,004$ ), a jej wzrost był obecny w typie histologicznym bez komponenty śluzowej (u 64,81% pacjentów) w odniesieniu do nowotworów śluzowych (u 40,00% pacjentów) ( $p=0,023$ ). Ponadto zauważył, że białko TNS4 znacznie częściej obecne było w nowotworach średnioróżnicowanych (u 80,00% pacjentów) niż w nowotworach niskoróżnicowanych (u 57,14% pacjentów) czy niezróżnicowanych (u 31,03% pacjentów) ( $p=0,002$ ). Wykazał także, że obecność tego białka była częściej widoczna w nowotworach z rozpoznaniem typu jelitowego (70,45%) niż z typem rozlanym (44,44%) wg klasyfikacji Laurena ( $p=0,020$ ).

W ocenie zależności pomiędzy ekspresją białek TNS1, TNS2, TNS3 oraz TNS4 a całkowitym przeżyciem pacjentów mgr Marcin Nizioł nie wykazał znamienności statystycznej w zakresie tej korelacji (odpowiednio  $p=0,873$ ,  $p=0,599$ ,  $p=0,634$ ,  $p=0,25$ ).

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant wyciągnął wnioski, które były zgodne, z założonymi celami:

1. Białko TNS1 może pełnić rolę w rozwoju przerzutów raka żołądka, a także wpływać na rozwój szczególnych typów histologicznych.
2. Zapalenie spowodowane infekcją *H. pylori* może mieć wpływ na wzrost ekspresji białka TNS2 w komórkach raka żołądka.
3. Ekspresja białka TNS3 może mieć związek z dojrzałością histologiczną raka żołądka.
4. Zwiększony poziom ekspresji TNS4 jest związany z typem histologicznym raka żołądka o lepszym rokowaniu, a także może wiązać się ze wzrostem masy guza.



Pod względem formalnym rozprawa doktorska zawiera 14 typowych rozdziałów, 44 kluczowe pozycje piśmiennictwa oraz dołączono kopie opublikowanych prac łącznie z oświadczeniami współautorów i ich wkładzie w przygotowanie publikacji.

Temat, który podjął Doktorant jest niezwykle ważny, ponieważ rak żołądka należy do nowotworów bardzo źle rokujących o niskim odsetku wyleczalności. Wciąż poszukujemy nowych czynników prognostycznych, które w sposób przewidywalny potrafiłyby ocenić biologię a co za tym idzie agresywność nowotworu. Naszym celem jest także poszukiwanie czynników predykcyjne, które z kolei mogłyby przewidywać prawdopodobieństwo odpowiedzi na leczenie, zwłaszcza immunoterapią czy ukierunkowane molekularnie.

Praca jest ciekawa, przejrzysta, dobrze zaplanowana i czyta się ją z przyjemnością i lekkością. Doktorant w swojej pracy wykazał się dobrym warształem naukowym, umiejętnością spekulacyjnego i logicznego myślenia, które świadczą o znajomości zasad planowania i przeprowadzania badań naukowych. Potwierdza to również zgromadzony dotychczas dorobek naukowy publikacyjny, doniesienia zjazdowe oraz dodatkowe aktywności naukowe.

Nie ma także wątpliwości odnośnie znaczącego wkładu w pracę badawczą Doktoranta (we wszystkich publikacjach jest on pierwszym autorem), który niewątpliwie był znaczący i samodzielny, chociaż oczywiście pod opieką Promotora i Promotora pomocniczego.

W dyskusji, mgr Marcin Nizioł ocenił i porównał swoje wyniki z danymi literaturowymi w sposób prawidłowy z pewnym spojrzeniem krytycznym. W podsumowaniu i dyskusji powinny jednak zostać uwypuklone ograniczenia tej pracy wynikające z jednoośrodkowej rekrutacji chorych, małej grupy pacjentów czy jej retrospektywnego charakteru. Podkreślenia wymaga fakt konieczności walidacji uzyskanych wyników w innym ośrodku zewnętrznym. Piśmiennictwo jest nowoczesne, anglojęzyczne zawierające kluczowe pozycje dotyczące przedstawionego zagadnienia, które zostało zacytowane we właściwym miejscu.

Chciałbym także zaznaczyć, że oceniana przeze mnie praca może mieć swoje istotne implikacje kliniczne, jednak wymaga to potwierdzenia w badaniach bez ograniczeń o których wspomniałem powyżej. Wnioskiem płynącym z tej pracy jest konieczność dalszych badań w tym kierunku.

Po szczegółowym zapoznaniu się całością pracy jednoznacznie stwierdzam, że nie mam istotnych uwag obniżających jej poziom, tym bardziej, że przedstawiony cykl prac naukowych został już wcześniej oceniony merytorycznie przez recenzentów czasopism w których zostały opublikowane. I ja w chwili obecnej pełnię rolę re-recenzenta.



Jednak z obowiązku recenzenta znalazłem następujące drobne uchybienia, które znacząco nie umniejszają jej wartości:

1. W podsumowaniu oraz dyskusji powinny zostać podkreślone ograniczenia tej pracy wynikające z jednośrodkowej pracy, małej grupy pacjentów w grupach kontrolnych, jej retrospektywnego charakteru;
2. Brakuje mi także oceny zależności pomiędzy ekspresją tych białek a DFS (ang. disease-free survival) – czas wolny od nawrotu choroby u pacjentów leczonych radykalnie oraz PFS (ang. progression-free survival) – czas wolny od progresji choroby u chorych leczonym systemowo (np. chemioterapią); są to bardzo ważne wskaźniki przeżywalności chorych i taka analiza powinna zostać wykonana;
3. błąd stylistyczny/gramatyczny wymagający korekty:

- str. 7: „Nadekspresja białka TNS2 przyczynia się do apoptozę zahamowania proliferacji i ruchliwości komórek nerkowych oraz nasiloną ich w warunkach głodzenia” – nie do końca rozumiem to zdanie, czy nie powinno być tak sformułowane zdanie: Nadekspresja białka TNS2 przyczynia się do apoptozy, zahamowania proliferacji i ruchliwości komórek nerkowych nasilonych w warunkach głodzenia;

Pomijając moje drobne uwagi, przedstawiona do oceny rozprawa spełnia ustawowe wymogi na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Należy podkreślić, że badanie zostało zaplanowane, wykonane i opisane na dobrym poziomie naukowym i niewątpliwie stanowi próbę rozwiązania oryginalnego zagadnienia naukowego dotyczącego poszukiwania nowych biomarkerów i czynników prognostycznych raka żołądka.

W związku z powyższym z pełnym przekonaniem wnioskuję do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr. Marcina Nizoła do dalszych etapów procedury przewodu doktorskiego, a z racji uzyskania wysokiego współczynnika oddziaływania (IF=8,197) oraz wysokiej punktacji MNiSW (300 punktów) wnoszę o wyróżnienie.

Prof. dr hab. n. med. Rafał Stec  
prof. zw. dr hab. n. med. Rafał Wiesław Stec