

12.05.2024 r. Warszawa

dr hab. n. med. Roman Sosnowski

Klinika Urologii i Onkologii Urologicznej

Szpital Kliniczny Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji z Warmińsko-Mazurskim

Centrum Onkologii

w Olsztynie

Recenzja pracy doktorskiej lek. med. Pawła Samocika „**Ocena ekspresji kinazy tyrozynowej Brutona oraz białka HBXIP w korelacji z białkiem supresorowym PTEN w raku gruczołu krokowego**” przedstawionej mi do oceny przez Wydział Nauk o Zdrowiu, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku.

Przekazana mi do recenzji praca została wykonana pod kierunkiem Pani Dr hab. n. med. Joanny Pacewicz.

Praca liczy 97 stron i napisana jest w typowym układzie. Spis treści ma klasyczną, klarowną strukturę z podziałem na: wstęp, teoretyczne podstawy pracy, cele, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, spis rycin i tabel, spis mikrofotografii, wykaz skrótów. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę, że spis skrótów powinien być umieszczony na początku rozprawy doktorskiej co znacznie ułatwia czytanie dalszej części dysertacji.

Praca zawiera dziesięć rycin, szesnaście tabel, dwanaście mikrofotografii i sto sześćdziesiąt osiem pozycji piśmiennictwa. Recenzent zaleca, aby w przyszłości pisania publikacji naukowy korzystać z jednego systemu podawania odwołań prac naukowych np. tzw. system

vancouverski (system autor-numer), ułatwi to identyfikacja cytowanych pozycji. Zwraca uwagę brak daty publikacji referencji nr 51

Na uwagę zasługuje staranna strona redakcyjna i edytorska pracy.

Wstęp pracy rozpoczyna krótkie wprowadzenie poświęcone ogólnym informacjom związanym z biologią nowotworu gruczołu krokowego. Autor w zarysie określa aktualny stan wiedzy, ograniczenia poznawcze dotyczące rozwoju nowotworu i obszary wymagające dalszych wnikliwych analiz i badań, do których m.in. należy identyfikacja specyficznych dla tego schorzenia biomarkerów.

Pierwsza część wstępu dokładnie opisuje budowę anatomiczną stercza, wraz z ryciną przedstawiającą schematyczny układ poszczególnych stref prostaty. Kolejne części przedstawiają epidemiologię, etiologię raka prostaty ze szczególnym uwzględnieniem czynników genetycznych m.in. nosicielstwo genu BRCA2. Tę część wstępu kończy podrozdział opisujący czynniki ryzyka omawianej choroby.

Kolejny podrozdział przedstawia dokładny opis histopatologiczny uwzględniający różne podtypy nowotworów prostaty jak i współczesny podział złośliwości komórek nowotworowych. W następnych podrozdziałach autor przedstawia ocenę stopnia zaawansowania, grupy ryzyka i obraz kliniczny raka stercza. Kolejno autor przedstawia metody diagnostyczne wśród których wyróżnia grupę biomarkerów. Zgadzam się z badaczem, że posługiwanie się w codziennej praktyce klinicznej biomarkerami w wyraźny sposób poprawi dokładność procesu diagnostycznego. Warto dodać do wymienionej grupy biomarkery: 4Kscore oraz TMPRSS2:ERG. W ostatniej części diagnostycznej przedstawione są metody pobrania wycinków z narządu m.in. biopsja przekroczeniowa, którą obecnie EUA uznaje za metodę z wyboru w tej procedurze.

Następny podrozdział dotyczy różnych form leczenia raka prostaty. Ciekawy wątek przedstawiony przez doktoranta dotyczy historii leczenia zabiegowego tego schorzenia. Jest to szczególnie cenne, iż doktorant opisuje kroki milowe dotyczącej tego postępowania, gdyż dla wielu czytelników informacje te mogą być zupełnie nieznane. Należy nadmienić, iż celem zwiększenia dawki promieniowania w sytuacjach raka prostaty o wysokim ryzyku do radioterapii z pól zewnętrznych dodajemy tzw. boost brachyterapii umożliwiającą podwyższenie skuteczności przy zachowanych porównywalnych działaniach niepożądanych. W podrozdziale poświęconym leczeniu systemowemu autor przedstawia różne formy

deprywacji androgenowej wraz z uwzględnieniem nowoczesnych antyandrogenów. Recenzent zwraca uwagę, że poza ww. formami leczenia systemowego jedną z opcji postępowania jest chemioterapia pod postacią docetaxelu stosowana w chorobach o istotnym obciążeniu masą nowotworową.

Kolejnym wnikliwie przedstawionym rozdziałem jest onkogeneza raka prostaty. Autor dokładnie przedstawia jeden z podstawowych szlaków odgrywających główną rolę w rozwoju i progresji raka gruczołu krokowego jakim jest PI3K-Akt-mTOR i mający wpływ na wzrost, przeżywalność, metabolizm i proliferację komórkową. Opisane są główne punkty tego szlaku jak aktywacja PI3K, rola PTEN, aktywacja Akt, aktywacja mTOR, regulacja innych istotnych białek w procesie nowotworowym. Kolejno autor dokładnie przedstawia funkcje HBXIP oraz BTK które są zaangażowane w regulację szlaku sygnałowego PI3K/Akt. Rola pierwszego białka to wpływ na rozwój nowotworów oraz regulacji odpowiedzi immunologicznej, rola drugiej substancji to przede wszystkim wpływ na limfocyty B a w szczególności jej izoformy C wpływające na rozwój raka prostaty. Kolejnym opisanym białkiem jest PTEN odgrywającym istotną rolę w regulacji szlaków sygnałowych kontrolujących proliferację komórek. Właściwości przeciwnowotworowe PTEN wynikają przede wszystkim z jego wpływu na szlak sygnalizacyjny PI3K/Akt/mTOR, poprzez degradację PIP3 do nieaktywnego PIP2, co hamuje ten szlak i prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G1. Recenzent gratuluje doktorantowi przystępnego wyjaśnienia w tej części rozprawy skomplikowanych szlaków molekularnych związanych z rozwojem nowotworów co ma szczególne znaczenia w zrozumieniu założeń – celów pracy.

W kolejnym rozdziale precyzyjnie przedstawiono cele doktoratu do których zalicza się:

- Ocena ekspresji białka HBXIP, kinazy tyrozynowej Brutona oraz białka PTEN w komórkach gruczolakoraka zrazikowego oraz utkaniu nienowotworowym prostaty.
- Ocena zależności pomiędzy ekspresją białka HBXIP, kinazy tyrozynowej Brutona oraz białka PTEN a cechami histologicznymi pacjentów poddanych radykalnej prostatektomii.
- Ocena zależności pomiędzy ekspresją białka HBXIP, kinazy tyrozynowej Brutona oraz białka PTEN a cechami klinicznymi pacjentów poddanych radykalnej prostatektomii.

- Ocena zależności ekspresji badanych białek a utratą ekspresji białka PTEN– uznanego markera agresywnego przebiegu raka gruczołu krokowego.
- Ocena przydatności powyższych białek jako nowych, potencjalnych biomarkerów tkankowych raka stercza.

W rozdziale „Materiał i metodyka badań” autor przedstawia grupę poddanych analizie pacjentów, u których w latach 2017-23 w Oddziale Urologii Onkologicznej i Ogólnej Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego im. Jędrzeja Śniadeckiego w Białymstoku, gdzie wykonano u pacjentów radykalną prostatektomię bez neoadjuwantowej terapii. W oparciu o informacje z bazy danej szpitalnej pozyskano dane kliniczne. Badanie przeprowadzono w grupie 60 chorych z rozpoznaniem gruczolakorakiem prostaty. Średni wiek chorych w momencie operacji wynosił 65,7 lat (zakres od 54 do 79 lat). Preparaty obejmowały ognisko pierwotne raka w obrębie prostaty (60 przypadków) oraz zmiany przerzutowe w węzłach chłonnych (17 przypadków). Dodatkowo marginesy po leczeniu operacyjnym stwierdzono u 27 pacjentów, co stanowiło 45% operowanych.

Do ekspresji tkankowej HBXIP, BTK oraz PTEN wykorzystywano odpowiednie przeciwciała a proces barwienia odbył się zgodnie z uznanym i obowiązującym procesem w Zakładzie Patomorfologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Do określenia poziomu ekspresji HBXIP i BTK na podstawie reakcji IHC wykorzystano skalę ilościową IRS a do oceny utraty ekspresji białka PTEN wykorzystano jakościowe porównanie intensywności barwienia jądra oraz cytoplazmy komórek nowotworowych z otaczającą tkanką nienowotworową.

Zwracam się z zapytaniem w jaki sposób badacz określił sposób pobrania tkanki nienowotworowej z prostaty? (w trakcie oceny makroskopowej przez patologa?)

Czy badacz dokonał analizy porównawczej materiału z węzłów chłonnych w których nie występowały przerzuty, jako dodatkowej tkanki „zdrowej” o innym niż prostata pochodzeniu?

Metody i narzędzia statystyczne został dobrane we właściwy sposób a przedstawienie danych jest zgodne z obowiązującymi standardami.

Wyniki zostały przedstawione w sposób przejrzysty i uporządkowany. Ich zilustrowanie za pomocą tabel, zdjęć i wykresów ułatwia lekturę pracy.

W odniesieniu do ekspresji białka HBXIP stwierdzono istotnie statystycznie wyższy IRS-score badanego białka w ognisku pierwotnym raka (wynik średni: 9,41; SD \pm 1,23) w porównaniu do utkania gruczołowego nienowotworowego (wynik średni: 3,18; SD \pm 0,73; $p = 0,000$) oraz istotnie statycznie wyższy IRS-score HBXIP w przerzucie raka do węzłów chłonnych (wynik średni: 8,12; SD \pm 1,41) w porównaniu do tkanki gruczołowej nienowotworowej (wynik średni: 3,18; SD \pm 0,73; $p = 0,000$). Zależność istotna statycznie występowała między IRS-score HBXIP w ognisku pierwotnym nowotworu a przerzutem ($p = 0,005$)

Następnie oceniono różnicę w ekspresji HBXIP pomiędzy tkanką gruczołową nienowotworową, tkanką nowotworową a przerzutem węzłowym w preparatach pochodzących od 17 pacjentów, u których występowały wszystkie trzy parametry. Stwierdzono istotnie statystycznie wyższy IRS-score badanego białka w ognisku pierwotnym raka (wynik średni: 9,41; SD \pm 1,23) w porównaniu do utkania gruczołowego nienowotworowego (wynik średni: 3,18; SD \pm 0,73; $p = 0,000$) oraz istotnie statycznie wyższy IRS-score HBXIP w przerzucie raka do węzłów chłonnych (wynik średni: 8,12; SD \pm 1,41) w porównaniu do tkanki gruczołowej nienowotworowej (wynik średni: 3,18; SD \pm 0,73; $p = 0,000$). Zależność istotna statycznie występowała między IRS-score HBXIP w ognisku pierwotnym nowotworu a przerzutem ($p = 0,005$).

Analogiczną analizę przeprowadzono dla BTK. Recenzent zwraca się zapytaniem, dlaczego u trzech pacjentów nie oznaczono ekspresji BTK w utkaniu gruczołowym nienowotworowym stercza (na czym polegały problemy techniczne). Ekspresja białka BTK wystąpiła tylko u ośmiu pacjentów w utkaniu gruczołowym nienowotworowym stercza, co stanowiło 15% przypadków, wśród których IRS-score wynosił średnio 0,42 (SD \pm 1,05). Z kolei ekspresja białka BTK w przypadku pierwotnych ognisk nowotworu, jak i ognisk przerzutowych PCa wykazana została we wszystkich preparatach. IRS-score wyniósł odpowiednio 7,93 (SD \pm 2,52) oraz 7,41 (SD \pm 2,35).

Wykazano istotnie statystycznie wyższy IRS-score badanego białka w ognisku pierwotnym raka (wynik średni: 8,60; SD \pm 1,96) w porównaniu do utkania gruczołowego nienowotworowego stercza (wynik średni: 0,00; SD \pm 0,0; $p = 0,000$) oraz istotnie statystycznie wyższy IRS-score białka BTK w przerzucie raka do węzłów chłonnych (wynik średni: 7,07; SD \pm 2,25) w

porównaniu do tkanki gruczołowej nienowotworowej (wynik średni: 0,00; SD \pm 0,0; p = 0,000). Nie wykazano statystycznie istotnej różnicy pomiędzy IRS-score białka BTK w ognisku pierwotnym PCa a przerzutem (p = 0,052).

Kolejna analiza dotyczyła PTEN - w 55 przypadkach nie wykazano utraty PTEN, z kolei utratę heterogenną zauważono w 3 przypadkach co stanowiło odpowiednio 94,8% oraz 5,2%. W preparatach pochodzących z ognisk pierwotnych raka gruczołu krokowego (n=60), zachowany PTEN wystąpił u 21 pacjentów (35%), utratę heterogenną wykazano u 27 pacjentów (45%), zaś utratę homogeną u 12 (20%).

W preparatach pochodzących z ognisk przerzutowych (n=17), stwierdzono zachowanie PTEN w 4 przypadkach (23,5%), utratę heterogenną w 3 preparatach (17,6%), z kolei utratę homogeną u 10 pacjentów (58,8%).

Analiza zależności pomiędzy IRS-score białek HBXIP i kinazy tyrozynowej Brutona oraz utratą białka PTEN a cechami klinicznymi pacjentów wykazała istotną statystycznie zależność pomiędzy IRS-score białka BTK w ognisku pierwotnym a miejscowym zaawansowaniem klinicznym (pT) (r=0,31; p=0,017) oraz IRS-score białek BTK (r=0,32; p=0,012;) i HBXIP (r=0,34; p=0,007) w ognisku pierwotnym a ilością pobranych węzłów chłonnych.

Oceniona zależność utraty białka PTEN w ognisku pierwotnym nowotworu a cechami klinicznymi PTEN wykazała wynik istotny statystycznie tylko dla ilości pobranych węzłów podczas limfadenektomii (p=0,043)

Na podstawie analizowanych zmiennych wskaźnikowych stwierdzono, że IRS-score PCa dla białka HBXIP jest istotnym statystycznie czynnikiem prognostycznym przerzutu.

Określono wartości IRS-score dla białka HBXIP równą 8, która mogłaby stanowić punkt odcięcia, powyżej którego istotnie rośnie ryzyko wystąpienia przerzutu.

Ocena zależności pomiędzy IRS-score białek HBXIP oraz kinazy tyrozynowej Brutona a utratą ekspresji białka PTEN nie wykazała istotnej statystycznie korelacji.

W części poświęconej omówieniu uzyskanych wyników autor umiejętnie konfrontuje zebrane i przeanalizowane dane z publikacjami innych autorów. Dobór piśmiennictwa i styl prowadzonej dyskusji znamionują dojrzałość badawczą i umiejętność krytycznej analizy zarówno własnych jak i cudzych wyników. Z satysfakcją stwierdzam, że kandydat dostrzegł i szeroko ustosunkował się do ważnych problemów.

Zwracam uwagę na konieczność podania referencji do zdania: „Jednym z białek mających istotne znaczenie w rozwoju raka prostaty jest PTEN, którego status w przypadku raka prostaty ograniczonego do narządu, jak wykazano w licznych publikacjach, pełni rolę markera niekorzystnego przebiegu choroby”. Podobnie do zdania „Analizując powyższe dane, zauważono, iż są zbliżone do wyników innych badaczy” niezbędne jest podanie referencji.

Wskazane jest podanie referencji do zdania: „Wyniki niniejszej pracy pozostają w zgodzie z badaniami Guo i współpracownicy, którzy przy pomocy różnych metod detekcji (immunohistochemia, ELISA, western blotting, real-time PCR) oceniali ekspresję zarówno genu, jak i białka BTK w tkance nienowotworowej prostaty oraz w komórkach raka stercza z ISUP 1 oraz ISUP 4”. Podobnie brak referencji w zadaniu: „Podobne wyniki uzyskał Zhu i współpracownicy, którzy wykazali podwyższoną ekspresję białka BTK w komórkach nowotworowych gruczołu krokowego w stosunku do komórek łagodnego rozrostu stercza.”

Recenzent w odniesieniu do dyskusji zwraca się z prośbą o odpowiedź na kilka pytań:

Jak należy interpretować wynik (czy są do tego jakieś podstawy molekularne), iż homogenna utrata ekspresji białka PTEN była największa w ogniskach przerzutowych (a nie np. w ognisku pierwotnym). Autor zaleca do analizy utraty ekspresji PTEN materiał z biopsji – jak odnieść można to zalecenie do ww. wyniku, gdzie utrata jest największa w zmianie przerzutowej?

Jakie byłoby wytłumaczenie braku zależności utraty ekspresji PTEN z cechami klinicznymi odpowiedzialnymi za agresywność choroby (np. ilość w/ch z przerzutami, stężenie PSA).

Dlaczego nie stwierdzono zależności IRS-score PCa dla białka BTK jako istotnego czynnika prognostycznego przerzutu (a jedynie dla HBXIP)?

Pozwolę zadać bardziej ogólne pytanie – jak jest zasadność badania i jakie podstawy molekularne ewentualnych różnic w omawianych białkach pomiędzy ogniskiem pierwotnym nowotworowym a przerzutowym węzłem chłonny? (czy taka różnica powinna w ogóle występować? Jeśli tak to dlaczego?) Czy nie zasadne byłoby określenie ww różnic pomiędzy tkanką nowotworową prostaty i tkanką nienowotworową. Analiza danych z biopsji pozwoliłaby w przyszłości na wykorzystanie tych metod do predykcji np. agresywność raka a co się z tym wiąże wyboru optymalnego leczenia.

Zrozumiałe i czytelnie określone wnioski podsumowują pracę doktorską.

1. Wzrost ekspresji białek HBXIP i BTK w ogniskach pierwotnych oraz przerzutach do węzłów chłonnych raka gruczołu krokowego może świadczyć o ich roli w procesie transformacji nowotworowej.
2. Wyższa ekspresja białek HBXIP i BTK oraz większa homogenna utrata ekspresji białka supresorowego PTEN wiąże się ze wzrostem złośliwości histologicznej ogniska pierwotnego raka gruczołu krokowego.
3. Wykazano zależność między ekspresją białka BTK w ognisku pierwotnym raka gruczołu krokowego a miejscowym zaawansowaniem nowotworu.
4. Wykazano zależność między ekspresją białka HBXIP w ognisku pierwotnym raka gruczołu krokowego a zwiększonym ryzykiem przerzutów do węzłów chłonnych.
5. Podsumowując, badane białka HBXIP oraz BTK, podobnie jak PTEN - uznany marker agresywnego przebiegu choroby nowotworowej prostaty - mogą być potencjalnymi, tkankowymi markerami prognostycznymi i predykcyjnymi raka gruczołu krokowego.

Całą pracę kończą streszczenia w języku polskim i angielskim w sumaryczny sposób przedstawiające grupę badaną, metodykę i uzyskane wyniki.

Recenzent gorąco zachęca do dalszej pracy w omawianym temacie. Niewątpliwie dynamiczny rozwój biologii molekularnej stanowi przyszłość w poszukiwaniu nie tylko biomarkerów umożliwiających właściwą stratyfikację pacjentów i odpowiedni dobór leczenia ale właśnie analiza roli wybranych białek może dać szansę stworzenia nowych, celowanych ścieżek terapeutycznych.

Wymienione niewielkie uwagi nie zmieniają mojej bardzo pozytywnej oceny recenzowanej rozprawy doktorskiej. Pragnę zwrócić uwagę na staranność prowadzonego badania, skrupulatne zbieranie danych, wnikliwą analizę wielu ważnych parametrów, rzeczową

dyskusję uzyskanych wyników w odniesieniu do najnowszych danych światowych. Bardzo staranna strona edytorska ułatwia czytanie opracowania. Dzięki umieszczeniu dobrej jakości zdjęć cała praca zyskała dodatkową wartość merytoryczną i wizualizacyjną.

Przedstawiona mi rozprawa spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim i z całym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady Senatu Wydziału Nauk o Zdrowiu, Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. med. Pawła Samocika do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zwracam się do Wysokiej Rady o nadanie wyróżnienia doktorantowi.

Z poważaniem

dr hab. n. med. Roman Sosnowski,



Sosnowski Roman