Recenzja pracy doktorskiej lek. Wojciecha Wesołowskiego "Ocena ekspresji neuropeptydu Y i jego receptorów w raku stercza"

Przedstawiona do oceny praca doktorska pod tytułem "Ocena ekspresji neuropeptydu Y i jego receptorów w raku stercza" ma postać rozprawy liczącej łącznie 116 stron; składa się ze wstępu, opisu hipotez badawczych i celów pracy, materiału i metod, wyników oraz dyskusji i wniosków. Tekst opatrzony jest spisem treści, podziękowaniami, listą skrótów, osobnym spisem rycin, tabel i wykresów, bibliografią oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim. Jest to więc układ typowy dla rozpraw doktorskich.

Wstęp rozpoczyna się omówieniem anatomii makroskopowej, histologii oraz czynności gruczołu krokowego, przy czym autor wiele miejsca poświęcił unerwieniu gruczołu oraz oddziaływaniu neuroprzekaźników i ich receptorów. W kolejnej części szczegółowo opisano epidemiologię raka prostaty; wspomniano także o ważnej kwestii nadmiernego rozpoznawania i nadmiernego leczenia raka stercza a w tym samym podrozdziale opisano jego przypuszczalne przyczyny i podstawy patogenezy. Niezrozumiałe jest zdanie o wzroście ryzyka raka u krewnych pierwszego stopnia (s. 10), ale następne są już bardziej klarowne. W tekście występują niezbyt właściwe stylistycznie sformułowania np. 'rak stercza (...) budzi kontrowersje' (s. 6) gdy chodzi raczej o kontrowersje w postępowaniu diagnostycznym i leczniczym w tym nowotworze. Występują wyrażenia potoczne jak np. "ciężkich cytokeratyn", "komórki posiadają receptory" (s. 8), co nie dziwi u patologa-praktyka, jednak nieco razi w tekście naukowym. Właściwsze byłoby połączenie rozważań patogenetycznych z kolejnym podrozdziałem, który opisuje zmiany molekularne w raku gruczołu krokowego. Opis zmian molekularnych jest interesujący i wyczerpujący, chociaż nieco chaotyczny, gdyż często niemal równocześnie omawiane są zmiany wczesne i zjawiska zachodzące w późnej fazie progresji raka. Następnie autor omawia zasady klinicznego rozpoznawania raka stercza, opisuje także zasady wykonywania oraz interpretacji biopsji gruboigłowej; to ostatnie zagadnienie powinno znaleźć się raczej w kolejnej części, dotyczącej diagnostyki patomorfologicznej. Opis diagnostyki patomorfologicznej jest szczegółowy i odwołuje się do aktualnych zaleceń.

Załączone ilustracje są dobrej jakości i dobrze pokazują omawiane zagadnienia. Można jedynie zauważyć, że kolorystyka i ustawienie bieli jest różne (np. 2g vs 2f), zdjęcia do ewentualnej publikacji wyników w czasopismach musiałyby więc zostać w części zmienione. Także sposób numerowania ilustracji (np. ryc. 2 od "a" aż do "l") nie jest najszczęśliwszy i zmniejsza czytelność tekstu.

W kilku miejscach opis pozostawia nieco do życzenia: rak przewodowy stercza jest zwykle składnikiem raka typowego ('zrazikowego'); nie można powiedzieć, że podział PIN na low grade i high grade został zarzucony, a raczej jedyną postacią PIN która jest rozpoznawana to zmiany high grade; wreszcie intraductal carcinoma jest powszechnie uważany za skutek progresji raka naciekającego a kontrowersje może raczej budzić jego samodzielne występowanie. Zapewne te potknięcia wynikają ze skrótowego potraktowania zagadnień, które mają marginalne znaczenie dla tematu pracy. Doktorant opisuje szczegółowo klasyfikację stopni zróżnicowania wg zmodyfikowanego podziału Gleasona, oraz systemu ISUP (NB. skrót pominięto w liście skrótów na początku rozprawy). System ISUP jest w tekście pracy nazywany 'grade group / grupą rokowniczą', gdy preferowaną obecnie nazwą jest ISUP grading. Tłumaczenie klasyfikacji przedstawione w tabeli 2 jest niejasne. Autor rozprawy wspomniał pokrótce o proponowanym rozpoznaniu 'IDLE', ale słusznie wyraża swój dystans do stosowania tej kontrowersyjnej nazwy. Omówienie zasad określania zaawansowania raka prostaty jest chyba zbyt skrótowe i przez to niedostatecznie klarowne; autor nie zaznaczył różnicy pomiędzy klasyfikacją cTNM a pTNM (a w wypadku stercza taka różnica istnieje); posługuje się też podziałem TNM w wersji UICC, podczas gdy podział AJCC jest - nie tylko moim zdaniem - prostszy i lepszy, zwłaszcza do celów naukowych, gdy nie ma potrzeby dostosowania się patologa do zaleceń używanych przez klinicystów. Inne czynniki rokownicze doktorant w następnym podrozdziale dotyczącym leczenia; słusznie zachowuje wyważony dystans do nie w pełni uznanych cech prognostycznych a także do nowych metod leczenia.

Znaczną część wstępu stanowi szczegółowe omówienie roli neuropeptydu Y, jego receptorów i sposobów działania; jest ono poprawne merytorycznie i wyczerpujące. Dają się jedynie zauważyć drobne potknięcia stylistyczne. Na przykład zdanie "Ostatecznie cały system bierze udział w angiogenezie [128, 141], niezbędnej dla procesu kancerogenezy" nie jest najszczęśliwsze, ponieważ tworzenie naczyń krwionośnych nie uczestniczy w samym powstawaniu nowotworu a w jego progresji. Cytowana z literatury Ryc. 3b zawiera tekst w

języku angielskim; ponieważ rozprawa została napisana w języku polskim bardziej właściwe byłoby przygotowanie własnej, polskojęzycznej wersji wzorowanej na oryginale pracy. Bardzo interesujący jest fragment tekstu dotyczący roli neuropeptydu Y w patogenezie nowotworów oraz roli systemu NPY w prostacie. Wstęp kończy się krótkim wyliczeniem zagadnień dotyczących NPY w raku stercza co do których brak jest informacji w literaturze lub dostępne dane są sprzeczne i niejasne. Stanowi to dobre przygotowanie do przedstawienia przez doktoranta **hipotez badawczych**: iż NPY pełni istotna rolę w raku gruczołu krokowego, wiąże się cechami morfologicznymi nowotworu, jego inwazyjnością a co za tym idzie muszą występować różnice ekspresji NPY i receptorów dla NPY pomiędzy tkanką nienowotworową a rakiem prostaty. Doktorant określił dwa klarowne **cele pracy**: określenie ekspresji NPY i receptorów dla NPY oraz zbadanie ich związku z cechami nowotworu. Hipotezy badawcze oraz cele pracy są właściwie sformułowane i znajdują uzasadnienie w przytoczonych we wstępie danych z literatury. Praca została wykonana na **materiale** archiwalnym z zastosowaniem mikromacierzy tkankowych. Opis doboru przypadków nie jest całkowicie klarowny, jeśli idzie o utkanie prostaty z rozrostem guzkowym to dopiero po przeczytaniu całości można przekonać się, że takie materiały były badane. Ograniczeniem pracy jest stosunkowo niewielka grupa badana. Sposób wytworzenia TMA został szczegółowo przedstawiony, jednak aczkolwiek wspomniano, że użyto rdzeni o średnicy 3 i 5mm, nie podano według jakiego klucza stosowano rdzenie różnej średnicy. Procedura wykonania odczynów immunohistochemicznych została opisana bardzo szczegółowo. Także dokładnie została przedstawiona ocena odczynów immunohistochemicznych i nie budzi ona zastrzeżeń; w wypadku barwienia w kierunku Ki67 zabrakło jedynie informacji jaką liczbę komórek oceniano w każdym przypadku; nie ma to jednak większego znaczenia dla uzyskanych wyników. Ocena ekspresji NPY/receptorów nie odbiega od metod stosowanych w takich przypadkach; cenne jest przeprowadzenie oceny topograficznej lokalizacji odczynów. Wartościowym rozwiązaniem jest także zastosowanie preparatów wirtualnych do konsultacji z promotorem i ko-promotorem. Niepotrzebnie w obrębie "Materiału i metod" znalazł się akapit dotyczący silniejszej ekspresji NPY/receptorów w raku niż w strukturach referencyjnych (s. 43); bardziej właściwe miejsce to "Wyniki". W opisie "bazy danych" zabrakło (chociaż nie ma to istotnego znaczenia dla oceny wyników) informacji z jakiego oprogramowania skorzystano do jej utworzenia. Dobór metod statystycznych jest poprawny.

Rozdział **"Wyniki"** otwiera dokładna charakterystyka kliniczno-morfologiczna badanych przypadków, które są przedstawione w postaci tekstowej oraz w tabeli 3. Tabela ta nie jest zbyt czytelna, m.in. z powodu użycia licznych skrótów. Na marginesie chciałem zauważyć, że operowanie licznym skrótami w rozprawie zmniejsza czytelność tekstu, a ponieważ praca jest stanowi publikacji o ograniczonej liczbie słów stosowanie skrótów nie jest niezbędne. Występuje niezgodność pomiędzy tabelą 3, a tekstem co do ekspresji ERG w jednym przypadku rozrostu guzkowego. Warto zauważyć, że taka ekspresja byłaby nietypowa. Kluczowa dla przeprowadzonego badania część wyników tj. odczyny w kierunku NPY/receptorów zostały przedstawione bardzo szczegółowo: jako zestawienia w tabelach oraz histogramy przedstawiające częstości poszczególnych odczynów. Interesujące jest rozległe omówienie wyników barwień immunohistochemicznych z dokładnym opisem jakościowym. Zdjęcia są liczne i w większość dobrze dobrane, niestety niektóre zdjęcia nie są dobrej jakości. Na części ilustracji umieszczono podziałkę mikrometryczną, która ma jednak zbyt małe rozmiary i jest mało czytelna, także nie jest jasne według jakiego klucza wybierano zdjęcia, na których skala została umieszczona (np. panel na stronie 51 zawiera dwa zdjęcia o powiększeniu 400x z podziałką i dwa zdjęcia o powiększeniu 200x bez podziałki). Ciekawą obserwacją jest stwierdzona przez doktoranta strefowość odczynu z silną reakcją w nowotworze naciekającym gałązki nerwowe. Doktorant przeprowadził bardzo szczegółową **analizę statystyczną** otrzymanych wyników, która została przedstawiona jako odrębny podrozdział, zawierający liczne tabele i wykresy. O ile analiza statystyczna została moim zdaniem przeprowadzona poprawnie, to użyte do ilustracji histogramy (wykresy 9 do 16) trójwymiarowe nie są zbyt czytelne, a oznaczenia wartości na części osi nie odpowiadają opisowi (np. na wykresach 9-12 "1"i "2" gdy wg legendy winno być "low" i "high") - bez odniesienia do wyników przedstawionych w tabelach są niezrozumiałe. Przedstawienie uzyskanych wyników kończy krótkie podsumowanie. Autor stwierdził w nim, że pomiędzy nienowotworową prostatą a rakiem występują różnice w ekspresji receptorów NPY, ale nie samego NPY; ekspresja badanych antygenów jest silniejsza w obszarach inwazji naczyń i jest ona skorelowana w obrębie zmiany pierwotnej i przerzutów; ekspresja NPY i receptorów nie wykazuje korelacji z zaawansowaniem raka ani ekspresją Ki67. Można więc stwierdzić, że cele pracy zostały osiągnięta a hipotezy badawcze zweryfikowane. **"Dyskusja"** rozpoczyna się omówieniem głównych kierunków badań dotyczących raka stercza. Autor ponownie słuszne wskazuje, że kluczowym i nadal nie w pełni rozwiązanym problemem jest odróżnienie

pomiędzy potencjalnie zabójczymi nowotworami wymagającym agresywnego leczenia a indolentnymi rakami, w wypadku których pacjent odnosi niewielką lub żadną korzyść z leczenia radykalnego. Dalej doktorant przechodzi do streszczenia badań dotyczących roli inwazji gałązek nerwowych oraz znaczenia NPY i jego receptorów; omawia wyniki innych autorów oraz wskazuje, że w literaturze dane na ten temat są fragmentaryczne. Dalej następuje omówienie uzyskanych wyników oraz oceny statystycznej. Doktorant formułuje też oparte na danych z literatury hipotezy na temat możliwych molekularnych podstaw zmian ekspresji NPY i jego receptorów oraz wskazuje na analogie i różnice pomiędzy rakiem stercza a innymi chorobami nowotworowymi w tym zakresie. Interesujące są przedstawione dalej dane o udziale struktur nerwowych w patogenezie raka gruczołu krokowego, a także rozważania o roli badanego w pracy systemu sygnalizacji w tworzeniu przerzutów. W wypadku tego ostatniego zagadnienia są to głównie rozważania teoretyczne, dotyczące innych nowotworów. Wiąże się to z faktem, że badania własne doktorant przeprowadził na bardzo niewielkiej liczbie zmian przerzutowych. Nieco miejsca poświęcił doktorant opisaniu związków NPY i jego receptorów z ekspresją ERG; opisał różnice pomiędzy uzyskanymi wynikami a danymi z literatury i przedstawił wiarygodne wytłumaczenia rozbieżności. Dyskusję wieńczą rozważania o leczeniu zaawansowanego raka gruczołu krokowego i o potencjalnym znaczeniu receptorów NPY jako obiekcie leczenia celowanego.

Zasadniczą część pracy kończą cztery **wnioski**. Stanowią one podsumowanie uzyskanych wyników i są moim zdaniem właściwie umotywowane w tekście pracy.

Bibliografia liczy 199 pozycji. Bibliografia ułożona jest alfabetycznie według nazwisk autorów, została sporządzona dokładnie i starannie, chociaż można zauważyć pojedyncze odstępstwa od stosowanego formatu pozycji bibliograficznych, a format ten nie jest w pełni standardowy (zwykle zawiera miesiąc wydania, co nie jest niezbędne, a w wypadku części czasopism jest trudne do ustalenia). Dla oznaczenia większej liczby autorów używane jest 'et all.' Zamiast przyjętego 'et al.'. Doktorant nie wszędzie ujednolicił użycie wielkich liter w tytułach cytowanych prac ('Jak w zdaniu' vs 'Jak W Tytule Książki') Niemal wszystkie cytowane artykuły są nowe, pochodzą z ostatnich kilku, a część z ostatnich kilkunastu lat, jedynie nieliczne klasyczne pozycje są starsze. Cytowane prace to artykuły oryginalne, w mniejszym stopniu prace poglądowe i metaanalizy. Nawet przy pobieżnym przeglądnięciu bibliografii widać, że zacytowano wiele najważniejszych prac dotyczących raka prostaty, które ukazały się w

ostatnich latach. Autor wykazał się więc umiejętnością zbierania i właściwego wykorzystania danych z literatury. Zabrakło może oryginalnych publikacji dotyczących tworzenia mikromacierzy tkankowych (cytowana 1 nowa praca w języku polskim, gdy bardziej właściwe byłoby uhonorowanie twórców metody TMA), jednak nie jest to główny temat pracy, stąd nie jest to problem istotny. Doktorant zacytował kilka podręczników, co w pracy mającej formę samodzielnej rozprawy jest przyjęte, a autor nie nadużył tego zwyczaju; cytując książki nie podał jednak, jak zwykle się praktykuje, wydawcy i miejsca wydania. Trzy pozycje stanowią odwołania do stron internetowy, przy czym pod numerem 197 autor odwołuje się do baz danych GUS oraz Krajowego Rejestru Nowotworów; należało te bazy cytować oddzielnie, zwłaszcza że KRN na swojej stronie podaje właściwy sposób jego cytowania.

Ograniczeniem pracy jest - co sam doktorant przyznaje w dyskusji - nieuwzględnienie danych klinicznych, w szczególności informacji o przeżyciu. Jak wiadomo brak takich danych jest częstym problemem w badaniach naukowych prowadzonych przez polskich patomorfologów. Podobnie sam autor pracy uważa, że ograniczeniem jest półilościowa jedynie ocena wykonanych odczynów immunohistochemicznych. Moim zdaniem nie jest to problem istotny, a wobec niestechiometrycznego charakteru reakcji immunohistochemicznych bardziej 'obiektywna' ocena (np. za pomocą komputerowej analizy obrazu) wniosłaby w najlepszym razie niewiele do uzyskanych wyników.

Najważniejszym ograniczeniem pracy jest stosunkowo niewielka liczba przebadanych przypadków. Szczególnie wobec faktu, że w pracy posłużono się mikromacierzami tkankowymi, a rak stercza jest nowotworem częstym, można by oczekiwać, że zostanie przebadany dużo większy materiał. Pomimo tego uzyskano interesujące, istotne statystycznie wyniki, jednak autor pracy powinien rozważyć znaczne rozszerzenie materiału przed publikacją uzyskanych wyników w czasopismach naukowych. Być może pozwoli to na wykazanie innych jeszcze związków pomiędzy danymi.

W całości pracę oceniam, mimo pewnych uchybień, **pozytywnie i bardzo wysoko**. Uzyskane wynik są oryginalne i stanowią istotną nowość, rozwijają też naszą wiedzę o patogenezie raka prostaty. W literaturze brak jest podobnego, całościowego opracowania roli NPY i jego receptorów w rozwoju tego nowotworu. Praca spełnia ustawowe (zawarte w ustawie o

stopniach i tytule naukowym) oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim; mając powyższe na uwadze wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Zdrowiu Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie lek. Wojciecha Wesołowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Kraków, dnia 19 maja 2019

dr hab. n. med. Krzysztof Okoń, prof. UJ