

Łódź, 15.12.2019 r

RECENZJA

pracy doktorskiej mgr Urszuli Rychlik

p.t. „Ocena zależności pomiędzy stężeniem swoistego antygenu sterczowego (PSA) a poziomem wybranych wskaźników stanu hormonalnego u chorych na raka gruczołu sterczowego”.

Promotor pracy: prof. dr hab. n. med. Jan Kanty Kulpa.

Rak gruczołu krokowego niemal na całym świecie stanowi poważny problem epidemiologiczny. Wynika to z faktu, że zapadalność i śmiertelność na ten nowotwór od wielu lat wyraźnie wzrasta a nadal, mimo postępów medycyny, jest on trudny do zdiagnozowania w początkowej fazie wzrostu ze względu na powolny, często bezobjawowy jego rozwój.

W chwili obecnej w rozpoznawaniu obecności raka prostaty, obok technik obrazowych i często skąpych objawów klinicznych słabo go różnicujących z łagodnym rozrostem gruczołu krokowego (BPH), istotną rolę przypisuje się oznaczaniu stężeń we krwi swoistemu antygenowi prostaty (PSA). Jest on glikoproteiną wytwarzaną w sterczu, występującą prawie wyłącznie w komórkach wydzielniczych przewodów prostaty. Jego stężenie, jako antygenu swoistego narządowo, jest podwyższone w stanach zapalnych gruczołu krokowego, jego łagodnego rozrostu lub raka.

W regulacji wzrostu i czynnościowej roli prostaty istotną rolę odgrywają androgeny, szczególnie 5 α -dihydrotestosteron (DHT), powstały w redukcji testosteronu niezwiązanego z białkami osocza (globuliną wiążącą hormony płciowe – SHBG i albuminą). Wzrost DHT powoduje zwiększoną stymulację komórek nabłonkowych stercza w kierunku syntezy różnych białek, w tym PSA mRNA i samego osoczowego PSA. Uważa się, że takie oddziaływanie DHT może zależeć od wielu hormonów wpływających na przemiany androgenów takich jak testosteron wolny i związany z białkami oraz hormony tropowe: lutropinę (LH) i folikulotropinę (FSH) czy prolaktynę (PRL) i estrogeny (głównie estradiol).

Biorąc powyższe spostrzeżenia pod uwagę Doktorantka postawiła za cel pracy dokonanie próby oceny zmian stężeń PSA i wskaźników biochemicznych (androgeny i wiążące je osoczowe białka) o potencjalnym współoddziaływaniu na te zmiany, u chorych na raka prostaty przed rozpoczęciem leczenia w grupach z różnymi metodami terapii. Postanowiła również uzyskane wyniki odnieść do szeregu wykładników stanu klinicznego chorych takich jak stopień zaawansowania choroby i złośliwości nowotworu, obecności przerzutów i czasu przeżycia badanych. Doktorantka cel pracy zamieściła

w rozdziale 2 wraz z Załoženiami pracy. Mam w tym miejscu uwagi. Po pierwsze opisując istotę Założeń i wynikający z nich cel pracy Doktorantka w tekście nie zamieściła cytowań i po drugie sam opis celu badań jest sptycony i nie odpowiada w całości wykonanym na szerszą skalę badaniom. Uważam jednak, że podjęcie całościowych badań w tym zakresie można uznać za wysoce celowe i uzasadnione.

Rozprawa posiada klasyczny układ dla prac doktorskich. Składa się z 11 rozdziałów, które stanowią: Wstęp, Założenia i cel pracy, Materiał i metody badań, Wyniki, Omówienie wyników, Wnioski, Streszczenie w j. polskim i angielskim, Piśmiennictwo, Spis rycin, Spis tabel. Dodatkowo Autorka zamieścił w rozprawie Wykaz najczęściej stosowanych skrótów. Praca liczy 131 stron. Jest starannie napisana techniką komputerową w dobrym, zrozumiałym języku polskim.

Wstęp pracy, obszerny, poprawnie napisany na 30 stronach z wykorzystaniem dobrze dobranych pozycji piśmiennictwa, zawiera niezbędne dane i dobrze wprowadza czytającego rozprawę w problemy związane z prowadzonymi badaniami. Doktorantka we wstępie opisuje anatomię i fizjologię gruczołu krokowego, szeroko dane dotyczące raka gruczołu krokowego, zwracając uwagę na klasyfikację patomorfologiczną w różnych stadiach zaawansowania i stopnia złośliwości nowotworu. Szczególny fragment Wstępu, według mnie najbardziej istotny w pracy, Doktorantka poświęca diagnostyce raka sterczay, w tym szeroko opisuje rolę PSA w jego diagnozowaniu i monitorowaniu leczenia. Opis Wstępu kończą dane dotyczące metod prowadzenia terapii.

Dla realizacji postawionego celu Doktorantka przeprowadziła szerokie badania u 209 chorych na zdiagnozowanego już raka prostaty (grupa badana RGK). Byli to pacjenci w wieku 47-90 (Me=67) lat w różnych stadiach choroby, poddanych leczeniu w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie w latach 2000-2007. Uzyskane wyniki odniosła do 2 grup porównawczych: grupy pierwszej osób zdrowych, zwanych w pracy grupą osób bezobjawowych (gr. Z, n=40, w wieku 40-80 z Me=52 lata) i grupy drugiej osób chorych na łagodny rozrost prostaty (gr. BPH, n=98, w wieku 36-81 z Me=66 lat). Dane kliniczne Doktorantka zebrała z dokumentacji medycznej. Czas trwania obserwacji chorych wynosił średnio 79 miesięcy (zakres: 5 – 120; Me 97,9). W okresie 2-letniej obserwacji 38 pacjentów zmarło (18,2%).

Dokumentacja opisowa badanych osób dokonana przed rozpoczęciem leczenia jest doskonale zebrana w formie 2 tabel i 4 rycin słupkowych. W opisie tym Doktorantka dokonała różnych podziałów na podgrupy, w których uwzględniła stopień zaawansowania klinicznego choroby, stopień złośliwości histologicznej wg. skali Gleasona, skalę sprawności pacjenta wg Karnofsky'ego, rodzaj zastosowanego leczenia oraz stężenie PSA. Doktorantka podaje również, że analizowała 10-letni okres obserwacji, gdzie zanotowała śmierć u 121 pacjentów (śmiertelność 57,9%). Jak więc uzyskała dane 10-letniego okresu skoro prowadziła badania w latach 2000-2007?

Bezpośrednio przed rozpoczęciem leczenia Doktorantka z udostępnionej dokumentacji medycznej chorych tworzyła zbiór danych dotyczący stopnia zaawansowania choroby i złośliwości nowotworu oraz u każdego pacjenta wykonywała oznaczenia analizowanych parametrów. W tym celu pobierała krew żylną i po wykrzepieniu odseparowywała surowicę i przechowywała ją w stanie zamrożenia, a po rozmrożeniu wykonywania oznaczenia w serii.

Oznaczano stężenia: PSA całkowitego (tPSA), wolnego PSA (fPSA), testosteronu (TEST), globuliny swoście wiążącej hormony płciowe (SHBG), lutropiny (LH), folikulotropiny (FSH), prolaktyny (PRL) i białka całkowitego. Wykonywano również rozdział elektroforetyczny białka surowicy oraz wyliczenia z oznaczonego stężenia testosteronu, SHGB i albuminy testosteronu wolnego (fTEST) i biodostępnego (bioTEST). Wyniki stężeń analizowanych parametrów w różnych badanych grupach i podgrupach poddano szczegółowej obróbce statystycznej korzystając z profesjonalnego programu *Statistica 12 PL*. Zwraca uwagę wykorzystanie własnych, opracowanych w macierzystej jednostce wartości referencyjnych oznaczanych parametrów do opracowywania wyników badań.

Wyniki pracy zostały szeroko opracowane. Uzyskane dane Doktorantka zebrała w 19 szczegółowych i czytelnych tabelach i 27 rycinach umieszczonych w tekście pracy. Doktorantka poprowadziła szczegółową analizę wyników w 3 badanych grupach: chorych na RGK, BPH i pacjentów bezobjawowych Z, uwzględniając w nich zależności od wieku, stopnia klinicznego zaawansowania, stopnia złośliwości i obecności przerzutów. Doktorantka, uznając *a priori* doniesienia naukowe, że androgeny stymulują rozwój raka prostaty analizowała wyniki badań potwierdzające takie założenie. Najbardziej spektakularne, wysoce znamienne wzrosty, co jest oczywiste, zarejestrowała między medianami stężeń PSA i fPSA w grupie RGK w porównaniu do obu grup odniesienia BPH i Z oraz w grupie BPH versus Z. Najwyższe wzrosty PSA i fPSA obserwowała, co było przewidywalne, w podgrupach chorych RGK z wyższym stopniem zaawansowania klinicznego i złośliwości nowotworu oraz w obecności przerzutów wobec chorych z łagodnym czy początkowym przebiegiem choroby. Nie wykazała jednak istotnych różnic w stężeniach całkowitego i wolnego TEST między grupami RGK i BPH. Doktorantka zanotowała dalej znamienne wzrosty mediany stężeń fTEST i bioTEST w grupie RGK versus Z i brak istotnego wzrostu między grupami RGK i BPH. Z kolei nie stwierdziła istotnych różnic stężeń fTEST i bioTEST między podgrupami chorych na RGK w różnym stadium zaawansowania klinicznego i o różnym stopniu złośliwości nowotworu oraz w obserwacji 2-letniego przeżycia chorych. Analiza stężeń białek surowicy - albuminy i SHGB u chorych w grupie RGK wykazała znamienny spadek median stężeń, co było spodziewane. Badając współzależności między ocenianymi parametrami najbardziej widoczne korelacje ($p < 0,05$) dotyczyły chorych na RGK, gdzie stwierdzono dodatnią zależność między stężeniem PSA i testosteronu u pacjentów z 4. stopniem zaawansowania klinicznego ($r = 0,3661$) oraz ujemnych zależności między stężeniem PSA i bioTEST oraz %bioTEST w grupie

chorych na RGK w 1. i 2. stopniu zaawansowania klinicznego choroby (odpowiednio $r=-0.2224$ oraz $r=-0,2920$). Ostatecznie Doktorantka nie stwierdziła stymulującego udziału androgenów na rozwój raka prostaty, do czego odniosła się przekonująco w Omówieniu swoich wyników badań, wspartych wynikami wielu doniesień naukowych.

W mojej opinii najbardziej wartościowe i interesujące wyniki dotyczą analizy prawdopodobieństwa 10-letniego przeżycia Kaplana Meiera w 3 wariantach: w całej grupie chorych na raka stercza RGK, w grupie RGK podzielonej na 4 podgrupy według stadium zaawansowania choroby oraz podzielonej na 3 podgrupy ze względu na stopień złośliwości nowotworu wg. skali Gleasona. Wyniki wskazują na istotne skrócenie czasu przeżycia w grupach chorych z wyższym stadium zaawansowania choroby oraz większym stopniu złośliwości nowotworu. Ciekawym wydaje się również wykazanie, że stężenie tPSA, a nie fPSA, istotnie ujemnie koreluje z czasem przeżycia, zarówno w obserwacji 2- jak i 10-letniej. Interesującym elementem analizy wyników badań wydaje mi się również podział chorych na RGK na 2 podgrupy pacjentów: z wyjściowym odsetkiem testosteronu na poziomie $\leq 15,8$ nmol/L ($n=106$) i $>15,8$ nmol/L ($n=103$) i zbadanie istotności różnic w odsetkach wolnego i biodostępnego testosteronu (fTEST% i bioTEST%), LH, FSH i PRL. Wyniki tego badania wykazały wysokie znamienności różnic odsetków między tymi podgrupami dla median fTEST% i bioTEST% (odpowiednio 2,05 versus 1,79%; $p=0,0014$ i 47,0 versus 40,0%; $p=0,0008$).

Niewątpliwie pozytywnymi elementami wykonanych badań, wpływającymi w istotny sposób na wartość uzyskanych wyników pracy były:

1. Dobry nabór pacjentów do badań i wystarczająco ich liczba.
2. Sumienna analiza danych znajdujących się w dokumentacji medycznej i umiejętne jej wykorzystanie.
3. Trafność doboru metod badawczych z dobrym warsztatem oraz rzetelność przeprowadzanych oznaczeń.
4. Doskonałe opracowanie analizy statystycznej wyników badań.

W rozdziale Omówienie Wyników zawartym na 30 stronach, który bardziej, jak uważam, przyjął formę dyskusji, mgr Urszula Rychlik rzeczowo i krytycznie ustosunkowała się do uzyskanych wyników badań, próbując tłumaczyć i porównać obserwowane zjawiska z najnowszymi danymi z piśmiennictwa naukowego zagranicznego i krajowego. Dyskusja świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki. Piśmiennictwo jest dobrze zebrane i cytowane w odpowiednich miejscach w tekście rozprawy. Liczy aż 421 pozycji, a większość stanowią prace najnowsze z lat 2005 – 2018. Pozytywnym elementem jest także fakt, że zdecydowana większość zebranego piśmiennictwa, przypada na prace oryginalne.

Doktorantka postawiony cel zrealizowała z dużą nadwyżką. Formułując bowiem Cel pracy sądziła, że rozwiązanie postawionego celu badawczego nie będzie wymagać tak wielu niezamierzonych trudnych i długotrwałych badań wymagających dużej wiedzy,

doświadczenia i operatywności. Przeprowadzone badania pozwoliły na wyciągnięcie 4 wniosków, wynikających z przeprowadzonych badań i uzyskanych wyników. Praca stanowi interesujące, oryginalne osiągnięcie Doktorantki. Żywię nadzieję, że mgr Urszula Rychlik podejmie dalsze badania w tym zakresie, co moim zdaniem ma głębokie uzasadnienie.

Sumując, pracę oceniam bardzo pozytywnie, moje uwagi nie obniżają jej wartości. Podjęty temat jest zasadny. Uzyskane wyniki potwierdziły słuszność założeń pracy i postawionego celu badawczego. Wnioski wynikają z uzyskanych rezultatów badań. Praca posiada niewątpliwe walory poznawcze, wnoszące określony wkład w rozwój nauki.

W głębokim przekonaniu ostatecznie stwierdzam, że Doktorantka w dobrze zaplanowanych i wykonanych samodzielnie badaniach rozwiązała należycie podjęty problem naukowy. W przedstawionej mi do recenzji rozprawy wykazała się bardzo dobrą wiedzą teoretyczną i praktyczną. Ostatecznie uznaję, że rozprawa odpowiada wszelkim wymogom stawianym pracom doktorskim zgodnie z Ustawą z dnia 14 marca 2003 roku (Dziennik Ustaw RP Nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami. W moim głębokim przekonaniu zasługuje na wyróżnienie i taki wniosek przedkładam Wysokiej Radzie Naukowej.

Mam przeto zaszczyt i przyjemność prosić Wysoką Radę Naukową Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie o dopuszczenie mgr Urszuli Rychlik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



00518 prof. dr hab. n. med. Marek Paradowski
DIAGNOSTA LABORATORYJNY
specjalista analityki klinicznej
specjalista toksykologii