

**Recenzja**  
**rozprawy doktorskiej lek. med. Magdaleny Dudy**  
**pt.: „Ekspresja i polimorfizm C3435T genu oporności wielolekowej**  
**u chorych z rakiem pęcherza moczowego”**

Rak pęcherza moczowego (BCa – *bladder cancer*) jest jednym z najpoważniejszych wyzwań współczesnej uro-onkologii. U mężczyzn występuje on 3-4-krotnie częściej niż u kobiet, przy czym u kobiet stanowi on nie mniej niż 40% a u mężczyzn ponad ¼ wszystkich nowotworów złośliwych będących przedmiotem uro-onkologii. Dominującą postacią histopatologiczną BCa jest rak wywodzący się z urotelium, zwany dawniej rakiem przejściowo-komórkowym (TCC – *transitional cell cancer*) a współcześnie rakiem urotelialnym (UC – *urothelial cancer*). Znaczna większość pierwotnych raków tego rodzaju ograniczona jest w chwili rozpoznania do urotelium (Ta lub CIS), bądź nacieka podnabłonkową tkankę łączną (T1) – określa się je akronimem NMIBC (*non-muscle invasive BCa*). Pozostałe naciekają co najmniej mięsień wypieracz moczu – MIBC (*muscle invasive BCa*). Leczenie pierwotne NMIBC polega na przezcewkowym wycięciu guza (TURBT – *transurethral resection of the bladder tumor*), przy u czym niemałej części chorych dochodzi po zabiegu do wznowy miejscowej guza. Z kolei wznowie może towarzyszyć progresja w postaci zwiększenia złośliwości raka, zwiększenia liczby guzów lub/i zwiększenia zaawansowania miejscowego (progresja do MIBC). Prawdopodobieństwo wystąpienia wznowy i progresji po TUR raka ograniczonego do błony śluzowej określa się w praktyce klinicznej na podstawie zarówno przesłanek klinicznych (np. liczba guzów i ich wielkość) jak i przesłanek uzyskanych na podstawie badania histopatologicznego materiału pochodzącego z TURBT (np. złośliwość i głębokość naciekania błony śluzowej). Rak naciekający błonę mięśniową, a także u niektórych chorych rak T1 lub CIS, stanowią wskazanie do radykalnego wycięcia pęcherza (RC – *radical cystectomy*). Nowotwory tego rodzaju stwarzają ryzyko tworzenia przerzutów do węzłów chłonnych lub/i przerzutów odległych. Prawdopodobieństwo istnienia mikro-przerzutów (zmian niewidocznych w tomografii komputerowej wykonanej przed RC) zależy zarówno od złośliwości, jak i od stopnia zaawansowania miejscowego UC. W celu ich zniszczenia stosuje się przed CR opartą na cisplatynie chemioterapię systemową (naChTx – *neoadjuvant chemotherapy*). Na zakończenie tych uwag wstępnych pragnę zaznaczyć, że zarówno na ryzyko wznowy i progresji NMIBC, a także na celowość zastosowania poprzedzającej CR naChTx i jej skuteczność musi wpływać charakterystyka genu konkretnego nowotworu.

Rozprawa będąca przedmiotem niniejszej recenzji, przedstawiona w postaci obszernego i starannie przygotowanego dzieła mającego układ typowy dla rozpraw tego rodzaju, dotyczy pośrednio jednego z najważniejszych zagadnień współczesnej uro-onkologii. Odnosi się ona bowiem do charakterystyki genowej raków urotelialnych pęcherza moczowego, która – jeśli zostanie poznana dogłębnie – wpłynie najpewniej na uszczegółowienie określania ryzyka nawrotu i związanego z nim ryzyka progresji po TURBT i tym samym pozwoli na precyzyjne definiowanie wskazań do leczenia uzupełniającego wlewkami dopęcherzowymi szczepionki BCG lub chemioterapeutyku. Ponadto, możliwość dokładnego określenia charakterystyki genowej UCs stanowiących wskazanie do RC stworzy



podstawy do dokładnego ustalenia, czy zastosowanie naChTx jest uzasadnione, inaczej mówiąc, czy konkretny rak okaże się wrażliwy na tę formę leczenia.

Cele badań przeprowadzonych przez Kol. Magdalenę Dudę sformułowane są jednoznacznie i klarownie. Doktorantka przedstawia je w rozdziale II. rozprawy („Założenia i cel pracy”, str. 25-26). Głównym celem naukowym jest nie tylko określenie zbadanej w materiale tkankowym pochodzącym z TURBT ekspresji zasadniczego genu oporności wielolekowej (genu *MDR1* – *multidrug resistance gene*), ale także szeregu cech molekularnych charakteryzujących badane przez Doktorantkę guzy – cech takich jak: typ odmienności morfologicznej (polimorfizmu) typu C3435T egzonu (eksonu) 26 genu *MDR1* oraz istnienia lub nieistnienia metylacji promotora genu *MDR1*.

Wprowadzenie do rozprawy doktorskiej Kol. Magdaleny Dudy, stanowi bardzo dobrze napisany wstęp. Jest on zredagowany w sposób znamionujący opanowanie przez Autorkę rozległej, wysoko specjalistycznej wiedzy dotyczącej tematu rozprawy. W jego pierwszej części przedstawia Doktorantka podstawowe informacje dotyczące raka pęcherza moczowego – od epidemiologii i etiologii oraz czynników warunkujących ryzyko powstania tego nowotworu poprzez systemy jego klasyfikacji do metod rozpoznania i podstawowych zasad leczenia. Druga część wstępu (str. 18-24 rozprawy), zatytułowana „Wybrane molekularne aspekty oporności wielolekowej” zawiera bogaty opis uwarunkowań molekularnych tej szczególnej cechy (*MDR* – *multidrug resistance*) nowotworów złośliwych, w tym raka urotelialnego. Jestem przekonany, że ten fragment Wstępu godzien jest wykorzystania przez Autorkę do napisania odrębnego artykułu poglądowego przeznaczanego dla ogółu urologów.

Materiał badań stanowią dane kliniczne, wyniki badań histopatologicznych oraz wyniki analiz molekularnych próbek tkankowych pochodzących z TURBT wykonanej u 115 chorych leczonych w jej podstawowym miejscu pracy Doktorantki – w Szpitalu Specjalistycznym im. Prof. Emila Michałowskiego w Katowicach. Badania przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego. Próbkę tkankową pobierano metodą tzw. zimnej biopsji kleszczykowej, czyli w sposób uniemożliwiający uszkodzenie termiczne materiału tkankowego. Analizie ostatecznej, w tym analizie statystycznej wykonanej z użyciem odpowiednio dobranych metod, poddano materię badawczą dotyczącą 97 chorych – czyli jedynie tych, których dokumentacja kliniczna (cechy T i G, wielkość i liczba guzów, wskaźnik ryzyka nawrotu guza) oraz charakterystyka molekularna wyciętych u nich guzów (poziom ekspresji genu *MDR1*, polimorfizm C3435T genu *MDR1* oraz stopień metylacji promotora tego genu) były kompletne. Wyłączenie z pierwotnej liczby chorych 8 osób bez kompletu analizowanych później danych należy uznać za właściwe, bo stanowiące o niebudzącej wątpliwości wiarygodności ostatecznych ocen. Uznanie budzi jeszcze jeden zabieg metodyczny. Otóż, niezależnie od badań przeprowadzonych na wycinkach tkankowych pochodzących z guzów nowotworowych, Autorka pobierała zawsze wycinki z niezmienionej błony śluzowej, aby później porównać wyniki badań molekularnych obu tych materiałów. Ponadto uzyskała materiał biopsyjny pobrany z prawidłowej błony śluzowej pęcherza u 10 osób niedotkniętych rakiem pęcherza, aby ocenić go pod względem jego cech molekularnych. Ocena ta wykazała nieistnienie różnic między charakterystyką molekularną materiału tkankowego uzyskanego od tych osób i charakterystyką molekularną materiału pochodzącego z biopsji makroskopowo niezmienionej błony śluzowej chorych poddanych TURBT. Dzięki temu uzyskała Doktorantka dowód na to, że tkanki pochodzące z biopsji niezmienionych obszarów pęcherza w przypadku TURBT są wiarygodnym materiałem odniesienia dla tkanek pochodzących z biopsji guzów pęcherza.

Metody badań przedstawione są w sposób nadzwyczaj staranny i szczegółowy (str. 28-49 rozprawy). Muszę powstrzymać się od merytorycznej ich oceny (nie jestem specjalistą w tej dziedzinie), niemniej po starannym ich przeczytaniu odnoszę wrażenie, że są zaprezentowane tak, że badania przeprowadzone przez Doktorantkę metodami przez nią użytymi można by powtórzyć w innym ośrodku specjalistycznym. Lektura rozdziału „Metody” przekonuje o kolosalnej rozległości badań i dużym stopniu ich skomplikowania a tym samym



budzi respekt dla pracowitości Doktorantki. Nie sądzę, aby Kol. Magdalena Duda osobiście wykonała wszystkie analizy molekularne, niemniej nie mam powodu wątpić w Jej ogromny wkład w zbudowanie i zgromadzenie materii naukowej Jej dysertacji doktorskiej. Przekonanie uzyskuję dostrzegając podczas lektury swobodę i znanstwo z jakimi metody badań są przez Doktorantkę opisane. Do oceny bardzo szerokiego spektrum wyników oraz do zbadania wielu wzajemnej zależności zastosowała Kol. Magdalena Duda dobrze dobrane metody statystyczne. W podrozdziale „Analiza statystyczna wyników” (str. 48-49 rozprawy) wyjaśniła przesłanki, które skłoniły Ją do właśnie takiego doboru tych metod, który uznała za stosowny.

Wyniki badań przeprowadzonych przez Doktorantkę przedstawione są w obszernym, dobrze skonstruowanym rozdziale (strony 50-80 rozprawy). Lekturę tego rozdziału ułatwia opatrzenie poszczególnych jego części odpowiednio skonstruowanymi zestawieniami tabelowymi i wieloma czytelnymi rycinami. W pierwszej części tego rozdziału Autorka wyjaśnia przekonująco dlaczego wycinki pobrane z niezmienionej błony śluzowej pęcherza („mapping kontrolny”) u osób poddanych TURBT można traktować jako „materiał odniesienia” dla materiału pochodzącego z guzów zwłaszcza, że badane cechy molekularne tego „materiału odniesienia” były takie same jak cechy materiału pochodzącego z biopsji błony śluzowej pęcherza wykonanej u poddanych cystoskopii osób, u których rak pęcherza nie występował (patrz wyżej), a także tłumaczy, co następuje (cyt. ze str. 50 rozprawy): „dla weryfikacji możliwości zastosowania prób pochodzących z tzw. *mappingu* jako prób odniesienia w prowadzonych badaniach uwzględniono porównanie profilu ekspresji genu *MDR1* i genu referencyjnego dla  $\beta$ -aktyny w tkankach *mappingu* z analogicznym oznaczaniem w próbach tkanek pobieranych od kontrolnej grupy zdrowych pacjentów, bez zmian nowotworowych w pęcherzu .... wykazano, że wyznaczany poziom ekspresji *MDR1* i genu kontrolnego ( $\beta$ -aktyny) nie różnił się pomiędzy próbami oznaczanymi jako *mapping* a wycinkami tkanek prawidłowych pobieranych z pęcherza osób grupy kontrolnej ..... próby *mappingu* potraktowano jako próby kontrolne dla badanych prób wycinków guzów pobieranych u tych samych pacjentów”. Dalej informuje, że „nie stwierdzono różnic o znamienności statystycznej pomiędzy poziomem ekspresji *MDR1* u kobiet i mężczyzn” a ponadto, że nie wykryto „korelacji między wiekiem pacjentów a poziomem badanego genu”. Te stwierdzenia upoważniły Doktorantkę do potraktowania całej grupy 97 pacjentów jako względnie jednorodnej kohorty i umożliwiły tym samym dokonanie zbiorcze analiz uzyskanych przez Nią wyników. Wobec tego odniesiono analitycznie poziom ekspresji genu *MDR1*, polimorfizm C3435R genu *MDR1* oraz stopień metylacji promotora tego genu do kolejno:

- złośliwości raka (wg 3-stopniowej klasyfikacji: G1, G2, G3);
- stopnia zaawansowania miejscowego guza (cecha T w klasyfikacji TNM: Ta vs T1 vs T2);
- liczby guzów (guz pojedynczy vs co najmniej 2 guzy) – uwzględniono przy tym badanie zależności od wspomnianej liczby guzów w połączeniu z ich złośliwością a następnie w połączeniu ze stopniem ich zaawansowania;
- największej średnicy guzów ( $\leq 3$  cm vs  $> 3$  cm).

W części IV.5 rozdziału „Wyniki” analizuje Autorka „wpływ polimorfizmu C3435T egzonu 26 genu *MDR1* na poziom ekspresji” tego genu i stwierdza, że największa ekspresja *MDR1* występowała w przypadku polimorfizmu C/C a najmniejsza w przypadku polimorfizmu T/T. Kolejne części tego podrozdziału zawierają prezentację analiz uwzględniających złośliwość guzów, następnie ich zaawansowanie i liczebność oraz stopień ryzyka wznowy i progresji raka po TURBT (wg powszechnie przyjętej klasyfikacji opracowanej przez EORTC Genito-Urinary Group – istota tej klasyfikacji przedstawiona jest we „Wstępie” na str. 13 i 14 rozprawy). Podobne metodologicznie analizy dotyczące kolejnego zagadnienia – „analiza zależności poziomu ekspresji genu *MDR1* w odniesieniu do obecności lub braku metylacji promotora genu” przedstawione są w następnym podrozdziale (IV.6). Nadzwyczaj ważną część tego podrozdziału stanowi jego fragment końcowy (od str. 77 rozprawy), w którym Doktorantka prezentuje wyniki analiz ekspresji *MDR1*, jego badanych polimorfizmów oraz stopnia metylacji jego promotora w odniesieniu do rzeczywistej wznowy raka urotelialnego wykrytej w toku wieloletniej obserwacji po pierwotnej TURBT. Wyniki tych bardzo ważnych z klinicznego punktu widzenia analiz są następujące: ekspresja *MDR1* w tkance guzów

pierwotnych okazała się statystycznie znamienne większa u chorych, u których doszło do nawrotu niż u osób, u których nawrót nie wystąpił, ponadto stwierdzono, że ekspresja *MDR1* była statystycznie znamienne większa u tych chorych, u których występował genotyp C/C i u których doszło do nawrotu niż u tych, u których nawrót nie wystąpił. Na tej podstawie formułuje Kol. Magdalena Duda konkluzję, że (cyt. ze str. 78 rozprawy) „dwukrotny wzrost ekspresji *MDR1* prowadził do zwiększenia o 1,3 ryzyka nawrotu choroby” (str. 78). W zakończeniu rozdziału „Wyniki” znajduje się krótka jego część dotycząca analizy prawdopodobieństwa przeżycia bez wznowy po TURBT – ilustruje je rycina 35 na str. 80 rozprawy. Niemniej, Autorka komentuje ten wykres krytycznie, bowiem podkreśla, że wznowę stwierdzono w ciągu 8 lat obserwacji jedynie u 1/5 chorych (to dobrze), co sprawia, że Jej zdaniem (cyt.) „badania w tym zakresie wydają się być pożądane a ich kontynuacja wysoce oczekiwana” – czy ten komentarz można traktować jako zapowiedź kontynuacji aktywności naukowej Doktorantki w tym zakresie? Na marginesie tego fragmentu recenzji pragnę podkreślić, że oczekiwałbym przedstawienia najbardziej niekorzystnej pod względem ryzyka nawrotu konstelacji badanych przez Kol. Małgorzatę Dudę cech molekularnych guza. W rozprawie dostrzegam jedynie poszczególne elementy analizy tego rodzaju a interesujące byłoby przeprowadzenie analizy wielowymiarowej uwzględniającej łącznie ekspresję *MDR1*, jego polimorfizm oraz metylację jego promotora.

Przedostatni fragment merytorycznej zawartości rozprawy stanowi rozdział „Dyskusja” (str. 81-96). Napisany jest z godnym uznania dla Doktorantki znanstwem przedmiotu i świadczy o rozległej wiedzy Kol. Magdaleny Dudy, będącej wynikiem nie tylko własnego doświadczenia ale także znakomitej znajomości piśmiennictwa odnoszącego się do materii rozprawy. Zawiera on kompendium współczesnej wiedzy na temat uwarunkowań genetycznych nowotworzenia, w tym powstania raka urotelialnego. W tym rozdziale powołuje się Doktorantka na informacje zawarte w dobrze dobranym, obszernym i aktualnym piśmiennictwie światowym i na ich tle omawia krytycznie istotę i znaczenie wyników własnych badań. Lektura tej części pracy przekonuje, że Doktorantka posiadała znajomość prowadzenia dyskursu prawdziwie naukowego, w którym wykorzystuje doświadczenie własne i osiągnięcia innych autorów.

Rozprawę Kol. Magdaleny Dudy wieńczy aż 9 wniosków – wszystkie są uzasadnione i wypływają logicznie z wcześniejszego wywodu. Mają one walor zarówno naukowy jak i poznawczy oraz do pewnego stopnia praktyczny. Najważniejszymi z klinicznego punktu widzenia wydają się wnioski 4., 6., 7. i 9. Wnioski świadczą, że Doktorantka zrealizowała wyznaczone przez nią cele badań. Cieszy, że wnioski sformułowane są w sposób wyważony. Autorka unika w nich stwierdzeń nazbyt „odważnych”. Niemniej, wniosek ostatni jest moim zdaniem bardzo znaczący – wynika zeń bowiem, że oznaczenie ekspresji genu *MDR1* oraz metylacji jego promotora w tkance guza mogłoby wskazać tych chorych na urotelialnego raka pęcherza moczowego, u których ryzyko wznowy po TURBT jest wzmożone.

Po wnioskach znajduje się spis dobrze dobranego piśmiennictwa liczącego aż 187 pozycji, w tym także artykułów autorstwa naukowców rodzimych. Zakończenie rozprawy stanowi krótkie sprawnie sformułowane streszczenie, napisane w języku polskim i w języku angielskim

Na zakończenie niniejszej oceny pragnę podkreślić z satysfakcją, że lektura rozprawy lek. Magdaleny Dudy była dla mnie autentyczną przyjemnością, ponieważ rozprawa mimo, że dotyczy materii naukowej wysoce specjalistycznej, to napisana jest jasno i zrozumiale, również dlatego, że opatrzona jest dobrze skonstruowanymi tabelami i klarownymi rycinami. Temat rozprawy uznaję za trafny i nierzwykłym interesujący. Chcę także uwypuklić dobitnie, że Autorka rozprawy jest urologiem-praktykiem o uznanej renomie i nie pracuje w ośrodku akademickim, co sprawia, że Jej przedstawione w rozprawie wysoko specjalistyczne dokonanie naukowe, niezwiązane bezpośrednio z warsztatem klinicznym, który wykorzystuje w codziennej praktyce, zasługuje na szczególne uznanie. Nie wątpię, że wartość naukowa rozprawy jest nie tylko pochodną staranności badawczej oraz pracowitości, doświadczenia i



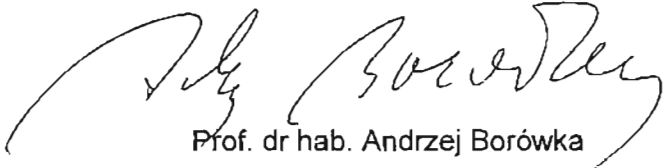
wiedzy jej Autorki, ale także przymiotów naukowych Pani dr hab. Ilony Bednarek pełniącej funkcję promotora w przewodzie doktorskim Kol. Magdaleny Dudy.

Nie mam wątpliwości, że dzieło Kol. Magdaleny Dudy, przedstawione w formie rozprawy doktorskiej opracowanej pod względem edytorskim bardzo starannie, jest autentycznym osiągnięciem naukowym. Przekonuje ono o pasji badawczej Autorki oraz o Jej umiejętności planowania i konsekwentnego realizowania trudnych badań. Ponadto, jest dowodem rozległej wiedzy i doświadczenia Doktorantki w dziedzinie onkologii, a zwłaszcza w jej trudnym obszarze obejmującym uwarunkowania molekularne raka pęcherza moczowego. Uznanie budzi także wyraźnie widoczna umiejętność współpracowania przez Kol. Magdalenę Dudę z zespołem badawczym działającym poza Jej zasadniczym miejscem wykonywania praktyki klinicznej.

Uważam, że rozprawa pt. „„Ekspresja i polimorfizm C3435T genu oporności wielolekowej u chorych z rakiem pęcherza moczowego” jest dziełem zasługującym na bardzo wysoką ocenę. Biorąc pod uwagę jego doniosłość w rodzimym piśmiennictwie onkologicznym, nie waham się uznać, że zasługuje na wyróżnienie.

Jestem w pełni przekonany, że opracowanie przedstawione przez Kol. Magdalenę Dudę spełnia wszelkie kryteria rozprawy na stopień doktora nauk medycznych.

Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu wniosek o dopuszczenie lek. Magdaleny Dudy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Andrzej Borówka