

**Ocena pracy doktorskiej lekarza Mateusza Rubinkiewicza pt.
Odpowiedź immunologiczna organizmu z udziałem limfocytów T regulatorowych
i jej wpływ na powstawanie nowotworów przewodu pokarmowego.**

Nowotwory przewodu pokarmowego są poważnym problemem zdrowotnym i społecznym. Co roku z ich powodu umiera na świecie ponad milion osób. Wyleczenie możliwe jest tylko we wczesnym stadium choroby. Niestety większość przypadków rozpoznawana jest dopiero w stadium zaawansowanym. Niektóre spośród nowotworów przewodu pokarmowego powstają na podłożu tak zwanych stanów przednowotworowych. Wczesne ich rozpoznanie i właściwe leczenie może zapobiec powstaniu nowotworu złośliwego i uchronić pacjentów od jego groźnych następstw. Ważne jest jednak właściwe odróżnienie zmian łagodnych od złośliwych, aby zastosować adekwatny sposób i zakres leczenia. Próbę różnicowania pomiędzy stanami przednowotworowymi a nowotworami przewodu pokarmowego podjął w swojej pracy lekarz Mateusz Rubinkiewicz.

Organizm człowieka dysponuje różnymi mechanizmami obrony przed nowotworami. Szacuje się, że każdego dnia miliardy komórek ulegają mutacjom. Skuteczne działanie układu odpornościowego zapewnia eliminację nieprawidłowych komórek i zabezpiecza nas przed nowotworami. Mechanizmy immunologiczne chroniące przed nowotworami obejmują: cytotoksyczność komórkową zależną od przeciwciał, działanie limfocytów T cytotoksycznych, cytotoksyczność pobudzonych neutrofilów i makrofagów, aktywację cytokin i układu dopełniacza. Niestety niektórym nowotworom udaje się uniknąć eliminacji przez układ immunologiczny. Ważną rolę w procesie tolerancji immunologicznej pełnią limfocyty T regulatorowe, charakteryzujące się ekspresją białka Foxp3.

Celem pracy lek. Mateusza Rubinkiewicza była ocena nacieku zapalnego z udziałem limfocytów T regulacyjnych oraz limfocytów T pomocniczych w obrębie zmian przednowotworowych oraz raków jelita grubego, żołądka i przełyku, a także określenie równowagi immunologicznej pomiędzy subpopulacjami limfocytów T regulatorowych oraz T pomocniczych na poszczególnych etapach karcynogenezy raków gruczołowych przewodu pokarmowego.

Spśród trzech publikacji, na których opiera się praca doktorska lek. Mateusza Rubinkiewicza, we wszystkich doktorant jest pierwszym autorem. Moim zdaniem jakość oraz

dobór cytowanych prac całkowicie spełnia warunki, stawiane rozprawom doktorskim. Publikacje analizują trzy stany przednowotorowe w porównaniu z nowotworami inwazyjnymi. Są to kolejno: polipy jelita grubego, przełyk Barretta oraz zanikowe zapalenie błony śluzowej żołądka.

Pierwsza z omawianych publikacji analizuje populacje limfocytów regulatorowych Foxp3 w tkankach zdrowych i polipach jelita grubego uzyskanych kolonoskopowo oraz w preparatach raka jelita grubego, pochodzących z zabiegów operacyjnych. Łącznie oceniono materiał pochodzący od 27 pacjentów. Autorzy badali ekspresję jądrową Foxp3 oraz błonową CD4, co ze względów metodologicznych wymagało użycia innych skrawków tkankowych. Badający wykazali stopniowo wzrastającą ekspresję zarówno Foxp3, jak i CD4 od polipów hiperplastycznych, przez gruczolakowe z dysplazją małego i dużego stopnia, do raków inwazyjnych jelita grubego, w których ekspresja obu markerów była najwyższa. Po wyliczeniu wzajemnego stosunku komórek wykazujących ekspresję Foxp3 do tych z ekspresją CD4, autorzy stwierdzili najniższe wartości dla polipów hiperplastycznych, a najwyższe dla tkanek raka jelita grubego, choć przyznają, że wyniki analizy statystycznej potwierdzają jedynie różnice pomiędzy pacjentami z polipami gruczolakowatymi z dużą dysplazją dużego stopnia oraz rakiem jelita grubego jako znamienne. Należy zwrócić uwagę na fakt, że badający rzetelnie i samokrytycznie podkreślili w pracy, że słabym punktem badania jest brak oceny ekspresji Foxp3 oraz CD4 na tych samych skrawkach. Nadmienili także, że ekspresja jądrowa Foxp3 nie jest wyłącznie cechą limfocytów regulatorowych. Te przesłanki wzmacniają wiarygodność doktoranta w krytycznej ocenie oraz opracowywaniu uzyskanych wyników.

Drugi przedstawiony artykuł porównuje ekspresję jądrową Foxp3 w wycinkach uzyskanych endoskopowo od 14 osób z zapaleniem przełyku bez metaplazji, 15 pacjentów z przełykiem Barretta oraz 14 chorych na raka przełyku. Poszczególne grupy zostały opisane pod względem charakterystyki pacjentów. Metodami immunohistochemicznymi oceniono ekspresję Foxp3 oraz CD4. Wykazano najwyższą ekspresję Foxp3 w komórkach raka jelita przełyku. Była ona kilkanaście razy wyższa, niż w materiale od pacjentów z zapaleniem przełyku bez metaplazji. Pośrednie wartości uzyskano w tkankach z metaplazją typu Barretta. Co ciekawe, ekspresja Foxp3 miała tendencję do wyższych wartości u pacjentów bez dysplazji, niż z dysplazją. Zwraca uwagę niespójność danych przedstawionych w tabeli, gdzie opisano 6 osób z przełykiem Barretta oraz dysplazją, podczas gdy na rycinie zilustrowano 9 osób z dysplazją. Nieco bardziej zastanawia fakt, że w streszczeniu opisano, że poza Foxp3

oceniona została również ekspresja CD4, natomiast brakuje wzmianki na ten temat w metodach, wynikach i dyskusji. Przyjąłem, że należy to traktować jako błędy edycyjne w przygotowaniu pracy do druku.

Trzecia z publikacji, składających się na przedstawioną mi do oceny dysertację doktorską jest pracą przyjętą do druku. Autorzy opisują w niej wyniki badań, przeprowadzonych na materiale tkankowym u 11 pacjentów z rakiem żołądka, 12 chorych z zanikowym zapaleniem błony śluzowej żołądka oraz 14 zdrowych osób. Ekspresja Foxp3 była średnio ponad trzykrotnie wyższa u chorych z nowotworem złośliwym, niż w dwóch pozostałych grupach, nie różniących się znamienne między sobą. Podobnie przedstawiała się ekspresja CD4, choć różnica między grupami była mniejsza. Autorzy w pracy dyskutują wyniki, omawiając także wzajemny stosunek wyników ekspresji CD4 oraz Foxp3. Samokrytycznie badacze stwierdzają, że brak korelacji uzyskanych wyników ze stopniem zaawansowania raka żołądka wynika najpewniej z niewielkiej liczebności próby badanej.

Omawiane publikacje zostały przygotowane zgodnie z wymaganiami stawianymi tego typu opracowaniom. Porównywane grupy są dobrane właściwie. W pierwszych dwóch pracach autorzy jasno precyzują kryteria włączenia oraz wykluczenia pacjentów z przeprowadzanych badań. Przestrzegają także wymaganych norm etycznych. Technika pobrania materiału oraz metodyka badań immunohistochemicznych zostały przedstawione w sposób klarowny i wyczerpujący. Metody statystycznego opracowania wyników dobrano właściwie, a same wyniki przedstawiono przejrzysto w postaci tabel i wykresów. Dwie z trzech prac zawierają wysokiej jakości zdjęcia mikroskopowe, ilustrujące ekspresję badanych białek. Omówienie wyników jest dogłębne i uwzględnia współczesne piśmiennictwo. W przedstawionych pracach uwzględniono uwagi samokrytyczne, dowodząc rzetelności przygotowania prac do druku. Proporcje poszczególnych części prac są właściwe. Jakość merytoryczną przedstawionych prac oceniam wysoko. Największą wartością przedstawionych badań jest zwrócenie uwagi na nowy aspekt immunologii nowotworów oraz stanów przednowotworowych przewodu pokarmowego.

Dysertacja zawiera klarowne omówienie, podsumowujące trzy prace badawcze, stanowiące jej podstawę. Dyskusja podzielona jest na przejrzyste podrozdziały, omawiające dogłębnie poszczególne publikacje. Świadczy o perfekcyjnej znajomości literatury i zrozumieniu znaczenia uzyskanych wyników.

Wnioski zebrane w czterech punktach wynikają z pracy, stanowią podsumowanie jej wyników. Cele pracy znajdują swoje odzwierciedlenie w przedstawionych wynikach oraz wnioskach. Zastanawia, dlaczego we wniosku drugim doktorant nie wymienia polipów gruczolakowatych jelita grubego, mimo że w pierwszej publikacji opisuje znamienne wyższe wartości Foxp3 w polipach z dysplazją. Wzbudza moją ciekawość interpretacja komórek z ekspresją Foxp3 jako limfocytów regulatorowych. Opisano ekspresję tego białka także w innych komórkach, w tym w komórkach nowotworowych. Czy wyniki badań, opisanych przez doktoranta wskazują jednoznacznie, że komórki z ekspresją Foxp3 są limfocytami regulatorowymi?

Piśmiennictwo obejmuje 22 pozycje, w większości z ostatnich lat. Uwzględniono w nim również publikacje krajowe.

Drobne uwagi edycyjne, głównie natury interpunkcyjnej, przekazano doktorantowi. Zwróciło moją uwagę niespójne nazewnictwo limfocytów T „regulatorowych” czy też, jak doktorant ujął to w celach pracy – „regulacyjnych”. Osobiście skłaniałbym się za tą drugą wersją, ponieważ angielski przymiotnik „regulatory” tłumaczy się jako „regulacyjny”.

Te, oraz wymienione przeze mnie wcześniej drobne uwagi nie umniejszają mojej pozytywnej oceny pracy Mateusza Rubinkiewicza, która wnosi nowe informacje na temat komórek, charakteryzujących się ekspresją białka Foxp3 w stanach przednowotworowych. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny praca doktorska lek. Mateusza Rubinkiewicza spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Wnoszę do Pana Dziekana oraz Rady Wydziału Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie lek Mateusza Rubinkiewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Piotr Myśliwiec
specjalista chorób
1170222