Gdańsk 31.10.2012

Dr hab. med. Marcin Matuszewski

Katedra i Klinika Urologii

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Ocena

pracy doktorskiej lek. med. Michała Markowskiego pt.: „ Ocena wartości diagnostyki fotodynamicznej (PDD) i testów genetycznych w rozpoznawaniu raka śródnabłonkowego (Cis) pęcherza moczowego"

Nowotwór pęcherza moczowego jest w 70-80 % wykrywany w fazie powierzchownej, czyli ograniczonej do błony śluzowej. W tej kategorii znajduje się także jego postać śródnabłonkowa, obejmująca zmiany ograniczone do śluzówki pęcherza, ale charakteryzujące się znacznym stopniem atypii komórkowej. Obecnie przyjęte leczenie guzów powierzchownych polega na elektroresekcji przezcewkowej stwierdzonych zmian nowotworowych uzupełnionej dopęcherzowymi wlewkami chemioterapeutyku. Zmiany o charakterze przedinwazyjnym śródnabłonkowym (Ca in situ) wymagają elektroresekcji i uzupełniających wlewek w immunoterapeutyku czyli zawiesiny atentowanych komórek BCG. Poważnym problemem medycznym w tej chorobie jest duża skłonność powierzchownych nowotworów do nawrotów. Sięga ona w zależności od stopnia złośliwości guza nawet 70%. Drugim niebezpieczeństwem jest możliwość postępu nowotworu pod postacią naciekania głębszych ścian pęcherza moczowego, co w konsekwencji wymaga operacyjnego usunięcia pęcherza. Progresja choroby oznacza też zwiększone ryzyko rozsiewu choroby i śmierci chorego.

W związku z powyższym niezwykle istotne jest prawidłowe prowadzenie chorych po pierwszej elektroresekcji nowotworu powierzchownego. Polega on na wielokrotnie wykonywanych cystoskopiach i elektroresekcjach ewentualnych nawrotów oraz stosowaniu odpowiednio do wskazań wlewek z chemioterapeutyku lub BCG. Procedur te są uciążliwe dla pacjentów, a ich mnogość w połączeniu z dużą ilością chorych sprawiają , że w ujęciu całościowych rak pęcherza moczowego jest najbardziej kosztownym dla budżetu służby zdrowia nowotworem urologicznym.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska lekarza Michała Markowskiego z Wydziały Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi zajmuje się właśnie problemem poprawy jakości prowadzenia chorych z powierzchownym nowotworem pęcherza moczowego jak i oceną sposobów zmniejszenie jego inwazyjności.

Wybranie do analizy dwóch zagadnień z tej dziedziny, czyli zastosowania fotodynamicznego ulepszenia wziernikowania pęcherza oraz wykorzystanie molekularnych czynników prognostycznych znajdowanych w osadzie moczu uważam, za trafne i odpowiadające obecnym potrzebom.

Redakcyjny układ pracy wynika jak rozumiem z wymagań obowiązujących na wydziale macierzystym doktoranta. Najpierw następuje streszczenie pracy w języku polskim i angielskim zawierające skrótowe omówienie badanego zagadnienia, potem wstęp poruszający istotne z punktu widzenia rozprawy doktorskiej aspekty diagnostyki i leczenia nowotworów pęcherza moczowego.

Następnie w rozdziale: „Założenia i Cel pracy" doktorant określa, że istotą pracy była chęć potwierdzenia na własnym materiale przydatności diagnostyki fotodynamicznej i badań molekularnych w rozpoznawaniu i leczeniu powierzchownego raka pęcherza moczowego, ze szczególnym zwróceniem uwagi na jego postać śródnabłonkową.

W kolejnych rozdziałach doktorant w sposób przejrzysty i wyczerpujący przedstawił współczesne poglądy na temat epidemiologii, klasyfikacji, diagnostyki i leczenia nowotworu pęcherza moczowego, co świadczy o dokładnej znajomości zagadnienia i bardzo podnosi wartość pracy. Opis poparty jest informacjami zaczerpniętymi z trafnie dobranego i bogatego piśmiennictwa. Przytoczone dane w sposób nie budzący wątpliwości uzasadniają celowość podjęcia badań opisanych w recenzowanej pracy.

W rozdziałach „Materiał i Metody" oraz „Wyniki" doktorant przedstawił charakterystykę dwóch grup pacjentów utworzonych w celu realizacji dwóch głównych celów pracy, a także rezultaty opracowania uzyskanych danych.

Pierwszym celem pracy była ocena przydatności cystoskopii w świetle ultrafioletowym z dopęcherzowym użyciem fotouczulacza w diagnostyce nowotworów śródnabłonkowych pęcherza moczowego i zbadanie, czy można za jej pomocą wykryć zmiany nie widoczne przy standardowej cystoskopia w świetle białym.

Dla realizacji tego celu przeanalizowano wyniki leczenie 32 chorych, których przyjęto do kontroli po wykonanej wcześniej elektroresekcji powierzchownych guzów pęcherza uzupełnionej wlewkami.

W standartowej cystoskopii wykryto 7 wznów procesu nowotworowego, w tym żadnego o cechach Ca in situ. Przy zastosowaniu PDD udało się wykryć zmiany u 10 chorych, w tym u czterech były to zmiany o charakterze Ca in situ. W dwóch przypadkach współistniały ze zmianami o innym charakterze, a w dwóch występowały niezależnie. Następnie poddano tę grupę analizie statystycznej.

Analiza statystyczna przydatności PDD w wykrywaniu nowotworów pęcherza moczowego w badanej grupie 32 pacjentów nie wykazała statystycznej istotnej różnicy w porównaniu z cystoskopią ze światłem białym przy p=0.57. Jest to wynik niezgodny, co prawda z danymi z piśmiennictwa, ale wynika z prawidłowego opracowania dostępnego materiału i najpewniej tę niezgodność można przypisać tylko małej wielkości grupy badane, co doktorant przyznaje w dyskusji. Patrz tabela 9.

W kolejnym etapie kontynuując analizę statystyczną wzięto pod uwagę tylko przypadki, u których stwierdzono nowotwór, ograniczając tym samym ilość analizowanych pacjentów do 10. W tak przeprowadzonej analizie potwierdzono, że jeżeli w pęcherzu jest wznowa, to do jej wykrycia cystoskopia z PDD ma statystycznie większą przydatność niż cystoskopią w świetle białym przy p = 0.04. Patrz tabel 10. Oczywiście wielkość grupy badanej osłabia siłę tego wniosku.

Tabela 11 opisuje podobną analizę wartości cystoskopii z PDD w diagnostyce nowotworów w podgrupie obejmującej histologiczne postacie raka urothelialnego razem z Ca in situ, bez zmian typu PUNLMP. Oceniono 7 chorych, u których wykryto 9 ognisk wznowy. Wykazano, w tej analizie statystyczne większą przydatność cystoskopii z PDD przy p= 0.02.

W tabeli 13 analizowano najważniejszą zależność w tej grupie, czyli przydatność PDD w diagnostyce wyłącznie Ca in situ. Analizie poddano 10 chorych, wykazując statystycznie istotna różnicę na korzyść PDD przy p = 0.03. Doktorant w dyskusji rzetelnie omawia pewne niedoskonałości tej analizy, co zapewne powtórzy podczas publicznej obrony.

W dalszym omówienie podano, że na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono

Drugim celem pracy było określenie przydatności oznaczeń markerów genetycznych występujących w komórkach osadu moczu w diagnostyce nowotworów pęcherza moczowego. Podkreślenia wymaga trudność oznaczania takich markerów w osadzie moczu, ale jednocześnie wiadomo, że jest to najbardziej mało inwazyjna metoda pobrania materiału z pęcherza.

Do jego realizacji doktorant podszedł w dwóch etapach. Najpierw przedstawił dane z badania tylko grupy 32 chorych leczonych z użyciem PDD. Oceniano u nich obecność markerów w komórkach w osadzie moczu. Podał , że nie udało mu się wykazać żadnej istotnej różnicy w występowaniu markerów HIF-1, GLUT1, endogliny, surwiwiny, COX-2, pomiędzy pacjentami ze stwierdzoną wznową i bez.

W drugim etapie doktorant analizuje różnice w obecności powyższych markerów w osadzie moczu powiększył grupę do 187 osób. Składała się ona z grupy 32 chorych analizowanych poprzednio oraz z 155 osób, w tym 83 pacjentów leczonych z powodu raka pęcherza moczowego i 71 całkiem zdrowych..

W kolejnych tabelach autor przedstawia obliczenia potwierdzające znamiennie statystycznie wyższą ekspresję markerów: czynnika indukowanego hipoksją-HIF-1, czynnika warunkującego transport glukozy -GLUT-1, markera aktywacji komórek śródbłonka naczyń krwionośnych i angiogenezy - endogliny, białka hamującego programowaną śmierć komórki – surwiwiny oraz, Cyklooksygenazy 2 - CoX-2 w moczu osób chorych na raka pęcherza moczowego w porównanie z osobami zdrowymi. Nie udało się natomiast udowodnić przydatności badanych markerów do precyzyjnego rozpoznania stopnia złośliwości histologicznej lub stopnia zaawansowania nowotworu. W dyskusji doktorant szeroko porównuje swoje wyniki z danymi piśmiennictwa potwierdzając ich zgodność.

Ciekawą i nową obserwacją jest to, że przy analizie ekspresji - HIF-1 okazało się, że jej średni poziom u zdrowych (w tym wypadku bez wznowy) w grupie po PDD był znacznie wyższy (805+/- 202), niż w drugiej grupie badanej u chorych z nisko zróżnicowanym rakiem G3 (524+/-203). Co prawda chorzy u których wykonywano PDD, to chorzy, u których wcześniej stwierdzano nowotwór pęcherza, ale były to zmiany w o różnych stopniach złośliwość. Tworzyli więc oni grupę, która składa się z różnych pacjentów jeżeli chodzi o stan nowotworu pęcherza, a ich jedyną cechą łączącą był fakt, że byli poddani jakiemuś testowi diagnostycznemu, w tym wypadku PDD. W związku z tym doktorant w dyskusji stwierdza, że przyczyną znaczących różnic w wynikach był być może wpływ

samego fotouczulacza na ekspresję HIF-1. Zaistnienie tego fenomenu utrudnia, co prawda, ocenę przydatności testu HIF-1 do diagnostyki nowotworu pęcherza moczowego, ale samo w sobie może dać przyczynek do dalszych badań.

Na podstawie analizy uzyskanych wyników doktorant podał następujące wnioski:

1. Użycie PDD w sposób statystycznie istotny zwiększa szansę wykrycia ognisk CIS u pacjentów leczonych z powodu raka urotelialnego ($p<0,03$).

Wniosek jest jak najbardziej prawdziwy i odpowiada na postawione przez doktoranta w założeniach pracy pytanie. Pewne zastrzeżenia budzi jedynie mała wielkość grupy badanej.

2. Poziom ekspresji wszystkich badanych genów nie koreluje z histologicznym typem wznowy raka pęcherza moczowego. Analiza statystyczna nie wykazała żadnych istotnych statystycznie różnic w ekspresji tych genów w poszczególnych przypadkach. Wartość p zawsze była wyższa niż 0,05.

Wniosek jest prawidłowy i odpowiada na zawarte w założeniach pytanie, czy markery genetyczne pozwolą na odróżnienie obecności raka śródnabłonkowego od innych postaci tego nowotworu. Moim zdaniem jako bardziej szczegółowy powinien jednak znaleźć się na trzecim miejscu.

3. Badania genetyczne komórek osadu moczu dostarczają istotnych informacji odnośnie biologii nowotworu. Ekspresja badanych genów na poziomie mRNA nie jest na chwile obecną pewnym testem pozwalającym na wykrycie raka pęcherza moczowego. Zaobserwowano statystyczną zależność między poziomem ekspresji badanych genów u osób zdrowych i osób z NIMBC co zachęca do prowadzenia dalszych badań na dużo większych grupach chorych, celem określenia przydatności wykonywanych testów genetycznych w praktyce klinicznej.

Wniosek jest prawidłowy i znajduje potwierdzenie w przeanalizowanym materiale. Na jego podstawie można rozważać, aby w przyszłości włączyć badane markery do typowania genowego, w którym bada się kilka lub kilkanaście białek lub genów na raz, aby w ten sposób postawić dokładniejsze rozpoznanie typu nowotworu wykorzystując analizę wielu czynników. Takie postępowania weszło już do praktyki klinicznej w leczeniu raka sutka pod postacią Oncotype czy Mammaprint.

Podsumowując, stwierdzam, że praca lek. med. Michała Markowskiego pt.: „ Ocena wartości diagnostyki fotodynamicznej (PDD) i testów genetycznych w rozpoznawaniu raka śródnabłonkowego (Cis) pęcherza moczowego" spełnia wymogi rozprawy na stopień doktora nauk medycznych. Kilka moich drobnych uwag nie umniejsza jej wartości i biorąc pod uwagę wkład pracy doktoranta i promotora wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk Biomedycznych i Kształcenia Podyplomowego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. med. Michała Markowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Kliniki Urologii
Uniwersyteckie Centrum Kliniczne
dr hab. med. Marcin Matuszewski