



Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii w Zabrze

41-808, Zabrze ul. H. Jordana 19

[www.histologia.zad.sum.edu.pl](http://www.histologia.zad.sum.edu.pl)

Prof. dr hab. n. med. Andrzej Gabriel

Zabrze dnia 09.01.2018

**Recenzja rozprawy doktorskiej  
lekarza Pawła Gajdzisa**

**pt.: *Ekspresja białka supresorowego PTEN w zależności od podtypu molekularnego raka piersi w guzach pierwotnych i odpowiadającym im przerzutach do węzłów chłonnych.***

Wyzwaniem dla współczesnej terapii onkologicznej jest opracowanie protokołów terapeutycznych dopasowanych do indywidualnych cech biologicznych każdego nowotworu złośliwego. Nie wytrzymał próby czasu schemat leczenia oparty jedynie na ustaleniu typu histologicznego, stopnia zróżnicowania i zaawansowania klinicznego nowotworów złośliwych. Pierwsze obserwacje dotyczące heterogenności guzów nowotworowych poczyniono u chorych na raka piersi, w którym współczesne leczenie uwzględnia podtyp molekularny guza determinowany przez status receptorów estrogenowych (ER), progesteronowych (PR) oraz Her-2 a także aktywność mitotyczną. Autor podejmuje ważny temat dotyczący poszerzenia wiedzy dotyczącej roli białka PTEN jako czynnika prognostycznego w przewidywaniu dalszego postępu choroby a także jego roli w ocenie homogenności współcześnie zdefiniowanych typów molekularnych raka. Jeżeli nie są to podtypy jednorodne, to istnieje potrzeba podjęcia dalszych badań nad zdefiniowaniem jeszcze nie uznanych za istotne czynników prognostycznych mogących mieć znaczenie dla opracowania protokołów terapeutycznych uwzględniających nowe leki będące w fazie prób

klinicznych . Innym ważnym i dostrzeganym dopiero od około 5 lat problemem jest obserwacja że w części raków piersi dochodzi do selekcji klonów komórkowych i ich szybkich mutacji w kierunku bardziej agresywnego i odróżnionego wzorca w stosunku do guza pierwotnego. Autor postanowił ocenić to zjawisko oceniając pobrane w tym samym czasie fragmenty tkankowe pochodzące z biopsji grubo igłowej oraz komórkowe pochodzące z biopsji cienkoigłowej regionalnych węzłów chłonnych zmienionych przerzutowo. Cel, który postawił sobie autor jest bardzo ważny w obliczu znanych faktów : u pewnego odsetka chorych na raka piersi leczonych zgodnie z ustalonym typem molekularnym guza pierwotnego obserwuje się niepowodzenia i brak odpowiedzi guza na zastosowane leczenie. W tej części dysertacji przed zdefiniowaniem szczegółowych celów autor stawia hipotezę: zjawisko zmiany ekspresji biomarkerów oraz zmiany podtypu molekularnego może w istotny sposób wpływać na niepowodzenia terapii raka piersi.

Cele szczegółowe rozprawy to :

- ocena różnic ekspresji białka PTEN w lokalizacji jądrowej i cytoplazmatycznej w guzie pierwotnym i występowanie zmian ekspresji w przerzutach do węzłów chłonnych
- analiza związku ekspresji białka PTEN z poszczególnymi podtypami molekularnymi raka piersi
- ocena związku występowania ekspresji PTEN z ekspresją receptorów ER PR i HER-2 w guzach pierwotnych i ich przerzutach
- ocena korelacji pomiędzy ekspresją PTEN a wiekiem chorych, typem i stopniem zróżnicowania histologicznego guza ,rozmiarem i zaawansowaniem nowotworu.
- ocena zjawiska zmienności występowania ekspresji ER PR i HER-2 oraz podtypu molekularnego w pierwotnym guzie piersi i jego przerzutach do węzłów chłonnych

Wybór celów badawczych jest istotny i ma ważne znaczenie praktyczne w poszerzaniu wiedzy dotyczącej właściwości biologicznych niektórych guzów złośliwych w występowaniu zmian fenotypu molekularnego już we wczesnej fazie rozsiewu komórek nowotworowych do lokalnych węzłów chłonnych . Mechanizmy powodujące to zjawisko między innymi zmiana ekspresji białka PTEN w obu lokalizacjach jądrowej i cytoplazmatycznej może być przyczyną nabytej oporności na hormonoterapię i leczenie anty –HER-2. Poznanie tego zjawiska pozwoli na

uzyskanie poprawy wyników leczenia chorych na raka piersi poprzez stosowanie inhibitorów m-TOR1. To stanie się możliwe poprzez ustalenie nowych strategii leczenia dopasowanych do aktualnych na danym etapie choroby cech molekularnych klonu komórek najbardziej agresywnych powodujących postęp choroby nowotworowej .

Praca liczy 91 stron i zawiera 13 tabel, 13 rycin, 12 fotografii oraz 141 pozycji piśmiennictwa. Układ pracy jest właściwy dla opracowań o charakterze oryginalnym. Wstęp podzielony został na 6 części. W rozdziale **Wstęp** autor przedstawia epidemiologię i czynniki ryzyka zachorowania na raka piersi .W kolejnym podrozdziale przedstawione są współczesne klasyfikacje anatomiczna i prognostyczna rekomendowane dla raka piersi przez American Joint of Committee on Cancer . W następnym podrozdziale przedstawiona jest aktualnie obowiązująca klasyfikacja raka piersi wg WHO z roku 2012 i znaczenie prognostyczne pewnych typów raka. Kolejną klasyfikacją omawianą przez autora jest klasyfikacja molekularna w aktualnym stanie wiedzy zdefiniowanym przez ekspertów w kolejnych latach 2013,2015 i 2017.Ważną zacytowaną przez autora opinią WHO jest stwierdzenie że w przypadku występowania różnic w pomiędzy wynikami badania PAM50 mikromacierzy z zastosowaniem minimalnej liczby genów a profilem immunohistochemicznym dalsze postępowanie z chorymi należy uzależnić od wyników analizy immunohistochemicznej ponieważ ona kwalifikuje chorych do zastosowania indywidualnego leczenia. Następny podrozdział omawia możliwości przedoperacyjnej diagnostyki patomorfologicznej raka piersi. Autor umiejętnie ocenia ograniczenia stosowania BAC w określeniu niektórych podtypów histologicznych oraz rozróżnieniu zmian przedinwazyjnych i inwazyjnych w stosunku do biopsji gruboigłowej, jednak preferuje tą metodę do uzyskania materiału cytologicznego z regionalnych przerzutowo zmienionych węzłów chłonnych. Kolejny podrozdział jest poświęcony budowie białka PTEN i jego dłuższej formy *long* (PTEN-L). Można dodać do opisanych przez autora funkcji tej formy białka PTEN że jest ona odpowiedzialna za regulację metabolizmu komórek poprzez kontrolowanie wytwarzania energii przez mitochondria. Następnie autor przedstawia czytelnikowi funkcje regulacyjne białka PTEN w cytoplazmie i na terenie jądra komórkowego. Kolejny ważny w konstrukcji p rozdziału *Wstęp* to udział PTEN w neoplazji . Białko to ma ważne znaczenie w regulacji proliferacji komórkowej i zahamowaniu apoptozy .

Zmiany strukturalne genu zlokalizowanego w chromosomie 10 w regionie 10q 23,21 związane z mutacją germinálną powodują powstawanie guzów hamartomatycznych a także zespołu makrocefalia /autyzm . Utrata ekspresji PTEN towarzyszy rakom endometrium, prostaty ,czerniakom , glejakom, lecz rownie w ostatnich miesiącach 2017 roku pojawiły się doniesienia dokumentujące utrat PTEN w raku płaskim głowy i szyi zwiszcza o etiologii HPV i raku oładka. W kolejnym podrozdziale autor przedstawia wspczesne możliwości terapeutyczne dedykowane kobietom u których stwierdzono w tkance raka piersi utrat ekspresji PTEN. W ostatnim rozdziale autor przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczącej możliwości zmiany statusu ekspresji ER, PR, HER-2 i PTEN przez komórki raka piersi w przerzutach do regionalnych węzłów chłnnych przygotowując w ten sposób czytelnika do przedstawienia uzasadnienia podjęcia pionierskiej próby oceny tego zjawiska na materiale analizowany w swojej dysertacji

W części zatytułowanej **Materiały i metody** autor przedstawił stan kliniczny 84 kobiet chorych na raka piersi diagnozowanych w latach 2014-2017 w Instytucie Curie w Paryżu i charakterystyk pobranego u nich materiału tkankowego i cytologicznego . Autor szczegółowo i profesjonalnie przedstawia metodyk i przeprowadzonej analizy immunohistochemicznej i uzasadnia wybór wybranej metody oceny ekspresji ER, PR , HER-2 oraz białka PTEN. Ekspresja i wyniki reakcji immunohistochemicznych oraz FISH HER 2 są ilustrowane dobrej jakości fotografiami . Uzyskane wyniki autor poddał analizie statystycznej. Rozdział **Wyniki** zawiera szczegółową analiz zmiany ekspresji PTEN w lokalizacji cytoplazmatycznej i jądrowej w przerzutach komórek nowotworowych do węzłów chłnnych w odniesieniu do guza pierwotnego. Ekspresja PTEN w przerzutach do węzłów chłnnych by istotnie statystycznie niższa niż w guzach pierwotnych zarówno w lokalizacji jądrowej jak i cytoplazmatycznej .Największe zmiany ekspresji autor wykazał w grupie raków o podtypie luminalnym B. Nie zaobserwował doktorant zmian w ekspresji PTEN w obu lokalizacjach w grupie raków o podtypie HER-2 dodatnim . Cytoplazmatyczna i jądrowa reakcja PTEN by skorelowana dodatnio z ekspresj ER, natomiast dodatnią korelacj ekspresji jądrowej wykazano w guzach z ekspresj HER-2 . Najniższą ekspresj PTEN doktorant stwierdził w grupie raków potrójnie ujemnych. W analizie zmiany fenotypów molekularnych raków w przerzutach do regionalnych węzłów chłnnych w odniesieniu do guzów pierwotnych wykazał autor

istotną statystycznie utratę ekspresji ER i na granicy istotności ekspresję PR ,a u 5 chorych zmianę ekspresji HER-2. Status HER-2 ma związek z niską ekspresją jądrową PTEN .W stosunku do analizowanych cech kliniczno-morfologicznych wykazał doktorant korelację ekspresji PTEN w lokalizacji jądrowej z zaawansowaniem choroby ocenianej przez cechę pT , tym samym wykazując ważność prognostyczną tej cechy guza. Łącznie do zmiany podtypu molekularnego doszło u 12 chorych kobiet co stanowiło 15,8% badanych materiałów tkankowych. St Najczęściej zmiany ekspresji dotyczyły podtypów luminalnych raka szybko mutujących w kierunku nieluminalnym. Fakt ten wykazuje możliwości braku zastosowania właściwej terapii w tej grupie chorych oraz daje wskazówkę praktyczną aby w tym podtypie molekularnym raków oceniać immunofenotyp nie w guzie pierwotnym lecz w już zaistniałych przerzutach do węzłów chłonnych .

Doktorant poprowadził dyskusję i omówienie wyników w sposób świadczący o bardzo dobrej znajomości tematu z zastosowaniem odniesień do istotnych aktualnych pozycji światowego piśmiennictwa, co świadczy o znajomości przez lekarza Pawła Gajdzisa najnowszego piśmiennictwa w badanym obszarze wiedzy. Doktorant cytuje bardzo liczne prace dotyczące oceny zmiany ekspresji biomarkerów definiujących poszczególne podtypy molekularne raków zwracając uwagę na duże różnice w zdefiniowaniu przez poszczególnych autorów odsetka zmian. Tłumaczy to trafnie stosowaniem różnych metod oceny ekspresji ocenianych biomarkerów . Omawiając prognostyczne znaczenie ekspresji białka PTEN w raku piersi autor podkreśla dużą wrażliwość atypowych komórek nabłonka gruczołowego piersi , nawet na niewielkie obniżenie ekspresji co prowadzi do dalszego dynamicznego rozsiewu choroby nowotworowej poprzez aktywację szlaku PI3K/AKT.

W podrozdziale dotyczącym oceny utraty ekspresji PTEN w raku piersi autor krytycznie ocenia interpretację publikowanych przez niektórych autorów wyników wykazujących duże rozbieżności wynikające z używania do analizy różnych klonów przeciwciał monoklonalnych skierowanych na receptory PTEN i występowaniu różnic interpretacyjnych analizowanych odczynów immunohistochemicznych.

Ważnym spostrzeżeniem autora jest wysunięcie hipotezy, że w trakcie postępu choroby nowotworem dochodzi już na etapie przerzutów do węzłów chłonnych zaburzeń transportu białka PTEN z cytoplazmy do jądra. Bo jak inaczej można interpretować mniejszą ekspresję PTEN w jądrze komórkowym w stosunku

do cytoplazmy ? Na podkreślenie zasługuje fakt, że wiarygodne wyniki badań lek. Pawła Gajdzisa uzyskane dzięki dobremu utrwaleniu małych fragmentów tkankowych są oryginalne i w aktualnym piśmiennictwie nie ma podobnych obserwacji dotyczących oceny synchronicznej pierwotnego guza i przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych. Część informacji przedstawionych w tym rozdziale nie jest związana bezpośrednio z uzyskanymi przez autora wynikami i powinna być przeniesiona do rozdziału **Wstęp**. Między innymi informacje dotyczące predykcyjnego znaczenia szlaku PI3K/AKT w raku piersi i immunosupresja PTEN w innych nowotworach złośliwych.

Rozprawa lekarza Pawła Gajdzisa zakończona jest 6 logicznymi **Wnioskami** wyciągniętymi z uzyskanych wyników badań i przeprowadzonej dyskusji. Wnioski przedstawione są w sposób jasny i uporządkowany będąc odpowiedzią na postawione cele pracy. Autor stwierdza iż :

- wykazana przez niego niższa ekspresja PTEN w rakach piersi w przerzutach do węzłów chłonnych w odniesieniu do guzów pierwotnych może mieć znaczenie w zastosowaniu leczenia ukierunkowanego na nowotwory z utratą PTEN u kobiet z zaawansowaną chorobą nowotworową

- stwierdzone przez autora różnice w ekspresji jądrowej i cytoplazmatycznej PTEN w komórkach raka piersi świadczą o zaburzeniu transportu cytoplazmatyczno-jądrowego tego białka w niektórych podtypach raka, zwłaszcza HER-2 dodatnich

- najniższą ekspresję PTEN stwierdził autor w guzach o podtypie potrójnie ujemnym,

- największe różnice w ekspresji PTEN w guzie pierwotnym i jego przerzucie do węzłów chłonnych występowały w podtypie luminalnym B, co może być jedną z przyczyną nabytej oporności na hormonoterapię

- stwierdzona dodatnia korelacja ekspresji ER z ekspresją PTEN zarówno w lokalizacji jądrowej i cytoplazmatycznej potwierdza istotną rolę ER w patogenezie raka piersi

- guzy z nadekspresją HER-2 cechują się wyższą ekspresją białka PTEN w lokalizacji jądrowej co może być istotną właściwością biologiczną raków HER-2 dodatnich

- w części nowotworów zauważono zmiany w ekspresji ER, PR, HER-2 oraz zmianę profilu molekularnego w przerzutach do węzłów chłonnych w stosunku do

guzów pierwotnych. Najczęściej stwierdzano utratę ekspresji ER w przerzutach i zmianę na podtyp potrójnie ujemny, co dowodzi że w części guzów już we wczesnym etapie rozsianej choroby nowotworowej dochodzi do heterogenności komórek . co powoduje gorszą prognozę i odpowiedź na terapię hormonalną u tych chorych. Powyżej stwierdzone zmiany profilu molekularnego raka w jego przerzutach wskazują na konieczność analizy fenotypu immunohistochemicznego komórek przerzutowych oprócz stosowanych oznaczeń w guzie pierwotnym celem lepszego doboru skutecznej terapii

- największą heterogenność autor stwierdził w guzach cechujących się profilem immunologicznym luminanym B, co w celu uzyskania lepszych wyników leczenia wymaga podziału tego podtypu na mniejsze grupy.

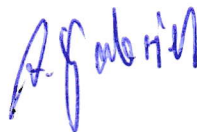
Komentując tę część rozprawy uważam że, wnioski są zbyt obszernie sformułowane i zawierają w swojej treści zbyt dużo informacji dotyczących uzyskanych wyników lecz z drugiej strony obfitość uzyskanych przez autora informacji była dla niego na pewno zaskoczeniem co świadczy że przedstawione wyniki i wnioski mogą być tematem badawczym w co najmniej kilku opracowaniach naukowych. Brak jest jeszcze jednego wniosku będącego zarazem praktyczną obserwacją do zastosowania klinicznego ,a mianowicie : istnieje konieczność wprowadzenia oznaczeń ekspresji PTEN w raku piersi u kobiet ze stwierdzanymi przerzutami do regionalnych węzłów chłonnych, ponieważ wykazanie braku ekspresji w lokalizacji jądrowej w komórkach przerzutowych może być istotnym wskazaniem do zastosowania leków hamujących ścieżkę sygnałową PI3K/AKT.

Piśmiennictwo obejmuje 141 właściwie cytowanych publikacji, 47 pochodzących z ostatnich 5 lat, co świadczy o aktualności podjętych tematów badawczych należących do grupy *hot topic problem in science* .

Pracę oceniam wysoce pozytywnie, a wzmiankowane uwagi nie wpływają na jakość merytoryczną rozprawy. Praca ma cechy dobrze zaplanowanego projektu badawczego a jej obszerne wyniki inspirują do podjęcia dalszych badań potwierdzających przydatność kliniczną oceny ekspresji białka PTEN w nowych terapiach wymierzonych wobec raka piersi u kobiet. W mojej ocenie przedstawiona praca stanowi samodzielne osiągnięcie naukowe poprzez uzyskanie oryginalnych rezultatów, a jej autor wykazał nie tylko wiedzę w przedstawionym temacie, ale także udowodnił umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych na profesjonalnym poziomie cechującym dojrzałego naukowca. Stwierdzam że

oceniana przeze mnie rozprawa doktorska spełnia w pełni wszelkie wymogi ustawowe stawiane pracom na stopień naukowy doktora nauk medycznych.

**Tym samym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie lek. Pawła Gajdzisa do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto ze względu na oryginalność i znaczenie praktyczne uzyskanych przez autora wyników oraz staranność w przeprowadzeniu badań zwracam się do Wysokiej Rady z wnioskiem o nagrodzenie ocenianej rozprawy doktorskiej .**

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'P. Gajdzis', is centered on the page.