Prof. zw. dr hab. n. med. Piotr Paluszkiewicz

p.o. Kierownik
Katedra Chirurgii i Pielęgniarstwa Chirurgicznego
Wydział Nauk o Zdrowiu
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Kierownik
Oddział Chirurgii Ogólnej i Przewodu Pokarmowego
Centrum Onkologii Ziemi Lubelskiej
im. św. Jana z Dukli w Lublinie

20-090 Lublin, ul. Dra Witolda Chodźki 6, tel +817187512; 607 303 600, e-mail: ppalusz@uhc.com.pl

Ocena rozprawy doktorskiej pt.
Ocena ekspresji HER2 w odniesieniu do wybranych czynników klinicznych i morfologicznych w raku żołądka
autorstwa lek. med. Natalii Wodyńskiej
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Bogusława Kędry
w II Klinice Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Badania nad przezbłonową glikoproteiną o masie cząsteczkowej 185 kD (p185) posiadającej aktywność kinazy tyrozynowej i będącej produktem białkowym genu c-erb-B2 datują się od 30 lat. Lawina badań po głośnym artykule *Akiyama i wsp.* z 1986 roku przedstawionym w tygodniku ***Science*** skierowana była głównie na udowodnienie roli wzmacniania sygnałów promitogennych w kancerogenezie i progresji nowotworów złośliwych. Naturalnym skutkiem opisania amplifikacji produktu genu c-erb-B2 w komórkach różnych nowotworów, była pokusa zablokowania jego funkcji, w celu zahamowania lub obniżenia aktywności mitotycznej komórek raka. Obiecujące badania przedkliniczne i akceptowalna toksyczność umożliwiły wprowadzenie do praktyki klinicznej pierwszego przeciwciała skierowanego przeciwko ludzkiej domenie receptora naskórkowego czynnika wzrostu typu 2 (HER2) i poddania go dalszym badaniom oraz analizom skuteczności w celu dokładnego opisania korzyści terapeutycznej związanej ze stosowaniem takiego typu terapii.

Dane sprzed 6 lat będące wynikami analizy w ramach projektu ToGA i przedstawione przez Banga i wsp. (***Lancet 2010; 376:687***) nie napawają optymizmem wskazując, że wprowadzenie trastuzumabu do klasycznej chemioterapii u chorych z

nieresekcyjnym rakiem żołądka wydłuża życie o 2,7 miesiąca. Dalsze badania zostały skierowane na precyzyjną identyfikację chorych, u których można uzyskać największą korzyść terapeutyczną oraz poszukiwania nowych cząstek o aktywności skierowanej przeciwko białku HER2. Obecnie w trakcie badań pozostają nowe cząsteczki: partuzumab, lapanitib, TDM-1 (przeciwciało skoniugowane z lekiem cytotoksycznym) oraz afanitib (NCT01522768).

Istnieje głębokie przekonanie, jednak udokumentowane jedynie częściowo, że silna ekspresja białka HER2 i nadmierna dimeryzacja z innymi członkami rodziny HER jest czynnikiem odpowiedzialnym za niektóre składniki złożonych zdarzeń biologicznych w komórkach nowotworowych, wpisujących się w ogólny proces progresji raka. Z tego powodu istotnym zagadnieniem pozostaje ustalenie rodzaju testu diagnostycznego i jego interpretacja wskazująca grupę chorych, u których spodziewana odpowiedź na cząsteczki zapobiegające dimeryzacji HER2 przyniesie obiektywną korzyść kliniczną. Przegląd piśmiennictwa wskazuje, że zastosowanie badania immunohistochemicznego i półilościowa ocena ekspresji białka HER2 może być traktowana jedynie jako skreening ale posiadający znaczną wartość stratyfikacyjną i dającą szansę do wstępnego wyselekcjonowania kandydatów do terapii skierowanej przeciwko glikoproteinie p185. Częstość ekspresji HER2 w komórkach raka żołądka waha się od 4 do 54% przypadków i odnosi się nieodparte wrażenie istnienia uwarunkowań geograficzno-środowiskowych. Mając powyższe na uwadze należy przedmiot zaplanowanych przez Doktorantkę badań przyjąć z uznaniem, wskazując na aktualność podjętej tematyki, jej potencjalne znaczenie aplikacyjne i wartość poznawczą przyczyniającą się do głębszego poznania różnorodności raków żołądka.

Przedstawiona do oceny monografia stanowi raport z badań Autorki nad częstością występowania silnej i bardzo silnej reakcji immunohistochemicznej w tkance raka żołądka uzyskanej na drodze operacyjnego zabiegu resekcyjnego. Podjęte analizy były ukierunkowane na ustalenie częstości wystąpienia reakcji immunohistochemicznej i jej zbieżności z różnymi czynnikami kliniczno-patologicznymi w celu ustalenia feonotypowej manifestacji nadekspresji błonowej białka HER2 co mogłoby w perspektywie ułatwić wykorzystywanie danych klinicznych do projektowania leczenia ukierunkowanego molekularnie. Wykorzystany układ redakcyjny jest typowy dla rozpraw doktorskich i nie budzi zastrzeżeń. Cały tekst Rozprawy Doktorskiej obejmuje

87 stron wydruku komputerowego, w tym przydatne z punktu widzenia redakcyjnego spisy fotografii, rycin i tabel oraz wykaz stosowanych w tekście skrótów. Strona graficzna opracowania zawiera 10 fotografii, 2 ryciny i 17 tabel. Czytelność strony graficznej i staranność jej opracowania wymaga wyróżnienia co świadczy o wyjątkowej staranności Autorki podczas jej opracowywania.

Wstęp pracy zawarty na stronach 3-28 z powodów redakcyjnych został podzielony na podrozdziały ułatwiając zrozumienie przesłanek podjęcia badań nad ekspresją białka HER2 w tkance raka żołądka. Autorka przytoczyła aktualne klasyfikacje kliniczne i patologiczne raka żołądka wykorzystywane w celu planowania terapii skojarzonej oraz metody diagnostyki ekspresji produktu białkowego genu c-erb-B2. Z punktu widzenia kompletności informacji należałoby uwzględnić heterogenność metod w zależności od stosowanego przeciwciała monoklonalnego używanego do reakcji immunohistochemicznej. Aktualnie powszechnie stosowane i dostępne na rynku są przeciwciała HerceptTest i A0485 (Dako, Glostrup, Dania), SP3 (Labvision, Thermo Fisher Scientific, Freemont, USA), 4B5 (Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA), i CB11 (Novocastra, Newcastle and Tyne, Anglia). Istnieją różnice w częstości uzyskanego testu dodatniego (reakcja silna i bardzo silna) w zależności od stosowanego przeciwciała, co w konsekwencji może wpływać na interpretację uzyskanych rezultatów. Z tego powodu metody immunohistochemiczne często traktowane są jako skrining a ostateczne potwierdzenie uzyskiwane jest technikami hybrydyzacji in situ. We wstępie należałoby wspomnieć również o technikach ekwiwalentnych do opisanej skrótowo FISH tzn. SISH (*silver in situ hybridization*) i DCDHISH (*dual-color and dual-hapten in situ hybridization*) oraz rozszerzyć obszar interpretacji uzyskanych wyników w technice immunohistochemicznej o zagadnienia związane z heterogennością ekspresji HER2 w tkance raka żołądka.

Cel pracy został jasno opisany w dwóch punktach i nie budzi zastrzeżeń. Cel jest naturalną konsekwencją wprowadzenia i odpowiada aktualnym trendom badawczym w biologii i terapii raka żołądka. Realizując założony cel zaprojektowano prospektywne badanie opisowe i wprowadzono wtórnie analizy korelacji, co na etapie projektowania uniemożliwia ustalenie minimalnej liczebności grupy badanej a jedynie daje możliwość wskazania kryteriów włączenia do badania.

Materiał i metody zostały przedstawione jasno a na prowadzone analizy uzyskano zgodę lokalnej Komisji Bioetycznej, co zaznaczono w tekście pracy. Do badania włączono chorych z rozpoznanym rakiem żołądka, którzy nie byli przedoperacyjnie leczeni przeciwnowotworowo a podczas kwalifikacji do operacji ustalono możliwość wykonania zabiegu resekcyjnego. Mając na uwadze kryteria włączenia ostatecznie dysponowano preparatem tkankowym pooperacyjnym umożliwiającym ocenę immunohistochemiczną różnych fragmentów guza nowotworowego, co podnosiło czułość i specyficzność stwierdzenia silnej i bardzo silnej reakcji histochemicznej z zastosowaniem komercyjnego zestawu HercepTest. Do ustalenia siły reakcji użyto skali Hofmann z punktem odcięcia 10% komórek z dodatnią reakcją błonową na stosowane przeciwciało monoklonalne. Przyjmuje się, że jest to powszechnie używane kryterium z uwzględnieniem odrębności reakcji polegającej na niekompletnym sygnale z całej błony komórkowej i określanej jako *„U-shaped"* i *„paralel lines"*. Posiadanie całego preparatu operacyjnego umożliwia dodatkowo ograniczenie błędu „wyboru pola" wynikającego z heterogenności guza, gdzie obszarom reakcji ujemnej mogą towarzyszyć obszary reakcji silnie dodatniej. Z metodycznego punktu widzenia ma to ogromne znaczenie, ponieważ nie można określić ostatecznej ekspresji HER2 odpowiadającej rakowi żołądka w rozmazie cytologicznym i bioptatach pobranych endoskopowo.
Do przeprowadzenia analizy matematycznej wykorzystano testy nieparametryczne co jest oczywistą konsekwencją braku rozkładu normalnego analizowanych zmiennych a także przyjęto 5% błąd wnioskowania.

Prezentacja **wyników** jest czytelna, tabele mają prostą konstrukcję i dają możliwość łatwego śledzenia prezentowanych wartości liczbowych. Niezrozumiałe jest używanie symbolu G (od *grading*) do opisania stopnia zaawansowania raka. Symbolem G zwykle opisuje się stopień zróżnicowania histologicznego guza nowotworowego. Wymaga to wyjaśnień w tekście pracy. Analizowana grupa chorych cechuje się znaczną heterogennością w zależności od zaawansowania choroby w momencie podjęcia terapii chirurgicznej w aspekcie cechy T, obecności zmienionych przerzutami nowotworowymi węzłach chłonnych i obecności przerzutów narządowych a także typu histologicznego (rozpoznano 6 typów raka w grupie 72 chorych). Taki rozkład cech kliniczno-patologicznych komplikuje dalsze analizy, ponieważ wprowadzenie kolejnych

zmiennych utrudnia analizę w grupach o małej liczebności. Ostatecznie reakcje silną i bardzo silną wg Hofmanna stwierdzono u co czwartego chorego z użyciem HercepTest w badaniu immunohistochemicznym. Nie znaleziono zależności częstości wystąpienia bardzo silnej i silnej reakcji immunohistochemicznej na białko HER2 w zależności od typu histologicznego wg Laurena, utkania histologicznego, zaawansowania patologicznego (pTNM) z uwzględnieniem wszystkich cech składowych tego systemu klasyfikacji, obecności infekcji *Helicobacter pylori* i przedoperacyjnego stężenia białka całkowitego i albumin w surowicy krwi.

Dyskusja zawarta w rozdziale **Omówienie wyników** prowadzona jest swobodnie i rzeczowo świadcząc o dużych zdolnościach interpretacyjnych, ostrożności wnioskowania oraz umiejętnościach Autorki do krytycznej oceny otrzymanych rezultatów. Ważnym elementem dyskusji jest uwypuklenie odrębności interpretacyjnych wyników uzyskiwanych u chorych z rakiem piersi i wynikających z tego faktu konsekwencjach.

Przedstawione **piśmiennictwo** świadczy o umiejętności selekcjonowania literatury przez Autorkę i nie budzi zastrzeżeń.

Wnioski odpowiadają na pytania postawione w celu pracy i wskazują na przypadkowy rozkład częstości wystąpienia silnej i bardzo silnej reakcji immunohistochemicznej u chorych z rakiem żołądka. Mając na uwadze możliwość wystąpienia różnic środowiskowych i geograficznych można przypuszczać, że populacja chorych Białostocczyzny cechuje się przeciętną częstością ekspresji produktu białkowego genu c-erb-B2. Obecnie należy przyjąć, że terapia przeciwciałami skierowanymi przeciwko domenie HER2 nie stanowi istotnego przełomu w leczeniu chorych z rakiem żołądka, wobec czego istnieje uzasadniona potrzeba kontynuacji badań nad ustaleniem kolejnych celów molekularnych odpowiadających za kluczowe mechanizmy progresji raka żołądka.

W podsumowaniu stwierdzam, że oceniana praca stanowi raport z badania opisowego o prawidłowej konstrukcji metodycznej. Pomimo zawiłości metodycznych uważam, że praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom przygotowywanym w

postępowaniu aplikacyjnym o stopień naukowy doktora. Z największą satysfakcją stwierdzam, że przeprowadzenie badania w jednostce o ugruntowanej pozycji naukowej dało możliwość zachowania spójności metodologicznej, merytorycznej oraz ustalenia tematu badania cechującego się oryginalnością, co wymaga specjalnego podkreślenia. W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku wniosek o dopuszczenie lekarz medycyny Natalii Wodyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, 15 września 2016

p.o. KIEROWNIKA
Katedry Chirurgii i Pielęgniarstwa Chirurgicznego
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
prof. dr hab. med. Piotr Paluszkiewicz

Prof. zw. dr hab. med. Piotr Paluszkiewicz