



Warszawa, dnia 19 czerwca 2023 r.

**Recenzja rozprawy na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych
i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne**

Lek. Maciej Lendzioszka

**Pt. „Białko PRL-3 w raku błony śluzowej trzonu macicy
- ocena ekspresji tkankowej w korelacji z VEGF”.**

Gruczolakorak błony śluzowej trzonu macicy jest nowotworem złośliwym wywodzącym się z błony śluzowej jamy macicy. Zachorowania związane z predyspozycjami genetycznymi dotyczą jedynie 3-5% pacjentów (zespół Lynch II). Obecny, klasyczny podział raka trzonu macicy obejmuje 2 typy: pierwszy - nowotwory wrażliwe na estrogeny, w tym nowotwory jako składowa zespołu Lyncha oraz drugi: raki surowicze (*uterine serous carcinoma*), jasnokomórkowe (*clear cell carcinoma*), mięsakoraki (*carcinosarcoma*). Epidemiologicznie rak błony śluzowej trzonu macicy jest szóstym najczęściej diagnozowanym nowotworem złośliwym u kobiet ze stałym wzrostem zachorowań (w 2020 roku na świecie odnotowano około 417 000 nowych zachorowań i 97 000 zgonów). Wiek zachorowania dotyczy głównie kobiet w okresie pomenopauzalnym (75%), przede wszystkim w szóstej i siódmej dekadzie życia (mediana zachorowania 60 lat).

Czynniki ryzyka zachorowania na raka trzonu macicy w typie 1 obejmują: wiek powyżej 50 roku życia, otyłość, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze zwłaszcza ze współwystępowaniem cukrzycy i/lub otyłości, hiperestrogenizm (egzo- czy endogeny), wczesna miesiączka (przed 12 rokiem życia), brak owulacji, brak lub tylko jedna ciąża, późna menopauza, stosowanie leku hormonalnego - tamoksyfenu, cykle bezowulacyjne, hormonalna terapia zastępcza bez komponenty progesteronowej. Z kolei dla typu drugiego czynnikami ryzyka zachorowania są jedynie jest wiek (starsze kobiety) oraz wcześniejsze narażenie endometrium na promieniowanie jonizujące (leczenia radioterapią raka szyjki macicy).

Natomiast czynnikami zmniejszającymi ryzyko zachorowania na raka błony śluzowej trzonu macicy są: krótki okres reprodukcyjny, wielodzietność, stosowanie złożonej hormonalnej terapii zastępczej lub doustnych preparatów antykoncepcyjnych (ochronne działanie gestagenów), wkładki wewnątrzmaciczne (zaburzona odpowiedź na hormony płciowe związana z indukcją przewlekłego stanu zapalnego), a także co ciekawe palenie tytoniu (w następstwie spadku stężenia estrogenów we krwi, co przyspiesza menopauzę).



Molekularne podstawy patogenezы raka endometriumu typu 1 i 2 związane są z mutacją genu supresorowego *PTEN*, genu *PIK3CA*, nadekspresją cząsteczki adhezji L1 (*L1 cell adhesion molecule*, L1CAM głównie w typie 2) czy nadekspresją białka p53 (zwłaszcza w typie 2).

Współcześnie dzięki wprowadzonym nowoczesnym testom genetycznym wyodrębniono 4 podtypy molekularna raka endometriumu:

1. z mutacją w obrębie genu *POLE*,
2. z deficytem naprawy niesparowanych zasad (*mismatch repair deficient*, dMMR) oraz z mutacją w obrębie genów należących do systemu naprawy błędnie sparowanych zasad, które charakteryzują się niestabilnością mikrosatelitarną (*microsatellite instability*, MSI),
3. z mutacją p53,
4. niesklasyfikowane pod względem molekularnym (*non-specific molecular profile*, NSMP).

Ta stosunkowo nowa klasyfikacja bezpośrednio przekłada się na ustalenie strategii postępowania onkologicznego, umożliwiając m.in. zastosowanie nowoczesnej immunoterapii np. inhibitorów punktu kontrolnego.

Strategia postępowania onkologicznego, a więc zastosowanie określonych metod terapeutycznych związane jest z ustaleniem stopnia zaawansowania klinicznego oraz klasyfikacji histopatologicznej ustalonych na podstawie starannie dobranych badań obrazowych, biopsji zmiany oraz badania fizykalnego. W raku endometriumu stosuje się dwie klasyfikacje: FIGO (*International Federation of Gynecology and Obstetrics*) z 2009 roku oraz TNM (*T-tumor; N-nodes; M-metastasis*). Postępowanie terapeutyczne obejmuje leczenie chirurgiczne, uzupełniającą teleradioterapię, brachyterapię, chemioterapię uzupełniającą lub paliatywną oraz immunoterapię.

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja zawiera opracowanie dotyczące ekspresji oraz roli białka PRL-3 oraz jej znaczenie w angiogenezie nowotworowej w przebiegu raka błony śluzowej macicy.

Z punktu widzenia praktycznego i klinicznego Doktorant podjął niezwykle ważny temat dotyczący ekspresji białka PRL-3 w odniesieniu do obecności w tkance nowotworowej czynnika wzrostu komórek śródbłona naczyń (VEGF) oraz jej znaczenie kliniczne.



Cele pracy

Lek. Maciej Lenzioszek określił precyzyjnie cel główny swojej pracy dotyczące roli białka PRL-3 w odniesieniu do obecności w tkance nowotworowej czynnika wzrostu komórek śródbłonna naczyń (VEGF). Cele szczegółowe obejmowały:

1. Analizę ekspresji PRL-3 metodami immunohistochemicznymi oraz VEGF przy zastosowaniu *Western immunoblot*.
2. Analizę ekspresji PRL-3 w odniesieniu do:
 - a. wieku chorych,
 - b. stopnia zaawansowania klinicznego raka,
 - c. zróżnicowania histologicznego,
 - d. głębokości nacieku mięśnia macicy,
 - e. obecności przerzutów w węzłach chłonnych miedniczych i okołoaortalnych,
 - f. obecności w tkance nowotworowej VEGF.

Dane formalne

Pod względem formalnym rozprawa doktorska liczy 60 stron oraz zawiera 125 pozycji piśmiennictwa, które dobrane jest w sposób prawidłowy oraz podzielona na typowe dla dysertacji rozdziały: wstęp, cel badawczy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim, suplement, wykaz tabel i rycin.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku Nr. R-I-002/286/2017.

Analiza statystyczna

Użyte przez Doktoranta metody analiz statystycznych: test Shapiro-Wilka, testy nieparametryczne, test Manna-Whitneya-Wilcoxonona zostały dobrane w sposób prawidłowy i adekwatny do założonych celów. Analiza statystyczna przeprowadzona została z użyciem profesjonalnego pakietu Statistica 13.0PL (StatSoft Inc. Polska).

Charakterystyka chorych

Do analizy włączono grupę 43 chorych z medianą wieku 62 lata (zakres wieku 48-78 lat) w tym było 16 nieródek (37,2%), 14 (32,5%) kobiet posiadało jedno dziecko, a 13 (30,3%) kobiet posiadało więcej niż jedno dziecko. Większość pacjentek - 31 (72,1%) było w okresie pomenopauzalnym.



Rozkład stopni zaawansowania raka endometrioidalnego przedstawiał się następująco: 23 (53,5%) chore były w I stopniu: FIGO (IA) -16 (37,2%) i (IB) – 7 (16,3%), w stopniu II - 9 (20,9%) oraz w stopniu III - 11 (25,6%).

Histologicznie 19 (44,2%) przypadków raka endometrium typu endometrioidalnego było w stopniu histologicznego zróżnicowania G1, 11 przypadków w G2 (25,6%) oraz 13 (30,2%) w G3. U 16 (37,2%) chorych wykazano naciek nieprzekraczający 50% grubości warstwy mięśniowej macicy, w 27 (62,8%) przypadkach był on równy lub przekraczał 50% grubości *myometrium*. Obecność przerzutów w węzłach chłonnych stwierdzono u 11 (25,6%) pacjentek.

Wyniki

Ekspresję białka PRL-3 stwierdzono u wszystkich 43 pacjentek, bez istotności statystycznej w zakresie stopnia nasilenia jego immunоекспresji w odniesieniu do wieku: immunоекспresję o słabym nasileniu (+) wykazano tylko w jednym przypadku (4%) w grupie kobiet ≤ 60 lat oraz jeden w grupie kobiet po 60 r.ż. (5,5%) ($p=0,834$); immunоекспresję o nasileniu średnim (++) wykazano u 7 (28%) chorych ≤ 60 r.ż. oraz u 5 (27,8%) chorych w wieku powyżej 60 r.ż. ($p=0,942$); z kolei wysoką immunоекспresję PRL-3 (+++) wykazano w 17 (68%) przypadkach ≤ 60 r.ż. oraz w 12 (66,7%) przypadkach chorych po 60 r.ż. ($p=0,485$).

Nasilenie immunоекспresji białka PRL-3 w odniesieniu do stopnia zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji FIGO (I/II w porównaniu do III) nie wykazała znamienności statystycznej dla immunоекспresji o słabym nasileniu (+) ($p=0,067$); immunоекспresję o nasileniu średnim (++) wykazano u 6 (18,8%) chorych w zaawansowaniu wczesnym, natomiast jej nie wykazano w zaawansowaniu późnym. Znamienne różnicę wykazano w zakresie wysokiej immunоекспresji białka PRL-3 (+++), odpowiednio w 24 (75%) przypadkach chorych w zaawansowaniu wczesnym oraz w 10 (90,9%) przypadkach w stopniu III ($p=0,011$).

Ocena zależności ekspresji białka PRL-3 od zróżnicowania histologicznego nowotworów nie wykazała znamienności statystycznej (odpowiednio: $p=0,679$ i $p=0,743$): nasilenie średnie immunоекспresji PRL-3 (++) zaobserwowano w 9 (30,0%) przypadkach G1/G2 i 3 (28,7%) G3 natomiast nasilenie wysokie (+++) odnotowano w 21 (70,0%) przypadkach G1/G2 oraz 10 (71,4%) G3, natomiast nie odnotowano immunоекспresji słabej (+).

Z kolei średnie i wysokie nasilenie immunоекспresji PRL-3 potwierdzono znamienne statystycznie (odpowiednio: $p=0,007$ i $p=0,028$) związek z głębokością nacieku *myometrium*. Jeśli głębokość nacieku wyniosła poniżej 50% grubości mięśnia macicy średnie (++) nasilenie immunоекспresji zauważono w 2 (12,5%) przypadkach, natomiast jej nasilenie wysokie w 12 (75,0%). W sytuacji, kiedy naciek nowotworowy był równy lub przekroczył połowę grubości nasilenie średnie (++) odnotowano w 6 (25,9%) przypadkach, a nasilenie wysokie w 20 (82,8%).



W sytuacji stwierdzenia przerzutowo zmienionych regionalnych węzłów chłonnych, w 11 (90,9%) ogniskach pierwotnych gruczolakoraków endometrium stwierdzono immunoekspresję wysoką (+++) z potwierdzeniem znamienności statystycznej ($p=0,005$).

W pooperacyjnym materiale tkankowym wszystkich chorych włączonych do badania wykazano ekspresję PRL-3 i VEGF, w tym obecność VEGF stwierdzono w 28 (65,1%) z 43 badanych przypadków wyłącznie z wysoką (+++) immunoekspresją PRL-3. Lek. Maciej Lendzioszek stwierdził istotną korelację pomiędzy wysoką (+++) immunoekspresją białka PRL-3 w ognisku pierwotnym nowotworu, a obecnością w jego tkankach VEGF ($p<0,001$).

Podsumowując uzyskane wyniki, wykazana przez Autora dysertacji korelacja zmian nasilenia immunoekspresji białka PRL-3 w zależności od wspomnianych czynników kliniczno-patologicznych wskazuje na konieczność dalszych badań w kierunku wpływu PRL-3 na biologię ogniska pierwotnego nowotworu oraz przebieg choroby, a być może i na efektywność leczenia miejscowego czy systemowego.

Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorant wyciągnął wnioski, które były zgodne, z założonymi celami:

1. We wszystkich ogniskach pierwotnych badanych raków endometrioidalnych wykazano immunoekspresję PRL-3.
2. Siła immunoekspresji PRL-3 nie zależy od wieku chorych.
3. W ogniskach pierwotnych, które charakteryzowała wysoka immunoekspresja PRL-3 potwierdzono obecność VEGF.
4. Wysoka immunoekspresja PRL-3 skorelowana jest ze stopniem zaawansowania klinicznego raka endometrioidalnego oraz obecnością przerzutów do węzłów chłonnych.
5. Nasilenie immunoekspresji PRL-3 nie zależy od stopnia zróżnicowania histologicznego raka endometrioidalnego.
6. Średnia i wysoka immunoekspresja PRL-3 skorelowana jest z głębokością nacieku nowotworowego mięśnia macicy.
7. Wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy wysoką immunoekspresją PRL-3 w ognisku pierwotnym nowotworu a obecnością w jego tkankach VEGF.
8. Stwierdzenie wysokiej immunoekspresji PRL-3 w ognisku pierwotnym raka endometrioidalnego może być niekorzystnym czynnikiem prognostycznym.



Podsumowanie

Temat, który podjął Doktorant jest ważny z uwagi poszukiwanie czynników prognostycznych w wielu nowotworach w tym w raku endometrium, co może bezpośrednio się przełożyć na intensywność leczenia onkologicznego, a tym samym ograniczenie działań niepożądanych takiego postępowania.

Praca jest krótka, ale ciekawa i przejrzysta, a dodatkowe ryciny, wykresy niewątpliwie podnoszą jej atrakcyjność. Doktorant w swojej pracy wykazał się dobrym warsztatem naukowym, chociaż oczywiście pod „czujnym okiem” Promotora.

W dyskusji, lek. Maciej Lendzioszek ocenił i porównał swoje wyniki z danymi literaturowymi w sposób prawidłowy, chociaż zabrakło mi bardziej krytycznego spojrzenia na własne wyniki. W podsumowaniu i dyskusji Doktorant nie zawarł ograniczeń tej pracy wynikających z jednoosrodkowej rekrutacji chorych, małej grupy pacjentów, jej retrospektywnego charakteru oraz heterogenności badanej grupy. Ponadto skala ekspresji białka PRL-3 jest skalą subiektywną i powinno poddać się drugiej ocenie innego, niezależnego patomorfologa. Ograniczenia są na tyle istotne, że mogą wpływać na wartość uzyskanych wyników. Natomiast uzyskane wyniki są bardzo mocną podstawą do stworzenia hipotezy badawczej, która powinna zostać sprawdzona w badaniach pozbawionych ograniczeń wspomnianych powyżej i przeprowadzonych w sposób prospektywny.

Chciałbym także zaznaczyć, że oceniana przeze mnie praca może mieć swoje istotne implikacje kliniczne, jednak wymaga to potwierdzenia w badaniach bez ograniczeń o których wspomniałem powyżej. Dlatego wnioskiem płynącym z tej pracy jest konieczność dalszych badań w tym kierunku.

Po szczegółowym zapoznaniu się całością pracy jednoznacznie stwierdzam, że nie mam istotnych uwag obniżających jej poziom.



Jednak z obowiązku recenzenta znalazłem następujące drobne uchybienia – literówki, których praktycznie nie można uniknąć w tak obszernej dysertacji:

1. błędy literówki i stylistyczne wymagające drobnej korekty:

- str. 30: „przypadku wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych” – powinno być: „przypadku wystąpienia przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych”; to jest cecha „N” a nie „M1”;

Pomijając moje uwagi, przedstawiona do oceny rozprawa spełnia ustawowe wymogi na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Należy podkreślić, że badanie zostało zaplanowane, wykonane i opisane na dobrym poziomie naukowym i niewątpliwie stanowi próbę rozwiązania oryginalnego zagadnienia naukowego dotyczącego immunoekspresji białka PRL-3 w raku endometrioidalnym w odniesieniu do obecności w tkance nowotworowej czynnika wzrostu komórek śródbłonna naczyń (VEGF) oraz wykazanie czy wnoszą one wartości prognostyczne w odniesieniu do czynników kliniczno-patologicznych.

W związku z powyższym z pełnym przekonaniem wnioskuję do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Macieja Lenzioszka do dalszych etapów procedury przewodu doktorskiego

KIEROWNIK
Kliniki Onkologii
prof. zw. dr hab. n. med. Rafał Wiesław Stec
Prof. zw. dr hab. n. med. Rafał Stec

MEMORANDUM
KIMBERLY CLARK
KIMBERLY CLARK
KIMBERLY CLARK