



Warszawa, dnia 12 lipca 2021 r.

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

pt. „Ocena ekspresji wybranych białek adhezyjnych w raku endometrium”.

W ginekologii onkologicznej rak trzonu macicy zajmuje bardzo ważną pozycję m. in. ze względu na epidemiologię (w Polsce 3 miejsce wśród zachorowalności na nowotwory złośliwe i 6 miejsce pod względem umieralności, na świecie odpowiednio 4 i 11 miejsce), ale także i na rokowanie (najlepiej rokujący nowotwór złośliwy narządu płciowego kobiety, przeżycia 5-letnie wynoszą około 80%).

Większość ok. 80% przypadków raka endometrium to gruczolakoraki endometrioidalne (pozostałe to nowotwory surowicze, jasnokomórkowe, endometrioidalne G3, śluzowe, mesonefroidalne, płaskonabłonkowe oraz nieodróżnicowane) związane z nadmiernym wydzielaniem estrogenów w wyniku otyłości, cukrzycy, nadciśnienia tętniczego, późnej menopauzy, bezpłodności lub hormonalnej terapii zastępczej. Inne endogenne czynniki ryzyka obejmują zespół policystycznych jajników, predyspozycje genetyczne związane z zespołem Lyncha, nowotwory wydzielające estrogen, raka piersi czy spadek odporności immunologicznej. Natomiast do czynników egzogennych zalicza się samodzielne leczenie estrogenami, hormonoterapię tamoxifenem w przebiegu raka piersi, czynniki dietetyczne, a także wcześniejszą radioterapię.



Jednym z kluczowych elementów rozwoju nowotworów jest mikrośrodowisko guza na które składają się między innymi komórki układu odpornościowego, fibroblasty, komórki śródbłonna oraz macierz zewnątrzkomórkowa. Wiadomo, że komórki nowotworowe nie są w pełni autonomiczne, gdyż wiele badań wykazało, że mikrośrodowisko guza ma duży wpływ na rozwój nowotworu, jego progresję i odpowiedź na podawaną terapię.

Z drugiej strony dowody naukowe wskazują, że zmiany we właściwościach przylegania komórek nowotworowych nadają komórkom guza fenotyp inwazyjny i migrujący. Zmiany we właściwościach adhezyjnych są często wynikiem zmian w ekspresji i funkcji cząsteczek adhezyjnych. Zaburzenia w regulacji ekspresji cząsteczek adhezyjnych komórek są obecne na każdym etapie inwazji miejscowej nowotworów oraz przerzutowania (oderwanie komórek nowotworowych z guza pierwotnego, przenikanie komórek do wnętrza naczyń krwionośnych, przemieszczanie się do odległych narządów).

Mając solidne podstawy naukowe, teoretyczne i kliniczne Doktorant podjął bardzo ważny i praktyczny temat badań naukowych dotyczący wybranych białek zaangażowanych w procesy adhezji i migracji komórek m.in. kadheryny, białka EpCAM (odpowiedzialne głównie za adhezję komórek) oraz Fascyna-1 (odpowiedzialna za migrację komórek).

Kadheryny zaliczane są do najważniejszych cząsteczek adhezyjnych pośredniczących w adhezji międzykomórkowej komórka-komórka. Rodzina kadheryn składa się z tzw. klasycznych kadheryn, które są zależnymi od wapnia mediatorami adhezji komórka-komórka oraz nieklasycznych w tym kadheryn desmosomalnych i protokadheryn. Najlepiej poznane są kadheryna E- (nabłonkowa) - ważny czynnik w utrzymaniu integralności nabłonka i polaryzacji oraz adhezji komórek, N- (neuronowa) oraz P- (łożyskowa).



Białko EpCAM (cząsteczka adhezyjna komórek nabłonkowych) jest przezbłonową glikoproteiną typu I z dwoma powtórzeniami podobnymi do EGF w domenie zewnętrznej i krótką domeną wewnątrzkomórkową zawierającą dwa miejsca wiązania dla α -aktyny (udział w połączeniu filamentów aktynowych). Jego funkcja związana jest z pośredniczeniem w homofilnych interakcjach adhezyjnych komórka-komórka, co zapobiega powstawaniu przerzutów, natomiast w nowotworach pełni funkcję ochronną (delecje EpCAM prowadzą do zwiększonego ryzyka rozwoju raka, a nadekspresja EpCAM w komórkach raka hamuje jego przerzutowanie).

Fascyny są grupą białek odpowiedzialnych za utrzymanie prawidłowej struktury wewnętrznej cytoszkieletu komórkowego. Wiążą ze sobą mikrofilamenty aktynowe, co umożliwia ruch komórek. Jednym z białek należących do tej grupy jest Fascyna-1, która organizuje filamenty aktynowe w wiązki o minimalnym stosunku 4:1 (aktyna/fascyna). Odgrywa ona istotną rolę w tworzeniu mikrokolców, fałdowania błony komórkowej i włókien naprężeniowych co jest istotne w tworzeniu różnorodnych zestawów wypustek komórkowych takich jak filopodia, a także odpowiada za ruchliwość i migrację komórek.

Lek. Łukasz Lewczuk określił precyzyjnie cele swojej pracy:

1. Ocena ekspresji białek adhezyjnych: E-kadheryna, N-kadheryna, P-kadheryna, EpCAM i Fascyna-1 w rakach błony śluzowej trzonu macicy.
2. Przeprowadzenie korelacji pomiędzy ekspresją powyższych białek a wybranymi parametrami histoklinicznymi.

W tym miejscu chciałbym podkreślić fakt interdyscyplinarności badań naukowych powiązanych pomiędzy naukami podstawowymi a naukami klinicznymi, co w onkologii jest niezwykle ważne i nadaje praktycznego znaczenia wynikom badań.



Na projekt badawczy uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Bioetycznej w Białymstoku nr R-I-002/68/2016 i R-I-002/108/2017.

Użyte przez Doktoranta metody analiz statystycznych: test U Manna-Whitneya, nieparametryczne analizy statystyczne, analiza korelacji rang Spearmana, test Manna-Whitneya dla dwóch grup, test Kruskala-Wallisa użyty dla trzech lub więcej grup i test post hoc Dunna zostały dobrane w sposób prawidłowy i zgodny z zasadami statystycznymi opracowania wyników, także dla małych grup.

Materiał badawczy stanowiła grupa 38 chorych leczonych chirurgicznie z powodu raka błony śluzowej trzonu macicy w Centrum Medycznym „Żelazna” w Warszawie w latach 2008-2015. W rutynowej ocenie histopatologicznej wycinków przeanalizowano typy histologiczne, stopień złośliwości histologicznej (G), stopień zaawansowania anatomo-klinicznego wg FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics), obecność przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych i przerzutów odległych. Pączkowanie guza zliczano w 5 polach widzenia (powiększenie x40) i klasyfikowano jako niski (<5 pączków) lub wysoki (≥5 pączków). Pięć skrawków z rozrostem atypowym endometrium z wyciętego materiału z grupy badanej zastosowano jako kontrole.

Badania immunohistochemiczne przeprowadzono na 38 tkankach pierwotnych guzów endometrium i 20 tkankach przerzutowych: 9 przerzutów do węzłów chłonnych (3 przypadków nie poddano barwieniom z powodu mikroprzerzutów) i 11 przerzutów odległych (7 do jajników, 2 do pochwy i 2 do okrężnicy) oraz w 5 kontrolnych skrawkach. Wyniki zostały ocenione przez dwóch niezależnych patologów (Zakład Patomorfologii Ogólnej UM w Białymstoku) pod mikroskopem świetlnym. Ekspresję białka obserwowano losowo w 10 polach widzenia (FOV) w dużym powiększeniu (powiększenie 10x40), przy czym w każdym FOV zliczano ≥100 komórek. Ekspresję obserwowano jako cytoplazmatyczną, błonową lub mieszaną i sklasyfikowano jako dodatnią w cytoplazmie (widoczna była tylko reakcja cytoplazmatyczna)



lub dodatnią w błonie (tylko reakcja błonowa lub mieszana). Ekspresja została obliczona na podstawie odsetka komórek immunoreaktywnych i zakres 1-100% wskazywał na dodatnią ekspresję. Dane uzyskane z analizy immunohistochemicznej przedstawiono jako średni procent poziomu ekspresji.

Lek. Łukasz Lewczuk w swojej pracy badawczej uzyskał następujące wyniki:

1. *Porównanie ekspresji białek E-, N-, P-kadheryn, EpCAM i Fascyny-1 w hiperplazji endometrium z atypią, w guzie pierwotnym i w przerzucie raka endometrium.*

W zmianach hiperplastycznych z atypią endometrium ekspresja E-, N- i P-kadheryn była bardzo podobna, głównie cytoplazmatyczna o słabej intensywności zabarwienia, ale równomierna w całym nabłonku hiperplastycznym. Ekspresja białka EpCAM była słaba, błonowa, natomiast ekspresji Fascyny-1 nie obserwowano.

W raku endometrium ekspresja kadheryn była zlokalizowana błonowo i/lub cytoplazmatycznie i była nierównomiernie zlokalizowana w tkance nowotworowej. Silniejszą reakcją trzech kadheryn zaobserwowano we froncie guza w porównaniu do głównej masy guza. Znamienne wyższą ekspresję cytoplazmatyczną w porównaniu do błonowej obserwowano w przypadku E-kadheryny w guzie pierwotnym ($p < 0,05$) oraz P-kadheryny w guzie pierwotnym ($p < 0,01$) oraz w przerzutach ($p < 0,001$). Wzrost ekspresji E-kadheryny, N-kadheryny czy P-kadheryny cytoplazmatycznej wiązał się ze wzrostem również reakcji błonowej w guzie pierwotnym raka endometrium. Ekspresja białka EpCAM w raku endometrium była błonowo-cytoplazmatyczna i obserwowano ją w 31,5% przypadków, podczas gdy w przerzutach była obecna tylko w 3 przypadkach. Ekspresję białka Fascyny-1 zaobserwowano w 77,1% przypadków pierwotnych raków endometrium oraz w 70,6% przypadków przerzutów, ale bez znamienności statystycznej.



2. *Korelacje pomiędzy ekspresją białek E-, N-, P-kadheryn, EpCAM i Fascyny-1 w pierwotnym guzie raka endometrium a parametrami histoklinicznymi.*

Znamienną zależność wykazano pomiędzy błonową ekspresją P-kadheryny a stopniem złośliwości histologicznej raka endometrium. Z kolei wyższy odsetek ekspresji błonowej P-kadheryny korelował z rakami niskozróżnicowanymi histologicznie ($p=0,020$). Zaobserwowano także znamienną statystycznie korelację pomiędzy obecnością pączków high-grade i wyższą cytoplazmatyczną ekspresją E-kadheryny ($p=0,017$), wyższą błonową oraz cytoplazmatyczną ekspresją P-cadheryny (odpowiednio $p=0,013$ i $p=0,001$). Wyższa ekspresja błonowa E-kadheryny również wiązała się z pączkowaniem high-grade, ale bez uzyskania istotności statystycznej. Jednakże wzrost ekspresji błonowej E-kadheryny w raku endometrium korelował z obecnością przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych ($p=0,040$). Ekspresja białek EpCAM oraz Fascyny-1 nie wiązała się z żadnymi parametrami histoklinicznymi. Zaobserwowano jednak zależności na granicy istotności statystycznej pomiędzy wyższą ekspresją białka EpCAM i niskim stopniem zróżnicowania histologicznego oraz obecnością pączków high-grade raka endometrium oraz pomiędzy wyższą ekspresją Fascyny-1 a obecnością przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych.



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

1. Wzrost ekspresji E-, N-, P-kadheryn we froncie inwazji guza w stosunku do głównej masy guza może świadczyć o specyficznym mechanizmie rozprzestrzeniania się miejscowego raka endometrium.
2. Wysoki stopień ekspresji błonowej P-kadheryny wiąże się z high-grade tumor budding oraz z niskim stopniem zróżnicowania histologicznego raka endometrium.
3. Wzrost błonowej ekspresji E-kadheryny w guzie pierwotnym raka endometrium wiąże się z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych.
4. Niższa błonowa ekspresja E-, N-, P-kadheryn w komórkach przerzutowych w porównaniu z guzem pierwotnym raka endometrium może świadczyć o ich potencjale metastatycznym.
5. Różnice w lokalizacji ekspresji białek cząstek adhezyjnych w raku endometrium mogą być związane z różnicowaniem typu histologicznego guza jak i jego agresywności.

Pod względem formalnym rozprawa doktorska oparta jest na dwóch pracach o łącznym współczynniku oddziaływania 4,881 oraz punktacji MNiSW 170 punktów. Zawiera 45 stron, 29 kluczowych pozycji piśmiennictwa oraz została podzielona na typowe dla dysertacji elementy: wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, wnioski, podsumowanie (umieszczone w rozdziale 4), literatura źródłowa, streszczenia w języku polskim i w języku angielskim, oświadczenia autora oraz współautorów publikacji. Dołączone zostały także skany 2. publikacji: „Cell adhesion molecules in endometrial cancer - A systematic review” oraz „Expression level of E-, N- and P-cadherin protein in endometrial cancer”.



Doktorant w swojej pracy wykazał się dobrym warsztatem naukowym, umiejętnością prospektywnego i logicznego myślenia, które świadczą o znajomości zasad planowania i przeprowadzania badań naukowych. Na podkreślenie zasługuje fakt współpracy Doktoranta z Zakładem Patomorfologii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku i zrozumienie problemu jakim jest interdyscyplinarność leczenia onkologicznego, zwłaszcza współpracy z naukami podstawowymi, jako niezbędnego elementu nowoczesnej onkologii. Nie ma także wątpliwości odnośnie znaczącego wkładu pracy Doktoranta, który był znaczący i w dużej mierze samodzielny, chociaż pod „czujnym okiem” Promotora i Promotora Pomocniczego.

Chciałbym zaznaczyć także dla rzetelności i wartości tej pracy ocenę preparatów przez dwóch niezależnych patologów, co powinno być standardem w badaniach naukowych, a nie zawsze jest.

W dyskusji, która została umieszczona w rozdziale 4. lek. Łukasz Lewczuk ocenił i porównał swoje wyniki z danymi literaturowymi w sposób prawidłowy. Konieczne natomiast jest krytyczna ocena własnych wyników, zwłaszcza, że pojawiły się rozbieżności w danych literaturowych („W badaniach własnych nie wykazano zależności między ekspresją białek EpCAM i Fascyny-1 w korelacji z czynnikami kliniczno-patologicznymi raka endometrium. Dane literaturowe jednak wskazują na zależność utraty białka EpCAM w bardziej zaawansowanym raku endometrium [status FIGO oraz naciekanie komórek rakowych do węzłów chłonnych] a także z krótszym czasem przeżycia pacjentek z rakiem endometrium”). W podsumowaniu dysertacji powinny zostać podkreślone ograniczenia tej pracy wynikające z jednośrodkowej pracy, małej grupy pacjentek oraz jej charakteru retrospektywnego (w pracy oryginalnej zostały one zawarte w dyskusji). Piśmiennictwo jest nowoczesne, anglojęzyczne zawierające kluczowe pozycje dotyczące przedstawionego zagadnienia, które zostało zacytowane we właściwym miejscu.

Chciałbym także zaznaczyć, że oceniana przeze mnie praca może mieć swoje istotne implikacje kliniczne związane z identyfikacją potencjalnych



czynników prognostycznych pacjentek chorych na raka endometrium.

Konieczna jest natomiast korelacja z innymi elementami mikrośrodowiska guza, które niewątpliwie wpływają na rozwój nowotworu zwłaszcza przy planowaniu dalszego rozwoju naukowego i dalszych badań.

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

W ocenie rozprawy doktorskiej z obowiązku recenzenta znalazłem następujące drobne uchybienia, które znacząco nie umniejszają jej wartości:

1. W podsumowaniu dysertacji powinny zostać podkreślone ograniczenia tej pracy wynikające z jednośrodkowej pracy, małej grupy pacjentek oraz jej charakteru retrospektywnego;
2. błędy stylistyczne i opisowe wymagające korekty:

- str. 6: „Przypadków nieoperacyjnych” – powinno być: przypadków nieresekcyjnych (nieoperacyjny jest pacjent np. ze względu na stan ogólny, a nieresekcyjna zmiana np. z przyczyn technicznych)

- str. 14: „przeżycia pacjentek z rakiem endometrium” – powinno być: pacjentek chorych na raka endometrium lub pacjentek z rozpoznanym rakiem endometrium

Pomijając moje drobne uwagi, przedstawiona do oceny rozprawa spełnia ustawowe wymogi na stopień doktora nauk medycznych.



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Klinika Onkologii

Należy podkreślić, że badanie zostało zaplanowane, wykonane i opisane na dobrym poziomie naukowym, tym bardziej, że przedstawiony cykl prac naukowych został już wcześniej oceniony merytorycznie przez recenzentów czasopism posiadających współczynnik wpływu w których zostały opublikowane.

W związku z powyższym z pełnym przekonaniem wnoszę do Wysokiego Senatu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Łukasza Lewczuka do dalszych etapów procedury przewodu doktorskiego, a racji z opublikowania wyników w czasopismach posiadających współczynnik oddziaływania wnoszę o jej wyróżnienie.


Kierownik Kliniki Onkologii
Dr hab. n. med. Rafał Stec
dr hab. n. med. Rafał Wiesław Stec