

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska p. t.: **Wartość prognostyczna E-kadheryny, beta kateniny i wimentyny wraz ze zjawiskiem tumor budding w raku odbytnicy i ich związek z wybranymi czynnikami kliniczno-patologicznymi**". Rozprawa jest oparta głównie na retrospektywnych badaniach immunohistochemicznych przeprowadzonych na materiale tkankowym pochodzącym z grupy 132 chorych na raka odbytnicy (55 kobiet i 77 mężczyzn) w wieku od 34 do 88 lat, u których - po wstępnym leczeniu napromienianiem – zastosowano leczenie operacyjne. Wyniki badań laboratoryjnych zostały uzupełnione i skorelowane z danymi klinicznymi, które odgrywają krytyczną rolę w ocenie rokowania u chorych na raka odbytnicy.

Doktorantka pierwotnie zakładała przebadanie dużo większej grupy chorych (181 chorych), w przypadku których dysponowała kompletnym zestawem danych klinicznych; w tym wynikami badań obrazowych przed rozpoczęciem leczenia. Niestety, niewystarczający materiał tkankowy uniemożliwił w 49 przypadkach przeprowadzenia badań laboratoryjnych.

Recenzowana praca doktorska ma standardowy układ i obejmuje 11 klasycznych rozdziałów tj. wstęp, cel pracy, materiał i metodyka, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo, spis tabel i spis rycin.

W rozdziale pt CEL PRACY Autorka precyzuje, że,

- po pierwsze, zasadniczym celem pracy nie jest jedynie ocena „wartości prognostycznej wymienionych w tytule czterech parametrów histologicznych i immunohistochemicznych guza pierwotnego”, ale szeroko pojęta ocena prawdopodobieństwa przeżycia całkowitego, bezobjawowego, wolnego od nawrotu miejscowego i wolnego od przerzutów odległych (rozsiewu) u chorych na raka jelita grubego z uwzględnieniem wielu innych, istotnych cech klinicznych i morfologicznych,
- a po drugie że dotyczy ona chorych leczonych z powodu **zaawansowanego raka odbytnicy** (to ważna informacja, gdyż jak sama Autorka podkreśla

zarówno we wstępie pracy jak i w części poświęconej dyskusji wyników własnych z piśmiennictwem, że czynniki kliniczno-morfologiczne wpływające na wyniki leczenia wczesnego i zaawansowanego raka jelita grubego są odmienne).

Lektura dwóch kolejnych rozdziałów (rozdziały: Materiał i metodyka oraz Wyniki) wskazuje, że sama redakcja pracy doktorskiej była poprzedzona dwoma żmudnymi etapami przewodu, na który składała się część doświadczalna oraz statystyczna analiza uzyskanych wyników badań laboratoryjnych.

Doświadczalna część pracy została wykonana w Zakładzie Patologii Nowotworów Świętokrzyskiego Centrum Onkologii. Ocenę wspomnianych markerów oparto na wykonanych testach immunohistochemicznych z zastosowaniem dedykowanych przeciwciał monoklonalnych i standardowych systemów detekcyjnych. Metodyka przeprowadzonych badań immunohistochemicznych nie budzi zastrzeżeń, z jednym wyjątkiem; zaskakuje mnie sposób interpretacji wyniku badania immunohistochemicznego na obecność wimentyny; za pozytywny wynik reakcji przyjęto odczyn zarówno o charakterze cytoplazmatycznym jak i jądrowym. Wimentyna należy do białek strukturalnych, konkretnie mikrofilamentów tworzących cytoskeleton komórek, w szczególności komórek o fenotypie mezenchymalnym lub podlegającym tzw. „przejściu nabłonkowo-mezenchymalnemu” (ang. *epithelial-mesenchymal transition*, EMT), dlatego za specyficzny odczyn na wimentynę uznaje się standardowo jedynie reakcję cytoplazmatyczną. Nie jest wykluczone, że gdyby Autorka za dodatni odczyn przyjęła jedynie reakcję cytoplazmatyczną, świadomie pomijając odczyn jądrowy wynikający najprawdopodobniej z niespecyficznego tła reakcji, to wówczas rezultaty analiz statystycznych (w odniesieniu do wimentyny) mogły by być nieco odmienne. Przemawiać za tym mogą m.in. wyniki cytowanej przez Panią Doktor pracy, której autorem jest Jaudah Al-Maghrabi [*Int J Clin Exp Pathol* 2020; 13(3):493-500]; we wspomnianej pracy za dodatnią reakcję na obecność wimentyny uznany został odczyn w cytoplazmie stwierdzony w ponad 5% komórek raka. Taką reakcję odnotowano jedynie w 35/202 (17,3%) przebadanych guzów.

Na uwagę zasługuje również liczba i odsetek przypadków z ekspresją E-kadheryny E i z dodatnim odczynem jądrowym na β -kateninę; w badanym materiale dodatni odczyn na E-kadherynę stwierdzono w 43 (32,6%) przypadkach, a jądrowy odczyn na β -kateninę w 104 (78,8%). Z tego zestawienia wynika, że w badanym materiale jądrowa reakcja na β -kateninę (104 guzy, 78,8%) w komórkach gruczolakoraka obserwowana była w znacznie większej liczbie przypadków niż utrata błonowego odczynu na kadherynę E (89 przypadków, 67,4%).

W tym miejscu wydaje się celowe pytanie, czy z powyższego faktu wynika, że „przesunięcie” β -kateniny do jądra komórkowego może być związane z innym patomechanizmem niż powszechnie znana degradacja błonowego kompleksu E-kadheryna- β -katenina?

Doświadczalną część pracy uzupełnia analiza zjawiska tzw. pączkowania komórek guza (ang. *tumor budding*) dokonana, najprawdopodobniej, w oparciu o powtórny ocenę preparatów histopatologicznych barwionych hematoksyliną-eozyną. *Tumor budding* zdefiniowano jako obecność pojedynczych komórek raka lub ich niewielkich skupień (<5 komórek gruczolakoraka) rozproszonych w podścielisku tzw. frontu guza i widocznych co najmniej w 5 polach widzenia, przy powiększeniu 200x. Analiza mikroskopowa inwazyjnego frontu raka wykazała obecność zjawiska „pączkowania” komórek raka u 92 (69,7%) chorych. Zjawisko to jest od kilku lat szeroko komentowane w piśmiennictwie a jego raportowanie w wynikach badań patomorfologicznych należy do standardów oceny materiału tkankowego we wczesnych rakach jelita grubego oraz u chorych w II stopniu zaawansowania (pT3-T4N0). W przypadku raka jelita grubego w III stopniu zaawansowania klinicznego (z przerzutami do węzłów chłonnych) wartość prognostyczna tego parametru budzi największe kontrowersje, stąd uwzględnienie tej cechy w niniejszym opracowaniu jest cennym przyczynkiem do naszej wiedzy o tym zjawisku i jego praktycznym znaczeniu [Badany materiał obejmował głównie chorych w stopniu pT3; 67,4% badanych, u blisko połowy – 43,2% - chorych stwierdzono przerzuty do węzłów chłonnych].

Z obowiązku recenzenta – patomorfologa chciałbym się na chwilę „zatrzymać” nad opisaną przez Doktorantkę korelacją pomiędzy występowaniem zjawiska pączkowania komórek raka i sposobem wzrostu guza. Ze zrozumiałych względów „*tumor budding*” koreluje z naciekającym (rozproszonym) typem utkania raka w obrębie „frontu guza”. Z danych z tabeli 31 (str 78) wynika jednak, że ogniska „pączkowania” komórek raka odnotowano także w połowie (33/66) guzów cechujących się rozprężającym typem wzrostu. W związku z tym wskazane wydaje się przededefiniowanie pojęcia „rozprężający typ wzrostu”. Być może ograniczenie tego pojęcia jedynie do guzów, które cechują się ostro ograniczonym frontem guza i jednocześnie nie wykazują zdolności do tworzenia mikro-ognisk naciekania podścieliska pozwoliłoby na wyłonienie grupy chorych na „zaawansowanego raka jelita” o stosunkowo dobrym lub przynajmniej nieco lepszym rokowaniu.

Wymienione wyżej cztery histologiczne i immunohistochemiczne cechy raka jelita grubego zostały poddane szczegółowej analizie statystycznej. W analizach statystycznych uwzględniono także szereg cech klinicznych takich jak: wiek i płeć chorych, wielkość i

lokalizację guza oraz rodzaj zabiegu operacyjnego (resekcja przednia vs amputacja brzuszno-kroczoowa vs operacja sposobem Hartmana), a także standardowe elementy raportu morfologicznego: sposób wzrostu guza i stopień jego złośliwości histologicznej (*grading*), zaawansowanie nowotworu w materiale operacyjnym oceniane na podstawie cech: pT i pN, obecność nacieku nowotworowego w otoczeniu nerwów, inwazji naczyń limfatycznych i krwionośnych, przekraczanie torebki przerzutowo zmienionego węzła chłonnego oraz histologiczna ocena radykalności zabiegu.

Największą wartość praktyczną mają uzyskane przez Doktorantkę wyniki **statystycznej analizy przeżyć** u chorych na zaawansowanego raka odbytnicy. W badanej grupie chorych na raka odbytnicy (n=132) prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia całkowitego, bezobjawowego i wolnego od rozsiewu choroby wynosiło, odpowiednio: 70%, 62% i 64%, w odniesieniu do przeżyć 10-letnich 59%, 54% i 55%, a w odniesieniu do przeżyć 15-letnich: 49%, 43% i 45%. Prawdopodobieństwo 5-letniego przeżycia wolnego od wznowy miejscowej wynosiło 68%, 10-letnie- 56%, a 15-letniego 49%.

W analizie jednoczynnikowej zmiennymi, które okazały się korelować jednocześnie z ryzykiem zgonu, nawrotu choroby i wystąpienia rozsiewu choroby były: stopień zaawansowania choroby (pT3 i pT4), naciekanie nerwów (PNI) i naczyń chłonnych lub krwionośnych (LVSI), obecność przerzutów w węzłach chłonnych oraz stan marginesów: radialnego (CRM) i resekcji histopatologicznej (R). Dodatkowym czynnikiem ryzyka w przypadku zgonu i nawrotu choroby było przekraczanie torebki przerzutowo zmienionego węzła chłonnego przez komórki nowotworowe (ECI).

W wieloczynnikowym modelu regresji Coxa wyłoniono dwie cechy mające niezależny znamienny wpływ zarówno na ryzyko zgonu, jak i ryzyko wznowy choroby oraz wystąpienia odległych przerzutów: była to jądrowa ekspresja beta-kateniny oraz wąski (nie przekraczający 2mm) margines radialny (CRM). Trzecim czynnikiem, wpływającym niezależnie na ryzyko zgonu było naciekanie tkanki tłuszczowej przerzutowo zmienionego węzła chłonnego (ECI), a w odniesieniu do przeżyć bezobjawowych i wolnych od przerzutów odległych – samo zajęcie węzłów chłonnych.

Wyżej wymienione dane, pochodzące z tabel 35- 37 zestawiono poniżej.

Tabela. Czynniki ryzyka według modelu regresji Coxa dla przeżycia całkowitego, wolnego od objawów choroby oraz odległych przerzutów

	Przeżycie całkowite	Przeżycie wolne od objawów choroby	Przeżycie wolne od odległych przerzutów
β -katenina	RR=2,71 p=0,0122	RR=2,43 p=0,0181	RR=2,65 p=0,0043
CRM	RR=5,07 p<0,0001	RR=2,70 p=0,0022	RR=2,59 p=0,0129
ECI	RR=2,53 p=0,0090	-	-
pN	-	RR=2,43 p=0,0017	RR=2,27 p=0,0043

CRM- dodatni margines radialny > 2mm, ECI- naciekanie torebki przerzutowo zmienionego węzła chłonnego, pN- status węzłów chłonnych

Z powyższego zestawienia wynika, że spośród badanych czterech parametrów mikroskopowych najistotniejszym z praktycznego punktu widzenia jest ocena jądrowej ekspresji **kateniny β** . Doktoranta wykazała również, że ekspresja kateniny β może wskazywać na oporność na neoadjuwantową radioterapię (tabela 33 str. 80 *Analiza związku beta kateniny z odpowiedzią na RTH*). Jest to oryginalna obserwacja. W dostępnym piśmiennictwie anglojęzycznym stwierdziłem jedynie pojedyncze doniesienie na ten temat (Takahashi H et al. *Histopathology*. 2017 Aug;71(2):227-237.). Wykazane w niniejszej dysertacji znaczenie kateniny β może stanowić ważną wskazówkę zarówno dla klinicystów jak i patomorfologów. Jeżeli znaczenie tego parametru w prognozowaniu ryzyka nawrotu i uogólnienia choroby bądź ryzyka zgonu, a także w ocenie odpowiedzi na leczenie neoadjuwantowe zostanie potwierdzone na większym materiale to wówczas marker ten powinien być dopisany do listy parametrów wymaganych obowiązkowo w standardowym raporcie patomorfologicznym z resekcji jelita u chorych na raka odbytnicy.

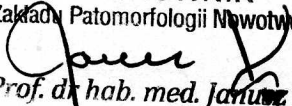
Podsumowane wyżej wyniki przeprowadzonych badań laboratoryjnych i analiz statystycznych oraz sformułowane przez Doktorantkę wnioski w pełni odpowiadają na wyznaczone cele rozprawy doktorskiej.

Na zakończenie chciałbym zwrócić uwagę jeszcze na jeden walor niniejszej rozprawy doktorskiej. Jest nią wzorcowo opracowany przegląd piśmiennictwa dotyczącego epidemiologii, etiologii i diagnostyki raka jelita grubego, ze szczególnym uwzględnieniem czterech parametrów zapisanych w tytule rozprawy oraz przegląd doniesień na temat wyników leczenia chorych na ten nowotwór. Równie interesującą lekturą jest część poświęcona dyskusji i porównania uzyskanych własnych wyników z danymi z piśmiennictwa. Obydwa rozdziały (pt WSTĘP i DYSKUSJA) dowodzą, że Pani Doktor Anna Huruk-Kichinka jest ekspertem z zakresu kliniki raka jelita grubego ale również prawdziwym znawcą patomorfologii tego nowotworu w stopniu którego nie powstydziliby się specjalista-patomorfolog. Obydwa rozdziały są godne polecenia wszystkim którzy zajmują się zarówno diagnostyką jak i leczeniem chorych na raka jelita grubego.

Reasumując, stwierdzam, że praca doktorska pt.: **Wartość prognostyczna**

E - kadheryny, beta kateniny i wimentyny wraz ze zjawiskiem tumor budding w raku odbytnicy i ich związek z wybranymi czynnikami kliniczno-patologicznymi” stanowi rozwiązanie oryginalnego zagadnienia naukowego i spełnia wszystkie warunki określone w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, dlatego zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Nauk Medycznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach z wnioskiem o dopuszczenie lekarza medycyny **Anny Huruk-Kuchinki** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

KIEROWNIK
Zakładu Patomorfologii Nowotworów

Prof. dr hab. med. Janusz Ryś