



# UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

**Kierownik Katedry Morfologii i Embriologii Człowieka**

**Zakładu Histologii i Embriologii**

**prof. dr hab. Piotr Dzięgiel**

Wrocław, 03.09.2018 r.

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Artura Anisiewicza pt.: „Regulacja mikrośrodowiska guza przez kalcytriol i jego analogi w procesie przerzutowania mysiego raka gruczołu sutkowego”**

Rak gruczołu piersiowego pomimo wciąż nowych i doskonalszych metod diagnostycznych, a także terapeutycznych jest w dalszym ciągu jednym z najgroźniejszych nowotworów złośliwych u kobiet, zarówno na świecie jak również w Polsce. Pod względem umieralności zajmuje drugie miejsce po raku płuc, który do niedawna w statystykach plasował się właśnie na tej pozycji. Postęp w różnych dziedzinach nauk medycznych oraz biologicznych (szczególnie w zakresie biologii molekularnej), spowodował diametralnie inne podejście do tej choroby niż jeszcze przed kilkoma czy kilkunastoma laty. Zaawansowane badania genetyczne, biochemiczne, a także morfologiczne, wykorzystujące wyrafinowane metody badawcze, pozwoliły na lepsze zrozumienie biologii komórek nowotworowych. Stworzono nową klasyfikację raka gruczołu piersiowego, opartą na cechach molekularnych, m.in. takich jak: status receptorowy (ER, PgR, HER-2) oraz biorącą pod uwagę ekspresję charakterystycznych białek w komórkach nowotworu tego narządu. Pozwoliło to na wdrożenie do postępowania terapeutycznego nowych środków leczniczych, których działaniem jest oparte m.in. na ekspresji ww. białek (np. tamoxifen, herceptyna i in.). Jednak pomimo tak znacznego postępu w badaniach i terapii gruczołu piersiowego, nie można powiedzieć, że „walka została wygrana”. W dalszym ciągu odnotowuje się wzrost zachorowań, co bezpośrednio koreluje ze wzrostem umieralności.

W związku z powyższym nieustające dążenia, mające na celu osiągnięcie sukcesu w leczeniu raka gruczołu piersiowego, zwróciły uwagę na rolę tzw. podścieliska guza nowotworowego w biologii tego raka. Podścielisko to, zwane także „mikrośrodowiskiem

guza”, wg ostatnich doniesień, może pełnić kluczową rolę w progresji nie tylko raka gruczołu piersiowego, ale także innych nowotworów złośliwych, na czele z rakiem płuc czy jelita grubego. Elementy podścieliska, na które składają się m.in. naczynia krwionośne i limfatyczne, komórki nacieku zapalnego czy wreszcie, być może kluczowe - fibroblasty towarzyszące guzom (CAF), warunkują procesy inwazji, przerzutowania, a co za tym idzie – progresji procesu nowotworowego.

Mając na uwadze powyżej przytoczone informacje, wg mojej oceny wybór tematu pracy doktorskiej jest jak najbardziej aktualny i w pełni wpisuje się w trend nowoczesnych badań naukowych z zakresu szeroko pojętej onkologii eksperymentalnej, których przedmiotem jest rak gruczołu piersiowego.

Przechodząc do oceny i skomentowania poszczególnych części pracy doktorskiej stwierdzam, że jest ona napisana w sposób przystępny, co umożliwi jej dogłębną analizę oraz recenzję.

Wstęp monografii stanowi zasadniczą część opracowania i na prawie 50-ciu stronach wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z epidemiologią, transformacją nowotworową, biologią, a także diagnostyką i leczeniem w raku gruczołu piersiowego. Na wstępie mojej oceny chciałbym zaznaczyć pewien problem związany z mianownictwem. Z morfologicznego (i histogenetycznego) punktu widzenia, omawiane w rozprawie doktorskiej nowotwory wywodzą się ze struktur gruczołowych, najczęściej przewodowych lub zrazikowych. W związku z tym zastosowanie określenia „rak gruczołu piersiowego” wydaje się najbardziej adekwatne, chociaż już w mocno przestarzałym mianownictwie histologicznym pokutuje określenie „gruczoł sutkowy”. Niezbyt dobrym jest również używanie określenia „rak piersi” – najprawdopodobniej, powszechnie stosowane z uwagi na nazewnictwo w j. angielskim, czyli „breast cancer”. Osobiście, mogę mieć tylko nadzieję, że w nowym, przygotowywanym mianownictwie histologicznym określenie „rak gruczołu piersiowego” znajdzie uznanie.

Jak już zostało wspomniane, wstęp recenzowanej pracy doktorskiej jest wyczerpujący merytorycznie, lecz chciałbym zwrócić uwagę na kilka nieścisłości jakie się w nim znalazły:

- na str. 19 już w pierwszym zdaniu doktorant przytacza stwierdzenie, w którym postuluje, że za całość procesu transformacji i progresji nowotworowej odpowiedzialny jest układ immunologiczny. Myślę, że lepiej napisać po prostu „miedzy innymi układ immunologiczny”
- str. 22: powinno być: przerzuty do lokalnych węzłów chłonnych”, a nie ich naciekanie.

- str. 27: lepiej napisać – „na podstawie obrazu histologicznego oraz ekspansji komórek nowotworowych”, a nie „zróżnicowania histologicznego”, które jest czymś innym morfologicznie
- także na tej samej stronie: zrazikowy rak przedinwazyjny (LCIS) nie jest rozpoznawany na podstawie badania mammograficznego lecz histopatologicznego
- na str. 34 warto wspomnieć, że w raku gruczołu piersiowego, w pierwszym etapie progresji nowotworowej dochodzi do przerzutów do węzłów chłonnych drogą naczyń limfatycznych, a nie naczyń krwionośnych
- str. 35: „Celem migrujących komórek nowotworowych są najbliższe naczynia limfatyczne i/lub krwionośne”
- str. 43: obecność fibroblastów towarzyszących guzom (CAF) stwierdza się nie w nacieku leukocytnym lecz w podścielisku otaczającym komórki nowotworowe
- na str. 50 „Wstępu” doktorant wymienia markery pozwalające identyfikować fibroblasty towarzyszące guzom (CAF). Jak do tej pory najlepszym ich markerem jest podoplanina, co warto podkreślić! Tym bardziej, że publikacja naszego zespołu (Histopathology – Pula B. et al., 2011), również pokazuje dodatnią korelację jej ekspresji z progresją przewodowych raków gruczołu piersiowego (IDC)
- str. 51 – skórna biosynteza zapewnia ok. 90% całkowitego jej stężenia w organizmie a nie „dostarcza”. Także na tej stronie powinno być: 7 –dehydrocholesterol
- str. 59: wg recenzenta doktorantowi chodziło raczej o odcinki przewodów gruczołu piersiowego, a nie o przewód piersiowy, który jest odmienną strukturą anatomiczną.

Kolejnym ocenianym rozdziałem pracy doktorskiej jest część zatytułowana „Materiały i Metody”. Również w przypadku tego fragmentu monografii stwierdzam, że jest napisany szczegółowo i wyczerpująco, co zaświadcza o dobrym przygotowaniu doktoranta do pracy laboratoryjnej. Jednocześnie, chciałbym wskazać na pewne nieścisłości jakie pojawiły się w manuskrypcie:

- str. 85 w tabeli 12: przeciwciała przeciw jakiemu VEGF były stosowane?
- na str. 86 opisane są badania z wykorzystaniem metody immunohistochemicznej – uwagi:
  - a) metoda immunohistochemiczna (IHC) (jak sama nazwa wskazuje) nie jest barwieniem, lecz reakcją barwną w wyniku wizualizacji procesu połączenia się antygeny ze specyficznym przeciwciałem
  - b) aktywna mięśni gładkich ( $\alpha$ SMA) nie jest markerem komórek śródbłonna naczyniowego

c) analizując załączone fotografie obrazów mikroskopowych reakcji IHC myślę, że do ich wizualizacji stosowano zestawy odczynników wykorzystujących diaminobenzydynę (DAB), co jest dość istotne w tej metodyce

d) również nieprofesjonalnym jest określenie „świecenie” w subiektywnej ocenie nasilenia reakcji IHC

- str. 87 – bardzo subiektywna ocena pola powierzchni depozytów kolagenowych, pomimo dysponowania komputerową analizą obrazu (?)

Ponadto w całym rozdziale dotyczącym metodyki badań brak informacji, jakie przeciwciała były stosowane do poszczególnych metod – IHC, WB? Czy były to przeciwciała monoklonalne, czy poliklonalne? Od jakiego zwierzęcia pochodziły (mysie, królicze itp.?). Jest to o tyle istotne, że dobór nieodpowiedniego przeciwciała może rzutować na jakość i wiarygodność reakcji IHC!

Rozdział „Wyniki” zawiera zestawienie wraz z omówieniem uzyskanych rezultatów podczas prowadzonych badań *in vivo* oraz *in vitro*. Jest napisany w przystępny sposób, a liczne barwne wykresy ułatwiają analizę otrzymanych wyników. Jednakże, również i do tej części pracy doktorskiej mam kilka uwag:

- na stronie 93 i 120 są zamieszczone fotografie obrazów mikroskopowych uzyskanych metodą histochemiczną oraz immunohistochemiczną (IHC). Są one bardzo małych rozmiarów, co uniemożliwia ich interpretację. Ma to szczególne znaczenie w przypadku reakcji IHC, gdzie trudno powiedzieć tak naprawdę, jakie struktury i komórki wykazują ekspresję poszczególnych antygenów (białek)?

- str. 109 – brak w załączonych tabelach charakterystyki przeciwciał użytych w metodzie WB

- str. 117: nie bardzo rozumiem jakie znaczenie miała ocena błony środkowej i przydanki aorty w analizie aktywacji śródbłonna, jeżeli jest on elementem błony wewnętrznej. Dodatkowo, karkołomna wydaje się ocena przebudowy ściany aorty pod wpływem stosowanych związków, oparta na „liczbie warstw” komórek? Jakich komórek, skoro aorta jest tętnicą typu sprężystego, gdzie nad komórkami mięśni gładkich dominują włókna elastyczne (z jakiego odcinka były pobierane próbki ściany aorty?) Z kolei w przydanie dominuje tkanka łączna właściwa z fibroblastami oraz pojedynczymi miocytami, a także włókna kolagenowe, sprężyste oraz naczynia naczyń! Zastosowanie metody IHC tego nie umożliwia, ponadto co było celem uwidocznienia w strukturze ściany aorty?

- str. 118 – wprowadzie czynnik von Willebranda (vWF) oraz endoglina (CD105) znakuje komórki śródbłonna, ale typowymi markerami są CD31 i CD34, których nie badano?

Poza tym, dlaczego oceniano *vasa vasorum* (naczynia naczyń) w przydanie aorty, skoro wydawało się, że analizie ma podlegać śródbłonek błony wewnętrznej? Nie wiem również jaki cel miała ocena ekspresji  $\alpha$ SMA w błonie środkowej w aspekcie aktywacji komórek śródbłonna naczyniowego?

Na koniec oceny rozdziału zawierającego wyniki przeprowadzonych eksperymentów, chciałbym się odnieść do jeszcze jednego aspektu. Mianowicie, prawidłowe mysie fibroblasty BALB/3T3 nie mogą być odzwierciedleniem komórek podścieliska guza nowotworowego – CAF (fibroblasty towarzyszące guzom). Są to całkiem odmienne komórki, najprawdopodobniej zarówno pod względem histogenezy jak również morfologii oraz biologii. Stąd trudno wyciągać wnioski na podstawie uzyskanych wyników w powyższym modelu komórkowym, w kontekście typowego mikrośrodowiska guza (podścieliska).

W rozdziale „Podsumowanie Wyników” doktorant w trafny sposób przedstawia uzyskane rezultaty swoich eksperymentów, co niewątpliwie podnosi wartość rozprawy doktorskiej. Do tej części mam również niewielkie uwagi, które w zasadzie dotyczą punktu 5 i 6. Wg mojej oceny pełniejszego komentarza oraz głębszej analizy wymaga brak korelacji wzrostu perfuzji obszaru guza nowotworowego z ekspresją naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF-A), będącego głównym stymulatorem angiogenezy (także nowotworowej). Nie zgadzam się także z punktem 6, w którym doktorant stwierdza, że w trakcie progresji guza wykazano wzrost aktywacji śródbłonna aorty, objawiającej się ekspresją CD105 oraz przebudową błony środkowej i przydanki. Jakie znaczenie miałyby mieć te dwie ostatnie struktury w aktywacji śródbłonna?

Zwieńczeniem przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej jest „Dyskusja” oraz „Wnioski”. Doktorant w tych dwóch rozdziałach wykazał się dużą dojrzałością pod względem otrzymanych rezultatów. Krytycznie ocenia swoje osiągnięcia, powołując się na wyniki innych autorów prowadzących badania w podobnej tematyce. Jednakże wcześniejsze moje uwagi rzutują w pewnym sensie zarówno na dyskusję jak również na przygotowane w pracy wnioski. Kwestia dysproporcji nasilenia perfuzji guza w stosunku do ekspresji VEGF-A, rola depozytów kolagenu w progresji nowotworu, czy badania aktywacji śródbłonna, wymagają głębszej analizy, a nawet poszerzenia eksperymentu z wykorzystaniem bardziej wyrafinowanej metodyki. Także rola komórek CAF w zaplanowanych badaniach z możliwością np. uzyskania ich z guza metodą mikrodysekcji laserowej, powinna być szerzej zbadana.

We wnioskach byłbym bardziej ostrożny i tak w pierwszym raczej: „Kalcytriol i jego analogi mogą wzmacniać proprzerzutowy potencjał ...” Wnioski nr 5 i 6 w świetle

wcześniejszych moich komentarzy powinny być zweryfikowane. Wniosek nr 7 wprawdzie dotyczy przeprowadzonych eksperymentów, ale wg mojej oceny nie dotyczy tematu pracy doktorskiej.

Podsumowując, pomimo licznych uwag do przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej uważam, że stanowi ona znaczne dokonanie, które może przyczynić się do lepszego zrozumienia działania kalcytriolu oraz jego pochodnych zarówno na biologię komórek nowotworowych jak również w pewnym sensie komórek podścieliska guza. Doktorant w prezentowanej monografii wykazał się dużą dojrzałością badawczą, stosując liczne techniki w zaplanowanych eksperymentach. Nie budzi również zastrzeżeń „poruszanie” się w tematyce analizowanego zagadnienia. Aktualne i bogate piśmiennictwo zostało należycie zastosowane oraz ujęte w pracy doktorskiej.

Mając na uwadze całokształt osiągnięć doktoranta, oryginalność a także nowatorski charakter badań wysoko oceniam recenzowaną pracę, która spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. (z późniejszymi zmianami), dotyczącej nadawania stopni naukowych i tytułu naukowego oraz stopni i tytułu w zakresie sztuki. Wnioskuje zatem do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu o przeprowadzenie dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk biologicznych.

Ponadto, proszę Wysoką Radę Naukową Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu  
ZAKŁAD HISTOLOGII I EMBRIOLOGII  
kierownik  
  
prof. dr hab. Piotr Dziegiel