

Dr hab. n. med. Barbara Radecka, prof. UO^{1,2}

Opole, 01 grudnia 2021 r.

¹Klinika Onkologii, Instytut Nauk Medycznych

Uniwersytet Opolski w Opolu

²Klinika Onkologii z Odcinkiem Dziennym

Opolskie Centrum Onkologii im. Prof. Tadeusza Koszarowskiego

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Anny Nagel

Tytuł rozprawy:

**WPLYW MIKROŚRODOWISKA GUZA
NA KOMÓRKI NOWOTWOROWE RAKA PIERSI
W KONTEKŚCIE ZMIAN W OBRĘBIE RECEPTORA ESTROGENOWEGO**

Wnioskuje do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego
o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Anny Nagel.

UZASADNIENIE

Praca ma duży aspekt poznawczy, bowiem, jak słusznie konstatuje Autorka nowy typ CAFs opisany w niniejszej pracy, dla którego charakterystycznym jest wydzielanie HGF, może stać się w przyszłości celem terapii lub przyczynić się do skuteczniejszego planowania już dostępnego leczenia.

Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały już częściowo opublikowane w prestiżowym, recenzowanym czasopiśmie naukowym, a przedstawiony przez Doktorantkę dorobek naukowy jest spójny i wskazuje, że badania nad biologią raka piersi są w obszarze jej szczególnych zainteresowań. Przywołane publikacje i doniesienia konferencyjne wskazują na stałą współpracę Doktorantki z klinicystami. W opinii recenzentki jest to warte podkreślenia, sugeruje bowiem, że Doktorantka doskonale rozumie potrzebę klinicznej przydatności prowadzonych badań.

Praca jest przygotowana bardzo starannie, a jej szczególne walory podkreślono w recenzji. Temat pracy koresponduje z dorobkiem naukowym doktorantki, a całość wskazuje na dojrzałość naukową mgr Anny Nagel

Dr hab. n. med. Barbara Radecka, prof. UO

Barbara Radecka

Dr hab. n. med. Barbara Radecka, prof. UO^{1,2}

Opole, 01 grudnia 2021 r.

¹Klinika Onkologii, Instytut Nauk Medycznych
Uniwersytet Opolski w Opolu

²Klinika Onkologii z Odcinkiem Dziennym
Opolskie Centrum Onkologii im. Prof. Tadeusza Koszarowskiego

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Nagel

Tytuł rozprawy:

**WPLYW MIKROŚRODOWISKA GUZA
NA KOMÓRKI NOWOTWOROWE RAKA PIERSI
W KONTEKŚCIE ZMIAN W OBRĘBIE RECEPTORA ESTROGENOWEGO**

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet w Polsce i na świecie. Liczba nowych rozpoznań systematycznie wzrasta. Jest to wynikiem z jednej strony coraz większego znaczenia środowiskowych czynników ryzyka (wydłużenie czasu życia ogółem oraz czasu ekspozycji na estrogeny, zwiększające się odsetki kobiet bezdzietnych czy rodzących pierwsze dziecko po 35 r.ż., a także kobiet z nadwagą i otyłością), a z drugiej - poprawy wykrywalności poprzez wprowadzenie badań przesiewowych na masową skalę. Wyniki leczenia chorych na raka piersi systematycznie się poprawiają. Jest to następstwem wczesnego wykrywania oraz postępu w leczeniu, zarówno miejscowym jak i systemowym. Fundamentalną zmianą w podejściu do systemowego leczenia raka piersi w ostatnich latach było wprowadzenie do diagnostyki raka piersi podziału na podtypy biologiczne. Dzięki odkryciom w zakresie nauk podstawowych oczywistym stało się, że rak piersi jest chorobą niejednorodną i stanowi spektrum podtypów molekularnych o odrębnych cechach biologicznych. Histologiczny obraz raka piersi nie jest bowiem wystarczający do ustalenia zmian genetycznych i zdarzeń biologicznych związanych z rozwojem i progresją raka.

Ponieważ dokładne molekularne definiowanie nie jest powszechnie dostępne, w codziennej praktyce klinicznej przyjęto zastępczą klasyfikację opartą na badaniach immunohistochemicznych oraz hybrydyzacji *in situ* (ISH). Markerami wykorzystywanymi w tej klasyfikacji są: receptor estrogenowy alfa (ang. *Estrogen Receptor alpha*, ER α), receptor progesteronowy (ang. *Progesterone Receptor*, PR), receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *Human Epidermal Growth Factor 2*, HER2) lub kodujący ten receptor gen *HER2* oraz wskaźnik proliferacji Ki67 (ang. *Ki67 Proliferation Index*).

Oznaczenie ekspresji tych biomarkerów pozwala wyodrębnić cztery podtypy biologiczne raka piersi (luminalny A, luminalny B, Her2-dodatni nieluminalny oraz potrójnie ujemny) charakteryzujące się odmiennym przebiegiem klinicznym i rokowaniem oraz, co szczególnie ważne, wymagające odmiennego leczenia systemowego. Najczęściej (w ok. 70% - 80% przypadków) występuje rak z ekspresją receptora estrogenowego. Dla onkologa klinicznego informacja o podtypie raka piersi jest kluczowa dla wyboru sposobu leczenia. Jednocześnie coraz powszechniejsza jest świadomość, że dostępna obecnie klasyfikacja jest niewystarczająca. Konieczne jest definiowanie bardziej szczegółowych cech biologicznych komórek nowotworowych, aby poprawić stratyfikację chorych i zapewnić lepszy dobór leczenia. Przez wiele lat badania w tym obszarze skupiały się na komórkach nowotworowych, aczkolwiek w ostatnich latach coraz więcej badań dotyczy mikrośrodowiska guza. Ten złożony ekosystem, tworzony przez komórki o różnym pochodzeniu ma istotny wpływ na wzrost, proliferację i przeżycie komórek nowotworowych. To komórki mikrośrodowiska i wydzielane przez nie cytokiny, chemokiny czy metabolity mają wpływ na takie procesy jak hipoksja, angiogeneza, remodelowanie macierzy międzykomórkowej, a także zmiany ciśnienia śródmiąższowego, czy pH.

W tym kontekście wybór tematu prowadzonych przez Doktorantkę, Annę Nagel, wieloletnich badań zasługuje na szczególne uznanie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma układ typowy dla tego typu opracowań. Obejmuje 95 stron maszynopisu, z tradycyjnym podziałem na wstęp, cel pracy, materiał i metodykę badań, wyniki, dyskusję z podsumowaniem oraz wykaz piśmiennictwa. Zawarto również streszczenia w języku polskim i angielskim. Całość wieńczy zwięzłe przedstawienie dorobku naukowego doktorantki, z którego wynika, że badania nad biologią raka piersi są w obszarze jej szczególnych zainteresowań. Przywołane publikacje i doniesienia konferencyjne wskazują na stałą współpracę Doktorantki z klinicystami. W opinii recenzentki

Dział

jest to warte podkreślenia, sugeruje bowiem, że Doktorantka doskonale rozumie potrzebę klinicznej przydatności prowadzonych badań.

We wstępie Autorka omawia w sposób niezwykle uporządkowany kwestie epidemiologii i diagnostyki raka piersi. Przytacza obowiązujące i powszechnie stosowane klasyfikacje pozwalające ocenić zarówno zaawansowanie choroby, jak i jej biologię. Omawiając podtypy biologiczne raka piersi zwraca uwagę nie tylko na cechy komórek nowotworowych, ale także przebieg choroby i rokowanie w poszczególnych podtypach. Opisuując raka potrójnie ujemnego Doktorantka wspomina o leczeniu molekularnie ukierunkowanym i przywołując sacytuzumab gowitekan (koniugat przeciwciała anti-Trop-2 i cytostatyku z grupy inhibitorów topoizomeraz) wskazuje, iż jest to jedyna dostępna dla tej populacji chorych terapia celowana. U chorych na raka potrójnie ujemnego możliwe jest także zastosowanie innego leczenia ukierunkowanego (np. inhibitorów PARP w przypadku mutacji w genach *BRCA1/2* lub immunoterapii). Wszystkie wymienione terapie nie są jak dotąd objęte w Polsce refundacją ze środków publicznych. Być może Autorka wymieniała tylko sacytuzumab gowitekan z uwagi na jego szczególnie mechanizm działania, jednak w toku dalszego studiowania pracy recenzentka nie znalazła merytorycznego uzasadnienia. W podrozdziale poświęconym mikrośrodowisku guza Autorka słusznie podkreśla, że jest to bardzo heterogenny ekosystem, w którym identyfikuje się komórki o różnej biologii. Źródła pochodzenia poszczególnych komórek oraz poprawność markerów używanych do ich identyfikacji są przedmiotem nieustannych badań i kontrowersji. W podrozdziale dotyczącym receptora estrogenowego Doktorantka wskazuje na istnienie dwóch izoform tego receptora ($ER\alpha66$ i $ER\alpha36$) oraz w przejrzysty sposób wyjaśnia różnice w ich powstawaniu, mimo, że obie powstają na bazie tego samego genu *ESR1*. Nie pomija także kwestii problemów diagnostycznych w zakresie oceny amplifikacji lub zmiany ekspresji tego genu metodą FISH i qPCR. Zwraca uwagę na fakt, iż $ER\alpha36$ występuje zarówno w guzach ER-ujemnych jak i ER-dodatnich, a nadekspresji $ER\alpha36$ często towarzyszy spadek poziomu ekspresji $ER\alpha66$, co sugeruje, że obie izoformy mogą wzajemnie się regulować. Podkreśla także odmienności w sygnalizacji estrogenowej obu izoform oraz fakt, że $ER\alpha36$ może także stać się celem terapeutycznym.

Celem pracy badawczej była analiza ekspresji izoform kodowanych przez gen *ESR1* i odpowiedzenie na pytanie, czy podwyższona liczba kopii genu *ESR1*, obserwowana również u chorych z normalną ilością białka $ER\alpha66$, jest związana z ekspresją $ER\alpha36$. Dodatkowym celem była ocena roli $ER\alpha36$ w komórkach mikrośrodowiska, a konkretnie fibroblastach



związanych z nowotworem (ang. *Cancer Associated Fibroblasts*, CAFs). Drugi cel został zdefiniowany podczas badań ekspresji izoformy ER α 36 w komórkach raka piersi, kiedy to Doktorantka traktując skrawki tkankowe przeciwciałami skierowanymi przeciwko izoformie ER α 36 odnotowała pozytywne barwienie komórek w mikrośrodowisku. Wykorzystanie tego zjawiska jako inspiracji do dalszych poszukiwań świadczy o dużej dojrzałości naukowej oraz tak ważnej dla naukowca dociekliwości.

W rozdziale Materiał dokładnie i w przejrzysty sposób opisano wykorzystane linie komórkowe, zastosowane pożywki, odczynniki, przeciwciała, bufony i aparaturę. Pewien niedosyt budzi fakt, że nie wymieniono tutaj preparatów tkankowych guzów piersi (zarówno zamrożonych jak i zatopionych w formalinie i utrwalonych w parafinie). Dopiero w rozdziale Metody na str. 37 jest informacja, z której można wnioskować, że taki materiał był badany. W takim razie powinien być wymieniony w rozdziale Materiały.

Z wyjątkową precyzją przedstawiono wszystkie zastosowane metody badawcze zarówno dotyczące analizy genów jak i białek. Badania zmian w obrębie genu *ESR1* jak i badań fibroblastów związanych z nowotworem przeprowadzono z wykorzystaniem tkanki guza pobranej od chorych. Doktorantka uzyskała zgodę stosownych komisji bioetycznych na przeprowadzenie badań oraz świadomą zgodę chorych na wykorzystanie do badań pobranych od nich tkanek. Analiza danych klinicznych chorych, od których pozyskano materiał budzi pewien niepokój, bowiem u 20% chorych nie podano informacji o stopniu histologicznego zróżnicowania, u 29% o typie histologicznym, a u 20% o statusie HER2. Można się domyśleć, że wynika to z niedostatków dokumentacji medycznej. Należy jednak podkreślić, że w okresie, kiedy pozyskiwano tkanki wspomniane parametry były elementem standardowej oceny patomorfologicznej, a chore były leczone, jak podaje Doktorantka, w jednostkach Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, zatem informacje o tych parametrach powinny być dostępne. Doktorantka odnosi się do danych klinicznych w dalszej części pracy, stąd niekompletność tych danych powinna być w opinii recenzentki wyjaśniona.

Zwraca uwagę szczególna rzetelność Doktorantki w postaci przytoczenia nazwisk badaczy wykonujących wybrane procedury.

Analizy danych klinicznych wykonane zostały przy użyciu programów Statistica ver. 12 (StatSoft), SPSS (IBM), GraphPad Prism i testu t studenta. Zmienne kategoryczne były porównywane testem χ^2 , a zmienne ciągłe przy użyciu współczynnika korelacji rang

Dad

Spearmana i testu Manna-Whitneya. Krzywe przeżycia Kaplana-Meiera były oceniane przy użyciu testu F-Cox.

Wyniki zostały przedstawione w sposób zwięzły, z odpowiednim ich zestawieniem w postaci tabel i rycin (5 tabel, 16 rycin). Autorka wykazała, że wyniki oceny liczby kopii genu *ESR1* metodą FISH i qPCR nie korelują ze sobą, co sugeruje, że obie metody mierzą inny rodzaj aberracji w obrębie genu *ESR1*. Wskazała też na złożoność takich aberracji w kontekście zmian ekspresji klasycznej izoformy ER α 66, jak i alternatywnej izoformy ER α 36. Zwiększoną liczbą kopii genu zaobserwowano u 9,2% chorych stosując qPCR (i korelowało to z gorszym przeżyciem wolnym od choroby) oraz u 26% stosując FISH.

Wysoka liczba kopii genu *ESR1* badana metodą qPCR jest zaangażowana w powstawanie innych izoform receptora estrogenowego, między innymi ER α 36. Co więcej, analizy ekspresji izoformy ER α 36 wykazały, że ekspresja ta koreluje ze złym rokowaniem chorych na raka piersi. Pomimo tego, iż ekspresja ER α 36 nie korelowała z wielkością guza, stadium choroby, zajęciem węzłów chłonnych, czy podtypem histologicznym, wysoka ekspresja ER α 36 powiązana była z krótszym czasem przeżycia wolnego od choroby. Natomiast ekspresja izoformy ER α 66 wykazała odwrotny efekt. Analiza przeżycia w podgrupach ER α 66-pozytywnej i ER α 66-negatywnej podtrzymała istotność korelacji ukazanej dla całej grupy, wskazując na niezależność wpływu ER α 36 na przeżycie wolne od choroby od poziomu ER α 66.

Badania mikrośrodowiska guza wykazały, że fibroblasty o wysokim poziomie ER α 36 korelowały z podwyższonym poziomem Ki67 w komórkach nowotworowych, co może przekładać się na bardziej agresywny przebieg choroby i niekorzystne rokowanie. Profil ekspresji genów w guzach chorych, u których występowały CAFs o wysokim poziomie ER α 36, wskazywał na reorganizację macierzy międzykomórkowej oraz obniżoną zdolność do odpowiedzi immunologicznej.

Ciekawym elementem pracy jest analiza *in vitro*, w której wykazano, że CAFs o wysokim poziomie ER α 36 posiadają unikalny profil sekretomu, którego składniki znane są z działania pronowotworowego. Jeden z takich składników, czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth Factor*, HGF) znacząco indukował inwazyjny fenotyp komórek potrójnie ujemnego raka piersi na ścieżce sygnalizacyjnej cMet/Akt.

Zwraca uwagę pewna niezgodność liczbowa – w rozdziale Wyniki, na stronie 46 Autorka podaje, że stosując qPCR „...zwiększoną liczbą kopii genu zaobserwowano u 9,2%

Rad

(37/402) chorych...”, podczas, gdy w rozdziale Dyskusja, na stronie 69, iż „... Podwyższoną liczbę kopii genu *ESR1* badaną metodą qPCR zaobserwowano u 9,4% chorych...”. Najprawdopodobniej jest to błąd wynikający z zaokrąglenia i w opinii recenzentki nie umniejsza to rzetelności obliczeń.

Dyskusja jest poprowadzona prawidłowo. Autorka porównuje wyniki swoich badań z danymi z piśmiennictwa, zwraca uwagę na znaczenie badań obejmujących zarówno komórki nowotworowe, jak również ich mikrośrodowisko. Wnioski są sformułowane prawidłowo i niosą istotne przesłanie praktyczne. CAFs będące jedną ze składowych mikrośrodowiska guza wykazują istotną rolę w progresji choroby, dlatego dalsze badania nad nowoczesnymi lekami ukierunkowanymi molekularnie powinny je uwzględniać. Praca ma duży aspekt poznawczy, bowiem, jak słusznie konstatuje autorka nowy typ CAFs opisany w niniejszej pracy, dla którego charakterystycznym jest wydzielanie HGF, może stać się w przyszłości celem terapii lub przyczynić się do skuteczniejszego planowania już dostępnego leczenia.

Bardzo wartościowym elementem pracy jest warstwa graficzna – czytelny i niezwykle estetyczny podział tekstu oraz piękne ilustracje.

Całość pracy opatrzona jest 158 pozycjami piśmiennictwa, z których zdecydowana większość została opublikowana w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach.

Uwagi językowe i edytorskie:

1. Na stronie 15 pojawia się określenie „Ponad to” pisane rozłącznie, aczkolwiek kontekst wskazuje, iż powinno się zastosować partykułę „Ponadto”;
2. Na stronie 16 pojawia się określenie „nadmiernym spożywaniem tłuszczu”, aczkolwiek poprawnie powinno być „nadmiernym spożywaniem tłuszczów”;
3. W niektórych miejscach pojawiają się nadliczbowe odstępy pomiędzy słowami, a gdzieś tam brak jest odstępu;
4. Na stronie 21 podtyp biologiczny HER2-dodatni jest określony jako HER2-pozytywny; nominalnie oznacza to, oczywiście ten sam podtyp, jednak w opinii recenzentki nazewnictwo powinno być ujednoczone;
5. Pozycja 21 piśmiennictwa jest przywołana nieprawidłowo; jest: Jacek Jassem, M. K., a powinno być Jassem, J. & Krzakowski, M.

had

Uwagi językowe i edytorskie często odbierane są jako niepotrzebne i nadmierne, jednak pracę doktorską powinna cechować szczególna staranność. Te uwagi nie wpływają, oczywiście, na wartość merytoryczną dzieła i końcową całościową pozytywną ocenę dysertacji.

Doktorantka wykazała się umiejętnością analitycznego myślenia oraz systemowego spojrzenia na opracowywane zagadnienie i potwierdziła swoje umiejętności prowadzenia pracy naukowej. Wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Anny Nagel do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy.

Dr hab. n. med. Barbara Radecka, prof. UO

