

Kraków, 11.04.2023



UNIwersYTET  
JAGIELLOŃSKI  
COLLEGIUM  
MEDICUM

dr hab. n. med. Magdalena Ulatowska-Białas  
Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum  
Katedra Patomorfologii UJCM

Wydział Lekarski

Katedra Patomorfologii

**Recenzja rozprawy doktorskiej pt. „Związek ekspresji  
białek PD-1 i PD-L1 z wybranymi parametrami kliniczno-  
morfologicznymi w rakach jelita grubego”**

**wykonanej przez mgr Paulinę Poter**

**pod opieką promotora dr hab. n. med. Katarzyny  
Karpińskiej-Łukaszewicz.**

Recenzja wykonana na podstawie pisma Przewodniczącego Rady Naukowej  
Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w  
Szczecinie z dnia 3.03.2023 oraz nadesłanego wraz z nim egzemplarza  
rozprawy doktorskiej.

ul. Grzegórzecka 16

PL 31-531 Kraków

tel. +48(12) 421 15 64

fax +48(12) 411 97 25

[www.patomorfologia.cm-uj.krakow.pl](http://www.patomorfologia.cm-uj.krakow.pl)

Przedstawiona do oceny praca doktorska pod tytułem „Związek ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z wybranymi parametrami kliniczno-morfologicznymi w rakach jelita grubego” ma układ typowy dla rozpraw doktorskich; składa się ze wstępu, opisu celów pracy, materiałów i metod, wyników oraz dyskusji i wniosków. Tekst opatrzony jest spisem treści, podziękowaniami, listą skrótów, osobnym spisem rycin, tabeli i wykresów, bibliografią oraz streszczeniami w języku polskim i angielskim.

Zagadnienia związane z możliwością zwiększenia skuteczności leczenia chorób nowotworowych stanowią ważną część badań naukowych. Stosunkowo niedawno wprowadzona metoda immunoterapii wydaje się być przełomową metodą leczenia, przynajmniej części zaawansowanych nowotworów złośliwych. Przykładem immunoterapii jest wykorzystanie w leczeniu nowotworów monoklonalnych przeciwciał anti-PD-1 i anti-PD-L1. Białka PD-1 i jego ligandy: PD-L1 i PD-L2 zostały odkryte i opisane pod koniec lat 90tych XX wieku, a obecnie skupiają zainteresowanie wielu badaczy jako potencjalne cele spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej o typie immunoterapii. W przedstawionej rozprawie Doktorantka oceniała ekspresję białek PD-1 i PD-L1 w komórkach raka jelita grubego oraz w towarzyszących mu limfocytach. Doktorantka wyciągnęła wnioski z uzyskanych wyników oraz rozważała implikacje praktyczne, które wypływają z faktu, że obecnie mamy już dopuszczone do stosowania leki, które, działając poprzez punkt kontrolny PD-1/PD-L1 mogą wpływać modyfikująco na immunologiczne funkcje limfocytów T i dzięki temu mogą być wykorzystywane, samodzielnie albo w połączeniu z tradycyjną chemioterapią, w leczeniu zarówno raka jelita grubego jak i innych nowotworów (tzw. immunoterapia celowana).

Pracę rozpoczyna zgrabnie napisany wstęp obejmujący wiadomości ogólne dotyczące raka jelita grubego, w tym różnice związane z lewo- bądź prawostronną lokalizacją nowotworu, czynniki ryzyka dla raka jelita grubego, czynniki prognostyczne i rokownicze oraz podstawowe wiadomości dotyczące najczęstszych szlaków karcinogenezy, a także leczenia raka jelita grubego. We wstępie Autorka przedstawiła również charakterystykę białek: PD-1 i jego ligandów: białka PD-L1 i PD-L2, krótko scharakteryzowała dopuszczone do stosowania leki działające poprzez ten szlak oraz zamieściła prosty, ale bardzo sugestywny schemat przedstawiający możliwe efekty terapii celowanej z użyciem monoklonalnych przeciwciał anti-PD-1 i anti-PD-L1. Cały wstęp jest napisany jasno, zwięźle i konkretnie i stanowi właściwe wprowadzenie do dalszych części rozprawy doktorskiej.

Autorka wymieniła trzy jasno postawione cele pracy oraz opisała metodykę stosowaną przy realizacji powyższych celów. W pracy wykorzystano technikę mikromacierzy tkankowych do oceny wykonanych odczynów immunohistochemicznych. Metoda ta posiada kilka zalet: przede wszystkim pozwala obniżyć koszty przy wykonywaniu znacznej liczby odczynów immunohistochemicznych w badanych przypadkach oraz pozwala zachować te same warunki badania dla wszystkich ocenianych przypadków. To prawda, jednak metoda ta ma także swoje ujemne strony: wybierając losowo trzy niewielkie obszary (wg informacji w tekście: obszary o średnicy 0,6mm), które „wycinamy” z nowotworu, finalnie przeprowadzamy badania na bardzo niewielkim skrawku całości nowotworu. Przy odczynach tak kapryśnych, jak PD-1 i PD-L1 i często występujących jedynie w pojedynczych komórkach na terenie całego

badanego wycinka, istnieje duże prawdopodobieństwo, że ekspresja badanych białek, przynajmniej w nielicznych komórkach, mogłaby zostać stwierdzona w większej liczbie przypadków, gdyby ocenie podlegał cały materiał w bloczku parafinowym, a nie tylko trzy minimalnej średnicy „walce” wycięte z nowotworu. Czy o wyborze tej metody zdecydowały głównie aspekty finansowe, czy z jakiegoś powodu doktorantka uznała ten rodzaj badania za bardziej odpowiedni?

Kolejnym ograniczeniem pracy jest stosunkowo niewielka liczba przebadanych przypadków. Badana grupa obejmowała 98 pacjentów. Wydaje mi się, że jeśli badanie dotyczy tak częstego nowotworu, jakim jest rak jelita grubego oraz jeśli wykorzystuje się metodę mikromacierzy, która pozwala na ograniczenie kosztów wykonywanych odczynów, liczba analizowanych przypadków mogłaby być większa. Z tekstu wywnioskowałam, że badanie dotyczyło pacjentów, u których raka jelita grubego rozpoznano w roku 2017. Czy taki był zamysł Doktorantki, że badanie ma dotyczyć chorych operowanych w jednym roku kalendarzowym i stąd taka liczba przypadków?

Podstawowe parametry badanej grupy zostały ujęte w dużej, jasno skonstruowanej tabeli. Moje zastanowienie wzbudził fragment przedstawiający ocenę stopnia zróżnicowania (tzw. złośliwości histologicznej, G) raków w badanej grupie. Wydaje mi się, że w grupie 98 przypadków zdecydowanie nadreprezentowane są raki o pośrednim (G2) stopniu zróżnicowania i tym samym niedoreprezentowane są raki o wysokim (G1) stopniu zróżnicowania. Z mojego doświadczenia diagnostycznego wynika, że procent raków jelita grubego o wysokim (G1) stopniu zróżnicowania jest niższy niż od raków G2, ale różnica ilościowa pomiędzy tymi grupami nie jest aż tak ogromna – czy doktorantka sama oceniała wybrane przez siebie przypadki, czy też korzystała z oceny wykonanej przez innych patomorfologów?

Metodyka i sposób wykonania odczynów immunohistochemicznych pozwalających na wizualizację białek PD-1 i PD-L1 jest przedstawiony jasno i dokładnie. Przy wykonywaniu odczynów nie zapomniano o uwzględnieniu kontroli pozytywnej i negatywnej. Uzyskane przy wykonywaniu odczynów szkiełka były oceniane zarówno przez patomorfologa, jak i przez istniejący system komputerowy dedykowany komputerowej analizie obrazu. Schemat oceny uzyskanego odczynu oraz sposób przeliczenia rozległości i intensywności odczynu na konkretną wartość liczbową, czyli liczenie tzw. H-Score zostały jasno i poprawnie opisane. Szkoda, że w całej pracy umieszczono jedynie trzy zdjęcia preparatów histologicznych ilustrujących ekspresję ocenianych białek (dodatkowo w opisach zamieszczonych przy zdjęciach nie podano powiększenia, przy którym zdjęcie zostało zrobione).

Dobór metod statystycznych jest poprawny.

Uzyskane wyniki zostały szczegółowo opisane i przedstawione w licznych tabelach, na rycinach i wykresach. Kluczowa część wyników, czyli korelacja ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z przeżyciami pacjentów zostały rozbite na kolejne 12-miesięczne okresy, aż do całkowitych 5-letnich przeżyć, czyli obejmują 15 kolejnych wykresów. Wykresy są czytelne, jednak biorąc pod uwagę fakt, że od 2-go do 5-go roku wyniki są podobne, myślę, że bez szkody dla czytelności pracy, można było zredukować liczbę umieszczonych w tekście wykresów. Bardzo

dobrym pomysłem było zamieszczenie zwięzłego podsumowania całości uzyskanych wyników na końcu tego podrozdziału.

Dyskusja została napisana zwięźle i logicznie. Autorka prezentuje w niej, w kontekście wyników z badania własnego, także prace innych autorów, którzy badali podobne zagadnienia starając się analizować i tłumaczyć występujące rozbieżności lub podobieństwa wyników. W dyskusji przedstawionej rozprawy doktorskiej zabrakło mi próby znalezienia wyjaśnienia przyczyn tego, że ekspresja białek PD-1 i PD-L1 została stwierdzona głównie u chorych młodszych, w rakach o mniejszym stopniu histologicznej złośliwości i o niższym klinicznym stopniu zaawansowania, bez przerzutów w węzłach chłonnych – czy zatem możemy zaryzykować twierdzenie, że obecność ekspresji białek PD-1 i PD-L1 jest korzystnym czynnikiem prognostycznym?

Bibliografia liczy aż 187 pozycji – część z nich to prace najnowsze, związane z badanym zagadnieniem. Jednak znaczny procent bibliografii to prace 10-cio letnie i starsze; wydaje mi się, że nie zawsze „więcej znaczy lepiej”. Praca nie byłaby mniej warta, gdyby nieco zredukować piśmiennictwo.

W całości pracę oceniam pozytywnie i wysoko. Uzyskane wyniki są oryginalne i stanowią ważny wkład w zrozumienie stosunkowo nowego i mało jeszcze poznanego zagadnienia jakim jest znaczenie ekspresji białek PD-1 i PD-L1 w różnych typach nowotworów, szczególnie w raku jelita grubego. Przedstawiona praca i uzyskane w niej wyniki mogą mieć znaczenie przy określaniu warunków kwalifikacji chorych do danego typu immunoterapii lub terapii łączonych, tak aby maksymalnie zwiększyć jej/ich skuteczność i tak, aby maksymalnie pobudzić indywidualną odporność przeciwnowotworową danego pacjenta.

Praca spełnia ustawowe (zawarte w ustawie o stopniach i tytułach naukowych) oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim, dlatego wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego z Szczecinie o dopuszczenie pani mgr Pauliny Poter do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Magdalena Ulatowska-Białas



Kraków, 11.04.2023