

Prof. dr hab. n. med. Andrzej Mróz

Warszawa 14.05.2023

Zakład Patomorfologii

Klinika Gastroenterologii, Hepatologii I Onkologii Klinicznej

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego – Warszawa

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Pauliny Poter z Katedry i Zakładu Patomorfologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie „Związek ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z wybranymi parametrami kliniczno-morfologicznymi w rakach jelita grubego” dokonana na podstawie uchwały Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medycznej z dnia 28.02.2023 roku (DWMiS/46/2023)

Rak jelita grubego należy niewątpliwie do chorób cywilizacyjnych i stanowi istotny problem zdrowotny, społeczny i ekonomiczny. Jest trzecim co do częstości nowotworem złośliwym na świecie i drugą przyczyną zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi. Dobrze udokumentowane są różnice w zapadalności na raka jelita grubego w zależności od populacji badanych związane ze szerokością geograficzną, rasą, czynnikami ryzyka a także lokalizacją zmiany w obrębie narządu. Do głównych klinicznych czynników ryzyka rozwoju raka jelita grubego zalicza się płeć, tryb życia pacjentów (niska aktywność fizyczna, palenie tytoniu, dieta wysokokaloryczna), otyłość, współistnienie chorób zapalnych jelita oraz wiek. Prognoza zaś wyznaczana jest przede wszystkim stopniem zaawansowania guza mierzonym głębokością nacieku, obecnością przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych i przerzutów odległych, obecnością angio- i neuroinwazji, typem histologicznym i stopniem zróżnicowania histologicznego raka, jak również czynnikami związanymi ze zmianami genetycznymi (niestabilność mikrostatitarna, mutacje w genach *KRAS/NRAS/BRAF*), pączkowaniem (budding), obecnością ognisk niskoróżnicowanego raka we froncie naciekania guza (poorly differentiated clusters PDC) czy obfitością limfocytarnego nacieku zapalnego w obrębie zmiany i w linii naciekania raka. Zwłaszcza ta ostatnia cecha

nabiera coraz większego znaczenia w ocenie klinicznej i morfologicznej jako wyraz odpowiedzi immunologicznej organizmu. Odpowiedź ta jest niestety często upośledzona poprzez mechanizmy blokujące prawidłowe punkty kontrolne, efektem czego jest nieprawidłowa działalność limfocytów T zablokowaniem ich niszczącego działania na komórki raka. Do intensywnie badanego i już od lat wykorzystywanego w terapii immunologicznego punktu kontrolnego należy szlak programowanej śmierci komórki, którego funkcja związana jest z pobudzeniem receptorów PD-1 na limfocytach. Okazuje się, że komórki nowotworowe wytworzyły mechanizmy blokujące ten receptor poprzez związanie go z ligandem (PD-L1). Od kilku już lat w nowoczesnej onkologii wykorzystuje się preparaty specyficznie łączące się z receptorami PD-1 i PD-L1 co przywraca prawidłową funkcję szlaku i wzmacnia przeciwnowotworowe działanie układu odpornościowego. Terapie te znalazły zastosowanie w leczeniu czerniaka złośliwego, niedrobnokomórkowego raka płuca, raka pęcherza moczowego, raka rejonu głowy i szyi oraz raka przełyku, żołądka i trzustki. Coraz więcej danych wskazuje na możliwość ich zastosowania także w raku jelita grubego. Istnieje zatem pilna potrzeba scharakteryzowania raka jelita grubego pod względem ekspresji receptorów PD-1 i PD-L1 odpowiednio w komórkach zapalnych towarzyszących guzowi i w komórkach nowotworowych. Wiedza ta posłuży do prawidłowej rekrutacji chorych, którzy w związku z obecnością blokady szlaku programowanej śmierci komórki, mają szansę rzeczywiście skorzystać z dodatkowego leczenia immunomodulującego.

Zagadnienie to jest osią bardzo właściwie dobranego i niezmiernie aktualnego i potrzebnego tematu przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej. Mgr Paulina Poter postanowiła zbadać immunohistochemiczną ekspresję białek PD-1 i PD-L1 w rakach jelita grubego, ocenić związek tej ekspresji z wybranymi parametrami kliniczno-morfologicznymi, jak również poszukać związku ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z przeżyciem pacjentów z rakiem jelita grubego. W tym celu wybrała grupę 98 histologicznych materiałów archiwalnych od pacjentów z rakiem jelita grubego, których scharakteryzowała klinicznie pod względem wieku, płci, lokalizacji guza, stopnia zaawansowania klinicznego jak również dokonała ponownej oceny histologicznej analizując głębokość naciekania guza w ścianie jelita grubego, stopień złośliwości histologicznej guza, obecność przerzutów w okolicznych węzłach chłonnych, pączkowanie guza, obecność nacieków zapalnych w guzie i froncie naciekania guza oraz status genu *KRAS* w części z nich. Następnie Kandydatka dla każdego przypadku

wyselekcjonowała najbardziej reprezentatywny bloczek parafinowy, z którego pobrała materiał do stworzenia mikromacierzy tkankowej. Wybór tej metody w porównaniu do tradycyjnego barwienia całych wycinków uważam za trafny, gdyż dzięki temu możliwe było zmapowanie i przeprowadzenie barwienia w tych samych, wystandaryzowanych warunkach. Do barwień wykorzystano mysie przeciwciała monoklonalne anty PD-1 oraz królicze anty PD-L1, zastosowano także prawidłowo dobrane kontrole negatywne odpowiednio z ludzkiego migdałka i łożyska trzeciego trymestru ciąży. Oceny ekspresji PD-1 w limfocytach oraz PD-L1 w komórkach guza i/lub limfocytach dokonano podwójnie przez doświadczonego patomorfologa oraz z zastosowaniem algorytmów sztucznej inteligencji odczytu ekspresji cytoplazmatycznej i błonowej białek uwzględniających liczbę pozytywnych komórek i intensywność barwienia. Dane dotyczące losów pacjentów uzyskano z Centralnego Ośrodka Informatyki. Uzyskane wyniki opracowano stosując właściwe metody statystyczne, zarówno w zakresie zmiennych mierzalnych jak i korelacji pomiędzy ekspresją białek i parametrami kliniczno-morfologicznymi. Ekspresja białka PD-1 w limfocytach obecna była u 29 na 98 badanych przypadkach, u 43 chorych zaś wykazano ekspresję PD-L1 w limfocytach a u 7 w komórkach raka. Ekspresja białka PD-L1 w komórkach raka była silniejsza od ekspresji w limfocytach. Na podstawie dokonanych analiz mgr Poter wyciągnęła logiczne wnioski wykazując iż ekspresja białka PD-1 w limfocytach związana była z młodszym wiekiem pacjentów, niższym stopniem zaawansowania klinicznego, brakiem przerzutów do węzłów chłonnych, bogatym naciekiem limfocytarnym, typem dzikim genu *KRAS* oraz przeżyciem chorych w pierwszym roku od rozpoznania. Podobnie ekspresja białka PD-L1 w limfocytach częściej występowała u chorych z niższym stopniem zaawansowania klinicznego oraz brakiem przerzutów raka do węzłów chłonnych. Ekspresja białka PD-L1 w komórkach rakowych z kolei częściej występowała u kobiet oraz w wyższym stopniu zaawansowania klinicznego choroby. Otrzymane wyniki, niezmiernie istotne w mojej ocenie ze względu na ciągle tworzące się kanony leczenia immunomodulującego w raku jelita grubego, zostały omówione w rzeczowej dyskusji, w której autorka z jednej strony wykazała się szeroką wiedzą w badanej dziedzinie i swobodnym poruszaniem się w kontekście literaturowym, z drugiej zaś uczciwie wskazała na ograniczenia swojej pracy związane, między innymi, z niewielką liczbą analizowanych przypadków.

Przedstawiona mi do recenzji praca ma układ typowy i składa się ze 103 stron formatu A4 zawierających wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, 187 pozycji

piśmiennictwa oraz spis treści, streszczenia w języku polskim i angielskim, załącznik, spisu 19 tabel i 22 rycin. W wstępie autorka kompetentnie i całościowo przedstawia zagadnienia dotyczące epidemiologii, patogenezы, molekularnych mechanizmów karcinogenezy raka jelita grubego oraz charakterystykę białek PD-1 i PD-L1 wraz z rolą stosowania ich inhibitorów w immunoterapii. Oceniam tę część rozprawy bardzo wysoko za jej przejrzystość i właściwą objętość z prostym przekazem dotyczącym założeń teoretycznych pracy.

Moją wątpliwość, a właściwie niedosyt budzi brak oceny korelacji ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z niestabilnością mikrosatelitarną w badanych guzach. Uważam, że taka analiza znacznie wzbogaciłaby pracę, zwłaszcza, że w algorytmach terapeutycznych wielu nowotworów to właśnie niestabilność mikrosatelitarna jest pierwszym warunkiem do rozważania zastosowania immunoterapii. Być może za rezygnacją z takiej oceny, przy raczej nieograniczonej dostępności materiału, stały jakieś inne przesłanki, które chętnie bym poznał. Ponadto prosiłbym o doprecyzowanie podstawy wyboru punktu odcięcia 30% nacieku limfocytarnego w podziale na grupy, sposób oceny tej cechy bowiem może mieć fundamentalne znacznie praktyczne w codziennej praktyce, a korelacja między ekspresją PD-1 a gęstością nacieków jest według autorki wyraźna. Z punktu widzenia edytorskiego mam jedynie uwagi związane z niewskazaniem przenoszenia tabel pomiędzy stronami oraz brakiem zastosowania kursywy w nazwach genów, co wobec całości przejrzystej dysertacji jest jedynie drobnostką.

Powyższe uwagi w żadnym razie nie umniejszają wysokiej oceny pracy mgr Poter. Przedstawione badanie to dobrze zaprojektowane, prawidłowo wykonane doświadczenie, a jego wyniki stanowią ważny głos w dyskusji nad prawidłową diagnozą i nowoczesnym, personalizowanym leczeniem raka jelita grubego. Należy podkreślić i docenić kompetencje Doktorantki, doskonały warsztat pracy i szerokie, profesjonalne spojrzenie na prezentowane zagadnienie. Z przyjemnością zatem stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa "Związek ekspresji białek PD-1 i PD-L1 z wybranymi parametrami kliniczno-morfologicznymi w rakach jelita grubego" spełnia kryteria ustawowe stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie o dopuszczenie mgr Pauliny Poter do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. dr hab. n. med. Andrzej Mróz  
specjalista patomorfologii  
NPWZ 4713818