

## RECENZJA ROZPRAWY NA STOPIEN DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

**Lekarza Barbary Bikowskiej -Opalach**

**„Analiza ekspresji beta-kateniny i LLT1 w szpiczaku plazmocytowym”**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Bogna Ziarkiewicz – Wróblewska

Celem pracy było określenie ekspresji beta-kateniny i LLT1 metodą immunohistochemiczną w archiwalnym materiale z trepanobiopsji szpiku kostnego chorych ze szpiczakiem plazmocytowym i w podgrupach kontrolnych pobranych w Klinice Chorób Wewnętrznych, Hematologii i Onkologii WUM, a ocenianych w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii WUM w latach 2014 -2015.

W dalszej kolejności analiza ekspresji beta-kateniny i LLT1 w zależności od wybranych parametrów klinicznych, wyników badań laboratoryjnych i radiologicznych, badań histopatologicznych, cytologicznych i cytometrycznych oraz cytogenetycznych szpiku kostnego.

Wreszcie ocena przydatności ekspresji beta-kateniny i LLT1 jako czynników rokowniczych w powiązaniu z różnymi parametrami klinicznymi oraz uzyskiwanymi wynikami leczenia.

Temat pracy jest dobrze dobrany, gdyż dotyczy próby poszerzenia możliwości diagnostycznych i rokowniczych w jednej z najczęściej występujących grup nowotworów hematologicznych jakim jest szpiczak plazmocytowy, którego obraz kliniczny jest zróżnicowany, a leczenie coraz bardziej uzależnione od uznanych czynników rokowniczych.

W 23 stronicowym wstępie autorka rozprawy omawia aktualną definicję szpiczaka plazmocytozowego, postaci chorobowe z obecnością białka monoklonalnego często wyprzedzające pełnoobjawowego szpiczaka (np. MGUS) lub mniej typowe jak postać bezobjawowa (SM) czy białaczka plazmocytozowa. Przedstawia aktualne dane epidemiologiczne, etiopatogenezę z szczególnym uwzględnieniem zmian genetycznych oraz czynników obejmujących między innymi modyfikacje epigenetyczne czy wpływ mikrosrodowiska szpiku kostnego. ( str30-31). W dalszej kolejności autorka przedstawia charakterystykę kliniczną szpiczaka plazmocytozowego, obowiązujące kryteria rozpoznania tzn. zmodyfikowane kryteria uszkodzenia narządowego – tzn SLiM i CRAB, kryteria rokownicze ogólne, biochemiczne immunologiczne i patomorfologiczne, w czytelnym zestawieniu tabelarycznym.. Autorka omawia też aktualne metody leczenia szpiczaka plazmocytozowego i kryteria oceny wyników leczenia wykazując dobrą znajomość problemów klinicznych.

W części poświęconej badaniom przez nią białkom B-kateninie i LLT1- lektyno-podobnym transkrypcje1 szczegółowo omawia ich rolę w procesach fizjologicznych i nowotworowych.

*Szczególnie interesujące jest, że beta-katenina będąc jednym z elementów szlaku sygnałowego Wnt bierze udział w procesie transkrypcji genów. Jednymi z białek, których transkrypcja jest zależna od szlaku Wnt i beta-kateniny są c-MYC i cyklina D1. Ze względu na dużą ilość białka*

*monoklonalnego w szpiczaku plazmocytowym mechanizm proteasomalnej degradacji jest niewystarczający i B-atenina gromadzi się w agrosomach.*

*Wykazano już że nadmierna aktywacja szlaku Wnt wiąże się z rozwojem wielu nowotworów, także szpiczaka plazmocytoowego. Jednak w szpiczaku nie stwierdzono mutacji w kluczowych elementach szlaku Wnt, więc akumulacja beta-ateniny w proteasomach jest wynikiem zaburzeń w procesach potranslacyjnych.*

*LLT1- na podstawie dotychczasowych doniesień literaturowych podkreślana jest istotna rola tego białka w hamowaniu funkcji komórek NK za pośrednictwem receptora CD161 oraz hamowanie osteoklastogenezy. Ekspresje LLT1 wykazano już m.in. w chłoniakach B-komórkowych, natomiast w dotychczasowych publikacjach nie ma zgodności co do jej ekspresji w szpiczaku plazmocytowym, choć potencjalnie białko to mogłoby odgrywać rolę w powstawaniu i progresji szpiczaka oraz rozwoju choroby kostnej.*

Na podstawie przedstawionych przez doktorantkę przesłanek oraz braku w dotychczasowych doniesieniach jednoznacznych wyników badań dotyczących znaczenia ekspresji B-ateniny i LLT1 w szpiczaku plazmocytowym, podjęcie badań dotyczących tego tematu było uzasadnione. Natomiast brakuje jasnej informacji czy ocena ekspresji wybranych białek dotyczyła już wykonanych wcześniej badań histopatologicznych czy doktorantka przeprowadzała sama dodatkowe badania w archiwalnym materiale histopatologicznym.

Materiał badany stanowiły 93 trepanobiopsje od 80 chorych w latach 2014-2015, w tym 42 dotyczyły chorych z nowo rozpoznany szpiczakiem, a 38 chorych po co najmniej jednej linii leczenia. Autorka nie określa przy tym stanu aktywności choroby po leczeniu, co utrudnia ocenę jednorodności badanego materiału, w kontekście znaczenia badanych czynników rokowniczych. Dobrano 3 grupy kontrolne: pierwsza - trepanobiopsje pobrane od 28 pacjentów z podejrzeniem innych schorzeń (brak jednoznacznego stwierdzenia o potwierdzeniu prawidłowego obrazu tych szpików), druga - 4 biopsje z ognisk poza szpikowych pacjentów ze szpiczakiem, a trzecia - 5 biopsji z ognisk poza szpikowych nienowotworowych nacieków plazmocytowych.

Ocena histopatologiczna była oparta o badanie ekspresji klasycznych markerów dla prawidłowych i nowotworowych plazmocytoów, a ekspresje beta-ateniny i LLT1 będące przedmiotem badania pracy doktorskiej oceniano metoda jakościową i półilościową w zmodyfikowanej skali IRS co szczegółowo zostało wyjaśnione przez doktorantkę. Ponadto ocenie poddano szereg danych klinicznych i wyników badań laboratoryjnych i obrazowych, a analizy statystyczne zostały przeprowadzone odpowiednio dobranymi testami.

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono na 37 stronach w 103 stronicowej rozprawie (bez piśmiennictwa), co świadczy o dużej pracy włożonej przez doktorantkę w szczególowe opracowanie retrospektywnie zebranych danych. Doktorantka kolejno przedstawia w przejrzysty sposób w zestawieniach tabelarycznych lub rycinach szczegółowe dane kliniczne z uwzględnieniem sposobów, efektów i powikłań leczenia, a następnie wyniki badań laboratoryjnych i radiologicznych.

Graficznie przedstawia stopień zajęcia szpiku, charakterystykę morfologiczną, procentowy rozkład plazmocytołów o określonych cechach immunofenotypowych w ocenie immunohistochemicznej i cytometrycznej. Załączono również obrazy mikroskopowe.

Doktorantka wykazała, że we wszystkich badanych trepanobiopsjach chorych ze szpiczakiem plazmocytowym stwierdzono wysoką ekspresję beta-kateniny w nowotworowych plazmocytołach (rzędu 98%), głównie w formie cytoplazmatycznych agregatów położonych wokół jądra komórkowego. Odsetek dodatnich plazmocytołów i intensywność odczynu były zróżnicowane ze średnią ekspresją beta-kateniny 6,33 wg skali IRS.

W grupie kontrolnej z „normokomórkowymi” szpiczaki również wykazano w części prawidłowych plazmocytołów ekspresję beta-kateniny o podobnej lokalizacji agregatów i zróżnicowanej intensywności jak w nowotworowych plazmocytołach. Niestety nie porównano tych grup z uwzględnieniem skali IRS. Natomiast wykazano w 5 zbadanych naciekach plazmocytołowych poza szpikowych, że ekspresja beta-kateniny określona wg skali IRS była niższa niż w szpiku, co warto byłoby potwierdzić na większym materiale. We wszystkich 6 badanych naciekach odczynowych plazmocytołów doktorantka wykazała ekspresję beta-kateniny o podobnym charakterze i zróżnicowanej intensywności jak w plazmocytołach nowotworowych.

Ekspresja drugiego białka - LLT1 badanego przez doktorantkę występowała podobnie jak beta-katenina w większości nowotworowych plazmocytołów, ale w rozlanej formie cytoplazmatycznej i podobnie jak beta-katenina w różnym odsetku i o różnej intensywności, choć średnia ekspresja LLT1 wg skali IRS była niższa niż beta-kateniny.

W grupie kontrolnej z „normokomórkowymi szpiczaki” doktorantce nie udało się ocenić ekspresji LLT1, a w przypadku plazmocytołowych nowotworowych nacieków poza szpikowych ekspresja LLT1 wg skali IRS była podobna jak w szpiku. Natomiast w odczynowych naciekach plazmocytołowych ekspresja LLT1 była wyższa i częściowo o innym charakterze niż w nowotworowych. Zbyt mała liczba zbadanych przypadków z odczynowymi plazmocytołami i poza szpikowymi naciekami plazmocytołowymi nie pozwala na wyciągnięcie wiążących wniosków.

Analiza ekspresji beta-kateniny w zależności od wielu wybranych czynników klinicznych nie pozwoliła na ustalenie statystycznie istotnych znamienności w zakresie dotyczącym danych demograficznych oraz w rozbudowanych analizach korelacji między ekspresją beta-kateniny a wynikami badan laboratoryjnych. Nie wykazano też znamiennych statystycznie zależności między rodzajem stosowanego leczenia a czasem przeżycia całkowitego oraz czasem wolnym od progresji, co wynika najpewniej z niejednorodności materiału klinicznego i zróżnicowanego sposobu leczenia. Doktorantka obserwowała jedynie pewne tendencje w tych zależnościach. Wykazano jedynie statystycznie znamienne niższą ekspresję beta-kateniny w nielicznych przypadkach szpiczaka o morfologii plazmoblastycznej oraz korelacje z ekspresją CD56.

Podobnie nieznamienne wyniki uzyskano w analizach ekspresji LLT1, za wyjątkiem znamiennej wyższej ekspresji LLT1 u chorych z niewydolnością nerek, co nie jest wystarczająco

istotne rokowniczo. Natomiast nieobecność istotnych statystycznie korelacji między ekspresją LLT1 a nasileniem zmian kostnych wydaje się interesująca w kontekście roli LLT1 w osteogenezie.

W dyskusji doktorantka rzeczowo odniosła się do wyników swoich badań w porównaniu do danych literaturowych dotyczących ekspresji beta-kateniny w szpiczaku plazmocytowym. Spośród wielu aspektów porównawczych wyników badań doktorantka zwraca uwagę na fakt, że dość szeroko opisywana w literaturze ekspresja beta-kateniny w szpiczaku dotyczy jej jako elementu aktywacji szlaku Wnt i wiele prac wskazuje na jądrową aktywację beta-kateniny w komórkach szpiczaka czego nie potwierdzono w przedstawianej pracy. Doktorantka słusznie zwraca uwagę na różnice dotyczące badanego materiału, bo większość doniesień dotyczyła badań na liniach komórkowych *in vitro*, co nie uwzględnia bardzo ważnego dla rozwoju nowotworowych plazmocytów mikrośrodowiska szpiku. Ponadto w omawianej pracy stosowano w badaniach inne odczynniki, i co ważne, przeciwciała dopuszczone do badań diagnostycznych u ludzi. Autorka nie potwierdziła też sugerowanej przez część autorów wartości beta-kateniny w możliwości różnicowania plazmocytów nowotworowych od prawidłowych. Podobne zależności i możliwości różnicowe dotyczyły w badanym materiale ekspresji LLT1.

Nie stwierdzono też jednoznacznego związku ekspresji LLT1 z nasileniem się zmian kostnych, który autorka oceniała w badanym materiale trepanobiopcyjnym. W literaturze nie było danych dotyczących tego problemu w klasycznych postaciach szpiczaka plazmocytoowego, udowodniono jedynie związek zwiększonej aktywności LLT1 ze zmianami osteosklerotycznymi w przypadku zespołu POEMS.

W 4 rozbudowanych wnioskach doktorantka w sposób obiektywny zawarła podsumowanie swoich badań. We wniosku dotyczącym znaczenia ekspresji beta-kateniny i LLT1 w prognozowaniu przebiegu klinicznego i zależności od stosowanego leczenia słusznie stwierdziła, że na podstawie przeprowadzonych badań można mówić jedynie o potencjale prognostycznym badanych białek. Wykazanie istotnych statystycznie związków i zalecenia badania ekspresji tych białek jako kolejnych czynników prognostycznych wymagałoby przeprowadzenia badań prospektywnych na jednorodnym materiale i oznaczaniu ekspresji beta-kateniny i LLT1 w ściśle określonych punktach czasowych, przy jednorodnych schematach leczniczych z uwzględnieniem jednorodnej oceny jakości remisji choroby.

Cała praca jest b. starannie opracowana i napisana. Przedstawiono ją w formie druku zwartego liczącego 116 stron, podzielonego na rozdziały zgodnie z zasadami stosowanymi dla tego typu rozpraw. Piśmiennictwo obejmuje 103 pozycje, a wyniki są przedstawione w 20 tabelach, 41 rycinach i 11 fotografiach. Zostały one przygotowane bardzo starannie i wymagały dużego nakładu pracy.

Podsumowując uważam, że przedstawiona rozprawa jest analizą badań immunohistochemicznych w trepanobiopsjach szpiku ocenianych w jednym zakładzie patomorfologii u pacjentów diagnozowanych i leczonych wg ustalonych zasad. Taka analiza ma wartość poznawczą, co może być wykorzystane w dalszych badaniach prospektywnych celem

optymalizacji zastosowania nowych wskaźników diagnostycznych i prognostycznych w szpiczaku plazmocytowym.

Uważam, że praca lekarz Barbary Bikowskiej-Opalach potwierdza jej bardzo dobre przygotowanie do badań laboratoryjno-klinicznych, a przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki ( Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust.1 z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U.z 2018r.poz 1669 z późn.zm.)

Dlatego przedstawiam Wysokiej Radzie wniosek o dopuszczenie Jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Beata Stella-Hołowiecka

