

Łódź, 19.02.2020r.

Ocena rozprawy doktorskiej lekarz medycyny Zuzanny Gronkiewicz pt. „Ocena występowania receptorów somatostatynowych w naczyniakowłókniaku młodzieńczym”

Naczyniakowłókniak młodzieńczy to bardzo rzadko występujący, złośliwy klinicznie, choć łagodny histologicznie guz występujący w nozdrzach tylnych i nosowej części gardła o niejasnej dotychczas etiopatogenezie. Predylekcja do płci, wieku, tendencja do inwolucji po okresie pokwitania, choć rzadko całkowitej, trudny do prognozowania i często zagrażający zdrowiu i życiu pacjenta przebieg klinicznym - to tylko niektóre cechy tego nowotworu wskazujące na jego odrębność od innych patologii rozrostowych regionu głowy i szyi. Poszukiwanie nowych metod diagnostycznych i leczniczych u pacjentów z naczyniakowłókniakiem młodzieńczym stanowi wyzwanie dla współczesnej medycyny i w tym kierunku idą zamierzenia lek. med. Zuzanny Gronkiewicz, która podjęła próbę wykazania, czy w tych nowotworach występuje ekspresja receptorów somatostatynowych oraz czy istnieje możliwość ich ewentualnego topograficznego i terapeutycznego zastosowania. Zapotrzebowanie współczesnej medycyny na rozszerzenie wiedzy w tym zakresie z uwagi na niejasny i nie w pełni wyjaśniony jej charakter, wybrany przez Doktorantkę temat pracy uważam za celowy i w pełni uzasadniony.

Praca doktorska została przygotowana przez Doktorantkę dzięki zapewnieniu bardzo dobrego zaplecza klinicznego, diagnostycznego i naukowo-badawczego. Praca lek. med. Zuzanny Gronkiewicz ma łączną objętość 127 stron tekstu i zawiera 27 rycin, 27 tabel oraz 212 pozycji piśmiennictwa w większości anglojęzycznego. Posiada ona typowy układ dla rozpraw doktorskich, zawiera siedem uporządkowanych rozdziałów z licznymi podrozdziałami porządkującymi zawarte dane.

Doktorantka w 40-stronicowym wstępie przedstawiła w sposób bardzo szczegółowy i wyczerpujący najbardziej aktualny stan wiedzy z zakresu epidemiologii, etiopatogenezy i postępowania diagnostyczno-terapeutycznego u pacjentów z naczyniakowłóknikiem młodzieńczym. Autorka w ciekawy i dokładny sposób przedstawiła teorie powstawania tego nowotworu, dawne i najnowsze klasyfikacje, aspekty kliniczne obejmujące objawy, diagnostykę i leczenie naczyniakowłóknika młodzieńczego. Doktorantka zwróciła uwagę na problemy, które wynikają w wybranych przypadkach z niedoskonałości powyższych metod leczniczych z zastosowaniem postępowania chirurgicznego, radioterapii oraz chemioterapii, wskazując jednocześnie na konieczność poszukiwania nowych, zwłaszcza w aspekcie postępowania w przypadkach guza resztkowego czy wznowy.

W dalszej części wstępu Doktorantka opisała hormon somatostatynę i jej receptory ze szczególnym uwzględnieniem ich roli antyproliferacyjnej, zwłaszcza we wczesnych etapach angiogenezy, oraz proapoptotycznej w procesach zapalnych i nowotworowych. Autorka opisała kliniczne zastosowanie syntetycznych analogów somatostatyny jak oktreotydu i lanreotydu, również w połączeniu z radionuklidami. Doktorantka potwierdziła tym samym swoją szeroką wiedzę z zakresu tych zagadnień. Należy podkreślić, że obydwie części wstępu dotyczące zarówno naczyniakowłóknika młodzieńczego jak i roli somatostatyny i jej analogów w diagnostyce oraz leczeniu chorób zapalnych i nowotworowych mogłyby stanowić odrębne prace poglądowe.

Podsumowując ocenę tej części pracy stwierdzam, że we wstępie Doktorantka czytelnie i wyczerpująco przedstawiła współczesne poglądy poświęcone problemowi naczyniakowłóknika młodzieńczego. Autorka wykazała się znajomością powyższych zagadnień popierając je licznymi cytowaniami, co świadczy o Jej dobrej orientacji w opracowywanym temacie. Rozdział ten kończy hipoteza badawcza o obecnej ekspresji receptorów somatostatynowych w badanym nowotworze a tym samym możliwości zastosowania celowanego leczenia preparatem stanowiącym połączenie oktreotydu z

chelatorem DOTA, wykazującym duże powinowactwo do receptora SSTR2. Hipoteza badawcza jednocześnie wskazała na celowość podjęcia tych badań u pacjentów z naczyniakowłóknikiem młodzieńczym, zwłaszcza w przypadkach wymagających pozastandardowego postępowania diagnostycznego i leczniczego.

W dalszej części Autorka jasno precyzuje cele swoich badań, zestawiając je w pięciu czytelnych punktach, które są konsekwentnie realizowane w dalszej części badań. Obejmują one:

- 1) ocenę występowania receptorów somatostatynowych w tkankach naczyniakowłóknika młodzieńczego za pomocą metod immunohistochemicznych,
- 2) ocenę rozkładu receptorów somatostatynowych w tkankach guza oraz ich cytolokalizacji,
- 3) ocenę występowania receptorów somatostatynowych u chorych z naczyniakowłóknikiem młodzieńczym za pomocą scyntygrafii z zastosowaniem ^{99m}Tc-oktreotydu i badania ⁶⁸Ga-DOTATATE PET/CT,
- 4) ocenę przydatności badań obrazowych z zastosowaniem analogów somatostatyny znakowanych radioizotopem (scyntygrafii z zastosowaniem ^{99m}Tc-oktreotydu i badania ⁶⁸Ga-DOTATATE PET/CT) w diagnostyce naczyniakowłóknika młodzieńczego,
- 5) ewaluację uzyskanych wyników pod kątem możliwości wdrożenia leczenia naczyniakowłóknika młodzieńczego za pomocą terapii celowanej z zastosowaniem analogów somatostatyny znakowanych radionuklidem (PRRT, ang. Peptide Receptor Radionuclide Therapy).

Uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym nr 111/2009; 146/2012, AKBE/28/13 na przeprowadzenie powyższych badań.

Doktorantka we właściwy sposób zaplanowała badania, które poza oceną kliniczną, uzyskaniem świadomej zgody chorego na udział w badaniu obejmowało: w pierwszej części badanie reakcji immunohistochemicznej (IHC) wobec SSTR 1-5 na materiale tkankowym pobranym od 25 pacjentów poddanych leczeniu operacyjnemu naczyniakowłóknika młodzieńczego w latach 2002-2013 leczonych w Klinice Otorinolaryngologii Wydziału Lekarsko-Dentystycznego (WLD), Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (WUM) w Szpitalu Czerniakowskim w latach 2003-2013, u których zabezpieczono materiał tkankowy, w tym u 4 pacjentów pochodził on z operacji pierwotnej i reoperacji guza resztkowego lub wznowy. We właściwy sposób dobrano grupę kontrolną, którą stanowili pacjenci leczeni w

tutejszej Klinice w latach 2007-2014 z powodu zaburzeń oddychania przez nos. Zabezpieczono w tej grupie materiał tkankowy małżowin nosowych dolnych pobrany od 32 pacjentów. Kontrolą dodatnią dla oceny reakcji immunohistochemicznej był materiał z guzów neuroendokrynych z przewodu pokarmowego (GEP-NEN, ang. gastro-entero-pancreatic neuroendocrine neoplasms), w których receptory SSTR wykazują wysoką ekspresję.

Należy podkreślić, że do oceny wyników reakcji IHC Doktorantka zastosowała skalę immunoreaktywności wg Remmele i Stegnera, która poprzez porównanie wartości wskaźnika IRS (IRS, ang. Immunoreactive Score) stanowiącego połączenie wyniku intensywności barwienia IS (IS, ang. Intesity of staining) oraz procentu wybarwionych komórek P (P, ang. percentage) umożliwia wiarygodną i powtarzalną metodę oceny nasilenia ekspresji wybranych białek.

W drugiej części poddano analizie badania obrazowe wykonane z zastosowaniem analogów somatostatyny znakowanych radionuklidami. U 3 chorych z podejrzeniem naczyniakowłókniaka młodzieńczego wykonano scyntygrafię z ^{99m}Tc -octreotydem oceniając ekspresję receptorów SSTR z zastosowaniem skali wizualnej i wskaźnika „tumor to normal tissue ratio”. Grupę kontrolną w badaniu scyntygraficznym stanowili pacjenci przed planowanym leczeniem głejaka mózgu z zastosowaniem celowanej terapii z zastosowaniem analogów somatostatyny znakowanych radionuklidem (PRRT).

U kolejnych 6 pacjentów wykonano badanie PET/CT z zastosowaniem pierwiastka emitującego pozytony (^{68}Ga) w połączeniu z peptydami DOTA (radionuklid ^{68}Ga DOTATATE) celem oceny gęstości ekspresji SSTR2 w guzie (4 pacjentów przed operacją oraz kolejnych dwóch przed i po zabiegu celem kontroli radykalności leczenia) z zastosowaniem skali wizualnej do oceny jakościowej oraz półilościowo przez pomiar wartości SUV max.

Szczegółowo opisano metody statystyczne zastosowane w rozprawie.

Opisując wyniki badań Autorka stwierdziła znamienne wyższą ekspresję białek SSTR1 i SSTR2 mierzoną wskaźnikiem immunoreaktywności w komórkach naczyniakowłókniaka młodzieńczego w porównaniu do ekspresji w komórkach błony śluzowej małżowiny nosowej dolnej w grupie kontrolnej. Nie potwierdziła powyższej zależności w odniesieniu do poziomu obecnej ekspresji białka SSTR3 w obydwu grupach, w których wskaźnik IRS nie różnił się znamienne. W odniesieniu do receptora SST5 – ekspresja była wyższa w grupie kontrolnej na poziomie istotności $p=0,001$. Ekspresja białka SST4 była znikoma w obydwu badanych grupach i zgodnie z klasami IRS wynik uznano jako brak reakcji. U chorych z naczyniakowłókniakiem

młodzieńczym wykazano ekspresję receptorów somatostatynowych w komórkach śródbłonka naczyń, ponadto w komórkach zapalnych naciekających guz oraz w macierzy pozakomórkowej. Wykazano wyższą ekspresję białek w porównaniu do grupy kontrolnej a dotyczyło to głównie białka SSTR1.

Z uwagi na wykazanie we wszystkich przypadkach głównie lokalizacji cytoplazmatycznej badanych receptorów somatostatynowych w komórkach naczyńiakowłókniaka uważam, że zdjęcia wykonane pod powiększeniem 400-krotnym znacznie lepiej by to zobrazowały w porównaniu do powiększenia 100 i 200-krotnego. Należy to podkreślić tym bardziej, że zamieszczone w pracy ryciny są wykonane bardzo starannie z właściwym wyborem obrazowanych fragmentów nowotworu, w komórkach którego obserwuje się reakcje IHC z badanymi białkami a sama ocena nasilenia reakcji i obliczanie procentu komórek z dodatnią reakcją IHC odbywały się pod dużym powiększeniem (400x) to umożliwiającym. Uważam, że dodanie do istniejących rycin, obrazów z ekspresją wewnątrzkomórkową, widoczną dopiero pod dużym powiększeniem, byłoby cennym uzupełnieniem pracy i przyszłych publikacji, zwłaszcza z punktu widzenia patologa.

W dalszej części pracy w badaniu scyntygraficznym z podaniem analogu somatostatyny znakowanego radionuklidem wykonanym u trzech pacjentów Doktorantka wykazała akumulację znacznika w obrębie naczyńiakowłókniaka w porównaniu do zdrowych okolicznych tkanek, która odpowiadała lokalizacji w badaniu rezonansem magnetycznym. Potwierdziło to nadekspresję receptorów somatostatynowych w każdym badanym przypadku. Autorka podała wartości wskaźników reakcji IHC w badanej grupie, nie zaopatrzyła jednak tego żadnym komentarzem dotyczących wielkości ekspresji w zależności od typu badanego receptora.

W badaniu PET/CT z zastosowaniem ⁶⁸Ga-DOTATATE wykonanym u 6 pacjentów Doktorantka stwierdziła mierny wzrost i niejednorodny rozkład akumulacji markera w obrębie nowotworu. Nie stwierdzono istotnych różnic między wartościami SUV w tkance patologicznej w porównaniu do fizjologicznego wychwytu przez zdrowe narządy o funkcji krytycznej dla zdrowia i życia. Nie wskazało to na wartość zastosowania terapii celowanej z użyciem analogów somatostatyny znakowanych radionuklidem u pacjentów z naczyńiakowłókniakiem młodzieńczym. W badaniach IHC u tych chorych we wszystkich przypadkach wykazano ekspresję SSTR2, w drugiej kolejności SSTR1. Podsumowując część pracy dotyczącą badań IHC należy podkreślić, że Autorka wykazała ekspresję SSTR 1-5, poza SSTR4 zarówno w materiale

tkankowym, jak i w badaniach obrazowych z zastosowaniem analogów somatostatyny znakowanych radionuklidami. Stwierdziła również ich wewnątrzkomórkową lokalizację zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej.

Podsumowując tą część pracy stwierdzam, że Doktorantka wzorowo przedstawiła wyniki, szczegółowo je opisując, unikając powtórzeń danych z tabeli w tekście.

W rozdziale dotyczącym omówienia wyników Doktorantka szczegółowo przedyskutowała je z wynikami innych autorów w dostępnej literaturze. Podział dyskusji na podrozdziały również ułatwia podsumowywanie kolejnych zagadnień będących przedmiotem dysertacji. Autorka umiejętnie porównuje wyniki własne do uzyskanych przez innych autorów. Wykazuje się dużą wiedzą, logicznie próbuje interpretować uzyskane wyniki, odbiegające czasami od wyników przedstawianych przez innych autorów. Należy podkreślić, że liczba publikacji obejmująca poruszane zagadnienie jest bardzo nieliczna. Podkreśla to pionierski niemal charakter pracy. W dyskusji, jak i w pozostałych częściach pracy Autorka wykorzystuje i cytuje 212 pozycji piśmiennictwa, przeważnie anglojęzycznego.

Całość pracy kończy się pięcioma wnioskami, znajdującymi swoje uzasadnienie w uzyskanych wynikach. Wnioski, stanowiące podsumowanie przeprowadzonych badań sformułowane są w sposób wyważony i podsumowujący podjęte zagadnienia i odpowiadające wszystkim celom. Powyższe świadczy o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Na podstawie wyników Doktorantka sformułowała następujące wnioski:

1. W przeprowadzonym badaniu za pomocą metod immunohistochemicznych wykazano ekspresję receptorów somatostatynowych w naczyniakowłókniaku młodzieńczym, uzyskując:
 - ekspresję SSTR1 i SSTR2 znamienne statystycznie wyższą w stosunku do grupy kontrolnej,
 - ekspresję SSTR3 nie wykazującą różnic statystycznych w porównaniu z grupą kontrolną,
 - brak ekspresji SSTR4,
 - ekspresję SSTR5 statystycznie niższą niż w grupie kontrolnej.
2. Dokonując oceny lokalizacji komórkowej każdego z typów SSTR, stwierdzono obecność wszystkich typów w cytoplazmie komórek zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej.

3. Przy użyciu badań obrazowych: scyntygrafii z ^{99m}Tc -oktreotydem i badania PET/CT z ^{68}Ga -DOTATATE wykazano *in vivo* obecność receptorów somatostatynowych u chorych z naczyniakowłóknikiem młodzieńczym.
4. Na podstawie wyników niniejszej pracy stwierdza się brak wyższości receptorowych badań scyntygraficznych i PET/CT w diagnostyce NwM nad ogólnie przyjętymi metodami obrazowania tej patologii.
5. Uzyskane wyniki z badania PET/CT z ^{68}Ga -DOTATATE nie uzasadniają celowości wdrożenia leczenia naczyniakowłóknika młodzieńczego za pomocą analogów somatostatyny znakowanych radioizotopem (PRRT).

W podsumowaniu Doktorantka zawarła wniosek łączący powyższe i będący tym samym przyczynkiem do dalszych badań i poszukiwań alternatywnych metod diagnozowania, leczenia i monitorowania pacjentów z tym rzadkim nowotworem.

Krytycznym wobec własnej hipotezy pracy jest wskazanie przez Doktorantkę, że obecnie dostępne metody obrazowania jak badanie rezonansem magnetycznym, tomografią komputerową z kontrastem, angiografia to nadal wartościowe techniki wystarczające do prawidłowej diagnostyki oraz monitorowania przebiegu leczenia w aspekcie guzów resztkowych i wznów. Wskazanie, że pokładane nadzieje w powstaniu nowej możliwości terapii z zastosowaniem analogów receptorów somatostatynowych znakowanych radionuklidem w diagnozowaniu i leczeniu chorych z naczyniakowłóknikiem w chwili obecnej nie wydają się być możliwe do spełnienia, stanowią bardzo ciekawą obserwację i wniosek wynikający z badań z obecnym stanem wiedzy medycznej dotyczącej tego zagadnienia. Praca tym samym stanowi przyczynek do rozwoju wiedzy w temacie biologii tego rzadkiego nowotworu. Posiada również duże walory nie tylko poznawcze ale i aplikacyjne wskazując na brak możliwości zastosowania testowanych metod u pacjentów z naczyniakowłóknikiem młodzieńczym w chwili obecnej oraz konieczność poszukiwania innych ścieżek sygnałowych związanych z reakcjami w innych genach i ich białkowych produktach z ewentualną możliwością do wykorzystania w terapii celowanej. Nasuwa się pytanie: Czy widzi Pani możliwość przydatności w diagnostyce i ewentualnym leczeniu naczyniakowłóknika metodami radioterapii celowanej z zastosowaniem innych analogów somatostatyny połączonych z radionuklidami? Czy zastosowanie pasireotydu mogłoby znaleźć swoje zastosowanie u pacjentów z naczyniakowłóknikiem młodzieńczym?

Po szczegółowym zapoznaniu się z przedłożoną rozprawą doktorską lekarz medycyny Zuzanny Gronkiewicz przedstawianą mi do recenzji z satysfakcją stwierdzam, że nie mam uwag krytycznych. Wartość merytoryczną i edytorską pracy oceniam bardzo wysoko.

Podsumowując, w oparciu o przeprowadzone badania oraz wyniki uzyskane przy zastosowaniu nowoczesnych i wiarygodnych metod, ugruntowaną wiedzę Doktorantki, jej samodzielność i swobodę poruszania się w temacie będącym przedmiotem badań, uważam, że omawiana 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 (DzU. Nr 65, poz.595 z późn.zm.) w związku z art.179 ust 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U z 2018r. poz. 1669 z późn.zm.) i na tej podstawie mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie lek. med. Zuzanny Gronkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, chciałabym podkreślić nowatorstwo pracy w zakresie samego wyboru tematyki, wzorowe przeprowadzenie badań, międzynarodowy zasięg w postaci już opublikowanej części wyników oraz walory aplikacyjne w diagnozowaniu i leczeniu chorych z naczyniakowłóknikiem młodzieńczym co skłania mnie do wnioskowania o wyróżnienie rozprawy doktorskiej lek. med. Zuzanny Gronkiewicz.



Prof.nadzw.dr hab.n.med.
WIOLETTA PIETRUSZEWSKA
specjalista otolaryngolog
specjalista alergolog
specjalista audiolog i foniatra
9951875