

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

Opole, 16 września 2020 r

¹Wydział Lekarski

Uniwersytet Opolski w Opolu

²Oddział Onkologii Klinicznej z Odcinkiem Dziennym

Opolskie Centrum Onkologii im. Prof. Tadeusza Koszarowskiego

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarza Romana Dubiańskiego

Tytuł rozprawy:

ANALIZA FUNKCJI JĄDROWEJ RECEPTORA HER2 W HER2-DODATNIM RAKU PIERSI

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem u kobiet w Polsce i na świecie. Pomimo znaczącego postępu w zakresie wczesnego wykrywania oraz leczenia tej choroby pozostaje ona nadal drugą przyczyną zgonów z powodu nowotworu u kobiet. Rozwój nauk podstawowych i badań nad biologią komórki nowotworowej wpłynął na zmianę postrzegania raka piersi jako jednorodnej choroby. Wiedza na temat heterogenności raka piersi oraz podtypów molekularnych stała się podstawą do stworzenia terapii ukierunkowanych na swoiste cele molekularne. Jednym z takich celów jest receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *human epidermal growth factor receptor 2*) - HER2. Receptor ten, jak i kodujący go jednoimienny gen *HER2* są przedmiotem intensywnych eksploracji przełomu XX i XXI wieku. HER2 jest jednym z rodziny białkowych receptorów naskórkowych czynników wzrostu i jest zaangażowany w przekazywanie komórkom sygnałów związanych z kontrolą ich wzrostu i funkcjonowania.

W około 15-20% raków piersi definiuje się jako HER2 dodatnie, a więc prezentujące nadekspresję białka receptorowego HER2 w ocenie immunohistochemicznej i/lub amplifikację genu *HER2*. Obie te cechy są związane z nadmierną proliferacją komórek, co powoduje, że raki HER2 dodatnie charakteryzują się gorszym rokowaniem niż raki HER2 ujemne. Mają agresywny przebieg i, co ważne, częściej występują u młodych kobiet.

BR

Wprowadzenie do praktyki klinicznej leków anty-HER2 znacząco odmieniło losy chorych na HER2 dodatniego raka piersi. Receptor HER2 jest obok receptorów estrogenowych i progesteronowych jedynym czynnikiem predykcyjnym odpowiedzi na leczenie ukierunkowane. Obecnie w ramach leczenia anty-HER2 wykorzystuje się przeciwciała monoklonalne, które łączą się z występującym w nadmiarze na powierzchni komórki białkiem receptorowym lub inhibitory kinazy tyrozynowej, które kompetycyjnie blokują domenę wewnątrzkomórkowej części receptora HER2 zapobiegając jej aktywacji. Oba mechanizmy prowadzą w konsekwencji do zahamowania sygnałów proliferacji komórki. Od wprowadzenia na początku XXI wieku do praktyki klinicznej pierwszego leku anty-HER2 – trastuzumabu – liczba leków ukierunkowanych na blokowanie zależnego od receptora HER2 przekazywania sygnałów proliferacyjnych systematycznie wzrasta. To ważne dla chorych na HER2 dodatniego raka piersi, bowiem u większości z nich obserwuje się pierwotną lub wtórną oporność na trastuzumab. Znamy już niektóre z mechanizmów takiej oporności, np. ekspresja w komórce nowotworowej skróconej, pozbawionej domeny zewnątrzkomórkowej – miejsca wiązania trastuzumabu – wersji receptora HER2, reaktywacja przekazywania sygnału przez szlak receptora estrogenowego, który jest w krzyżowej zależności ze szlakiem HER2, czy wreszcie aktywacja alternatywnych szlaków przekazywania sygnału, zwłaszcza szlaku PI3K/PTEN.

Poznanie mechanizmów oporności stwarza możliwość odkrycia dodatkowych terapii przełamujących taką oporność. Szlak sygnałowy zależny od receptora HER2 nadal kryje wiele tajemnic, a jego dalsze eksplorowanie pozwala mieć nadzieję, na dalszy postęp w leczeniu chorych na HER2 dodatniego raka piersi.

W tym kontekście wybór tematu pracy przez doktoranta zasługuje na szczególne uznanie.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma układ typowy dla tego typu opracowań. Obejmuje 65 stron maszynopisu, z tradycyjnym podziałem na wstęp, cel pracy, materiał i metodykę badań, wyniki, dyskusję z wnioskami oraz wykaz piśmiennictwa. Zawarto również streszczenia w języku polskim i angielskim.

We wstępie autor omawia budowę i funkcje receptora HER2 oraz jego znaczenie w raku piersi. W oddzielnym podrozdziale przedstawiono aktualny poziom wiedzy na temat białka HER2 występującego w jądrze komórkowym przytaczając obszerne piśmiennictwo. Celem pracy było poznanie jądrowej funkcji receptora HER2 oraz sprawdzenie czy zahamowanie szlaku HER2 przez trastuzumab, a także oporność na ten lek wpływa na ekspresję genów zaangażowanych w istotne procesy regulacyjne.

W rozdziale Materiały dokładnie i w przejrzysty (częściowo tabelaryczny) sposób opisano wykorzystane linie komórkowe, zastosowane odczynniki i aparaturę. Z wyjątkową precyzją przedstawiono wszystkie zastosowane metody badawcze. Hodowla linii komórkowych była wielomiesięcznym procesem i w tym kontekście budzi prawdziwy podziw wytrwałość w jej prowadzeniu lekarza klinicysty, zaangażowanego w codzienną praktykę i

BR

opiekę nad chorymi. Do obliczeń statystycznych wykorzystano program GraphPad Prism 5.0. Wyniki zostały przedstawione w sposób zwięzły, z odpowiednim ich zestawieniem w postaci tabel i rycin (6 tabel, 16 rycin). Zwraca uwagę szczególnie staranne pod względem graficznym przygotowanie rycin, co ułatwia śledzenie wyników pracy. Doktorantowi udało się potwierdzić wcześniejsze doniesienia o obecności białka receptorowego HER2 w jądrze komórkowym oraz wykazać, że traktowanie komórek wrażliwych trastuzumabem w różnych stężeniach powoduje zmiany ekspresji genów, których produkty zaangażowane są w metabolizm glukozy, witaminy A oraz lipidów. Z kolei w komórkach opornych na trastuzumab autor zaobserwował spadek aktywności kinazy aktywowanej przez AMP - głównego miernika metabolizmu w komórkach.

W dyskusji autor porównuje wyniki swoich badań z danymi z piśmiennictwa. Co więcej, doktorant szeroko prezentuje dane wskazujące na istotny wpływ jądrowej frakcji receptora HER2 na metabolizm komórki nowotworowej, zarówno wrażliwej, jak i odpornej na działanie trastuzumabu. W rozdziale tym autor prawidłowo ocenił wyniki swoich badań, wykazał się dobrą znajomością opisywanego tematu i umiejętnością analitycznego myślenia oraz powiązania wiedzy z zakresu nauk podstawowych z wiedzą kliniczną. Wartościowym jest nawiązanie do równolegle prowadzonych w Zakładzie Onkologii Molekularnej i Translacyjnej NIO-PIB badań nad kontrolą metabolizmu komórki w raku jasnokomórkowym nerki oraz potrójnie ujemnym raku piersi.

Całość pracy opatrzona jest 88 pozycjami piśmiennictwa, większość opublikowane w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach.

Uwagi:

1. Pewne zastrzeżenia budzą niektóre wnioski, które mają raczej charakter podsumowania wyników pracy, a nie konkluzji.
2. W rozdziale Materiały nie wymieniono bloczków parafinowych, które są przedmiotem obróbki immunohistochemicznej. Dopiero w dyskusji na str. 52 jest informacja, z której można wnioskować, że taki materiał był badany. W takim razie powinien być wymieniony w rozdziale Materiały
3. W pracy niespójnie zastosowano skrót oznaczający receptor progesteronowy, używając PgR (np. str. 15.) lub PR (np. str. 16.), przy czym w wykazie skrótów występuje tylko PgR. W piśmiennictwie stosowane są oba skróty i oba są poprawne, jednak powinno być to ujednolicone;
4. W wykazie skrótów nie uwzględniono m. in. AMP, FBS, BSA, PCR, czy qRT-PCR, Co-IP i kilku innych;
5. W pracy zamiennie użyte jest określenie gen *ERBB2* i gen *HER2*, mimo że nie wyjaśniono w sposób jednoznaczny, iż jest to tożsame. Dla osób nie związanych z medycyną może to być niezrozumiałe. Co więcej, w wykazie skrótów nie pojawia się gen *HER2*;

BR

6. Opisując definicję statusu HER2 dodatniego odwołano się do stanowiska CAP (pozycja 60. piśmiennictwa) wskazując jako jedyną metodę hybrydyzacji *in situ* FISH, podczas, gdy stanowisko to mówi o ISH (dopuszczając tym samym także CISH).
7. Uwagi edytorskie często odbierane są jako niepotrzebne i nadmierne, jednak pracę doktorską powinna cechować szczególna staranność:
 - a. brak jest spacji przed myślnikiem, niemal w całej pracy;
 - b. „myocardium”, które nie jest słowem polskim, powinno być zapisane kursywą (analogicznie jak słowo „loci”, które na stronie 37. jest napisane kursywą);
 - c. podpisy pod rycinami mają różny układ – są wyrównane do lewej (np. ryc. 4.) lub wyrównane (np. ryc. 3. czy 5.), a także wyrównane od lewej do prawej (np. ryc. 13.);
 - d. niektóre pozycje nie mają podanego DOI, mimo, że jest on dostępny. Np. pozycja 83 ma DOI: [10.1038/sj.bjc.6603535](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603535);
 - e. dysertacja napisana jest w języku polskim, zatem w cytowaniu pozycji, które mają wielu autorów powinno znaleźć się „i wsp.” a nie „et al.”, nawet jeśli są to pozycje opublikowane w języku angielskim.

Te uwagi nie wpływają, oczywiście, na wartość merytoryczną dzieła i końcową całościową pozytywną ocenę dysertacji.

W pracy tej Doktorant wykazał swoją ogólną wiedzę na temat leczenia raka piersi i potwierdził swoje umiejętności prowadzenia pracy naukowej. Wnioskuje do Wysokiej Rady Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o dopuszczenie Romana Dubiańskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

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

Barbara Radecka

Opole, 16 kwietnia 2020r.

BR