

Katedra i Klinika Hematologii, Nowotworów Krwi i Transplantacji Szpiku
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich
Wybrzeże Pasteura 4, 50-367 Wrocław
tel. (71) 784 25 76, fax. (71) 327 09 63

Wrocław, 9.12.2016

Ocena pracy doktorskiej
magister Niny Woźnialis

pt. „Chłoniak rozlany z dużych komórek B, CD5 dodatni – analiza morfologiczno-kliniczna z uwzględnieniem wybranych markerów przebudowy macierzy pozakomórkowej angiogenezy oraz czynników prognostycznych”

Chłoniaki nieziarnicze (*non-Hodgkin's lymphoma, NHL*) stanowią heterogenną grupę nowotworów wywodzących się limfocytów, ich prekursorów lub komórek powstałych z transformacji limfocytów T lub B. Stanowią 3-5 % wszystkich nowotworów złośliwych i powodują 3,4 % zgonów (dane z 2015 r). Spośród nich największą grupę (25-30 %) tworzy agresywny chłoniak rozlany z dużych limfocytów B (*diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL*). Częstość występowania DLBCL w Europie wynosi kilkanaście przypadków na 100 000 ogólnej populacji na rok. Szacuje się, że w Polsce jest rocznie około 2500 nowych zachorowań. DLBCL może wystąpić w różnym wieku, ale głównie u starszych i ponad połowa chorych ma więcej niż 65 lat.

U chorych na DLBCL w węźle chłonnym lub tkance pozawęzłowej występuje rozlany nacieki z zatarciem prawidłowej struktury. Są to komórki z linii limfocytów B, czego dowodzi obecność antygenów CD19, CD20, CD79a (panel podstawowy). Zajęcie szpiku kostnego stwierdza się u < niż 10 % chorych z DLBCL, lecz u dalszych 10-20 % obraz w szpiku i w węźle chłonnym może być rozbieżny, np. w węźle chłon-

nym agresywny DLBCL a w szpiku chłoniak z małych komórek B o niskim stopniu złośliwości. U około 10 % chorych na DLBCL występuje nadekspresja CD5 i charakteryzuje ich nieco starszy wiek, nieznacznie częstsze występowanie u kobiet, częstsze zajęcie szpiku i niekorzystny międzynarodowy indeks rokowniczy. Ekspresja CD5+ na komórkach chłoniakowych zdaniem licznych autorów ma poważne konsekwencje kliniczne, bowiem jest niezależnym biomarkerem złej prognozy, ale dla wielu wyznacznikiem odrębnej podjednostki chorobowej słabiej odpowiadającej na chemioterapię zawierającą rytuksymab z i bez przeszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych, co wpływa na skrócenie czasu wolnego od choroby i całkowitego czasu przeżyciu (Tzankov A et al.: *Multiparameter analysis of homogenously R-CHOP-treated diffuse large B cell lymphomas identifies CD5 and FOXP1 as relevant prognostic markers: report of the prospective SAKK 38/07 study. J Hematol Oncol* 2015 Jun 14;8:70. Doi: 10.1186/s13045-015-0168-7; Alinari L et al.: *De novo CD5+ diffuse large B-cell lymphoma: Adverse outcomes with and without stem cell transplantation in a large, multicenter, rituximab treated cohort. Am J Hematol* 2016; 91: 395-9). Powyższe dane wskazują, że mgr Nina Woźnialis zajęła się ważnymi i aktualnymi problemami diagnostyki DLBCL.

Przedstawiona do oceny praca doktorska obejmuje 86. stronicowy wydruk komputerowy, bogato ilustrowany 3 rycinami, 6 barwnymi fotografiami i 15 tabelami, a piśmiennictwo zawiera 260 pozycji.

We wstępie doktorantka wykazała się rozległą wiedzą dotyczącą etiopatogenezy DLBCL, trudnej i wciąż modyfikowanej klasyfikacji tej choroby oraz kompleksowej diagnostyki. Omówiła liczne czynniki ryzyka rozwoju DLBCL uwzględniając obraz histopatologiczny węzła chłonnego, immunofenotyp i ocenę immunohistochemiczną, translokacje chromosomalne, aberracje strukturalne, zaburzenia epigene-

tyczne, zaburzenia cyklu komórkowego i apoptozy jak też zmienione relacje z mikrośrodowiskiem węzłów chłonnych lub pozawęzłowych grudek chłonnych.

Mgr Nina Woźnialis sformułowała cztery ambitne cele badawcze, są to:

1. zbadanie częstości występowania chłoniaka DLBCL CD5 (+) w populacji polskiej
2. porównanie cech klinicznych chorych na DLBCL, w grupach: CD5(+) i CD5(-)
3. zbadanie poszerzonego fenotypu chłoniaka DLBCL CD5 (+) w porównaniu do DLBCL CD5 (-), z uwzględnieniem czynników prognostycznych oraz ekspresji wybranych metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej
4. ocena nasilenia angiogenezy u chorych na DLBCL CD5 (+), DLBCL CD5 (-) i w grupie pacjentów niehematologicznych.

Materiał badawczy stanowiły węzły chłonne i nieliczne wycinki narządowe pochodzące od 64 chorych na DLBCL diagnozowanych i leczonych w dwu jednostkach warszawskich, tj. w Centrum Onkologii-Instytucie im. M. Skłodowskiej-Curie oraz w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym. Grupę badaną stanowiło 36 chorych na DLBCL CD5 (+), 19 kobiet i 17 mężczyzn (średni wiek 69 lat) a grupę porównawczą 28 chorych na DLBCL CD5 (-), 14 kobiet i 14 mężczyzn (średni wiek 58,5 lat). Jako ukierunkowane grupy kontrolne dla poszczególnych badań jak przeciwciała przeciw-CD34, przeciw-HIF1 α wykorzystano narządy limfatyczne od 13 pacjentów bez schorzeń układu chłonnego bądź krwiotwórczego. Założenie porównania dwu grup DLBCL wyodrębnionych w oparciu o obecność lub nie ekspresji CD5 jest w pełni uzasadnione merytorycznie.

Cele badawcze doktorantka realizowała przy pomocy dobrze dobranych i nowoczesnych metod badawczych. Zbadała ekspresję: antygenów na komórkach chłoniakowych, uznanych czynników prognostycznych, metaloproteinaz macierzy komór-

kowej i białek związanych z ich funkcjonowaniem oraz markerów angiogenezy. Aktywność angiogenezy oceniała przy pomocy analizy półilościowej w mikroskopie świetlnym oraz analizy morfometrycznej z zastosowaniem komputerowej analizy obrazu. W celu zapewnienia czystości badanych grup dla wykluczenia agresywnej, blastoidalnej postaci chłoniaka nieziarniczego z komórek strefy płaszczka posłużyła się odpowiednimi metodami immunohistochemicznymi barwienia cyklina D1 i D3 oraz SOX11.

Pomocne do analizy metodyki badań jest przedstawienie szczegółowej charakterystyki metaloproteinaz (tabela 4) oraz przeciwciał zastosowanych w badaniach immunohistochemicznych (tabela 5), metod barwienia (tabela 6) oraz przypomnienie skali oceny reakcji immunohistochemicznej (tabela 7). Wszystkie zastosowane metody są właściwe do realizacji wybranych celów naukowych. Autorka dokładnie opisała zasady metod oraz przebieg poszczególnych badań.

Wyniki badań zostały dobrze udokumentowane i przedstawione. Na wyróżnienie zasługuje dokumentacja fotograficzna. Wyniki badań zostały rzetelnie opracowane statystycznie przy pomocy programu IBM SPSS Statistics 19 oraz kilku metod jak dokładny test Fishera dla tablic kondygnacji 2 x 2, test Manna-Whitneya, test analizy wariancji (ANOVA) dla porównania wyników badań morfometrycznych, a dla potwierdzenia uzyskanych wyników wykonano porównania wielokrotne przy pomocy testu Tukeya.

Na podstawie wszechstronnej analizy uzyskanych wyników mgr Nina Woźniak wysnuła cztery wnioski uprawnione.

1) DLBCL CD5(+) występuje w Polsce z częstością podobną jak w innych krajach europejskich, większą niż w USA i mniejszą niż w Japonii,

2) Szczegółowe porównanie cech klinicznych chorych potwierdziło występowanie w grupie DLBCL CD5 (+) cech kwalifikujących do grupy wysokiego ryzyka i powodujących szybszy postęp choroby,

3) U chorych z DLBCL CD5(+) stwierdzono istotnie większą ekspresję niekorzystnych czynników prognostycznych, tj: BCL2, FOXP1 i CD44 oraz MMP-9 oraz mniejszą ekspresję CD30 i TIMP-2 jak też cyklin D1 i D3.

4) Angiogeneza była znamienne większa u chorych na DLBCL CD5 (+) w porównaniu do tych z DLBCL CD5 (-), natomiast takiej różnicy nie stwierdzono porównując unaczynienie w DLBCL CD5 (-) z obecnym w tkankach limfatycznych chorych „niehematologicznych”.

Uważam, że doktoranta zrealizowała wszystkie zaplanowane cele rozprawy doktorskiej.

Bardzo ważną i ciekawą część pracy stanowi dojrzała i krytyczna dyskusja. Wszechstronna wiedza dotycząca uwarunkowań patomechanizmu DLBCL umożliwiła doktorantce wnikliwą interpretację własnych dokonań i prognozowanie możliwych zastosowań uzyskanych wyników w praktyce klinicznej.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Niny Woźnialis spełnia wszelkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim i dlatego wnoszę do Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie o dopuszczenie jej autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Kandydatka spełnia wymagania określone w art. 26 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz.595 z późniejszymi zmianami).

Wnioskuje o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Niny Woźnialis, bowiem praca została dobrze zaplanowana, rzetelnie wykonana i przeanalizowana a wyniki

dostarczają ważnych informacji przydatnych w diagnostyce i prawdopodobnie także przyszłej modyfikacji leczenia chorych na DLBCL CD5 (+). Osiągnięcia te były możliwe dzięki połączeniu pasji badawczej doktorantki z bardzo dobrym przygotowaniem warsztatowym.

Maria Podolak-Dawidziak

Prof. dr hab. n. med. Maria Podolak-Dawidziak

Recenzent