



INSTYTUT GRUŻLICY I CHOROÓB PŁUC

ZAKŁAD PATOMORFOLOGII

Kierownik Zakładu: dr hab. n. med. Renata Langfort, prof. nadzw.

ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa

tel.(48)(22) 43 12 257, fax (48)(22) 43 12 427

Praca na stopień doktora medycyny

mgr Nina Woźnialis

Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej

Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie

W Warszawie

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

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

Promotor pomocniczy: dr n. med. Beata Gierej

RECENZJA

Chłoniaki należą do nowotworów złośliwych układu limfatycznego, charakteryzujących się klonalnym rozrostem komórek limfoidalnych, które odpowiadają różnym stadiom zróżnicowania prawidłowych limfocytów B, T lub naturalnych cytotoksycznych (NK). Dzieli się na chłoniaka Hodgkina, wcześniej nazywanego ziarnicą złośliwą oraz chłoniaki nie-Hodgkina, określane chłoniakami nieziarniczymi.

Chłoniaki nie-Hodgkina stanowią ok. 70% wszystkich chłoniaków i w zdecydowanej większości wywodzą się z limfocytów B (86%), rzadziej z limfocytów T (12%), a najrzadziej z komórek NK (2%).

Etiologia nowotworów nie jest znana, chociaż do czynników odgrywających istotną rolę w zachorowaniu należą czynniki środowiskowe, zakażenia, zwłaszcza wirusowe (m. in. EBV, HTLV-1, HIV, HCV), czynniki immunologiczne, jatrogenne i predyspozycje genetyczne.

W rozwoju nowotworu, niezależnie od czynnika etiologicznego, podstawowe mechanizmy nowotworzenia polegają na wystąpieniu niestabilności genetycznej, z zaburzeniem regulacji

ekspresji onkogenów, utratą funkcji genów supresorowych i genów naprawy DNA.

Wśród chłoniaków z komórek B, najczęstszą postacią jest rozlany chłoniak z dużych komórek B (*DLBCL – Diffuse Large B-cell Lymphoma*), który należy do nowotworów o agresywnym przebiegu i w związku z tym wymaga podjęcia jak najszybszego leczenia. Choroba zajmuje przede wszystkim węzły chłonne, ale może również rozwijać się w lokalizacji pozawęzłowej, w narządach wewnętrznych.

W ciągu ostatnich lat obserwuje się stopniowy wzrost liczb zachorowań na świecie na tę postać chłoniaka.

Chłoniak DLBCL stanowi niezwykle heterogenną grupę zarówno morfologicznie jak i klinicznie. Część postaci ma określony charakterystyczny obraz morfologiczny, immunofenotypowy i kliniczny, część nie ma jak dotąd zdefiniowanych kryteriów diagnostycznych i jest nazywana DLBCL-NOS – postać nieokreślona, która obejmuje najwięcej przypadków.

Rozpoznanie DLBCL, podobnie jak innych chłoniaków wymaga diagnostyki mikroskopowej, najczęściej węzła chłonnego lub wycinka pobranego z narządu objętego procesem nowotworowym, z wykonaniem badań immunohistochemicznych, zwykle obejmujących szeroki panel przeciwciał. Oprócz markerów B, T i NK, które pozwalają na określenie przynależności do linii komórkowej nowotworu, istotne jest oznaczenie indeksu proliferacyjnego Ki-67, jak również wykorzystanie przeciwciał skierowanych przeciwko produktom białkowym onkogenów (BCL-2, BCL-6, cyklina D-1) lub białek fuzyjnych powstałych w wyniku translokacji materiału genetycznego.

Rozwój genetyki i biologii molekularnej, wprowadzenie nowych metod leczenia, w bardzo istotny sposób wpłynęły na zmianę klasyfikacji chłoniaków.

Wiadomo już, że nie jest to jedna choroba, ale cała grupa zróżnicowanych morfologicznie i immunofenotypowo jednostek, w obrębie których ciągle wyodrębnia się nowe postaci.

W obrębie chłoniaka DLBCL – NOS zostały wyróżnione 3 podtypy immunohistochemiczne: *germinal centre B-cell-like* (GCB), *non germinal centre B-cell-like* (non-GCB) i najrzadsza postać *CD5-positive* DLBCL.

Ostatni podtyp stał się celem pracy doktorskiej Pani Niny Woźnialis. Doktorantka podjęła się zbadania częstości występowania chłoniaka DLBCL CD5(+) w populacji polskiej, porównania cech klinicznych chorych na DLBCL, w grupach CD5(+) i CD5(-), oceny poszerzonego immunofenotypu chłoniaków DLBCL CD5(+) w porównaniu do DLBCL CD5(-) z uwzględnieniem czynników prognostycznych oraz ekspresji wybranych metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej, jak również oceny nasilenia angiogenezy u chorych na DLBCL CD5(+), DLBCL CD5(-) i w grupie chorych niehematologicznych.

Praca rozpoczyna się krótkim wprowadzeniem, w którym zostały zawarte najistotniejsze informacje dotyczące chłoniaków: definicja, objawy choroby, podstawy rozpoznania, ze zwięzłą charakterystyką postaci DLBCL – NOS i 3 wyróżnionych podgrup immunohistochemicznych (GCB, non-GCB, CD5(+) DLBCL). Najrzadsza postać, jaką jest CD5(+) DLBCL stanowi bardzo mało poznaną, względnie nowo wyodrębnioną podgrupę chłoniaków o agresywnym przebiegu klinicznym. Nie jest jeszcze jasne, czy postać ta stanowi odrębną jednostkę kliniczną, czy immunofenotypowy wariant DLBCL.

W związku z tym badania dotyczące tej rzadkiej formy chłoniaka są w pełni uzasadnione. W części zatytułowanej „Przegląd piśmiennictwa” Doktorantka przedstawia aktualną klasyfikację chłoniaków, mechanizmy nowotworzenia i bardzo interesujące zagadnienia dotyczące oddziaływania zachodzącego pomiędzy podścieliskiem i metaloproteinazami, co wiąże się ściśle z tworzeniem się sieci naczyńniowej w obrębie mikrośrodowiska guza. W dalszej części szerzej omawia zagadnienia związane z chłoniakiem rozlanym z dużych komórek B DLBCL. Przedstawia definicję, podział, epidemiologię i etiologię nowotworu, obraz kliniczny, obraz mikroskopowy, immunofenotyp i opis podgrup immunohistochemicznych oraz nieprawidłowości genetyczne, jak również zasady leczenia i rokowanie.

W części dotyczącej materiału i metod, została przedstawiona charakterystyka badanej grupy, która objęła 36 przypadków DLBCL CD5(+) wyłonionych spośród chorych, u których rozpoznano chłoniaka rozlanego z dużych komórek B, w latach 2008-2012 w Centrum Onkologii-Instytut w Warszawie i w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym w latach 2002-2013.

Materiał pochodził z węzłów chłonnych, z wycinków z żołądka, biopsji mózgu, z jelita i jądra. W badanej grupie znalazło się 19 kobiet i 17 mężczyzn w wieku od 29 do 87 lat (średnia wieku 69 lat). Grupę porównawczą stanowiło 28 przypadków DLBCL CD5(-), obejmujących materiał z węzłów chłonnych, z żołądka, jelit i wątroby.

Dla oceny przeciwciał anti-CD34 i anti-vWF oraz anti-HIF1 α wybrano odpowiednie grupy kontrolne, które odpowiadały nie zmienionym nowotworowo migdałkom podniebiennym i węzłom chłonnym.

Istotne dane kliniczne, obejmujące wiek, płeć, lokalizację i zaawansowanie choroby oraz odpowiedź na leczenie Autorka uzyskała z dokumentacji medycznej chorych.

Szczegółowo zostały omówione procedury histologiczne i immunohistochemiczne, dodatkowo w tabelach przedstawiono panel zastosowanych przeciwciał immunohistochemicznych, z uwzględnieniem wykorzystanego klonu oraz specyficzne metody reakcji immunohistochemicznych dla badanych antygenów.

Autorka oceniała ekspresję antygenów CD20, CD3, CD5, CD10, BCL6, MUM1, czynników prognostycznych (CD138, BCL2, FOXP1, CD30), oceniała indeks proliferacyjny przy użyciu Ki-67, ekspresję metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej i białek powiązanych z funkcjonowaniem tych enzymów (MMP-2, MMP-9, TIMP-2, CD44) oraz ekspresję markerów angiogenezy przy pomocy CD34, vWF, VEGF, HIF1 α . W celu wykluczenia agresywnej, blastoidnej postaci chłoniaka z komórek strefy płaszczu wykonała reakcje z cykliną D1, D3 i SOX11.

Ponadto Doktorantka badała angiogenezę przy użyciu dwóch metod: analizy półilościowej w mikroskopie świetlnym oraz analizy morfometrycznej z zastosowaniem komputerowej analizy obrazu.

Otrzymane wyniki zostały poparte szczegółowymi tabelami (8) i rycinami (6), ułatwiającymi ich interpretację.

Wyniki zostały zwięźle i jasno omówione w „Dyskusji”. Autorka wykazała się dobrą znajomością przedmiotu oraz obiektywizmem w ocenie własnych wyników. Dyskusja ściśle dotyczy przedmiotu przeprowadzonych badań. Dobór wybranego piśmiennictwa jest prawidłowy i odpowiednio cytowany.

Cztery zwięźle wnioski wynikające z wykonanej pracy, stanowią podsumowanie otrzymanych wyników i są zgodne z postawionymi celami badawczymi.

Recenzowana praca obejmuje łącznie 86 stron, 15 tabel, 3 ryciny i 6 fotografii i zawiera przejrzysty układ: wprowadzenie, cele pracy, przegląd piśmiennictwa, materiał i metody, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski. Kończy się streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Zawiera również spis treści, wykaz zastosowanych skrótów, spis tabel, rycin i fotografii oraz 260 pozycji piśmiennictwa, dobrane bardzo starannie i adekwatnie do badanego zagadnienia.

Sposób przygotowania pracy nie budzi zastrzeżeń pod względem stylu i nazewnictwa, a poza bezpieczną wartością merytoryczną, co warto jest podkreślić, rozprawa napisana jest ładną, poprawną polszczyzną.

Autorka w swojej pracy doktorskiej podejmuje niezwykle ważną i trudną tematykę, jaką są chłoniaki, w tym tak rzadka postać, jak chłoniak CD5(+) DLBCL.

Wnioski, jakie wynikają z wykonanych badań są niezwykle cenne i stanowią istotny wkład w dotychczasową wiedzę na temat chłoniaków.

Przede wszystkim Doktorantka wykazała, że w populacji polskich chorych z rozpoznaniem DLBCL, ta postać chłoniaka stanowiła 6,26% (53 przypadki na 846 chorych), podobnie jak w innych krajach Europy.

Ponadto dowiodła, że chłoniak DLBCL CD5 (+) jest nowotworem o agresywniejszym przebiegu i gorszym rokowaniu w porównaniu z chłoniakiem DLBCL CD5 (-). Częściej dotyczy osób > 60 roku życia i skali sprawności ECOG ≥ 2 , co powoduje że są oni klasyfikowani do grupy wysokiego ryzyka wg Międzynarodowego Indeksu Prognostycznego (IPI).

Istotnym spostrzeżeniem jest znamienne wyższa ekspresja niekorzystnych czynników prognostycznych: BCL2, FOXP1, CD44 i MMP-9, niższa ekspresja CD30 i TIMP-2 oraz cykliny D1 i D3 w chłoniaku DLBCL CD5(+) w porównaniu z CD5(-). Może to tłumaczyć wyraźnie gorszy przebieg kliniczny chłoniaka CD5(+), jego większą inwazyjność i skrócenie OS.

Bardziej agresywny przebieg chłoniaka CD5(+) w porównaniu do CD5(-) można także tłumaczyć bardziej nasiloną angiogenezą, co wykazały badania morfometryczne przeprowadzone przez Doktorantkę.

Uzyskane wyniki badań wykazały odmienną chłoniaka DLBCL CD5(+) w porównaniu z CD5(-), jego agresywniejszy przebieg kliniczny.

Ponadto, zgodnie z uzyskanymi wynikami angiogeneza odgrywa istotną rolę w rozwoju rozlanego chłoniaka z dużych komórek B, co może być cenną wskazówką w wykorzystaniu leków antyangiogennych w ich leczeniu.

Ocena stopnia nasilenia angiogenezy może mieć znaczenie w ewentualnym prognozowaniu efektów terapii u chorych

Diagnostyka chłoniaków jest niezwykle trudna, wymaga odpowiedniego przygotowania materiału do badania mikroskopowego, ogromnego doświadczenia ze strony lekarza patomorfologa, jak również możliwości wykonania szeregu badań dodatkowych. Ponadto ze względu na dużą heterogenność morfologiczną komórek limfoidalnych, ich rozmieszczenie w wielu narządach, stanowią one niezwykle zróżnicowaną grupę nowotworów, zarówno pod względem histologicznym jak i klinicznym.

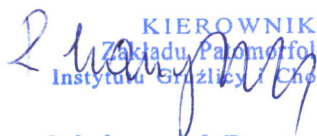
Doktorantka podjęła się trudnego zadania, ale uzyskane wyniki są niezwykle interesujące i niewątpliwie będą przydatne w lepszym zrozumieniu tej rzadkiej postaci chłoniaka.

Jedyną drobną uwagą, jak nasunęła mi się po przeczytaniu pracy jest użycie określenia „rozrosty proliferacyjne”. W słowie „proliferacyjne” już zawiera się rozrost. W związku z tym należy używać innego sformułowania, np. choroby

Poza tym, rozprawa doktorska pani Niny Woźnalis spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawie na stopień doktora medycyny. określone w art.13 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. 5 z późn. Zm.).

Ogólna ocena pracy jest wysoka, a projekt badania, zastosowana metodyka badawcza, analiza i interpretacja wyników, przedstawione wnioski wskazują na świetne, merytoryczne przygotowanie Doktorantki. Temat pracy i wnioski z niej płynące mają znakomite przełożenie praktyczne, mogą być bardzo pomocne w diagnostyce i kwalifikacji do leczenia chorych z chłoniakiem CD5(+) DLBCL.

Dlatego zwracam się do Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytut o dopuszczenie mgr Niny Woźnialis do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


KIEROWNIK
Zakładu Patomorfologii
Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc

dr hab. n. med. Renata Langfort
profesor nadzwyczajny