

Warszawa, 10.02.2021

Prof. dr hab. n. med. Barbara Górnicka
Katedra i Zakład Patomorfologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. Małgorzaty Kołos
pt: „Morfologiczno-molekularny algorytm diagnostyczny
raka jelita grubego”**

Rak jelita grubego (rjg) stanowi niezwykle istotny problem zdrowotny w Polsce i na całym świecie, zwłaszcza w krajach wysoko rozwiniętych. Jest on najczęściej występującym nowotworem złośliwym przewodu pokarmowego. W Polsce jest trzecim co do częstości występowania nowotworem złośliwym u mężczyzn i drugim u kobiet. W związku z rozwojem wiedzy i stosowaniem stale rozwijających się metod diagnostyki i leczenia śmiertelność z powodu tego nowotworu maleje, jednak stale pozostaje na wysokim poziomie. Niestety w Polsce wskaźnik śmiertelności jest najwyższy w porównaniu do innych krajów Europy.

Rak jelita grubego jest zróżnicowaną jednostką chorobową zarówno pod względem klinicznym (raki prawo i lewostronne), jak i terapeutycznym, morfologicznym i patogenetycznym. Zgodnie z dzisiejszym stanem wiedzy wyróżnia się trzy podstawowe ścieżki nowotworzenia. Pierwsza z nich, najczęstsza, to szlak karcinogenezy związany z niestabilnością chromosomową (CIN). Stwierdzany jest w około 75% raków sporadycznych oraz w rakach powstałych na podłożu zespołu polipowatości rodzinnej (*FAP*). Jego istotą jest akumulacja licznych mutacji powodujących delecje lub duplikacje dużych fragmentów chromosomów. We wczesnym etapie dochodzi do zmian w obrębie

obu kopii genu supresorowego *APC* (mutacje, zmiany epigenetyczne). W wyniku tego zostaje aktywowany szlak Wnt, w jądrze gromadzi się beta katenina i w efekcie dochodzi do aktywacji transkrypcji genów stymulujących proliferację. Procesowi temu towarzyszą mutacje aktywujące genów *KRAS* i *BRAF* w obrębie szlaku MAPK. Dochodzi do dalszej stymulacji proliferacji i zapobieżenia apoptozie. Progresja nowotworu związana jest następnie z mutacjami innych genów supresorowych (np. kodujących białka SMAD2 i SMAD 4. W późnym etapie karcinogenezy pojawiają się mutacje typu utraty funkcji genu *TP53*. Drugi szlak karcinogenezy związany jest z niestabilnością mikrosatelitarną (MSI). Zapoczątkowuje go dziedziczna bądź nabyta mutacja w genach kodujących białka odpowiedzialne za wykrywanie, wycięcie i naprawę błędów powstałych podczas replikacji DNA (genów mutatorowych takich jak np. *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*). W ich wyniku powstają błędy w sekwencjach mikrosatelitarnych, które najczęściej dotyczą regionów niekodujących. Jednak niektóre z nich mogą pojawiać się w regionach kodujących lub promotorowych genów regulujących wzrost komórki (*TGF-beta*, *BAX*). Po etapie utraty heterozygotyczności, prowadzi to do niekontrolowanego rozplemu i przetrwania genetycznie uszkodzonych klonów komórkowych. Warto zwrócić uwagę, że w guzach powstałych w tym mechanizmie patogenetycznym może dochodzić do mutacji w genach *APC*, *BRAF* i rzadko *KRAS* natomiast mutacje genu *TP53* nie są charakterystyczne. Trzecia znana ścieżka patogenetyczna w swej początkowej fazie nie jest związana z mutacjami ale z zaburzeniami epigenetycznymi – hipermetylacją wysp CpG i fenotypem CIMP. Guzy powstałe w wyniku tego typu zaburzeń mogą być guzami stabilnymi mikrosatelitarnie, jak również niestabilnymi mikrosatelitarnie. W trakcie rozwoju guzów mogą pojawiać się mutacje *BRAF* (CIMP1), *KRAS* (CIMP2) lub *TP53* (CIMP-negative). Warto podkreślić, że około 15% raków jelita grubego to nowotwory, które nie przebiegają według wyżej opisanych szlaków karcinogenezy. Najprawdopodobniej mechanizmy ich powstania nie są w chwili obecnej jeszcze

poznane. Zdefiniowanie szlaków karcinogenezy raka ma ogromne znaczenie prognostyczne i co chyba jeszcze ważniejsze terapeutyczne, gdyż na tej podstawie można wdrożyć terapię celowaną. Precyzyjne określenie czynników predykcyjnych jest podstawą do stratyfikacji chorych i wyłonienia tych, którzy mogą odnieść korzyść z dobrze zaplanowanej terapii ukierunkowanej molekularnie.

Diagnostyka histopatologiczna raka jelita grubego jest ostateczną metodą potwierdzającą rozpoznanie tego nowotworu oraz pozwala na ocenę licznych czynników prognostycznych i predykcyjnych. W przypadkach o określonym przebiegu klinicznym oraz posiadających pewne cechy morfologiczne, wskazane jest wykonanie panelu immunohistochemicznego, który pozwala wyłonić raki związane z niestabilnością mikrosatelitarną (w tym raki rozwijające się na podłożu zespołu Lyncha). Raki zaawansowane, zakwalifikowane do leczenia za pomocą terapii celowanych podlegają ocenie statusu molekularnego pojedynczych markerów predykcyjnych. Każdy guz w znacznym stopniu zaawansowania klinicznego, przed wdrożeniem terapii anty-EGFR, powinien mieć oznaczony molekularną ocenę mutacji genów *KRAS* i *NRAS* (w oznaczonych kodonach) oraz genu *BRAF*. Powinna być również wykonana ocena niestabilności mikrosatelitarnej u pacjentów z zespołem Lyncha lub ze sporadycznymi rakami MSI-H metodami immunohistochemicznymi i molekularnymi. Ponieważ dostępność badań genetycznych jest ograniczona, a procedura jej wykonania jest czasochłonna warto się zastanowić, czy w pewnych wyodrębnionych grupach pacjentów nie można byłoby już wcześniej określać statusu molekularnego guza. Oczywiście szerokie badanie genetyczne wszystkich raków jelita grubego w chwili rozpoznania byłoby pewnie najlepszym rozwiązaniem, jednak bardzo kosztownym i pewnie nie zawsze możliwym do wykonania. Jednak wyodrębnienie na podstawie badania histopatologicznego połączonego z badaniem immunohistochemicznym grup guzów, w których celowe byłoby wykonanie badania wytypowanych zmian

genetycznych nawet na wczesnym etapie choroby, mogłoby skrócić czas oczekiwania na leczenie w chwili stwierdzenia jej postępu.

W związku z tym, że w określaniu czynników predykcyjnych i prognostycznych w raku jelita grubego istotną rolę odgrywają wspólnie badania morfologiczne, immunohistochemiczne i molekularne od kilku lat pojawiają się w piśmiennictwie (wzorem innych narządów np. piersi) propozycje klasyfikacji morfologiczno-molekularnych. Jednak do tej pory żadna z zaproponowanych klasyfikacji nie jest powszechnie stosowana. Cały czas trwają prace nad sporządzeniem wartościowego algorytmu pozwalającego przewidzieć i określić czynniki predykcyjne na etapie badania histopatologicznego (w połączeniu z badaniami immunohistochemicznymi) i na tym etapie wyodrębnić grupy chorych, dla których przypisane byłoby konkretne badania genetyczne. Praca lek. Małgorzaty Kołos wpisuje się w ten cykl badań.

Celem rozprawy doktorskiej była próba stworzenia algorytmu diagnostycznego (uwzględniającego dane kliniczne, obraz morfologiczny i badania immunohistochemiczne), który pozwoli dokonać podziału pacjentów na grupy w zależności od ścieżki karcinogenezy. Dopiero po zakwalifikowaniu chorych do wydzielonej grupy w algorytmie wskazana jest konieczność wykonania odpowiednio wyselekcjonowanych badań genetycznych. Mówiąc inaczej przewidywany algorytm przekładałby się na planowanie badań molekularnych w odniesieniu do przewidywanych efektów leczenia. Zmniejszałby koszty i co ważniejsze skracałby czas dalszej diagnostyki.

Uważam, że wybór tematu rozprawy jest cały czas aktualny, słuszny i potrzebny praktycznie.

Praca ma typowy układ, liczy 131 stron maszynopisu, zawiera liczne tabele, ryciny i zdjęcia.

W liczącym 25 stron **wstępie i wprowadzeniu** Autorka w kolejnych podrozdziałach przedstawia epidemiologię, szlaki karcinogenezy, czynniki prognostyczne i predykcyjne, klasyfikacje morfologiczno-molekularne

oraz strategię terapii raka jelita grubego. Zagadnienia te Doktorantka omawia szczegółowo, uwzględniając aktualną wiedzę. Zawarte informacje w sposób wyczerpujący wprowadzają czytającego w zagadnienie i uzasadniają nakreślone przez Doktorantkę cele badań.

Cel badań został przedstawiony w rozdziale trzecim. Jest nim opracowanie przydatnej klinicznie ścieżki diagnostycznej raka jelita grubego na podstawie typów morfologiczno-molekularnych. Autorka założyła sobie stworzenie algorytmu postępowania diagnostycznego, który pozwoli dokonać podziału pacjentów na grupy w zależności od drogi karcinogenezy, a następnie stworzy możliwość wyboru czynników predykcyjnych dla terapii celowanej.

Materiał i zastosowane metody badawcze. Badania przeprowadzono na grupie 74 przypadków raka jelita grubego (w 40 przypadkach materiał pochodził od kobiet, a w 34 przypadkach od mężczyzn). We wszystkich przypadkach wykonano spójne badania makroskopowe z pobraniem wycinków zgodnie z wytycznymi Polskiego Towarzystwa Patologów. Pobrane wycinki zostały utrwalone i przeprowadzone według standardowej procedury histopatologicznej. W każdym przypadku został sporządzony histopatologiczny raport synoptyczny uwzględniający typ histologiczny raka, stopień dojrzałości (G), stopień zaawansowania patomorfologicznego (pTNM), cechy inwazji naczyń i nerwów, obecność depozytów komórkowych, pączkowanie (*budding*), margines proksymalny, dystalny i obwodowy oraz cechy mikroskopowe niestabilności mikrosatelitarnej MSI (nacieki zapalne, heterogenność utkania, margines wzrostu guza). W każdym przypadku wykonano badania immunohistochemiczne z oceną ekspresji białkowych genów mutatorowych *MLH1*, *MSH2* i *MSH6* oraz z oceną ekspresji jądrowej białka p53. Dla oceny ekspresji genów mutatorowych zastosowano dwa typy odczynów: negatywna lub pozytywna reakcja jądrowa. Rozumiem, że reakcje te były jednoznaczne czyli zawsze takie same w 100% komórek guza i nie wystąpiły przypadki braku możliwości oceny reakcji. W ocenie ekspresji jądrowej białka p53 odnotowano

trzy typy reakcji: dodatnia (>90% komórek z reakcją pozytywną, grupa TP53-III), ujemna (<1% komórek z reakcją pozytywną, grupa TP53-II) i heterogenna (procent reakcji dodatniej od 1 do 90, grupa TP53-I). Grupę z odczynem heterogennym podzielono dodatkowo na trzy podgrupy kierując się procentowym udziałem dodatniej reakcji w preparacie. Zastosowano następujące przedziały: 1-25%, 26-50% i od 51-90%. Kolejnym zaplanowanym etapem badań były badania molekularne wykonane w całej badanej grupie. Z wybranego wycinka wyizolowano DNA, a następnie wykonano ocenę niestabilności mikrosatelitarnej, mutacji w genach *KRAS*, *BRAF* i *TP53* oraz statusu metylatora wysp CpG i metylacji promotora *MLH1*. Ocenę niestabilności mikrosatelitarnej wykonano badaniem PCR z użyciem uprzednio walidowanego panelu 5 markerów mikrosatelitarnych (NR21, NR24, NR27, BAT25 i BAT26). Przyjęto następujące kryteria oceny: MSI-H 2 i >2 markerów z niestabilnością, MSI-L – 1 marker z niestabilnością. Identyfikacja mutacji w genach *KRAS* (ekson 20) *BRAF* (ekson 15) i *TP53* (ekson 4,5,6,7,8) została zapoczątkowana poprzez amplifikację DNA przy pomocy starterów PCR. Po wykonaniu procedury sekwencje odczytywano z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej. Status CIMP oceniano metodą ilościowego PCR w oparciu o panel pięciu markerów. Tą samą metodą przeprowadzona była analiza metylacji promotora genu *MLH*. W obu tych sytuacjach obliczano procent metylowanego DNA (PMR). Każda próbka była oceniana jako dodatnia przy PMR>10. Przypadek oceniany jako CIMP dodatni musiał zawierać przynajmniej 3 (z panelu pięciu) markery ocenione jako dodatnie (PMR>10). Zastosowane metody obliczeń statystycznych nie budzą zastrzeżeń. Dla przeprowadzenia wszystkich analiz kluczowy był wynik reakcji immunohistochemicznych z przeciwciałem przeciwko p53 gdyż ocenę danych klinicznych, cech makro- i mikroskopowych, wyników pozostałych badań immunohistochemicznych i badań molekularnych opracowano w odniesieniu do przedstawionych powyżej grup badawczych, zależnych od wyniku reakcji immunohistochemicznej z tym przeciwciałem.

Liczebność grup, dobór materiału i zastosowane metody badawcze nie budzą zastrzeżeń. Zastanawiam się jedynie dlaczego doktorantka nie wykonywała również badań mutacji w genie *NRAS*? Zmiany molekularne w tym genie są obecnie uznanym czynnikiem predykcyjnym i niewątpliwie takie badania byłyby bardzo ciekawe w kontekście założonych celów pracy.

Rozdział **wyniki** jest podzielony na części w zależności od problemu badawczego. Do grupy PT53-I zakwalifikowano 21 przypadków (28%), do grupy PT53-II – 25 przypadków (34%), a do grupy PT53-III i 28 przypadków (38%). Część piąta tego rozdziału poświęcona jest analizie statystycznej otrzymanych wyników, a część szósta ich podsumowaniu. Dla większej przejrzystości recenzji wnioski płynące z obu tych części będę umieszczała przy omawianiu poszczególnych rozdziałów i podrozdziałów wyników.

Część pierwsza poświęcona jest wynikom klinicznym. Analizowano wiek, płeć i lokalizację guza w grupach badawczych. W grupie TP53-I rjg występował częściej u chorych powyżej 71 roku życia, w lokalizacji prawostronnej. W grupie TP53-II raki również występowały częściej u osób >70 roku życia i zlokalizowane były z niemal równą częstością zarówno po stronie prawej, jak i lewej. W grupie TP53-III raki podobnie jak w grupie II-giej lokalizowały się z równą częstością w obu lokalizacjach. Różnice nie wykazywały istotności statystycznej. W podsumowaniu wyników dotyczących tej części zauważyłam pewną nieścisłość. Autorka (na stronie 73) napisała, że raki w grupie Tp53-III wystąpiły najliczniej wśród osób poniżej 60 roku życia. Takiego wniosku nie mogę wysnuć na podstawie danych zawartych w tabeli 3. W grupie tej rzeczywiście najliczniej pojawiły się raki wśród najmłodszych pacjentów (poniżej 50 rż), jednak analizując grupę III-cią najczęściej byli zakwalifikowani do niej chorzy najstarsi.

Cześć druga poświęcona jest wynikom patomorfologicznym. Klasyczny rak gruczołowy występował najczęściej w grupie Tp53-III. W grupie tej najczęściej zaobserwowano najwyższy stopień zaawansowania patomorfologicznego (pT4a i b) oraz największą liczbę węzłów chłonnych z przerzutami raka. Raki

nisko dojrzałe najczęściej wystąpiły w grupie Tp53 negatywnej. Różnice w występowaniu przerzutów w węzłach chłonnych pomiędzy grupami były istotne statystycznie.

Kolejny podrozdział poświęcony jest występowaniu mikroskopowych cech niestabilności mikrosatelitarnej w badanych grupach. Cechy te (nacieki zapalne rozlane lub typu choroby Crohna, heterogenność tkanek, obecność śluzu i rozprężający typ wzrostu) najczęściej występowały w grupie Tp53-I. Dla typów nacieków zapalnych różnice w badanych grupach były istotne statystycznie, natomiast dla heterogenności tkanek i marginesu wzrostu wykazywały tendencję statystyczną.

Część trzecia wyników to wyniki badań immunohistochemicznych. Wyniki dotyczące reakcji z przeciwciałem przeciwko p53 zostały już wcześniej przedstawione i służyły doktorantce do podziału badanych przypadków na 3 zasadnicze grupy. W tym podrozdziale bardziej szczegółowo omówiono szeroką grupę I-szą z propozycją podziału na podgrupy. Zauważyłam pewną niezgodność danych z tabeli 7 i tabeli 2 w propozycji tego podziału. W tabeli drugiej w grupie TP-I wydzielono podgrupę od 1-25% (jak rozumiem taki zakres jest prawidłowy) podczas gdy w tabeli siódmej ta sama podgrupa ma zakres od 10% do 25%. Myślę, że jest to błąd redakcyjny. Kolejny podrozdział dotyczy barwień immunohistochemicznych dla określenia niestabilności mikrosatelitarnej. W tab. 8 przedstawiono analizę immunohistochemicznej niestabilności mikrosatelitarnej w grupach badawczych ograniczonej do określenia utraty ekspresji określonej liczby markerów (1 marker lub 2 i więcej markerów). Trochę zabrakło mi w tym miejscu szczegółowego zestawienia jakie markery uległy zaburzeniu ekspresji (zwłaszcza że w zaproponowanym algorytmie jest jednoznaczne odniesienie do konkretnego markera (MLH1). Wyjaśnienie jest zawarte na stronie 63 - rozumiem, że utrata jednego markera zawsze odnosi się do MLH1.

Wykazano istotność statystyczną w badanych grupach w zależności od utraty ekspresji IHC MSI. Utrata w markerze MLH1 wystąpiła najczęściej w grupie TP53-I-szej, a utrata ekspresji w co najmniej dwóch markerach – najrzadziej w grupie TP53-III-ciej. Podsumowując, można powiedzieć, że raki z cechami MSI najliczniej wystąpiły w grupie TP53-I-szej. W grupach TP53-II-giej i III-ciej dominowały przypadki MSS. W tych grupach cechy MSI stwierdzono w 20% przypadków grupy II-giej i jedynie 7,7% przypadków grupy III-ciej (błąd literowy na str. 63). Zawarty w tym miejscu podział MSI na *low* i *high* jest niewłaściwy. Podział ten może być dokonany na podstawie wyników badań molekularnych, a nie immunohistochemicznych. Nie zmienia to jednak obliczeń dotyczących ogólnego wystąpienia MSI dokonanych na podstawie barwień immunohistochemicznych.

Kolejna część wyników poświęcona jest badaniom molekularnym. Warto zauważyć, że wyniki wszystkich przeprowadzonych badań molekularnych (MSI, mutacje *KRAS* *BRAF*, fenotyp CIMP i metylacja promotora *MLH1*) w powiązaniu z podziałem na grupy (TP53-I, II i III) cechuje istotność statystyczna. Pierwszy z podrozdziałów dotyczy molekularnego statusu niestabilności mikrosatelitarnej. Wykazano istotną statystycznie zależność w/w statusu w badanych grupach. W grupie TP53-I dominowały guzy z cechami MSI (głównie typu MSI-high). W grupach TP53 II i III w większości przypadków (odpowiednio 80% i 92,8%) nie stwierdzono MSI. Różnice w ocenie MSI metodami immunohistochemiczną i molekularną wystąpiły jedynie w 3 przypadkach. W tych guzach badania IHC wskazywały na MSI (reakcja negatywna), podczas gdy badania molekularne tej ścieżki karcinogenezy nie potwierdziły (trochę zabrakło mi próby wyjaśnienia tej rozbieżności w dyskusji). Kolejny podrozdział to analiza mutacji genu *TP53*. Mutacje typu *missense* dominowały w grupie TP53-III, a typu *frameshift/nonsense* w grupie TP53-II. W grupie TP53-I mutacje występowały najrzadziej. Kolejny fragment rozprawy to analiza statusu genu *KRAS*. Mutacje tego genu występowały

w 52% i 50% odpowiednio w grupach TP53-II i TP53-III, podczas gdy w grupie TP53-I jedynie w 19% (różnica istotna statystycznie). W dalszej części dysertacji Autorka omawia wyniki dotyczące statusu genu *BRAF*. Doktorantka stwierdza, że mutacja tego genu wystąpiła jedynie w guzach grupy TP53-I. Jednocześnie w kolejnym zdaniu pisze: „Wystąpiła ona (mutacja *BRAF*) wyłącznie w guzach o procentowym udziale reakcji IHC TP53 między 51 a 99%”. Jest to pewna niekonsekwencja, gdyż do grupy TP53-I zaliczono guzy o procentowym udziale reakcji IHC p53 między 1% a 90%. Guzy z procentowym udziałem reakcji IHC p53 między 91 a 99% zaliczono do grupy TP53-III. Jednak według danych z tabeli 12 w grupie TP53-III nie stwierdzono przypadków mutacji genu *BRAF* – zakładam więc, że **właśnie te** dane są prawidłowe, a określenie przedziału do 99% jest pomyłką redakcyjną.

Następnie Autorka opisuje wyniki dotyczące metylacji wysp CpG (fenotyp CIMP – *CpG island methylator phenotype*) i metylacji promotora genu *MLH1*. Wykazała, że te zmiany epigenetyczne wystąpiły istotnie statystycznie częściej w grupie TP53-I.

Poza wynikami w odniesieniu do grup TP53-I, II i III, Doktorantka wykazała jeszcze inne istotne zależności molekularne oraz związki zmian molekularnych z cechami mikroskopowymi. Analiza statystyczna wyników pokazała, że istnieje istotny związek między mutacją genu *BRAF*, a molekularnie stwierdzoną niestabilnością mikrosatelitarną (zarówno *low* jak i *high*) oraz z metylacją CIMP. Stwierdzono również, że istnieje zależność między mutacją genu *BRAF* (mylnie nazwaną na str. 70 metylacją) i metylacją CIMP z: występowaniem określonych typów nacieków zapalnych (typu choroby Crohna i rozlane), rozprężającym wzrostem guza oraz prawostronną lokalizacją (te cechy mikroskopowe mogą wskazywać na wystąpienie MSI).

Rozdział wyniki kończy stworzenie i omówienie algorytmu molekularno diagnostycznego. Stworzenie takiego dość prostego algorytmu (opartego na badaniu histopatologicznym i wykonaniu 4 barwień IHC) jest niewątpliwie

najważniejszym ze zrealizowanych celów pracy. Pozwala na określenie ścieżki karcinogenezy na etapie diagnostyki histopatologicznej. Pozwala też na zaplanowanie wykonania badań genetycznych zgodnie z potrzebami i we właściwym czasie. Postępowanie według zaproponowanego algorytmu skróciłoby czas oczekiwania pacjenta na decyzje o wyborze terapii innej niż anty-EGFR. Mam jedną uwagę. W algorytmie zaproponowanym przez Autorkę znalazło się miejsce dla mutacji genu *NRAS*, który nie był analizowany w pracy. Umieszczenie go (choć wysoce prawdopodobne i zapewne słuszne) nie wynika jednak z przeprowadzonych przez Autorkę badań. Dodatkowo nie wyjaśnione jest użycie „gwiazdek” w niektórych miejscach algorytmu – nie wiem co mają oznaczać?

Cały rozdział poświęcony wynikom pracy jest napisany jasno, czytelnie, wyniki przedstawione są w formie licznych tabel, rycin i zestawień bardzo ułatwiających czytanie. Jedna uwaga ogólna. Przy podawaniu wyników warto byłoby moim zdaniem umieszczać zarówno dane liczbowe jak i procentowe – ułatwiłoby to czytanie pracy.

Dyskusja uzyskanych wyników oparta jest o starannie zebrane piśmiennictwo uwzględniające najnowsze doniesienia. Doktorantka konfrontuje wyniki własne z danymi literaturowymi, wykazując bardzo dobrą znajomość przedmiotu pracy oraz swobodę w operowaniu posiadanymi wiadomościami. W początkowej części dyskusji Autorka omawia światowe wytyczne do diagnostyki raka jelita grubego i konfrontuje je z wytycznymi polskimi. Następnie przedstawia funkcjonujące w literaturze propozycje klasyfikacji morfologiczno-molekularnych i odnosi się do nich krytycznie, jednocześnie przedstawiając założenia i korzyści wynikające z zaproponowanego przez Nią algorytmu. Szeroko omawia i uzasadnia dokonany przez Nią wybór podziału rjg na grupy w zależności od barwienia IHC z przeciwciałem przeciwko p53 opierając się na dostępnych danych literaturowych. Podkreśla, że kryteria oceny obecności reakcji oraz stopień jej nasilenia korelowały z wynikami badań molekularnych genu *TP53*. Następnie

wyjaśnia połączenie rozkładu ekspresji p53 ze zmianami molekularnymi odzwierciedlającymi różne szlaki karcinogenezy. Uzyskane w pracy istotne zależności konfrontuje z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy. Uważa, że zasadne jest poszerzenie wytycznych dotyczących panelu barwień w diagnostyce raka jelita grubego o ocenę reakcji z przeciwciałem przeciwko białku p53. Następnie zwraca szczególną uwagę na jedną ze ścieżek karcinogenezy związanej nie z mutacjami genów ale z mechanizmem ich wyciszania, poprzez zmiany epigenetyczne. Szeroko omawia doniesienia z piśmiennictwa związane z badanym przez Nią fenotypem CIMP. Identyfikacja tego szlaku karcinogenezy rjg nabiera znaczenia zarówno prognostycznego, jak i predykcyjnego, gdyż stosunkowo często jest on związany z niestabilnością mikrosatelitarną i mutacją genu *BRAF*. Wyniki uzyskane przez Doktorantkę znajdują potwierdzenie w literaturze światowej.

Na podstawie przeprowadzonych analiz Doktorantka wyszczególniła 5 dość rozbudowanych **wniosków**, które logicznie wynikają z przeprowadzonych badań. Są one dość szczegółowe i w swojej treści zawierają podsumowanie wyników. Są wysnute prawidłowo i odpowiadają na postawione w pracy cele.

Wniosek 1 mówi o zasadności podziału wszystkich raków jelita grubego na grupy na morfologiczno-molekularne w zależności od typu reakcji IHC z p53, która odzwierciedla zmiany zachodzące w tym genie.

Wnioski 2 i 3 odnoszą się do zmian morfologicznych i molekularnych występujących w grupach przedstawionych we wniosku pierwszym. Istotne statystycznie zależności potwierdzają przydatność wydzielenia takich grup. W grupie TP53-I stwierdzono guzy typu MSI z towarzyszącymi mutacjami genu *BRAF*, metylacją promotora *MLH1* i fenotypem CIMP. W grupie tej występowały też nacieki zapalne typu choroby Crohna i rozlanego oraz pojedyncze węzły chłonne z przerzutami. W grupie TP53-II dominowały guzy typu MSS, w połowie przypadków stwierdzano mutację genu *KRAS*. Guzy typu MSI występowały w 20% przypadków. W grupie tej dominowały nacieki zapalne typu

nieokreślonego, raki tej grupy nie prezentowały przerzutów do węzłów chłonnych. W grupie TP53-III przeważały guzy MSS, w połowie przypadków towarzyszyły im mutacje genu *KRAS*. Jedynie w pojedynczych przypadkach odnotowano zaburzenia epigenetyczne. W grupie tej stwierdzano liczne węzły chłonne z przerzutami raka. W obrazie morfologicznym dominowały nieokreślone nacieki zapalne.

Wniosek 4 odnosi się do ścieżki patogenezy związanej z fenotypem CIMP. Guzy z tym zaburzeniem epigenetycznym korelowały z mutacją genu *BRAF* i z charakterystycznym obrazem morfologicznym (nacieki zapalne typu choroby Crohna, rozprężający margines wzrostu).

Wszystkie wymienione powyżej wnioski mają głównie znaczenie badawcze.

Wniosek 5 to podsumowanie wcześniej wyszczególnionych wniosków z zaproponowaniem przydatnego klinicznie algorytmu diagnostycznego z użyciem 4 markerów immunohistochemicznych (p53, MLH1, MSH2, MSH6), połączonego z propozycją wykonania lub odroczenia zbadania statusu genów *KRAS* oraz *BRAF*. Wniosek ten jest najważniejszym osiągnięciem pracy badawczej Doktorantki, ma duże znaczenie praktyczne i jest przełożeniem wyników pracy badawczej na algorytm diagnostyczny przydatny w praktyce klinicznej.

Rozprawę uzupełnia obszerne **piśmiennictwo** obejmujące 129 starannie dobranych pozycji oraz **streszczenie** w języku polskim i angielskim, w którym zawarte jest zwięzłe podsumowanie celu pracy, metod i wyników przeprowadzonych badań. Do pracy dołączony jest wykaz skrótów, spis tabel, spis rycin oraz 5 aneksów. Aneksy zawierają klasyfikację histopatologiczną guzów jelita grubego, omówienie kryteriów dla oceny stopnia zróżnicowania rjg, omówienie kryteriów dla oceny stopnia zaawansowania patomorfologicznego rjg oraz wytyczne odnośnie raportowania wyników biomarkerów dla rjg. Aneks 5 to 17 zdjęć mikroskopowych. Są one starannie dobrane, pokazują typy raków

w barwieniu HE oraz ilustrują wykorzystane w pracy reakcje immunohistochemiczne.

Praca napisana jest starannie, z dbałością o szatę graficzną, zilustrowana licznymi tabelami, rycinami i fotografiami. Wyszczególnione w tekście recenzji uwagi odnoszą się w większości do błędów redakcyjnych i nie mają zasadniczego wpływu na ogólną ocenę dysertacji.

Praca lek. Małgorzaty Kołos jest interesującym studium o wartościach zarówno poznawczych, jak i mających zastosowanie w praktyce. Jest to własny oryginalny dorobek naukowy Doktorantki. Przedstawiona do recenzji dysertacja stanowi rozwiązanie założonego oryginalnego problemu naukowego oraz potwierdza dużą wiedzę teoretyczną Kandydatki.

Rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych. Dlatego mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego wniosek o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

1581822
Prof. dr hab. n. med.
specjalista patologii i cytologii
Warszawa, ul. Nasielska 161

Prof. dr hab. n. med. Barbara Górnicka