

Dr hab. n. med. Barbara Radecka, prof. UO^{1,2} Opole, 29 października 2023 r.

¹Klinika Onkologii, Instytut Nauk Medycznych

Uniwersytet Opolski w Opolu

²Klinika Onkologii z Odcinkiem Dziennym

Opolskie Centrum Onkologii im. Prof. Tadeusza Koszarowskiego

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarz Sylwii Tabor

Tytuł rozprawy

**WPLYW BIAŁKA HAX1
NA ŚCIEŻKĘ SYGNAŁOWĄ ESTROGENU I PROGRESJĘ
W LUMINALNYM RAKU PIERSI**

Ocena wyboru tematu

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. Współcześnie rak piersi to choroba, której genetycznie uwarunkowana heterogenność znajduje odbicie w cechach fenotypowych, a wiedza na temat podtypów raka piersi stała się podstawą do stworzenia terapii ukierunkowanych na swoiste cele molekularne.

Barbara Radecka

Raki luminalne charakteryzują się ekspresją receptorów estrogenowych (ER) i / lub receptorów progesteronowi (PR), raki HER2 dodatkowo wykazują nadekspresję białka receptorowego HER2 i / lub amplifikację genu kodującego takie białko, a w przypadku raków trójujemnych żadna w wymienionych cech nie jest identyfikowana, ani odpowiednio reprezentowana. Najczęściej, w ok. 70-80% przypadków rozpoznawane są raki luminalne. Rozróżnienie podtypów biologicznych raka piersi w oparciu o wymienione cechy fenotypowe ma kluczowe znaczenie, bowiem poszczególne podtypy różnią się przebiegiem biologicznym i rokowaniem oraz, co szczególnie ważne w codziennej praktyce, odmienną wrażliwością na poszczególne metody systemowego leczenia.

Nieustannie poszukuje się biomarkerów, które mogą mieć znaczenie prognostyczne, czyli być pomocne w ocenie rokowania oraz znaczenie predykcyjne, czyli być pomocne w wyborze optymalnego leczenia, szczególnie leczenia systemowego.

Białko HAX1 (ang. *haematopoietic cell-specific protein-associated protein X-1*) opisane po raz pierwszy w 1997 roku kodowane jest przez jednoimienny gen *HAX1* zlokalizowany na chromosomie 1 (1q21.3). Białko to jest obecne w różnych tkankach ludzkiego organizmu, jak mięśnie szkieletowe, mięsień serca czy tkanka płucna, a jego nadmierną ekspresję stwierdzono w komórkach wielu nowotworów, w tym raka piersi. Z tego powodu staje się ono obiektem badań i poszukiwania, czy i jakie może mieć znaczenie prognostyczne i/lub predykcyjne.

W tym kontekście wybór tematu prowadzonych przez Doktorantkę, Sylwię Tabor, badań zasługuje na szczególne uznanie. Doktorantka podjęła temat niezwykle ważny z praktycznego punktu widzenia i niedostatecznie opisany.

Ocena formalna

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma układ typowy dla tego typu opracowań. Obejmuje 121 stron maszynopisu, z tradycyjnym podziałem na wprowadzenie, cele pracy, materiał i metodykę badań, wyniki, dyskusję, podsumowanie i wnioski oraz wykaz piśmiennictwa. Zawarto również streszczenia w języku polskim i angielskim. Całość wieńczą załączniki obejmujące precyzyjną definicję punktów końcowych oraz VI klasyfikację AJCC dla raka piersi wersję obowiązującą w okresie leczenia chorych będących przedmiotem analizy).

Lud

Ocena merytoryczna

We wstępie Autorka omawia w uporządkowany sposób zagadnienia dotyczące białka HAX1 ze szczególnym uwzględnieniem jego znaczenia w procesach migracji, apoptozy, tworzenia przerzutów odległych i angiogenezy oraz endocytozy. Doktorantka przywołuje tutaj również rodzime publikacje, powstałe jako efekt współdziałania pracowników naukowych Narodowego Instytutu Onkologii z naukowcami z zagranicznych ośrodków. Szczególnie duży walor poznawczy recenzentka dostrzegła w podrozdziale 1.5, gdzie Autorka dysertacji przedstawia szereg danych o roli białka HAX1 w różnych nowotworach, nie tylko w raku piersi, ale także w raku płuca, przelyku, żołądka, jelita grubego czy gruczołu krokowego. Doktorantka wspomina również o znaczeniu zaburzeń ekspresji genu *HAX1* w schorzeniach nienowotworowych, np. łuszczycy (gdzie nadmierna ekspresja skutkuje wysokim stężeniem białka HAX1) czy ciężkiej wrodzonej neutropenii (chorobie Kostmanna, gdzie obserwuje się niedobór produktu tego genu).

Dalsza część wstępu to zagadnienia związane w rakiem piersi – epidemiologia oraz aspekty kliniczne. Doktorantka wyjaśnia znaczenie biologicznych podtypów raka piersi, Wychodząc od historycznej pracy Charlesa Perou, gładko przechodzi przez molekularną klasyfikację do klasyfikacji kliniczno-patomorfologicznej, która jest stosowana w codziennej praktyce i pozwala wyodrębnić biologiczne podtypy raka piersi o znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym. Bazując na podtypach Autorka przejrzysto i wyczerpująco przedstawia zasady systemowego leczenia chorych na wczesnego raka piersi. Zawarto tutaj również informacje o najnowszych trendach w zakresie takiego leczenia, uwzględniając miejsce immunoterapii, inhibitorów kinaz cyklinozależnych 4 i 6 (CDK4/6) oraz olaparybu u chorych z dziedzicznymi mutacjami w genach *BRCA1* i *BRCA2*.

Doktorantka nie pomija także kontrowersji związanych z wyborem optymalnego uzupełniającego leczenia u chorych na luminalnego HER2-ujemnego raka piersi, takich jak punkt odcięcia dla wskaźnika proliferacji Ki-67, wskazań do testów wielogenowych i wreszcie ograniczeń w dostępie do tych testów. W tym kontekście warto podkreślić jest również przytoczenie kalkulatorów ryzyka nawrotu – MAGEE i PREDICT, jako narzędzi przydatnych w codziennej praktyce. Oba te kalkulatory, podobnie jak indeks immunohistochemiczny (IHC4), a także testy wielogenowe (OncotypeDx Recurrence Score [RS], Mammaprint, Prosigna PAM 50 Risk of Recurrence Score [ROR], Endopredict [EP], Breast Cancer Index [BCI]) zostały omówione w odpowiednich podrozdziałach wstępu. Doktorantka trafnie oceniła przydatność kliniczną (prognostyczną i predykcyjną) oraz wady i zalety każdego z nich.

Dad

Głównym celem pracy badawczej było określenie wartości prognostycznej białka HAX1 w luminalnym raku piersi oraz jego ewentualnej wartości predykcyjnej dla leczenia antyestrogenowego. Rozdział cele pracy jest w opinii recenzentki nadmiernie rozbudowany. Wśród informacji o metodach, punktach końcowych gubi się zasadnicza kwestia - cele. Recenzentka oczekiwałaby nie tylko wyszczególnienia celu głównego, ale także jasnego i zwięzłego zdefiniowania celów dodatkowych i liczy, że odbędzie to podczas publicznej obrony dysertacji.

Rozdział Materiały i metody jest opracowany bardzo starannie. Doktorantka w przejrzysty sposób opisała materiał biologiczny, w tym preparaty tkankowe guzów piersi, wykorzystane linie komórkowe, zastosowane pożywki, odczynniki, przeciwciała, sondy i aparaturę. Przeprowadzone przez Doktorantkę badanie składa się z dwóch części.

Pierwsza część pracy to retrospektywna analiza dokumentacji medycznej dwóch grup chorych na raka piersi leczonych w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie: pilotażowej (N=46) i rozszerzonej (N=90). Grupa pilotażowa objęła chore z różnymi podtypami biologicznymi raka piersi, leczone w 2007 roku, a grupa rozszerzona wyłącznie chore na raka luminalnego HER2-ujemnego, leczone w latach 1999-2008. W każdej z opisanych grup znalazły się dwie kohorty – badana, która stanowiły chore z nawrotem pod postacią przerzutów odległych po pierwotnym radykalnym leczeniu oraz kontrolna, którą stanowiły chore bez nawrotu. Doktorantka oceniła związek pomiędzy wartościami takich punktów końcowych jak czas przeżycia całkowitego (*overall survival*, OS) i czas przeżycia wolnego od nawrotu odległego (*distant recurrence free survival*, DRFS) a poziomem białka HAX1 w komórkach pierwotnego guza. Dodatkowo przeanalizowała związek pomiędzy statusem białka HAX1 a innymi czynnikami o znaczeniu rokowniczym, jak typ histologiczny, stopień histologicznej złośliwości, podtyp biologiczny, patomorfologicznie oceniony stopień zaawansowania czy wiek. W grupie pilotażowej ocenę immunohistochemiczną ekspresji białka HAX1 przeprowadzono w oparciu o kategoryzację stopnia intensywności (kategoria N0, N1, N2 i N3), natomiast w grupie rozszerzonej metodą półilościową bez kategoryzacji pod kątem intensywności. W obu grupach oceniano barwienie cytoplazmatyczne i jądrowe. Warto podkreślić, że Doktorantka wskazuje z imienia i nazwiska osoby, które wykonały analizy immunohistochemiczne. Dla przeprowadzenia tej części analizy Doktorantka uzyskała pozytywną opinię Komisji Bioetycznej NIO-PIB w Warszawie, zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej z 1975 roku, zrewidowanej w 1983 roku (numery opinii 24/2007 oraz 49/20).

Dowd

Druga część pracy ma charakter eksperymentalny, a jej celem było wyjaśnienie mechanizmów molekularnych funkcjonowania białka HAX1 w komórce. W prospektywnym badaniu Doktorantka oceniła wpływ poziomu białka HAX1 na przeżycie komórek oraz jego powiązania ze ścieżką sygnałową zależną od receptora estrogenowego. W tym celu przeprowadziła przesiewowe testy ekspresji genów zależnych od receptora estrogenowego w liniach z zachowaną funkcją genu *HAX1* i wyciszeniem genu *HAX1* niestymulowanych β -estradiolem.

Doktorantka wyczerpująco opisała metody statystyczne zastosowane w każdej części swoich badań. Zastosowane metody statystyczne są właściwe i odpowiednio dobrane do założonych celów.

Wyniki zostały przedstawione w sposób zwięzły, z odpowiednim ich zestawieniem w postaci tabel i rycin (13 tabel i 52 rycin). W odrębnym rozdziale Doktorantka precyzyjnie opisała charakterystykę grupy chorych, których bloczki tkankowe oceniono, podając rozkład cech demograficznych, patomorfologicznych i klinicznych.

W grupie pilotażowej ekspresja cytoplazmatyczna oraz całkowita (ale nie jądrowa) białka HAX1 w komórkach raka piersi korelowały ze stopniem histologicznego zróżnicowania nowotworu i okazały się istotnie wyższe u chorych z przerzutami odległymi w porównaniu z chorymi bez nawrotu. W analizach jednoczynnikowych Autorce udało się określić poziom cytoplazmatycznej i całkowitej ekspresji białka HAX1 korelujący z OS i DRFS, nie odnotowała ona natomiast korelacji pomiędzy ekspresją HAX1 w jądrach komórkowych, a wspomnianymi parametrami przeżycia. W analizie wieloczynnikowej podwyższona ekspresja cytoplazmatyczna i całkowita białka HAX1 okazała się być niezależnym, negatywnym czynnikiem prognostycznym ryzyka wystąpienia przerzutów odległych (odpowiednio HR 2,832; $p = 0,017$ i HR 4,249; $p = 0,010$). Nie wykazano wpływu ekspresji jądrowej HAX1 na OS i DRFS.

W grupie rozszerzonej Doktorantka wykazała znamiennej różnicę pomiędzy całkowitym poziomem białka HAX1 w grupie kontrolnej i badanej. W tej grupie także poziom cytoplazmatycznej i całkowitej (ale nie jądrowej) ekspresji białka HAX1 korelował z OS i DRFS. W analizach wieloczynnikowych cytoplazmatyczny i całkowity (ale nie jądrowy) poziom HAX1 okazały się niezależnymi, niekorzystnymi czynnikami prognostycznymi dla OS i DRFS.

Łódź

W części eksperymentalnej badania Doktorantka wykazała odpowiedź na stymulację β -estradiolem zarówno w liniach komórkowych z wyciszeniem genu *HAX1* jak i w komórkach z zachowaną jego funkcją. Zastosowanie antyestrogenów prowadziło do obniżenia żywotności komórek, bardziej w liniach z wyciszeniem genu *HAX1*, co prawdopodobnie mogłoby odpowiadać wyższej aktywności leczenia antyestrogenowego w komórkach bez nadmiernej ekspresji *HAX1*. Doktorantka wykazała także, iż ekspresja genu *HAX1* wpływa na ekspresję genów związanych ze ścieżką sygnałową estrogenu, co ma wpływ na proliferację komórek i metabolizm komórkowy.

Dyskusja jest poprowadzona prawidłowo i stanowi znakomity przegląd dostępnego piśmiennictwa na temat znaczenia *HAX1* jako potencjalnego czynnika prognostycznego, wpływu ekspresji genu *HAX1* na stymulację hormonalną i aktywność cytotoksyczną antyestrogenów, ekspresję genów zależnych od aktywacji receptora estrogenowego. Autorka wykazała w tym przeglądzie, iż uzyskane przez nią wyniki są zgodne z uzyskanymi przez innych badaczy, którzy również wykazali gorsze rokowanie u chorych na luminalnego HER2 ujemnego raka piersi z wysokim poziomem białka *HAX1* w tkance nowotworowej lub wysoką ekspresję genu *HAX1* na poziomie mRNA.

Wnioski są sformułowane prawidłowo i niosą przesłanie praktyczne, wskazują bowiem na wyższe ryzyko rozwoju przerzutów odległych oraz krótszego OS u chorych na operacyjnego luminalnego HER2 ujemnego raka piersi z podwyższony poziom *HAX1* w komórkach guza pierwotnego.

Doktorantka wskazuje, iż przygotowana przez nią analiza stanowi największe, przeprowadzone do tej pory badanie retrospektywne, wskazujące na możliwość pełnienia przez *HAX1* roli negatywnego czynnika prognostycznego w luminalnym, HER2-ujemnym raku piersi. Recenzentka pokusiła się o przeszukanie baz danych i potwierdza wniosek Doktorantki w tym względzie.

Ocena piśmiennictwa i poprawności językowej

Całość pracy opatrzona jest 77 pozycjami piśmiennictwa, z których zdecydowana większość została opublikowana w międzynarodowych, recenzowanych czasopismach. W dużej części są to prace opublikowane w ostatnim dziesięcioleciu, włączając najnowsze publikacje z 2022 i 2023 roku, co świadczy o znajomości literatury przedmiotu, umiejętności korzystania z licznych źródeł i docenieniu publikacji tak zagranicznych jak i rodzimych

Racł

ośrodków badawczych. Opracowanie piśmiennictwa jest jednolite i bardzo staranne. W tym kontekście cytowanie pozycji 21. Z podaniem pełnego nazwiska Pani Prof. Joanny Didkowskiej i jedynie inicjałów UW – Pani Doktor Urszuli Wojciechowskiej wydaje się zwykłym chochlikiem.

Dysertacja jest napisana poprawnym językiem z wykorzystaniem prawidłowej stylistyki i terminologii. Poniżej wyszczególniono kilka uwag językowych i edytorskich:

- rak potrójnie ujemny, rak trójujemny (strona 18) oznacza to samo, jednak ujednolicenie nazewnictwa ułatwia odbiór
- znaleziono kilka kolokwializmów, np.:
 - „czynników przyżyciowych” (strona 60), gdy mowa o parametrach przeżycia OS i DRFS;
 - w wykazie skrótów niewłaściwe jest rozwinięcie dla BCT; skrót ten oznacza bowiem leczenie oszczędzające gruczoł piersiowy (ang. *breast conserving therapy*), a więc skojarzenie zabiegu chirurgicznego z radioterapią, a nie wyłącznie operację oszczędzającą piersi (ang. *breast conserving surgery*)
 - miejscami nie zachowano spójności akapitów i wcięć i odstępów pomiędzy wersami.

Uwagi językowe i edytorskie często odbierane są jako niepotrzebne i nadmierne, jednak pracę doktorską powinna cechować szczególna staranność. Te uwagi nie wpływają, oczywiście, na wartość merytoryczną dzieła i końcową **całościową pozytywną ocenę dysertacji**.

Bardzo wartościowym elementem pracy jest warstwa graficzna – czytelny i niezwykle estetyczny podział tekstu, przyjazna czcionka oraz dopracowane w szczegółach wykresy i tabele. Recenzentka docenia dwustronny wydruk manuskryptu!

Podsumowanie

Przedstawiona mi do recenzji dysertacja lekarz Sylwii Tabor dotyczy ważnego zagadnienia poszukiwania biomarkerów prognostycznych i predykcyjnych u chorych na raka piersi. Doktorantka przeprowadziła wieloetapowy projekt badawczy, sprawnie łącząc aspekty medycyny klinicznej i doświadczalnej. Część eksperymentalna była wielomiesięcznym

Ład

procesem i w tym kontekście budzi prawdziwy podziw wytrwałość w jej prowadzeniu lekarza klinicysty, zaangażowanego w codzienną praktykę i opiekę nad chorymi.

Prezentując wyniki własne Doktorantka niejednokrotnie wskazuje na potrzebę dalszych badań w wybranych obszarach, co pozwala żywić nadzieję na kontynuowanie przez Doktorantkę, lekarz Sylwii Tabor dalszej pracy naukowej.

Doktorantka wykazała się umiejętnością analitycznego myślenia oraz systemowego spojrzenia na opracowywane zagadnienie i potwierdziła swoje umiejętności prowadzenia pracy naukowej, a indywidualny wkład Doktorantki w tę analizę jest wystarczający i udokumentowany. **Końcowa całościowa ocena dysertacji jest pozytywna.**

W opinii Recenzentki, rozprawa doktorska lekarz Sylwii Tabor, pt. „Wpływ białka HAX1 na ścieżkę sygnałową estrogenu i progresję w luminalnym raku piersi” wykonana w Narodowym Instytucie Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowym Instytucie Badawczym w Warszawie, pod opieką promotora - **dr hab. n. med. Ewy Grzybowskiej, prof. Instytutu** i promotora pomocniczego – **dr. n. med. Alicji Trębińskiej-Stryjewskiej** spełnia kryteria przypisane rozprawom na stopień naukowy doktora zdefiniowane w art. 13 ust. 1. Ustawy z dn. 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 późn. zm.).

Wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie o dopuszczenie lekarz Sylwii Tabor do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, z uwagi na podniesione w recenzji walory rozprawy, duży aspekt poznawczy i rzetelne opracowanie ważnego interdyscyplinarnego problemu medycznego, stawiam wniosek o wyróżnienie pracy przez Radę Naukową Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowego Instytutu Badawczego w Warszawie.



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