

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej lek. med. Małgorzaty Kasprzyk-Żyszczyńskiej pt. „Ekspresja izoform VEGF, ich receptorów oraz wybranych białek współpracujących w procesie angiogenezy w gruczolakoraku endometrium kobiet”.

Rozwój guzów nowotworowych, powstawanie przerzutów i neovasculogeneza to nierozłączne procesy, które prawie od wieku zajmują sporo miejsca w publikacjach. Opisano podstawy tworzenia nowych naczyń, przebudowę już istniejących w przypadku rozwoju nowotworu, oraz czynniki, które umożliwiają wzrost i rozwój naczyń. Obecne osiągnięcia techniki i rozwój badań immunohistochemicznych, a przede wszystkim biologii molekularnej rzuciły nowe światło oraz pozwoliły zmodyfikować część teorii, których założenia trafnie sprecyzowane ponad wiek temu nadal nie do końca są jasne.

Do tej pory ustalono jakie czynniki wpływają na rozwój naczyń, zarówno krwionośnych jak i limfatycznych. Ostatnie dwie dekady to okres intensywnych odkryć całego zorganizowanego systemu czynników regulujących vasculogenezę. Wyłoniono szereg czynników (rodzina czynników VEGF, Prox-1, FGF, HIF-1, PDGF, ANG-1 i Ang-2, LOX, Met, TGF, IGF, MMP-2, uPAR,) wraz z ich receptorami i opisano powiązania jakie muszą zaistnieć by doszło do nowotworzenia naczyń.

Identyfikacja immunohistochemiczna naczyń krwionośnych i limfatycznych (CD34, CD31, czynnik VIII, rodzina VEGF, podoplanina, LYVE-1, Prox-1, FGF-2, Ang-1 i Ang-2) jest powszechnie stosowana przez badaczy zajmujących się neovasculogenezą. Pomimo tak szczegółowej wiedzy na temat regulacji angiogenezy i limfangiogenezy oraz doskonałych technik oznaczania naczyń, zjawiska te w kontekście poznania dróg i sposobów szerzenia się przerzutów guzów litych były i są przedmiotem wielu kontrowersji.

Z tego punktu widzenia dobór tematu pracy doktorskiej lek. med. Małgorzaty Kasprzyk-Żyszczyńskiej wydaje się niezwykle trafny.

Pracę otwiera bardzo rozbudowany wstęp. Doktorantka w oparciu o szerokie piśmiennictwo, tylko w tej części pracy cytuje 248 pozycji przy czym niektóre wielokrotnie, przybliżyła nam niemal wszystkie zagadnienie wiążące się z angio- i waskulogenezą. We wstępie są rozdziały znakomite jak np. te dotyczące VEGF i ich receptorów w procesie nowotworzenia lub

opisujące białka macierzy pozakomórkowej w tym EDIL3. Zdecydowanie słabsze natomiast są rozdziały poświęcone zagadnieniom klinicznym, czego dowodem niech będzie zamieszczenie przez doktorantkę tabeli z nieaktualną już historyczną klasyfikacją FIGO.

Cele pracy doktorantka formułuje jasno. Dwa główne to: zbadanie ekspresji izoform VEGF w rakach endometrium człowieka oraz ocena ekspresji ich receptorów dla izoform VEGFF w rakach endometrium.

Cele dodatkowe to ocena ekspresji izoform VEGF i ich receptorów w rakach endometrium o różnym stopniu zróżnicowania G1, G2, G3.

Kolejny cel dodatkowy to ocena ekspresji endogliny, neuropiliny-1, neuropiliny-2, EDIL-3 oraz HOXA-5 jako białek różnicujących różne stopnie złośliwości histologicznej w odniesieniu do kontroli.

Materiał i metody to rozdział bardzo zwięzły, wyłączając tabelę ze specyfikacją przeciwciał, zmieściłby się na dwóch stronach. Niestety rozdział ten posiada poważne niedociągnięcia. Brak jest chociaż podstawowych danych klinicznych o grupie badanych kobiet (wiek, stopień zaawansowania klinicznego choroby) oraz porównania tej grupy z grupą kontrolną. Nie wiemy praktycznie nic na temat z jakich powodów operowane były kobiety z grupy kontrolnej, czy np. nie było w tej grupie atypowych rozrostów endometrium, co mogłoby spowodować pojawienie się ekspresji badanych markerów na podobnym poziomie jak w rakach gruczolowych G1.

Duży niedosyt zostawia również opis oceny reakcji immunohistochemicznych szczególnie w kontekście oceny VEGF-A, VEGF-B, VEGF-D i ich receptorów oraz NRP-1. Brak informacji czy pomiar gęstości optycznej barwień dotyczył każdorazowo osobno utkania raka i podścieliska czy był pomiarem ogólnym. W tym drugim przypadku na wynikach mogła zawrzeć histologiczna budowa raków tzn. w rakach dobrze zróżnicowanych G1 cewy nowotworowe są jeszcze poprzedzielane stosunkowo dużymi polami podścieliska, natomiast gruczolakoraki niskozróżnicowane G3 mają układy lite powyżej 50%.

Kolejne 21 stron pracy zajmuje prezentacja wyników. lek. med. Małgorzata Kasprzyk-Żyszczyńska przedstawia wyniki w 5 dobrze opisanych tabelach. W mojej opinii warto by tą część wyników poszerzyć o wykresy, które w sposób graficzny przedstawiłyby różnicę w ekspresji markerów w badanych tkankach.

Dokumentacja fotograficzna nieco rozczarowuje. Doktorantka prezentuje osiem rycin zawierających łącznie 32 mikrofotografie. Ich wspólną cechą jest słaba jakość techniczna, a przyczyną użycie papieru złej jakości do zdjęć. Szkoda bo dobra jakość zdjęć mogła w znacznym stopniu uwiarygodnić wyniki.

Jednak największym błędem tej części pracy jest zastąpienie przez autorkę obowiązującego terminu „stopień złośliwości histologicznej” przez stadium. Termin ten sugeruje, że badania były wykonywane na materiale kolejnych stadiów choroby. A tak nie jest. Rak endometroidny niskozróżnicowany G3 pojawia się często od początku choroby i bardzo rzadko jest kontynuacją choroby, która początkowo była rakiem wysokozróżnicowanym G1. Mało tego często wraz ze wzrostem zaawansowania choroby stopień zróżnicowania gruczolaka rośnie i staje się on gruczolakorakiem wysokodojrzałym np. w przerzutach nowotworowych.

Dyskusja w znacznym stopniu stanowi przedłużenie oraz częściowo powtórzenie wstępu, zresztą znakomitego, do pracy. Doktorantka posiłkuje się kolejnymi 95 pozycjami piśmiennictwa dokładnie porównując i analizując otrzymane przez siebie wyniki z wynikami innych badaczy. Porusza temat terapii celowanej ukierunkowanej na angiogenezę szeroko opisując jej znaczenie dzisiaj i prawdopodobnie w przyszłości. Podkreśla, że recenzowana praca doktorska jest jedną z pierwszych prac badawczych oceniających immunohistochemicznie cztery główne ligandy VEGF oraz odpowiadającym im receptorom w raku endometrium.

Przechodząc do sześciu wniosków, pora się zastanowić czy na podstawie tak małej grupy badanych przypadków, dodatkowo o nieznanym stopniu zaawansowania klinicznego, określenia wieku pacjentek jak i jakichkolwiek wiadomości o grupie kontrolnej możemy próbować sformułować jakieś konstruktywne wnioski poza zwykłym opisem uzyskanych ekspresji badanych markerów.

Wniosek pierwszy jest odpowiedzią na cel badania. Możemy całkowicie zaakceptować część dotyczącą opisu ekspresji izoform VEGF-A i D oraz B w rakach endometroidnych i preparatach kontrolnych. Jednak postawienie wniosku o zakłóceniu limfangiogenezy w oparciu o brak ekspresji w badanych przypadkach jak i grupie kontrolnej to chyba zbyt daleko idące podsumowanie.

Wniosek drugi w części opisującej narastającą ekspresję receptora R3 w miarę spadku zróżnicowania komórkowego sugerującą odbudowywanie się limfangiogenezy w guzach o niższym stopniu zróżnicowania częściowo podważa wniosek pierwszy.

Wniosek 3 przytoczę w całości. Ekspresja NRP-1 i NRP-2 rosła wraz ze spadkiem zróżnicowania komórkowego. Oznaczać to może, że jest to szlak uzupełniający limfangiogenezę. Uważam, że postawienie takiego wniosku w oparciu o wyniki statystycznie nieznamiennie nie powinno mieć miejsca. Wystarczyła by informacja, że ekspresja NRP-1 i NRP-2 była obserwowana jedynie w komórkach guza. W materiale kontrolnym tej ekspresji nie wykazano.

Wniosek czwarty. Ekspresja endogliny rosła w populacji komórek nowotworowych, co może oznaczać rosnący udział tego peptydu we wzroście guza. Wniosek ten powinien brzmieć, by być bardziej zrozumiałym, w ten sposób: w rakach endometroidnych wraz ze spadkiem stopnia zróżnicowania raka obserwowano wzrost ekspresji endogliny.

Wniosek piąty. Można przyjąć, że EDIL-3 biorąc udział w angiogenezie wraz ze wzrostem ekspresji pełni ważną rolę w przebudowie i rozwoju ściany naczynia.

EDIL-3 rośnie wraz ze spadkiem stopnia złośliwości raka to jest fakt udowodniony przez doktorantkę. Natomiast związek z przebudową i rozwojem ściany naczyń nie został udowodniony.

Wniosek szósty. Utrata ekspresji HOXA-5 poprzez związek z p53 może sugerować ważną jego rolę w tworzeniu się guzów. Zdaniem recenzenta pojawienie się pewnej słabej, jednak wyższej niż w kontroli ekspresji w guzach G1, nieco podważa ten wniosek.

Z obowiązku recenzenta chciałem jeszcze zwrócić uwagę na liczne, drobne błędy edytorskie. Przygotowując publikację sugerowałbym zastąpić często pojawiający się termin metastaza słowem przerzut. Również, o czym pisałem wcześniej, korekty wymaga słownictwo dotyczące stopnia histologicznego zróżnicowania raka. Termin stadium G1-G3 jest niewłaściwy. W pracy jest sporo błędów gramatycznych i edytorskich. Np. na stronie 55 czytamy: „ekspresja tego białka ujawniała się w pojedynczych komórkach zrębu i w części komórek zrębowych”, czy też: oceniając ekspresję VEGF-R1 w badanych strukturach wykazałam, że ogólna gęstość optyczna produktu reakcji immunohistochemicznej na ten parametr była wyższa niż w kontroli”. Proponował bym również zastąpić wyrażenie niski wskaźnik obrotu komórek, terminem niski współczynnik proliferacji komórek.

Reasumując, mimo wielu uwag krytycznych pracę w całości oceniam pozytywnie jako interesującą i dotykającą bardzo istotnych zagadnień wiążących się z angiogenezą w nowotworach. Zdaję sobie sprawę z trudu jaki doktorantka włożyła w jej przygotowanie. Imponująca liczba cytowanych prac, dobrze napisany wstęp i dyskusja stanowią przede wszystkim o wartości tej pracy. Niezwykle trudny temat pracy, mógłby być z powodzeniem tematem pracy habilitacyjnej.

Podsumowując, lek. med. Małgorzata Kasprzyk-Żyszczyńska wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną w zakresie biologii molekularnej, patomorfologii oraz ginekologii oraz posiada umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Upoważnia mnie to do zwrócenia się do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach o dopuszczenie lek. med. Małgorzaty Kasprzyk-Żyszczyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Patologii Nowotworów
prof. dr hab. n. med. Dariusz Łan