

dr hab. n. med. Agnieszka Kuchta
Zakład Chemii Klinicznej
Katedra Analityki Klinicznej
Gdański Uniwersytet Medyczny
Marii Skłodowskiej-Curie 3a,
80-210 Gdańsk

Gdańsk 18 09 2024

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Wrzeszcz

pt. **„Ocena wartości prognostycznej wybranych czynników hemostatycznych oraz zmiana ich stężenia w odpowiedzi na zastosowane leczenie uzupełniające u pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi”**

Promotor pracy dr hab. n. med. Barbara Ruszkowska-Ciastek

Katedra Patofizjologii Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy

Przedstawiona do recenzji praca doktorska, analizuje powiązania pomiędzy funkcjonowaniem układu hemostatycznego a występowaniem i przebiegiem chorób nowotworowych, poruszając tym samym ważne klinicznie i aktualne zagadnienie poszukiwania nowych biomarkerów poprawiających ocenę rokowania i dobór spersonalizowanej terapii u pacjentek z rakiem piersi.

Rak piersi jest w Polsce najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet i mimo obserwowanego rozwoju diagnostyki oraz terapii główną przyczyną zgonów nowotworowych wśród kobiet na świecie. Trudności w postępowaniu diagnostyczno-terapeutycznym wynikają między innymi z dużej heterogenności pod względem klinicznym, histopatologicznym, molekularnym i genetycznym nowotworów piersi. Dlatego poszukiwanie nowych, łatwo dostępnych i użytecznych w codziennej praktyce klinicznej markerów jest zadaniem niezwykle istotnym i kluczowym dla rozwoju spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej w tej grupie chorych.

Badania ostatnich lat wskazują na istotną zależność pomiędzy występowaniem i progresją choroby nowotworowej a funkcjonowaniem układu hemostatycznego. Jednym z elementów zaburzenia hemostazy bezpośrednio związanym z aktywnością komórek nowotworowych jest promocja procesów krzepnięcia poprzez wytwarzanie czynników prokokoagulacyjnych, takich jak czynnik tkankowy, którego znaczenie w przebiegu choroby nowotworowej podparte jest coraz większą ilością badań. Istotne znaczenie w inwazji i

Prodziekan
Wydziału Lekarskiego
ds. Nauki

prof. dr hab. Tomasz Grzybowski

przerzutowaniu komórek nowotworowych przypisuje się także procesom fibrynolitycznym, a w szczególności elementom systemu aktywacji plazminogenu. Rola poszczególnych elementów układu aktywacji plazminogenu wydaje się być jednak wielotorowa i związana nie tylko z procesami aktywacji plazminy, a ich znaczenie jako prognostycznych biomarkerów w raku piersi jest niejednoznaczne i wymaga pilnych badań.

W ramach przedstawionego projektu w grupie pacjentek z inwazyjnym rakiem piersi podjęto próbę oceny wartości prognostycznej osoczowego stężenia wybranych czynników hemostatycznych w tym elementów układu krzepnięcia: czynnika tkankowego (TF) i inhibitora szlaku czynnika tkankowego (TFPI) oraz fibrynolizy: tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), aktywatora plazminogenu typu urokinazy (u-PA), inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1). Przeanalizowano wpływ leczenia uzupełniającego na badane parametry. Przeprowadzono także analizę porównawczą wybranych czynników hemostatycznych w odniesieniu do parametrów demograficzno-antropometrycznych oraz kliniczno-patologicznych.

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi zbiór spójnych tematycznie dwóch prac eksperymentalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach naukowych o łącznym IF=7,1, punktacja MNiSW=210 pkt.. Zaprezentowane prace są publikacjami wieloautorskimi, co jest uzasadnione biorąc pod uwagę zakres prowadzonych prac eksperymentalnych i podjętą problematykę badawczą. W obu publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem, a jej wkład w zaplanowanie, przeprowadzenie, analizę badań oraz powstanie artykułu nie budzi wątpliwości.

Zebrane publikacje zostały poprzedzone ciekawym, obszernym, liczącym 63 strony, wstępem, w którym doktorantka opisując zagadnienia hemostazy zarówno w stanach fizjologicznych jak również w chorobach nowotworowych stopniowo wprowadza czytelnika w poruszaną problematykę badawczą, wyjaśniając jednocześnie znaczenie i aktualność podjętego celu badań. Wstęp wzbogacony został o 8 tabel i 13 rycin, które znacznie ułatwiają odbiór i podsumowują przedstawione informacje. Bibliografia wykorzystana we wstępie liczy 189 pozycji z czego 70% to publikacje z ostatnich 10 lat. Przedstawiona do oceny rozprawa zawiera ponadto streszczenie w języku polskim i angielskim, opis celów badań oraz główne wnioski pracy, a także wykaz skrótów i prac wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.

W pierwszej, z przedstawionych do oceny prac, opublikowanej w 2022 roku w Journal of Clinical Medicine autorzy objęli badaniem i obserwacją 41 kobiet w wieku 45-69 lat z rozpoznanym pierwotnym jednostronnym rakiem piersi bez przerzutów odległych. U wszystkich pacjentek przed rozpoczęciem leczenia, metodami immunochemicznymi,

oceniono stężenie t-PA, u-PA, PAI-1 oraz stężenie kompleksów PAI-1/t-PA, PAI-1/u-PA. W okresie obserwacji którego mediana wynosiła 66 miesięcy odnotowano 4 przypadki wznowy choroby nowotworowej oraz 5 zgonów spowodowanych ogólnoustrojową chorobą przerzutową.

Jak pokazują badania ostatnich lat oceniane w pracy elementy fibrynolityczne odgrywają istotną, choć skomplikowaną rolę w inwazji i przerzutowaniu komórek nowotworowych. Układ aktywatora plazminogenu z jednej strony, poprzez katalizowanie degradacji białek błony podstawnej i macierzy pozakomórkowej, ułatwia inwazję komórek nowotworowych, z drugiej strony wydaje się pełnić istotną rolę w procesach nowotworzenia, poprzez regulację mechanizmów niezwiązanych bezpośrednio z procesami aktywacji plazminy. Znaczenie poszczególnych elementów układu aktywatora plazminogenu od lat budzi duże zainteresowanie jednak ich rola jako biomarkrów prognostycznych w raku piersi nie została jak dotąd jednoznacznie udokumentowana.

W wyniku przeprowadzonych w pracy badań i wykorzystania szerokiego panelu analiz statystycznych za najsilniejszy predyktor nawrotu choroby, wśród badanych elementów fibrynolitycznych, uznano całkowite stężenie t-PA, którego wyższe stężenie było istotnie powiązane z dłuższym czasem wolnym od choroby. Wykazano także, że pacjentki z niskim poziomem aktywnej formy PAI-1 charakteryzowały się znacząco dłuższym czasem przeżycia. Na uwagę i wyróżnienie zwraca ciekawa dyskusja zawarta w omawianej publikacji, która podsumowuje kliniczne znaczenie uzyskanych wyników, umieszcza je w kontekście innych, często sprzecznych wyników badań, wskazując jednocześnie na potencjalne kliniczne i metodyczne przyczyny obserwowanych rozbieżności. O dużej dojrzałości naukowej mgr Katarzyny Wrzeszcz świadczy także jasne wypunktowanie słabych punktów pracy i wskazanie na konieczność prowadzenia dalszych badań przed wyciągnięciem klinicznie użytecznych wniosków.

Moje wątpliwości budzi jedynie opis analizowanych parametrów. Zarówno w publikacji jak i w podsumowaniu projektu pojawia się pojęcie aktywności PAI-1. Na rynku dostępne są testy pozwalające ocenić aktywność PAI-1 jednak zgodnie z przedstawionym opisem metod załączone w pracy wyniki uzyskano przy pomocy testów ELISA, które ewentualnie mogą pozwolić na ocenę stężenia określonej/aktywnej formy białka. Dodatkowo mając na uwadze osiągnięte wyniki i szeroki panel analizowanych parametrów interesuje mnie czy podjęto próbę analizy zależności pomiędzy całkowitym stężeniem t-PA a stężeniem kompleksu PAI-1-t-PA.

Zagadnienia znaczenia hemoostazy w kontekście rozwoju i terapii raka piersi są także tematem drugiej z recenzowanego cyklu pracy, opublikowanej w 2023 roku w czasopiśmie *Life*. Jednym z kluczowych elementów zaburzenia procesów hemostazy jest związana z aktywnością komórek nowotworowych promocja skrzepu. Wśród prookoagulacyjnych czynników wytwarzanych przez komórki nowotworowe nadekspresja TF odgrywa kluczową rolę w kaskadzie krzepnięcia związanej z procesem nowotworowym. Wysoka ekspresja TF w tkance nowotworowej wydaje się być z jednej strony powiązana z progresją choroby i gorszymi wynikami klinicznymi z drugiej może mieć istotne znaczenie w rozwoju powikłań stosowanej terapii. Celem recenzowanej pracy była ocena wpływu leczenia uzupełniającego na stężenie i aktywność czynników układu homeostazy w tym TF, TFPI, t-PA oraz PAI-1 a także analiza przydatności badanych parametrów w przewidywaniu ryzyka nawrotu choroby nowotworowej. Badaniem objęto 60 pacjentek z pierwotnym inwazyjnym rakiem piersi. W okresie obserwacji, z medianą wynoszącą 71 miesięcy, odnotowano 9 zgonów wynikających z ogólnoustrojowej choroby przerzutowej oraz 3 przypadki wznowy choroby. Próbkę krwi od pacjentek pobierano dwukrotnie - 24 godziny przed planowaną operacją oraz 8 miesięcy po operacji usunięcia guza. W tym okresie pacjentki zostały poddane uzupełniającej terapii przeciwnowotworowej.

Uzyskane wyniki i przeprowadzone analizy statystyczne wskazują, że w grupach pacjentów u których zastosowano radioterapię, chemioterapię lub hormonoterapię jako jedyną formę leczenia adiuwantowego, nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian w analizowanych biomarkerach hemostatycznych poza stężeniem PAI-1, którego istotny wzrost zaabsorbowano w każdej z analizowanych grup pacjentów. Natomiast u pacjentów ze skojarzoną terapią uzupełniającą odnotowano istotnie zwiększenie stężenie TF, PAI-1, a także wzrost aktywności TFPI i TF, przy istotnym obniżeniu stężenia t-PA. Na podstawie uzyskanych wyników doktorantka przedstawiła wniosek, że skojarzona terapia uzupełniająca, ale nie monoterapia, ma istotny wpływ na poziom biomarkerów hemostazy. Mając na uwadze różny zakres zastosowanego leczenia chirurgicznego, brak informacji czy rodzaj zastosowanego leczenia uzupełniającego był powiązany z zakresem leczenia operacyjnego oraz wyniki przedstawione w tabeli 2 i 3 wskazujące istotne różnice zmian analizowanych parametrów w grupach uwzględniających rodzaj pierwotnego leczenia, interesuje mnie czy zdaniem doktorantki zastosowany schemat badania, w którym próbki od pacjentek pobierano przed leczeniem chirurgicznym może mieć istotny wpływ na uzyskane wnioski dotyczące terapii uzupełniającej.

W prezentowanym badaniu poza oceną wpływu terapii na analizowane parametry hemostazy przeanalizowano także wartość prognostyczną badanych markerów. Na podstawie przeciętnego 6 letniego okresu obserwacji wykazano wyższą częstość zgonów z powodu raka lub nawrotu choroby u pacjentów z wyższymi wyjściowymi poziomami TF i stężeniem PAI-1. Analiza markerów w próbkach uzyskanych po leczeniu wykazała dodatkowo, że wyższe stężenie t-PA odpowiadają gorszym wynikom przeżycia.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została zredagowana w sposób staranny i przejrzysty, a uzyskane wyniki są istotnym elementem światowych badań nad znaczeniem układu hemostazy w przebiegu choroby nowotworowej. W podsumowaniu projektu zabrakło mi jednak zestawienia wyników dwóch przeprowadzonych badań i końcowych wniosków dotyczących parametrów takich jak t-PA i PAI-1, które były analizowane w obu grupach badawczych.

Podsumowując stwierdzam, że mgr Katarzyna Wrzeszcz zrealizowała zakres badań będący celem dysertacji. Problem badawczy został poprawnie sformułowany. Praca zawiera oryginalne i wartościowe wyniki. Badania zostały właściwie zaplanowane, przeprowadzone i mogą stanowić ważny wkład w opracowanie klinicznie użytecznych biomarkerów wykorzystywanych w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej pacjentek z rakiem piersi.

Przedstawiona rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 ustawy Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2021 r., poz. 478 ze zm.). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o dopuszczenie magister Katarzyny Wrzeszcz do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto biorąc pod uwagę szeroki zakres prac badawczych i wartość aplikacyjną otrzymanych wyników, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Agnieszka Kuchta

dr hab. n. med. Agnieszka Kuchta

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
Katedra Analityki Klinicznej
Zakład Chemii Klinicznej
80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 7