

Dr hab. n. med. Dariusz Kajdaniuk  
Zakład Patofizjologii  
Katedra Patofizjologii i Endokrynologii  
Wydział Nauk Medycznych w Zabrze  
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

Zabrze, 20.09.2020 r.

## Ocena

### rozprawy doktorskiej mgr Joanny Toszek

#### **pt. Ocena zależności pomiędzy przedoperacyjnym stężeniem IGF-1 a fenotypem immunohistochemicznym gruczolaka przysadki u pacjentów z akromegalią**

Rozprawa doktorska przedłożona przez mgr Joannę Toszek pochodzi z Zakładu Neuroendokrynologii Międzywydziałowej Katedry Diagnostyki Laboratoryjnej i Molekularnej Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, placówki cenionej w środowisku neuroendokrynologów i endokrynologów nie tylko z powodu wysokiego profesjonalizmu w zakresie oceny immunohistochemicznej gruczolaków przysadki, ale również z powodu prowadzenia szeroko zakrojonych interesujących badań dotyczących różnych aspektów endokrynologii, w szczególności neuroendokrynologii.

Akromegalia jest rzadką chorobą spowodowaną nadmiernym wydzielaniem hormonu wzrostu (GH), zwykle przez guz przysadki. Rozpoznanie jest najczęściej stawiane z opóźnieniem, w związku z czym często dochodzi do rozwoju różnych powikłań choroby będących przyczyną zwiększonego zagrożenia przedwczesnym zgonem. Oznaczenie stężenia insulinopodobnego czynnika wzrostu -1 (IGF-1) i GH we krwi zaliczane jest do podstawowej diagnostyki biochemicznej. Diagnostyka szczegółowa obejmuje ocenę czynności większości osi hormonalnych, a także ocenę ukierunkowaną na powikłania akromegalii. Leczeniem z wyboru jest wybiórcze usunięcie gruczolaka przysadki z dostępu przez zatokę klinową, u większości pacjentów po przygotowaniu farmakologicznym. Badanie immunohistochemiczne jest „złotym standardem diagnostycznym” w pooperacyjnej ocenie guzów przysadki. Dzięki zastosowaniu specyficznych przeciwciał, można ocenić nie tylko fenotyp immunohistochemiczny (hormonalny) gruczolaka, ale także jego potencjał wzrostowy. Niedawno wprowadzono zalecenie rozszerzenia pooperacyjnego badania gruczolaków przysadki o immunohistochemiczną ocenę trzech głównych czynników transkrypcyjnych kontrolujących dojrzewanie komórek przysadki: PIT-1 odpowiadającego za różnicowanie somatotropów, laktotropów i tyreotropów, T-PIT związanego z rozwojem kortykotropów oraz SF-1 charakterystycznego dla komórek gonadotropowych. U chorych, u których leczenie neurochirurgiczne było nieskuteczne, należy stosować przewlekłe leczenie, w pierwszej kolejności analogami somatostatyny pierwszej generacji. W leczeniu drugiego rzutu należy rozważyć pasyreotyd, pegwisomant, kabergolinę lub ich kombinacje. W każdym przypadku chorych należy objąć obserwacją przez całe życie w celu monitorowania i aktywnego leczenia następstw akromegalii. Powyższe postępowanie jest w swej istocie ustawicznym staraniem o to by doprowadzić do trwałego wyleczenia pacjentów z akromegalią lub przynajmniej do zminimalizowania powikłań tej choroby. Jesteśmy (endokrynolodzy) przekonani o tym, że precyzyjna diagnoza postawiona w okresie przedoperacyjnym umożliwia wdrożenie właściwego postępowania w tym okresie tj. leczenia farmakologicznego (lub rezygnacji z niego),

kwalifikacji do zabiegu operacyjnego (czas w którym zabieg zostanie wykonany, wybór ośrodka). Postawienie precyzyjnej diagnozy przedoperacyjnej w połączeniu z wynikiem badania immunohistochemicznego guza przysadki umożliwi również określenie rokowania, radykalności zabiegu, określenie skuteczności leczenia farmakologicznego w przypadku zabiegu nieradykalnego czy też ryzyka wznowy, są to więc przesłanki do personalizacji postępowania. Oceniając zależności pomiędzy przedoperacyjnym stężeniem IGF-1 a fenotypem immunohistochemicznym gruczolaka przysadki u pacjentów z akromegalią Doktorantka wpisuje się nie tylko w aktualny trend badawczy (poznawczy), ale realizuje również zapotrzebowanie endokrynologów, neuroendokrynologów i neurochirurgów na tego typu analizę. Jest oczywiste, że nie ma lepszego miejsca w Polsce (i nie tylko) dla przeprowadzenia badania, którego treść ujęto w tytule dysertacji. Doktorantka miała wielkie szczęście, że zetknęła się z łódzką neuroendokrynologią, mogła bowiem skorzystać z wiedzy, umiejętności, doświadczenia i efektów pracy Profesorów w osobach Marka Pawlikowskiego, Jolanty Kunert-Radek, Katarzyny Winczyk. Opracowanie i zrealizowanie przez Doktorantkę tak skonstruowanego programu badawczego z zakresu neuroendokrynologii świadczy o Jej sprecyzowanych zainteresowaniach i posiadanych umiejętnościach naukowych i klinicznych.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska liczy 131 stron i została podzielona na klasyczne rozdziały stosowane w tego typu opracowaniach.

Rozpoczyna ją strona tytułowa. Tytuł w jasny sposób oddaje ogólny cel jaki postawiła sobie Autorka dysertacji.

Po stronie tytułowej następują obowiązkowe oświadczenie Autorki oraz podziękowania dla Promotora - Profesora Katarzyny Winczyk i Współpracowników.

Spis treści (2 strony) jest czytelny i stanowi odzwierciedlenie podziału rozprawy na rozdziały.

Wykaz Skróatów Stosowanych w Pracy zajmuje 3 strony. Wykaz ten jest przejrzysty, a zastosowane skróty są właściwe i nieprzypadkowe co ułatwia czytanie rozprawy. Wyjaśnienia skrótów podano w języku polskim i w zdecydowanej większości również w języku angielskim. W dużej części zawarte w Wykazie skróty powstały z pełnej nazwy w języku angielskim. Drobne uwagi: powinno być: *antibody* i raczej *transformujący czynnik wzrostu  $\beta$*  (zamiast typu  $\beta$ ).

Wstęp obejmuje 41 stron, zawiera też 7 tabel. We Wstępie, podrozdziały zawierając wiedzę ogólną przeplatają się z podrozdziałami zawierającymi wiedzę bardzo szczegółową. Zarówno części ogólne jak i szczegółowe są ujęte w kontekście aktualnych trendów naukowych w medycynie teoretycznej i klinicznej. Część ogólna pojawia się w kilku odsłonach (podrozdziały o podstawach neuroendokrynologii, aspekt fizjologiczny i patofizjologiczny neuroendokrynologii, w tym opisy działania GH i IGF-1 oraz diagnostyka, leczenie i rokowanie w akromegalii), za każdym razem na wysokim edukacyjnym poziomie. Wartościowe są również edukacyjne opisy i porównania metod analitycznych stosowanych w oznaczaniu GH i IGF-1. Ciekawe są też wątki z zakresu historii medycyny. Z kolei w części szczegółowej, fragment o zaburzeniach genetycznych prowadzących do rozwoju gruczolaków przysadki (Gruczolaki przysadki. Etiopatogeneza.) sam w sobie stanowi gotowy manuskrypt krótkiej pracy pogłądowej wartej opublikowania, podobnie tekst dotyczący fenotypu immunohistochemicznego gruczolaków z kolejnych podrozdziałów (Gruczolaki przysadki. Klasyfikacja. Gruczolaki somatotropowe przysadki. Gruczolaki klinicznie nieczynne hormonalnie.), który jest w zasadzie gotowym manuskrytem artykułu typu szkolenia podyplomowego. Wstęp jest bardzo dobrze przemyślany i ciekawy, choć wydawałoby się, że zbyt długi (stanowi 1/3 tekstu), ale po jego przeczytaniu łatwo zrozumieć, że stanowi pełne uzasadnienie dysertacji. Wstęp zawiera niezbędne do realizacji celów pracy wprowadzenie i odpowiednie definicje. Wywody i przemyślenia Autorki prezentowane w tym rozdziale są ułożone logicznie i konsekwentnie prowadzą do założeń i celów pracy. Wstęp oceniam bardzo wysoko. Drobne uwagi dotyczą edycji tekstu, m.in. powinno być: *somatotropinoma*, i raczej *transformujący czynnik wzrostu  $\beta$*  (str. 14).

Założenia pracy prowadzą do sformułowania zasadniczego Celu dysertacji (1 strona), a jest nim analiza porównawcza przedoperacyjnego stężenia IGF-1 we krwi chorych z akromegalią z fenotypem hormonalnym guza przysadki określonym w pooperacyjnym badaniu immunohistochemicznym. Dalszym celem była ocena wskaźników potencjału wzrostowego gruczolaka przysadki związanych z jego inwazyjnością i nawrotowością (Ki-67, protymozyna  $\alpha$  i receptor dla folitropiny) oraz dokonano ich porównania ze stężeniem IGF-1 przed operacją.

Rozdział Materiały i Metody (9 stron) ma typowy układ, zawarto w nim też 1 tabelę z wartościami referencyjnymi IGF-1 w zależności od wieku. Rozdział ten powinien raczej nazywać się „Materiał i Metody” Materiał kliniczny był właściwy dla realizacji celów zamierzonej pracy. Biorąc pod uwagę, że dodatni odczyn na GH obecny jest nie tylko w guzach dających kliniczne objawy akromegalii, do badania włączono także chorych z rozpoznanym przedoperacyjnie klinicznie nieczynnym hormonalnie gruczolakiem przysadki, u których w badaniu immunohistochemicznym guza wykazano dodatni odczyn na GH. W części „Materiał” zabrakło mi trochę zwrócenia uwagi na to czy wyniki IGF-1 w grupie z akromegalią dotyczyły chorych przed wprowadzeniem terapii SSA. Zastanawiałem się też, czy pacjenci 1. i 2. z Tabeli 10 (str. 66) nie powinni być zaliczeni do grupy z akromegalią. Najpewniej zakwalifikowano ich prawidłowo, do grupy z gruczolakami przysadki nieczynnymi hormonalnie, ale zabrakło mi w tym miejscu tj. w Materiale, krótkiego wyjaśnienia dlaczego, gdyż mieli jednak podwyższone stężenie IGF-1, szczególnie pacjent 1. Autorka bardzo dobrze natomiast opisała część „Metody”, podziwiałem opis metodologii badania immunohistochemicznego, a potem analizy odczynów immunohistochemicznych w mikroskopie elektronowym. Zgodnie z obowiązującymi zasadami, w celu weryfikacji reakcji fałszywie dodatnich i fałszywie ujemnych przeprowadzono odpowiednie badania kontrolne. Kontrola dodatnia, obejmowała wykonanie odczynów immunohistochemicznych na dany hormon w preparatach tkankowych wcześniej już ocenianych w Pracowni Immunohistochemii Zakładu Neuroendokrynologii i dających z konkretnym przeciwciałem pierwszorzędowym pozytywną reakcję prawie we wszystkich komórkach. Dla GH pozytywną kontrolę stanowił preparat gruczolaka typu *somatotropinoma*, w którym niemalże wszystkie komórki nowotworowe wykazywały dodatni odczyn na badany hormon. Dla PRL jako kontrolę dodatnią wykorzystano preparat gruczolaka prolaktynowego, na ACTH gruczolak o typie *kortykotropinoma*. Natomiast w ocenie gonadotropin przysadkowych i  $\alpha$ -SU zastosowano kontrolnie preparat *gonadotropinoma* współsyntetyzujący LH i FSH oraz preparat gruczolaka o typie *alfoma*. Kontrolę dodatnią dla odczynu na TSH stanowił bardzo rzadko występujący guz typu *tyreotropinoma*. Z powyższego wynika olbrzymie doświadczenie ośrodka z którego pochodzi Doktorantka.

Rozdział Wyniki (21 stron) zawiera 6 tabel i 12 rycin, które wpleciono w tekst opisujący w części ich zawartość. Rozdział ten zawiera dużą ilość obserwacji statystycznych i porównań. Metody statystyczne użyte w dysertacji zostały dobrane właściwie. Tę część pracy oceniam wysoko – jest logiczna, zrozumiała, a wcześniej dobrze zostały udokumentowane jej podstawy. Wartość samą w sobie stanowi dokumentacja fotograficzna o bardzo wysokiej jakości. Biorąc pod uwagę, że zakres wartości referencyjnych IGF-1 we krwi człowieka zmienia się wraz z wiekiem, Autorka wyliczyła i poddała analizie różnice pomiędzy przedoperacyjnym stężeniem IGF-1 a górną granicą zakresu referencyjnego dla wieku badanego pacjenta ( $\Delta$ IGF-1). Takie podejście bardzo mi odpowiada, w mojej opinii jest to jeden z elementów diagnostyki biochemicznej, który warto korelować z aspektem klinicznym. Drobne uwagi dotyczą edycji tekstu, m.in. powinno być: zakres referencyjny (str. 62, 66), CNFPA.

Dyskusja obejmuje 18 stron. Obszerna i rzeczowa dyskusja dowodzi szerokiej i rzetelnej wiedzy Doktorantki dotyczącej poruszanych zagadnień, umiejętności wykorzystania aktualnych danych z piśmiennictwa jak również umiejętności krytycznego rozpatrywania argumentów przemawiających za wnioskami. Spośród wielu fragmentów dyskusji doceniłem komentarz Autorki związany z klinicznie niemym *somatotropinoma*, w którym w zasadzie podzieliła moje wątpliwości

związane z zakwalifikowaniem wspomnianych dwóch pacjentów do jednej z grup badanych jako CNFPA. Doktorantka przytacza dane z piśmiennictwa potwierdzające niejednoznaczność zastosowanego kryterium włączenia do grupy CNFPA. W mojej opinii stwierdzenie Autorki, że sytuacja współistnienia „cichego” *somatotropinoma* z przekraczającym górną granicę zakresu referencyjnego stężeniem IGF-1 we krwi może być wynikiem nieprawidłowej budowy IGF-1 jest zbyt daleko idącą hipotezą, do postawienia której nie dostarcza żadnych dowodów naukowych i danych z piśmiennictwa. Doktorantka sama zresztą kończy ten fragment Dyskusji spostrzeżeniem, z którym się zgadzam, że w każdym przypadku rozpoznania nieczynnego klinicznie gruczolaka przysadki ocena stężenia IGF-1 we krwi jest pomocna w diagnostyce skąpoobjawowej akromegalii. Interesująca jest również końcowa część Dyskusji. Obecnie wiadomo, że parametry stosowane w rutynowej diagnostyce histologicznej (zawarte w rekomendacjach WHO) są często niewystarczające dla ustalenia rzeczywistego potencjału wzrostowego gruczolaka przysadki. Z tego powodu prowadzone są intensywne badania mające na celu wskazanie innych markerów, które byłyby pomocne w określeniu inwazyjności czy nawrotowości nowotworu. Pionierskie prace prowadzone w Łodzi pod kierunkiem profesora Marka Pawlikowskiego dotyczyły dwóch wskaźników - protymozyny  $\alpha$  i receptora dla folitropiny. Doktorantka przedstawia wyniki badań nad tymi parametrami oraz Ki-67 w zależności od fenotypu immunohistochemicznego guzów przysadki i porównuje swą analizę z danymi z piśmiennictwa. W większości Dyskusji Autorka doskonale dobierała dowody, które dokumentują Jej przemyślenia, a z piśmiennictwa wybrała najciekawsze fakty, choć z uwagi na skomplikowaną naturę zagadnienia było to trudne.

Proponowane Wnioski w liczbie 7 znajdują oparcie w całości wywodów Doktorantki, a większość z nich nosi w sobie pierwiastki nowości, wszystkie są klinicznie wartościowe: 1. Gruczolaki przysadki dające kliniczne objawy akromegalii wykazują w badaniu immunohistochemicznym różne profile hormonalne – najczęściej są to guzy wielohormonalne, a rzadziej gruczolaki somatoprolaktynowe i monohormonalne guzy somatotropowe. 2. Gruczolaki klinicznie nieczynne hormonalnie z dodatnim odczynem na hormon wzrostu w ocenie immunohistochemicznej są zazwyczaj guzami wielohormonalnymi. 3. U chorych z akromegalią przedoperacyjne stężenie IGF-1 we krwi, zależy od fenotypu immunohistochemicznego guza – najniższe wartości występują u osób z tzw. „czystym” gruczolakiem somatotropowym, a zdecydowanie wyższe u chorych z somatoprolactinoma i gruczolakiem wielohormonalnym. 4. U osób z gruczolakami klinicznie nieczynnymi hormonalnie wykazującymi dodatni odczyn immunohistochemiczny na hormon wzrostu przedoperacyjne stężenie IGF-1 mieści się zazwyczaj w zakresie referencyjnym. 5. W obu grupach badanych gruczolaków przysadki nie stwierdzono korelacji pomiędzy wartościami wskaźnika proliferacji Ki-67 a przedoperacyjnymi stężeniami IGF-1 we krwi chorych. 6. W gruczolakach przysadki odczyn na protymozynę  $\alpha$  wykazuje bardzo zróżnicowane nasilenie. Zarówno u pacjentów z akromegalią jak i u chorych z gruczolakami klinicznie nieczynnymi hormonalnie nie stwierdzono statystycznej zależności pomiędzy odczynem na protymozynę  $\alpha$  i przedoperacyjnym stężeniem IGF-1. 7. Gruczolaki przysadki dające objawy akromegalii, szczególnie makrogruczolaki, charakteryzują się większą ilością komórek posiadających receptory dla folikulotropiny (FSHR) niż gruczolaki klinicznie nieczynne hormonalnie z dodatnim odczynem immunohistochemicznym na hormon wzrostu. W badanych gruczolakach nie stwierdzono statystycznej zależności pomiędzy nasileniem odczynu na FSHR a przedoperacyjnym stężeniem IGF-1. Doktorantka sformułowała też (co mi odpowiada) Wniosek końcowy stanowiący podsumowanie rozprawy: U chorych z akromegalią przedoperacyjne stężenie IGF-1 jest związane z fenotypem hormonalnym gruczolaka przysadki, natomiast nie ma zależności pomiędzy stężeniami IGF-1 i immunohistochemicznymi wskaźnikami wzrostu guza – antygenem Ki-67, protymozyną  $\alpha$  i receptorem dla folitropiny. Wnioski korespondują z Celami, a Autorka zrealizowała postawione przed sobą zadania. Zastanawiam się jednak czy we wniosku 3. zamiast „najniższe wartości” nie powinno

być raczej „niższe wartości”? Akceptuję wniosek 4., proponuję jednak by w ewentualnych publikacjach zachować jego otwarty charakter i opatrzyć komentarzem.

Piśmiennictwo, w większości anglojęzyczne, nie pomijające jednak istotnych doniesień polskich składa się z 253 pozycji ułożonych według kolejności cytowania. Dobór piśmiennictwa jest w podjętym temacie kompletny, stoi na bardzo wysokim poziomie.

Dysertacja zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim (po 4 strony). Wydaje się, że powinna zawierać też słowa kluczowe w obu tych językach.

Rozprawę doktorską czytałem z przyjemnością i dość szybko uświadomiłem sobie, że Autorkę cechuje zarówno dbałość o język i edycję tekstu, jak również dbałość o zawartość merytoryczną publikacji. Pod względem edycyjnym rozprawa jest opracowana bardzo starannie, wręcz perfekcyjnie. Zauważone przez mnie drobne błędy literowe i edycyjne są w tak dużych opracowaniach trudne do uniknięcia.

Przechodząc do zbiorczej oceny rozprawy doktorskiej przedłożonej przez mgr Joannę Toszek stwierdzić trzeba, że dysertacja ta dotyczy zagadnienia aktualnego, ważnego i interesującego nie tylko ze względów poznawczych, lecz także – może nawet przede wszystkim ze względów praktycznych, klinicznie użytecznych. Autorka udowodniła między innymi, że u chorych z akromegalią przedoperacyjne stężenie IGF-1 jest związane z fenotypem hormonalnym gruczolaka przysadki, a nie ma zależności pomiędzy stężeniami IGF-1 i immunohistochemicznymi wskaźnikami wzrostu guza – antygenem Ki-67, protymozyną  $\alpha$  i receptorem dla folitropiny. Wpisała się więc w najnowsze trendy badawcze i poszerza nasz pogląd na to jak przełożyć się może fenotyp immunohistochemiczny guza przysadki na wyniki badań hormonalnych. Jej zasługą jest poszerzenie możliwości postawienia precyzyjnej diagnozy u pacjentów z akromegalią.

Oceniana rozprawa wskazuje na bardzo dobrą ogólną wiedzę teoretyczną w zakresie endokrynologii, a w szczególności neuroendokrynologii, a także dowodzi umiejętności prowadzenia pracy badawczej w tym zakresie. Zebrany materiał jest wystarczający dla należytego udokumentowania wniosków a metodyka postępowania badawczego jest dobrana właściwie oraz precyzyjnie opisana. Powyższe spostrzeżenia i uwagi recenzenta w żadnym wypadku nie podważają znaczenia uzyskanych wyników. Autorkę cechuje umiejętność właściwego postawienia aktualnego problemu badawczego oraz poprawnego jego rozwiązania w granicach określonych celem badań, a oceniana rozprawa nosi cechy samodzielnego dorobku naukowo-badawczego.

Zdaniem Recenzenta zakres prowadzonych badań, rzetelność ich wykonania i udokumentowania, ich pracochłonność a nade wszystko kliniczna wartość merytoryczna uzyskanych wyników uzasadniają wystąpienie o wyróżnienie pracy.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z późn. zm).

Zgłaszam przeto do Wysokiej Rady Wydziału Wojskowo-Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, wniosek o dopuszczenie mgr Joanny Toszek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Donini Karłowicz