

## **Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych z dziedziny medycyny**

**lek. med. Marka Gowkielewicz**

**pt.: „Ekspresja hormonu anty-Müllerowskiego w tkance raka endometrium”**

Promotor: prof. dr hab. med. Marcin Józwick

Hormon anty-Müllerowski (AMH), produkowany jest przez komórki Sertolego w jądrze i komórki ziarniste w jajniku. Swoją nazwę AMH zawdzięcza roli, jaką odgrywa w życiu płodowym, powodując u płodów płci męskiej zanik struktur powstających z przewodów Müllera. U płodów płci żeńskiej, przy nieobecności testosteronu i AMH, dochodzi do przekształcenia przewodów Müllera w żeńskie wewnętrzne narządy płciowe i zaniku przewodów Wolffa. AMH jest glikoproteiną należącą do cytokin z grupy transformujących czynników wzrostu (TGF- $\beta$ ), działającą przy udziale dwóch typów receptorów błonowych AMHRI i AMHRII.

Zanik przewodów Müllera u płodów męskich odbywa się między innymi na drodze apoptozy i autofagocytozy. Badania in vitro i in vivo wykazały, że AMH działając przez receptor AMHRII hamuje cykl komórkowy i indukuje apoptozę w komórkach nowotworowych. Stąd, niedaleko już do postawienia hipotezy, mówiącej o tym, że potwierdzenie obecności specyficznych dla AMH receptorów w komórkach nowotworowych będzie miało implikacje nie tylko diagnostyczne, lecz również będzie wpływało na przebieg choroby.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska lek. med. Marka Gowkielewicz pt.: „Ekspresja hormonu anty-Müllerowskiego w tkance raka endometrium” nawiązuje do wspomnianego nurtu badawczego. Jej zasadniczą część stanowi publikacja, która ukazała się w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences vol. 20 (6) w marcu 2019 roku. Impact Factor czasopisma wynosi 3.687. Doktorant jest jej pierwszym i korespondencyjnym autorem. Poza tym w skład zawierającej 43 strony rozprawy wchodzi: ankieta pracy zawodowej doktoranta, streszczenia w języku polskim i angielskim oraz część stanowiąca przedstawienie grupy i metod badawczych, omówienie wyników i wnioski w języku polskim.

Praca pt. „Anti-Müllerian hormone expression in endometrial cancer tissue” stanowiąca rozprawę dokorską to 18 stron maszynopisu. Składa się z pięciu części: wprowadzenie, wyniki, dyskusja, materiał i metoda, piśmiennictwo i ze streszczenia. Nietypowy układ, w którym część opisująca materiał i metodykę badania umieszczony jest po prezentacji wyników i dyskusji narzucony był zapewne przez wydawcę pisma. Praca zawiera pięć tabel i cztery ryciny a jej podbudowę stanowią 124 pozycje piśmiennictwa.

We wstępie opisane zostały mechanizmy działania i wpływ AMH w rozwoju embrionalnym oraz nowe perspektywy wykorzystania obecności receptorów AMH w komórkach nowotworowych. Autor powołuje się na publikacje mówiące o tym, że AMH działając przez tkankowo specyficzne receptory AMHRII może powodować regresję lub spowolnienie wzrostu nowotworów kobiecego narządu płciowego. Efekt ten może być wykorzystany do zastosowania AMH jako czynnika wspomagającego terapię nowotworów, wśród

.których wymienia się raka trzonu macicy i związane z nim stany przednowotworowe, ziarniszczaaka jajnika i inne guzy ze sznurów płciowych. W końcowym fragmencie wstępu autor skupia się na raku trzonu macicy jako najczęstszym nowotworze kobiecego narządu płciowego w krajach rozwiniętych. Zaznacza jednak, że do tej pory związek między AMH a ryzykiem zachorowania i przebiegiem raka endometrium „jest dwuznaczny”.

Uwzględniając opisane wyżej aspekty, jako **cel** pracy autor stawia sobie znalezienie odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy tkanka stanów przednowotworowych endometrium (PCE) oraz czy tkanka różnych typów histopatologicznych raka endometrium (EC) wykazuje ekspresję AMH ?
2. Czy AMH pochodzenia endometrialnego jest obecne u chorych na nowotwór macicy kobiet po menopauzie, czy tylko regularnie miesiączkujących ?
3. Czy ekspresja AMH dotyczy raków dobrze rokujących czy ze złą prognozą ?
4. Jakie inne czynniki mogą mieć wpływ na obecność AMH ?

**Materiał i metoda.** Przedstawienie grupy badanej a w szczególności zastosowanych metod badawczych jest wyczerpujące. Badania zostały przeprowadzone na tkankach EC oraz PCS uzyskanych w wyniku leczenia operacyjnego zgodnego z protokołem onkologicznym u 232 pacjentek. W zależności od typu histopatologicznego zmiany endometrium pacjentki podzielono na 8 grup: rozrost bez atypii, rozrost z atypią, gruczolakoraki typu I wysoko, średnio i niskozróżnicowane, gruczolakorak surowiczny, jasnokomórkowy i mieszany.

W analizie wzięto pod uwagę następujące czynniki: wiek pacjentki, typ histopatologiczny nowotworu, stopień zaawansowania klinicznego wg klasyfikacji FIGO z roku 1988, status hormonalny (okres przed-, około- i pomenopauzalny), lata aktywności hormonalnej (od pierwszego do ostatniego krwawienia miesięczkowego), indeks masy ciała – BMI, liczbę porodów, masę urodzeniową noworodków, łączny i średni czas karmienia piersią, stosowanie hormonalnej terapii zastępczej (HRT), współwystępowanie cukrzycy typu 2 oraz nadciśnienia tętniczego.

Tkanki pobrane do badań histopatologicznych zostały utrwalone zgodnie z obowiązującą procedurą , a następnie przygotowano z nich preparaty (6 µm) do standardowego barwienia hematoksyliną i eozyną.

Na skrawkach otrzymanych w wyniku zastosowania techniki mikromacierzy tkankowej TMA przeprowadzono reakcję immunohistochemiczną.

W analizie statystycznej zastosowano szeroki wachlarz testów pozwalający na ocenę różnic w ekspresji AMH między poszczególnymi rozpoznaniem histopatologicznymi oraz poszczególnymi cechami w badanych grupach. Prawdopodobieństwo dla istotnych statystycznie wyników przyjęto jako  $p < 0.05$ .

**Wyniki.** W badanej grupie ekspresję AMH w tkance endometrium stwierdzono u 23 pacjentek. Prezentację wyników autor rozpoczyna od opisu zależności między obecnością AMH a typem histologicznym zmian w endometrium, zróżnicowaniem histologicznym oraz stopniem zaawansowania. Zauważy istotną statystycznie różnicę w ekspresji AMH pomiędzy typami zmian histopatologicznych endometrium. (test Kruskala-Wallisa  $p = 0.004$ ). Obecność białka AMH potwierdzono w przypadku rozrostu bez atypii, raków typu I G1, G2 oraz w

raku jasnokomórkowym. Najsilniejszą ekspresję wykazała tkanka raka jasnokomórkowego, mniejszą rozrostów bez atypii, a najsłabszą raków typu I G1 i G2. Różnice okazały się znamienne statystycznie;  $p = 0.004$ . W pozostałych rodzajach raka nie stwierdzono ekspresji AMH.

W odniesieniu do stopni zaawansowania obecność AMH stwierdzono w stopniach I A, IB, IIA, IIIC, IV, jednak różnice w ekspresji nie były istotne statystycznie. Nie stwierdzono ekspresji AMH w stopniach II B, III A oraz III B wg FIGO.

Następnie autor opisuje zależności między obecnością AMH i uwzględnionymi w analizie czynnikami ryzyka raka endometrium takimi jak: cukrzyca typu 2, stosowanie terapii hormonalnej, wiek okołomenopauzalny lub pomenopauzalny, aktywność hormonalna dłuższa lub krótsza niż 40 lat, nadciśnienie tętnicze, liczbą porodów oraz całkowitym i średnim czasem karmienia piersią.

Zakończenie części omawiającej wyniki stanowi opis zależności ekspresji AMH od analizowanych łącznie średniego czasu karmienia piersią ( $p=0.004$ ), typu raka ( $p=0.006$ ) oraz od lat aktywności hormonalnej ( $p=0.045$ ). Nie stwierdzono żadnych istotnych interakcji między ocenianymi zmiennymi. Szansa na obecność AMH w endometrium rosła wraz z długością średniego czasu karmienia piersią, łącznie z występowaniem raka jasnokomórkowego i typu I G1, G2 oraz liczbą lat, jakie minęły od pierwszego do ostatniego krwawienia miesiączkowego (czas krótszy niż 40 lat wiązał się z mniejszą szansą na ekspresję AMH).

**Dyskusja.** Jest to mocna strona pracy. Opiera się na ok 70 pozycjach piśmiennictwa. Opisuje badania wykazujące obecność AMH nie tylko w komórkach raka endometrium, ale również w ziarniszczeniu jajnika, raku piersi, czy raku prostaty. Autor uwzględnił wiele przykładów badań genetycznych tłumaczących wpływ AMH na rozwój różnych rodzajów raka gruczołowego. Opisał również możliwy wpływ tego hormonu na zjawisko chemooporności i wskazał możliwe kierunki przyszłych badań nad rolą AMH w leczeniu nowotworów.

**Wnioski.** W oryginalnej pracy nie występuje oddzielna część poświęcona wnioskowi z badania rozumianym jako odniesienie do postawionych we wstępie celów. Taki rozdział doktorant zamieścił w polskojęzycznej części rozprawy. Przedstawił następujące wnioski.

1. Ekspresję AMH wykazano tylko w 4 typach histopatologicznych zmian endometrium: rozrostach bez atypii, rakach typu I G1 i G2 oraz, raku jasnokomórkowym. Autor pisze, że obecność AMH w raku jasnokomórkowym wiązała się z ograniczeniem jego stopnia zaawansowania – maksymalnie do połowy grubości mięśnia macicy. Biorąc pod uwagę hamujące cykl komórkowy oraz proapoptotyczne właściwości białka wydaje się, że obecność AMH wiąże się z korzystniejszym rokowniczo typem nowotworu lub ogranicza ekspansywność raka źle prognozującego.
2. Wydłużający się średni czas laktacji w połączeniu z wyżej wymienionymi typami histopatologicznymi nowotworu oraz długotrwałym okresem aktywności hormonalnej (powyżej 40 lat) miał pozytywny wpływ na ekspresję AMH. Ustanawia to okoliczności związane z potencjalnie lepszą prognozą.
3. Wykazana dodatnia korelacja nadciśnienia tętniczego oraz stosowania HRT na ekspresję AMH wymaga dalszych analiz.

4. Poziom ekspresji AMH u kobiet w wieku okołomenopauzalnym i menopauzalnym był na podobnym poziomie. Nie stwierdzono ekspresji AMH u pacjentek w młodszym wieku będącymi jednocześnie osobami aktywnymi hormonalnie (25 przypadków).
5. Uzyskane wyniki sugerują, że AMH może być potencjalnym markerem prognostycznym oraz, być może, środkiem terapeutycznym w leczeniu nowotworów z ekspresją specyficznych dla niego receptorów.

**Uwagi recenzenta.** Temat podjęty przez lek. med. Marka Gowkielewicza w jego rozprawie na stopień doktora nauk medycznych jest nowy i ciekawy. Wartość badań jest znacząca ze względu na to, że w dotychczasowym piśmiennictwie prace na temat obecności i roli AMH w nowotworach kobiecego narządu płciowego jest sporadyczna. W związku z tym pole do badań wydaje się bardzo szerokie, ale nie stanowi to ułatwienia w ich projektowaniu i prowadzeniu.

Pierwszym i kluczowym dla badania wynikiem jest potwierdzenie obecności AMH i jego receptora w tkankach zmian patologicznych endometrium. Odsetek pacjentek z potwierdzoną ekspresją AMH w badanej grupie jest co prawda niewielki i wynosi ok. 10% (23 na 232 chore), ale umożliwił dokonanie analizy statystycznej.

Doktorant analizując rozkład ekspresji AMH w zależności od różnych typów stanów przednowotworowych i raków endometrium dochodzi do wniosku, że jego obecność związana jest z dobrze rokującymi rakami typu I o zróżnicowaniu G1 i G2, wczesnym rakiem jasnokomórkowym oraz rozrostem bez atypii. Pewną wątpliwość budzi łączna analiza rozrostów i raków zwłaszcza, że obecność AMH potwierdzono w łagodnym rozroście bez atypii a nie stwierdzono w bezpośrednim prekursorze jakim jest rozrost atypowy, w obecnej nomenklaturze określanym jako śródnabłonkowa neoplazja endometrium (EIN).

W odniesieniu do stopni zaawansowania wg klasyfikacji FIGO z 1988 roku obecność AMH w grupie badanej stwierdzono w stopniach I A, IB, IIA, IIIC, IV, jednak różnice w ekspresji nie były istotne statystycznie. Nie stwierdzono ekspresji AMH w stopniach II B, III A oraz III B.

Od 2009 roku obowiązuje nowa klasyfikacja FIGO raka trzonu macicy i właśnie do niej odnoszą się obecnie wszystkie zalecenia dotyczą raków o niskim i wysokim ryzyku nawrotu. Jednocześnie klasyfikacje te różnią się zasadniczo w ramach stopnia I i III, a w tych jak wynika z przedstawionych badań najczęściej występowała ekspresja AMH. Nie znamy rozkładu stopni FIGO w zależności od rozpoznania histopatologicznego, dlatego z pewną ostrożnością podchodzę do stwierdzenia, że obecność AMH wiąże się z korzystniejszym rokowniczo typem nowotworu lub ogranicza ekspansywność raka źle prognozującego. Żywię jednak nadzieję, że w kolejnych publikacjach klasyfikacja FIGO nowego i zebranego wcześniej materiału będzie ujednoczona i podana wg zasad obowiązujących w roku publikacji pracy.

We wniosku nr 2, w polskiej części dysertacji, pojawia się pewna sprzeczność. Doktorant pisze:

„Wydłużający się średni czas laktacji w połączeniu z wyżej wymienionymi typami histopatologicznymi nowotworu oraz długotrwałym okresem aktywności hormonalnej (powyżej 40 lat) miał pozytywny wpływ na ekspresję AMH. Ustanawia to okoliczności związane z potencjalnie lepszą prognozą.” Laktacja jednoznacznie związana z rodnością stanowi powszechnie znany czynnik ochronny w stosunku do raka endometrium, natomiast długi czas miesiączkowania traktujemy jako czynnik ryzyka w raku typu I i nie odgrywające roli w raku typu II.

Opisując działanie proapoptyczne AMH traktujemy ekspresję tego hormonu jako czynnik korzystny rokowniczo. Doktorant we wniosku nr 5 stawia tezę, że może on być potencjalnym czynnikiem prognostycznym. Dla uzasadnienia takiego twierdzenia pomocna byłaby analiza porównawcza czasu do wznowy i przeżyć całkowitych w grupach chorych z ekspresją i bez ekspresji AMH.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska, a zwłaszcza stanowiąca jej podstawę praca pt.: „Anti-Müllerian hormone expression in endometrial cancer tissue” opublikowana w International Journal of Molecular Sciences 2019; vol. 20 (6) jest dobrze zaplanowanym i wykonanym projektem badawczym. Na uwagę zasługuje ciekawy dobór tematu, szeroki panel wykonanych badań oraz połączenie tematyki klinicznej z nowoczesną diagnostyką histologiczną. Wyniki badania zostały wyczerpująco omówione na tle dotychczasowej literatury. Postawione cele znalazły swoje odzwierciedlenie we wnioskach. Wymienione wyżej uwagi recenzenta w niczym nie umniejszają wartości pracy. Są one propozycją na rozwinięcie podjętego tematu.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w dziedzinie medycyny spełnia moim zdaniem warunki stawiane pracom doktorskim w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14.03.2003 o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016, poz. 882 z późniejszymi zmianami).

Wobec powyższego zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego o dopuszczenie lek. med. Marka Gowkielewicza do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

dr hab. n. med.  
PAWEŁ DERLATKA  
SPECJALISTA GINEKOLOG-ONKOLOG  
SPECJALISTA GINEKOLOG-POŁOŻNIK  
4170272



Dr hab. n. med. Paweł Derlatka

II Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii

Warszawski Uniwersytet Medyczny