

Warszawa, 14.02.2022

Prof. dr hab. n. med. Barbara Górnicka
Katedra i Zakład Patomorfologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

**Ocena rozprawy doktorskiej lek. Katarzyny Sikory pt:
„Rak wielopostaciowy płuca (*pleomorphic carcinoma*) – charakterystyka
kliniczno-patologiczna, immunofenotyp, czynniki prognostyczne
i predykcyjne”**

1. Przedstawienie podstawowych danych o Kandydatce

Pani Katarzyna Sikora uzyskała tytuł zawodowy lekarza 9-tego listopada 1990 roku po odbyciu studiów na Wydziale Lekarskim Akademii Medycznej w Warszawie (obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny), co uprawnia ją do ubiegania się o stopień naukowy doktora. Jest zatrudniona w Zakładzie Patomorfologii Klinicznej Mazowieckiego Szpitala Specjalistycznego w Radomiu. Od 01.05.2020 jest wykładowcą akademickim i prowadzi zajęcia z patomorfologii na Wydziale Lekarskim Wydziału Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu na Uniwersytecie Technologiczno-Humanistycznym w Radomiu.

Lek. Katarzyna Sikora 06.09.2021 złożyła wniosek o wszczęcie postępowania w sprawie ubiegania się o stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplinie nauki medyczne, do Dyrektora Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc dra hab. Stefana Wesołowskiego, prof. IGiChP. Wniosek został zaakceptowany 05.10.2021. W załączonej dokumentacji brak danych o ewentualnym wcześniejszym ubieganiu się o stopień doktora.

Jest drugą Autorką publikacji w czasopiśmie indeksowanym (Clin Neuropathol 2015 IF 1.11). Prowadzi działalność szkoleniową.

Przedstawiała liczne wykłady w ramach szkoleń wewnętrznych głównie z zakresu onkologii. Prezentowała także ciekawe przypadki diagnostyczne na konferencjach organizowanych przez Polskie Towarzystwo Patologów, CMKP oraz Centrum Onkologii Instytut w Gliwicach. Brała także udział w Konferencji "Badam się więc mam pewność" organizowanej przez Radomskie Centrum Onkologii. W latach 2015-2019 była Członkinią Zarządu Oddziału Warszawskiego PTP, a od roku 2018 jest Członkinią Komisji ds. Licencjonowania Zakładów Patomorfologii PTP (uczestniczyła także w przygotowaniu zasad licencjonowania).

2. Informacje o obowiązujących przepisach prawa na dzień wszczęcia postępowania, w tym obowiązujących kryteriach oceny

Recenzję przeprowadzono zgodnie z art. 187 Ustawy Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce z dnia 20 lipca 2018. Zgodnie z tym artykułem ocenie podlega: ogólna wiedza teoretyczna kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, ocena czy przedmiotem rozprawy jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i ewentualna możliwość zastosowania wyników badań. Do pracy powinno też być dołączone streszczenie w języku angielskim.

3. Recenzja

Przyjęta do recenzji praca poświęcona jest badaniom nad specyficzną postacią raka płuca jaką jest rak pleomorficzny.

Rak płuca stanowi bardzo istotny problem kliniczny i diagnostyczny. Należy do najczęściej występujących nowotworów człowieka na świecie, jest również najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów. W ciągu ostatnich 15 lat dzięki rozwojowi nauk klinicznych i podstawowych, zwłaszcza z zakresu biologii molekularnej i genetyki, dokonał się ogromny postęp w leczeniu chorych na raka płuca, co znacznie poprawiło wyniki przeżycia chorych.

Niemal wszystkie nowotwory złośliwe płuca to raki. Czyste nowotwory pochodzenia mezenchymalnego występują rzadko, jednak należy pamiętać,

że mogą występować nowotwory, które w swoim utkaniu zawierają komponent mezenchymalny lub go przypominający (*mesenchymal-like*). Komponent ten najczęściej powstaje wskutek przemiany nabłonkowo mezenchymalnej i może stanowić jedynie kilkanaście procent utkania guza ale może również dominować i całkowicie eliminować zróżnicowany komponent nabłonkowy. Do takiej grupy nowotworów należą raki wielopostaciowe (pleomorficzne) (*pleomorphic carcinoma* PC) należące do raków sarkomatoidnych. Według definicji WHO są to nisko zróżnicowane raki niedrobnokomórkowe (płaskonabłonkowe, gruczołowe lub wielkokomórkowe), które w swoim utkaniu zawierają co najmniej 10% komponentu wrzecionowatokomórkowego lub olbrzymiokomórkowego lub raki zbudowane wyłącznie z utkania wrzecionowatego lub olbrzymiokomórkowego (zwane wówczas rakami wrzecionowatokomórkowymi lub rakami olbrzymiokomórkowymi). Ze względu na różnorodne utkania w obrębie jednego guza ostateczne rozpoznanie raka wielopostaciowego jest możliwe na podstawie badania histopatologicznego materiału pooperacyjnego. Rozpoznanie opiera się na cechach morfologicznych często jest rozszerzone o badania immunohistochemiczne. Jednak panel przeciwciał mających znaczenie w wygenerowaniu ostatecznego raportu histopatologicznego jest nieustalony. Raki wielopostaciowe występują rzadko, stanowią około 2-3% wszystkich raków niedrobnokomórkowych płuca. Uważa się, że charakteryzują się agresywniejszym przebiegiem i gorszym rokowaniem niż inne raki niedrobnokomórkowe. Ze względu na rzadkość występowania, badania opierają się zwykle na niewielkich grupach chorych i ich przebieg kliniczny i strategia leczenia nadal pozostawiają wiele niewiadomych. Stąd podjęcie przez lek. Katarzynę Sikorę tematu szczegółowej charakterystyki kliniczno-patologicznej, immunofenotypu, czynników prognostycznych i predykcyjnych raków wielopostaciowych opartej na dużej liczbie przypadków jest niewątpliwie ważne, aktualne i potrzebne praktycznie.

Praca ma typowy układ, liczy 154 strony maszynopisu, zawiera jeden załącznik, 56 tabel, 15 rycin i zilustrowana jest 28 fotografiami.

W liczącym 19 stron **wstępie** Autorka w kolejnych podrozdziałach przedstawia aktualny stan wiedzy dotyczącej raka wielopostaciowego płuca (epidemiologia, charakterystyka kliniczna, rokowanie, klasyfikacja histopatologiczna, klasyfikacja TNM). Szczególną uwagę zwróciła na badanie mikroskopowe z uwzględnieniem podtypów morfologicznych, diagnostyki immunohistochemicznej, diagnostyki różnicowej i badań molekularnych. Opisała również rolę pewnych czynników prognostycznych i predykcyjnych takich jak ocena ekspresji PD-L1 (czynnik prognostyczny i mogący mieć zastosowanie we wdrożeniu immunoterapii), ocena szerzenia się raka przestrzeniami powietrznymi STAS (ważny czynnik prognostyczny) czy ocena markerów przemiany nabłonkowo mezenchymalnej, których wartość prognostyczna i diagnostyczna w raka pleomorficznych nie jest do końca ustalona. Wstęp kończy krótki podrozdział opisujący strategię terapeutyczną. We wstępie umieszczono 11 fotografii mikroskopowych (przy publikacji wyników sugerowałabym użycia większych powiększeń co poprawiłoby ich czytelność).

Kolejny rozdział to założenia pracy. W rozdziale tym Autorka podkreśla ubogi i niejednoznaczny stan wiedzy na temat raka wielopostaciowego i tym uzasadnia podjęcie badań.

Cel badań został przedstawiony w rozdziale trzecim. Autorka założyła sobie przeprowadzenie retrospektywnej analizy grupy chorych z rozpoznaniem raka wielopostaciowego, wrzecionowatokomórkowego i olbrzymiokomórkowego płuca, korelację cech morfologicznych i immunofenotypu z danymi klinicznymi oraz określenie czynników predykcyjnych i prognostycznych. Do osiągnięcia założonego celu wykonała:

1. Szczegółową analizę morfologiczną wymienionych powyżej typów raków z określeniem cech histopatologicznych (rodzaj i ilość komponentów nabłonkowego i mięsakowego, rozległość martwicy,

- nasilenie nacieku zapalnego, obecność zatorów z komórek raka w świetle naczyń krwionośnych i chłonnych oraz naciekanie opłucnej)
2. Ocenę immunofenotypu z zastosowaniem przeciwciał przeciwko CKAE1/AE3, TTF1, p40 oraz przeciwciał będących markerami przemiany nabłonkowo mezenchymalnej (wimentyna, E-kadheryna, ZEB1).
 3. Ocenę ekspresji białka PD-L1 (we wszystkich komponentach raka) i jej korelację z typem histopatologicznym, immunofenotypem i ekspresją markerów przemiany nabłonkowo mezenchymalnej (wimentyna, E-kadheryna, ZEB1).
 4. Analizę STAS i jego korelację z ekspresją białka PD-L1 i ekspresją markerów przemiany nabłonkowo mezenchymalnej (wimentyna, E-kadheryna, ZEB1).

Jako ostatni cel szczegółowy Autorka założyła sobie stworzenie listy czynników prognostycznych i predykcyjnych, które mogą mieć istotne znaczenie dla przebiegu choroby i jej leczenia.

Materiał i zastosowane metody badawcze.

Początkowo do grupy badanej włączono 123 pacjentów z rozpoznaniem raka sarkomatoidnego, pleomorficznego, wrzecionowatokomórkowego oraz olbrzymiokomórkowego, leczonych operacyjnie w Klinice Chirurgii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc (IGiChP). Po reklasyfikacji i wyłączeniu pacjentów, którzy przed zabiegiem otrzymywali chemioterapię ostatecznie do grupy badanej zakwalifikowano 107 przypadków. Ze względu na dostępność danych oraz możliwości oceny pewnych czynników badana grupa nie zawsze wynosiła 107 chorych (np. dane dotyczące objawów klinicznych były dostępne u 101 chorych, możliwość oceny wskaźników OC i PFS u 70 chorych, a STAS u 99 chorych) – dla większej przejrzystości wydaje mi się, że informacje te powinny być umieszczone w rozdziale metody.

Dane kliniczne uzyskano z zasobów bazy informatycznej IGiChP (poszerzone o informacje na temat zgonów zasięgnięte z Powszechnego Elektronicznego Systemu Ewidencji Ludności). Jako wskaźniki kliniczne zastosowano przeżycie całkowite (OS) i przeżycie wolne od choroby (DFS). Trochę brakuje mi w tym miejscu danych metodycznych do określenia DFS dotyczących szczegółowej analizy obserwacji klinicznych – co Autorka uznała za zdarzenie kończące DFS, czy wszyscy chorzy byli poddawani regularnym badaniom, takim samym, w porównywalnych okresach czasu? W jaki sposób byli leczeni? Czy chorzy zoperowani niedoszczętnie byli wyłączeni z badanej grupy?

W każdym przypadku zostało określone: typ histopatologiczny zgodny z klasyfikacją WHO z 2015 (kryteria oceny nie różnią się od aktualnej klasyfikacji z 2021 roku), typ i rozległość utkania nabłonkowego i mięsakowego (czy rozległość poszczególnych utkań była opisywana w określonych przedziałach?), inwazje naczyń (BVI i LVI), naciekanie opłucnej, rozległość martwicy (w skali 0-3), nacieki zapalne (w skali od 0 do 3) (w jaki sposób określano włóknienie wykorzystywane w dalszych badaniach?), STAS (obecność oraz liczbę ognisk co pozwoliło określić status *low* i *high*), stopień zaawansowania klinicznego i patologicznego według skali TNM (według klasyfikacji z 2017 roku, edycja 8). Barwienia immunohistochemiczne wykonano zgodnie z wymogami określonymi w specyfikacjach z pozytywną kontrolą zewnętrzną lub wewnętrzną, a w przypadku oceny ekspresji PD-L1 także z kontrolą negatywną. Odczyny immunohistochemiczne (z wyjątkiem PD-L1) oceniano biorąc pod uwagę nasilenie i rozległość reakcji – w ostatecznej ocenie stosowano skalę trzystopniową – brak ekspresji, ekspresja niska lub wysoka. Ekspresję PD-L1 uznawano za dodatnią bez względu na nasilenie reakcji; oceniano odsetek komórek dających reakcję pozytywną, ostatecznie w skali 3-stopniowej. W pracy zastosowano prawidłowe metody statystyczne.

Rozdział 5-ty zawiera wyniki. Podrozdział 5.1 to wyniki odnoszące się do danych klinicznych. Dane dotyczące objawów klinicznych były dostępne u 101

chorych, dane dotyczące palenia papierosów były dostępne u 81 pacjentów. Autorka zamieściła dane epidemiologiczne (częstość występowania raka wielopostaciowego w odniesieniu do wszystkich operowanych raków płuca wynosi 1,6%), oraz dane dotyczące lokalizacji i obrazu klinicznego choroby w badanym materiale PC częściej były stwierdzane u mężczyzn, częściej u palaczy papierosów, zlokalizowane były częściej obwodowo. Dane dotyczące okresu po zakończonym leczeniu operacyjnym były dostępne u 70 osób. Zauważono nieścisłość w tab. 3 i 4. Grupą badaną w tych przypadkach była grupa 70 osób, a nie 107. Wobec tego bez wznowy były 62 osoby, a bez przerzutów – 47 osób. Zmiana ta nie ma wpływu na pozostałe dane w obu tabelach. Wznowa miejscowa wystąpiła u 8 chorych (średnio po 2,6 lat) a przerzuty odległe u 23 chorych (średnio po 1,24 latach). Inne dane podane są w streszczeniu str. 122 (pomyłka? które z nich są prawdziwe i które stosowane są w dalszych obliczeniach?). Najliczniejszą grupę stanowili chorzy operowani w stadium pT2 (37,4%), w stadium pT1 operowano tylko 4 przypadki (3,7%). Najczęściej stwierdzano III stopień zaawansowania klinicznego. Podrozdział 5.3 odnosi się do typów histopatologicznych. W 85 przypadkach w utkaniu PC stwierdzono zróżnicowane utkanie nabłonkowe (AC, LCC, SCC i ME), w 22 przypadkach histopatologicznie utkanie raka stanowił wyłącznie komponent mięsakowaty. Tabela 6 (zgodnie z podpisem) przedstawia udział poszczególnych typów utkania nabłonkowego w badanych guzach. Podano liczbę przypadków poszczególnych typów zróżnicowanych raków, jednak policzone odsetki nie odnoszą się do badanych guzów (107 przypadków) tylko do grupy 85 osób z widocznym rakiem zróżnicowanym. Dość krótko opisane jest w jaki sposób Autorka ocenia rozległość obu utkań nowotworu (czy oceniano ją w jakiś przedziałach?). Na końcu tego podrozdziału Autorka umieściła dane o korelacji (a raczej w większości przypadków jej braku) typu zróżnicowanego utkania nabłonkowego oraz mięsakowatego z martwicą, naciekaniem opłucnej, inwazją naczyń krwionośnych i limfatycznych, obecnością STAS, ekspresją ZEB1, wielkością

zmiany i stopniem zaawansowania. Inwazja naczyń limfatycznych występowała najczęściej w PC z mieszanym utkaniem raka zróżnicowanego, a najrzadziej w raku wielkokomórkowym. Wykazano brak korelacji inwazji naczyń limfatycznych z typem utkania mięsakowego. Kolejny podrozdział odnosi się do martwicy. Wykazano istotność statystyczną pomiędzy nasileniem martwicy i stopniem zaawansowania klinicznego i patologicznego. Nie wykazano istotności statystycznej w badaniu korelacji z typem histopatologicznym raka, typem komponentu mięsakowego, LVI, BVI, pN, STAS i ekspresją ZEB1. Informacja, że w analizie OS i DFS przyjęto punkt odcięcia na poziomie 25% powinna być umieszczona w metodach. W większości przypadków PC obserwowano zatory z komórek nowotworowych w naczyniach chłonnych i częściej w krwionośnych. Wykazano korelacje LVI z typem zróżnicowanego utkania nabłonkowego oraz korelację BVI z pT. Nie wykazano istotności statystycznej z pozostałymi badanymi parametrami. Podrozdział 5.6 poświęcony jest badaniom immunohistochemicznym. Wykazano dodatnią reakcję z CKAE1/E3 w komponentie nabłonkowym we wszystkich guzach oraz w komponentie mięsakowym około 90% guzów. Ekspresja ZEB1 była wyraźnie wyższa w komponentie mięsakowym (uwaga ogólna: w opisie nie należy porównywać liczb z odsetkami w grupach o różnej liczebności). Do analizy statystycznej Autorka podzieliła wszystkie przypadki na 4 grupy w zależności od ekspresji cytokeratyny AE1/AE3 i wimentyny, przy czym w grupach tych brano pod uwagę ekspresję cytokeratyny jedynie w komponentie zróżnicowanego raka (nie uwzględniono komponentu mięsakowego), a wimentyna brana była pod uwagę w obu komponentach. Ten podział na grupy nie jest dla mnie do końca jasny gdyż odczyn z CKAE1/AE3 w komponentie nabłonkowym był dodatni we wszystkich przypadkach i nie różnicował grup. Tak naprawdę grupy te powstały w zależności od ekspresji wimentyny w obu komponentach. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności z wielkością zmiany, stopniem zaawansowania LVI, BVI, ekspresją PD-L1 i STAS. ZEB1 najczęściej był

dodatni w grupie z negatywnym odczynem z wimentyną. Następnie badano związki pomiędzy ekspresją wimentyny w komponencie mięsakowym i pozostałymi parametrami. Wykazano istotny związek dodatniej ekspresji ZEB1 z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych ($p=0,033$). Kolejny podrozdział poświęcony jest ekspresji PD-L1. W tab. 15 przedstawiono ekspresję PD-L1 w całym guzie i poszczególnych komponentach. Mam zastrzeżenie co do liczenia odsetek w komponencie nabłonkowym. Grupa badana wynosi w tych przypadkach 85 osób a nie 107, zaś wpisanie w rubryce „parametr” brak komponentu jest nieprawidłowe. Ciekawą obserwacją jest zauważona różnica w ekspresji w zależności od wieku blozków parafinowych. Powtórzone reakcje przyniosły jak rozumiem podobne wyniki (w tekście „nie wpłynęły na zmianę wyników”) co niekoniecznie potwierdza otrzymane wyniki a może świadczyć o innym przygotowaniu materiałów na etapie przed przygotowaniem bloczka np. zbyt długie utrwalanie w formalinie?, stosowanie formaliny niebuforowanej?, inne. Ekspresja PD-L1 występowała najczęściej w guzach z utkaniem raka wielkokomórkowego (w obu komponentach histopatologicznych) oraz częściej w komponencie raka gruczołowego, niż w komponencie raka płaskonabłonkowego. Wykazano także związek nasilenia reakcji z PD-L1 z rozległością martwicy i intensywnością nacieku zapalnego. Na końcu tego podrozdziału umieszczono informację o włóknieniu i związku jego nasilenia z ekspresją PD-L1 – jednak nie wiem w jaki sposób to nasilenie włóknienia było oceniane – w rozdziale metody brak opisu. Podrozdział 5.8 poświęcony jest zjawisku STAS. Nie stwierdzono różnic w obecności, nasileniu oraz typu morfologicznego zjawiska STAS w zależności od typu utkania. STAS występował znamienne częściej u chorych z wyższym stopniem zaawansowania choroby. Kolejne podrozdziały poświęcone są przeżyciu całkowitemu (OS). Z całej badanej grupy 36 chorych żyło w momencie zakończenia badania (okres obserwacji średnio 7,43 lata). Mediana OS w badanej grupie wynosiła 1,92 lata. Przeżycia całkowite korelowały ze stopniem zaawansowania choroby (co nie

dziwne, najgorsze rokowania występowały w stopniu SIII/IV) oraz obecnością inwazji naczyń limfatycznych i krwionośnych. Najniższe przeżycia stwierdzano w grupie z mieszanym utkaniem raków zróżnicowanych. Nie wykazano istotnych statystycznie zależności OS od obecności martwicy, typu histologicznego komponentu mięsakowatego, ekspresji markerów immunohistochemicznych (w tym markerów przemiany nabłonkowo mezenchymalnej i PD-L1) oraz STAS. W analizie wieloczynnikowej wykazano, że niezależnymi predyktorami przeżycia całkowitego był stopień zaawansowania III/IV (podnosi ryzyko zgonu 2,844 razy w stosunku do stopnia I) oraz mieszany typ komponentu nabłonkowego (w odniesieniu do gruczolakoraka podnosi ryzyko zgonu w każdym czasie 7, 249 razy). Kolejne podrozdziały odnoszą się do przeżycia wolnego od choroby (DFS). Analizie poddano 70 chorych, u których były dostępne dane na temat przebiegu klinicznego. Tab. 38 przedstawia informacje na temat osób z tej grupy żyjących w momencie zakończenia badania. Nie ma jednak informacji, czy chorzy ci żyli bez nawrotu choroby? Tabela 39 przedstawia przeżycia wolne od choroby w badanej grupie. Liczba zdarzeń określona jest na 59. Brakuje wyjaśnienia co jest rozumiane jako zdarzenie? Czy jest to udowodniony morfologicznie nawrót choroby (wznowa, przerzut) – w tej sytuacji nie zgadza się ich liczba z podawanymi wcześniej danymi (str. 40). Czy inne wykładniki kliniczne nawrotu choroby były też brane pod uwagę – jeśli tak, to jakie? Z podanych dalej informacji wynika, że DFS istotnie korelował ze stopniem zaawansowania choroby (był najniższy w grupie III/IV, a najwyższy w grupie I), rozległością martwicy, obecnością inwazji naczyń limfatycznych. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic DFS z typem histologicznym obu komponentów ani z ekspresją immunohistochemicznych markerów przemiany nabłonkowo mezenchymalnej. Tabela 46 wymaga wyjaśnienia – w podpisie jest zależność od cytokeratyny AE1/AE3 podczas gdy dane w tabeli odnoszą się wyłącznie do wimentyny, a w grupie bez elementu nabłonkowego nie jest określone jaka jest reakcja w komponentcie sarkomatoidnym. Nie wykazano

istotnych statystycznie różnic w DFS w zależności od ekspresji PD-L1 i nasilenia reakcji. Przeprowadzono analizę dwuczynnikową ekspresji PD-L1 i innych zmiennych – wykazano, że DFS różnił się znamienne biorąc pod uwagę ekspresję PD-L1 i rozległość martwicy. Gorsze wyniki DFS stwierdzono też u chorych STAS dodatnich w porównaniu z chorymi bez szerzenia się raka drogami powietrznymi. Również nasilenie STAS (hs v/s ls) wiązało się z pogorszeniem DFS. Analiza wieloczynnikowa niezależnych predyktorów DFS wykazała, że są nimi: rozległa martwica w odniesieniu do martwicy zajmującej do 25% guza (podnosi prawdopodobieństwo wystąpienia zdarzenia), typ komponentu płaskonabłonkowy w odniesieniu do raka gruczołowego (obniża prawdopodobieństwo wystąpienia zdarzenia), grupa z brakiem ekspresji wimentyny w obu komponentach w odniesieniu do grupy z dodatnią ekspresją w komponentie mięsakowatym (podnosi prawdopodobieństwo wystąpienia zdarzenia).

Dyskusja uzyskanych wyników oparta jest o starannie zebrane piśmiennictwo uwzględniające najnowsze doniesienia. Doktorantka konfrontuje wyniki własne z danymi literaturowymi, wykazując bardzo dobrą znajomość przedmiotu pracy oraz swobodę w operowaniu posiadanymi wiadomościami. Na początku dyskusji Autorka zwróciła uwagę na trudności w analizie porównawczej wyników własnych z wynikami publikowanymi w piśmiennictwie wynikające z trudności diagnostycznych raków wielopostaciowych oraz zmian w klasyfikacjach.

Dyskusja skonstruowana jest w formie podrozdziałów odpowiadających podrozdziałom przedstawiającym wyniki. Dane kliniczne uzyskane w trakcie przeprowadzonego badania były w większości zgodne z danymi literaturowymi. Analizując obrazy morfologiczne raków wielopostaciowych Autorka w większości opisów jest zgodna z innymi Autorami. Rak wielopostaciowy ma bardzo złożony obraz morfologiczny przez co sprawia trudności w diagnostyce różnicowej. Dodatkowo wiarygodne określenie typów oraz rozległości

poszczególnych komponentów jest często niemożliwe. Należy jednak starać się uzyskać możliwie najbardziej precyzyjne rozpoznanie gdyż może mieć ono znaczenie prognostyczne. W diagnostyce różnicowej należy używać panelu badań immunohistochemicznych wskazanych przez Autorkę. Jednak w porównaniu z danymi z literatury Autorka zaobserwowała w badanej grupie złożony rozkład ekspresji markerów zwyczajowo używanych w diagnostyce poszczególnych komponentów (cytokeratyny, p40, TTF-1). Jest to ciekawa obserwacja i może wskazywać na różnokierunkowe różnicowanie się komórek w obrębie PC. Autorka potwierdziła także obserwacje innych badaczy, że rozlana silna ekspresja wimentyny (zwłaszcza w materiale oligobiopsyjnym) każe myśleć o rozpoznaniu PC. W świetle rozbieżności literaturowych dotyczących znaczenia martwicy i konieczności oceny jej rozległości autorka potwierdziła doniesienia o jej znaczeniu prognostycznym. Przemiana nabłonkowo mezenchymalna jest jednym z kluczowych mechanizmów powstawania PC. Doniesienia literaturowe nie są zbyt liczne jednak większość Autorów dopatruje się mechanizmu EMT w aktywacji ZEB1. Autorka wskazała na możliwość aktywacji tych procesów w PC inną ścieżką sygnałową. Kolejny fragment dyskusji odnosi się do ekspresji PD-L1. Ma to niewątpliwie bardzo istotne znaczenie w opracowaniu metod diagnostycznych z wykorzystaniem inhibitorów punktów kontroli immunologicznej. Autorka omawia trudności interpretacyjne wykonywanych badań jednak podkreśla znaczenie wysokiej ekspresji tego markera w podejmowaniu decyzji terapeutycznych. Kolejny szeroki fragment dyskusji poświęcony jest stosunkowo od niedawna odnotowywanemu zjawisku szerzenia się raka przestrzeniami powietrznymi. Ten typ szerzenia się raka płuca został wprowadzony do klasyfikacji dopiero w 2015 roku stąd liczba publikacji jest niewielka i głównie odnoszą się do zróżnicowanych raków płuca i wykazują rozbieżności. W związku z tym ocena STAS w raku pleomorficznym przeprowadzona przez Autorkę ma bardzo istotne znaczenie. Autorka podkreśla wątpliwości dotyczące kryteriów rozpoznawania STAS (niektórzy autorzy wręcz

negują jego występowanie uznając te zjawiska za artefakt operacyjny) skąd mogą wynikać różnice w otrzymywanych wynikach. Większość autorów uzyskała korelacje z rozpoznaniem STAS i rokowaniem uznając go za istotny niezależny czynnik prognostyczny. W badaniu doktorantki obecność STAS miała związek z krótszym przeżyciem wolnym od choroby ale analiza wieloczynnikowa może wskazywać, że rzeczywiście jest to ważny czynnik prognostyczny ale raczej w korelacji z innymi cechami guza. Wielu Autorów podkreśla, że zjawisko STAS może mieć związek z przemianą nabłonkowo mezenchymalną. Wyniki uzyskane przez doktorantkę nie potwierdzają tej obserwacji. Według danych z literatury raki pleomorficzne rokują gorzej niż inne zróżnicowane niedrobnokomórkowe raki płuca. Obserwację tę Autorka poddaje w wątpliwość. Wprawdzie w przeprowadzonej pracy nie badała ona innych typów raków i dyskutowana przez Nią teza odnosi się do danych z KRN jednak ten zaobserwowany trend niewątpliwie wymaga dalszych badań. Ciekawą obserwacją (nie potwierdzoną w innych badaniach) jest wartość prognostyczna rodzaju komponentu nabłonkowego.

W całej dyskusji Autorka krytycznie podchodzi do otrzymanych wyników i stara się wytłumaczyć je wskazując związki przyczynowo skutkowe.

Kolejnym rozdziałem pracy jest **podsumowanie**. Doktorantka zebrała założenia pracy i otrzymane wyniki i najważniejsze (jej zdaniem) wnioski wynikające z pracy badawczej.

Na podstawie przeprowadzonych analiz Doktorantka wyszczególniła 15 dość rozbudowanych **wniosków**, które w większości logicznie wynikają z przeprowadzonych badań. Są one dość szczegółowe i w swojej treści zawierają podsumowanie wyników. Odpowiadają na postawione w pracy cele.

1. Dane epidemiologiczne, lokalizacja i obraz kliniczny raka wielopostaciowego są podobne do danych zawartych w piśmiennictwie, a częstość występowania tej postaci raka w polskim materiale operacyjnym wynosi 1,6% raków płuca.

2. Określenie typów histologicznych utkania, szczególnie nabłonkowego, jest istotne rokowniczo: raki o mieszanym utkaniu gruczołowo-płaskonabłonkowym mają gorszy OS i częściej towarzyszy im inwazja naczyń limfatycznych ($p < 0,05$), raki z utkaniem płaskonabłonkowym mają lepszy DFS ($p < 0,05$), raki z utkaniem wielkokomórkowym i olbrzymiokomórkowym mają tendencję do gorszego OS i DFS ($p > 0,05$).
3. Rozległość poszczególnych typów utkania nie ma znaczenia klinicznego.
4. Badania immunohistochemiczne są bardzo pomocne w diagnostyce PC. Reakcje z cytokeratyną AE1/AE3 i E-kadheryną pozwalają na identyfikację, często bardzo skąpego, komponentu nabłonkowego. Reakcje z TTF1 i p40 pomagają w określeniu różnicowania komórkowego, ale odczyny te mogą mieć różnorodną ekspresję w obrębie tego samego guza. Rozlana cytoplazmatyczna reakcja z wimentyną, w licznych komórkach, ułatwia odróżnienie PC od innych podtypów NSCLC z obecnością komórek pleomorficznych, co może być kluczowe w diagnostyce materiałów przedoperacyjnych.
5. W badanych guzach często występują cechy uważane za prognostycznie niekorzystne, takie jak: martwica (74%), inwazja naczyń krwionośnych (73%) i limfatycznych (48%), inwazja opłucnej (71%).
6. Rozległość martwicy ma istotny związek ze stopniem zaawansowania klinicznego i patologicznego ($p < 0,05$). Martwica $> 25\%$ jest niezależnym predyktorem wystąpienia nawrotu choroby lub zgonu. Rozległej martwicy $> 50\%$ często towarzyszy wysoka ekspresja PD-L1 ($p < 0,05$).
7. Ekspresja markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej: wimentyny i ZEB1 w raku wielopostaciowym jest wysoka, przy zmniejszonej ekspresji E-kadheryny, co potwierdza aktywację i istotną rolę procesów EMT w rozwoju tego nowotworu. Ekspresja markerów EMT wydaje się mieć znaczenie głównie diagnostyczne. Nie wykazano jej znaczenia prognostycznego, a także związku ze STAS i ekspresją PD-L1.

8. Zaobserwowano występowanie grupy raków z elementami pleomorficznymi, ze zróżnicowanym komponentem nabłonkowym, która nie wykazuje ekspresji markerów EMT i wiąże się z krótszym DFS. Wymaga ona dalszych badań w celu określenia jej miejsca w klasyfikacji i znaczenia klinicznego.
9. W raku wielopostaciowym obserwuje się wysoką częstość (64%) i nasilenie ekspresji PD-L1 ($TPS \geq 50\%$ -42%), co stanowi ważny czynnik predykcyjny.
10. Ekspresja PD-L1 nie ma związku z OS i DFS, ale chorzy z martwicą $>25\%$ i dodatnią ekspresją PD-L1 mają najniższą medianę DFS ($p=0,023$) i powinni być objęci systematyczną opieką w celu wczesnego wykrycia nawrotu choroby.
11. Zjawisko STAS, stwierdzone w 39% badanych guzów (39/99 przypadków), występowało u chorych z wyższym stopniem zaawansowania choroby ($p<0,05$). Nie wykazano związku pomiędzy obecnością STAS a inwazją naczyń, rozległością martwicy, typem histologicznym utkania czy rozległością komponentu mięsakowatego. Nie stwierdzono również związku z ekspresją markerów EMT.
12. Kryteria ilościowe oceny STAS zaproponowane przez Uruga i wsp. - niski i wysoki STAS - są obiecującym kierunkiem rozwoju badań nad znaczeniem rokowniczym STAS.
13. STAS ma znaczenie prognostyczne dla DFS: chorzy z obecnością STAS mają gorszy DFS w analizie jednoczynnikowej ($p<0,05$). W analizie wieloczynnikowej wartość prognostyczna STAS co do nawrotu choroby jest zmienna, co przemawia za tym, że jest to ważny czynnik rokowniczy, ale w połączeniu z innymi parametrami. Chorzy ze STAS mają tendencję do gorszego przeżycia całkowitego ($p>0,05$).
14. Czynniki prognostycznymi dla OS są:

- w analizie jednoczynnikowej: stopień zaawansowania III/IV ($p=0,014$), inwazja naczyń limfatycznych ($p=0,028$) i naczyń krwionośnych ($p=0,048$), mieszany typ komponentu nabłonkowego: gruczołowo-płaskonabłonkowy ($p=0,006$);
- w analizie wieloczynnikowej niezależnymi predyktorami są: stopień zaawansowania III/IV ($p=0,037$) oraz mieszany typ komponentu nabłonkowego: gruczołowopłaskonabłonkowy ($p=0,003$).

15. Czynniki prognostycznymi dla DFS są:

- w analizie jednoczynnikowej: stopień zaawansowania III/IV ($p=0,011$), nasilenie martwicy ($p=0,004$), inwazja naczyń limfatycznych ($p=0,036$), obecność STAS ($p=0,01$) oraz obecność wysokiego STAS ($p=0,006$);
- w analizie wieloczynnikowej niezależnymi predyktorami są: martwica $>25\%$ ($p=0,015$), typ komponentu nabłonkowego - utkanie płaskonabłonkowe rokuje lepiej ($p=0,013$) oraz brak ekspresji wimentyny w komponente mięsakowatym ($p=0,022$).

Wnioski w większości wyprowadzone są prawidłowo, jednak mam kilka zastrzeżeń.

Wniosek 4. Reakcje z cytokeratyną AE1/AE3 i E-kadheryną pozwalają na identyfikację, często bardzo skąpego, komponentu nabłonkowego. Jest to z pewnością słuszne jednak nie wynika bezpośrednio z badań przeprowadzonych w pracy – nie ma informacji w ilu przypadkach podane reakcje immunohistiochemiczne pozwoliły na wyodrębnienie komponentu nabłonkowego. Reakcje z TTF1 i p40 pomagają w określeniu różnicowania komórkowego, ale odczyny te mogą mieć różnorodną ekspresję w obrębie tego samego guza. W wynikach brak informacji na temat wyników tych badań w konkretnych guzach jest podana jedynie informacja o koekspresji w dwóch guzach w komponente nabłonkowym i w dwóch w komponente mezenchymalnym – to chyba za mało do wyciągnięcia takiego wniosku. Rozlana

cytoplazmatyczna reakcja z wimentyną, w licznych komórkach, (brak określenia w jakim komponencie) ułatwia odróżnienie PC od innych podtypów NSCLC z obecnością komórek pleomorficznych, co może być kluczowe w diagnostyce materiałów przedoperacyjnych.

Wniosek 8. Zaobserwowano występowanie grupy raków z elementami pleomorficznymi, ze zróżnicowanym komponentem nabłonkowym, która nie wykazuje ekspresji markerów EMT i wiąże się z krótszym DFS. Wymaga ona dalszych badań w celu określenia jej miejsca w klasyfikacji i znaczenia klinicznego. Autorka wspomina o takiej grupie chorych w dyskusji jednak w rozdziale wyniki ta grupa nie jest jednoznacznie wyodrębniona (jak duża grupa?).

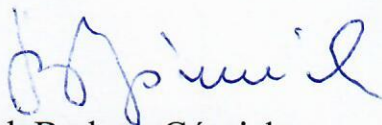
Ze względu na retrospektywny charakter badania wszystkie wnioski odnoszące się do DSF formułowałabym ostrożniej – z użyciem raczej formy „mogą być” a nie „są” lub „może mieć” a nie „ma”.

Rozprawę uzupełnia obszerne **piśmiennictwo** obejmujące 105 starannie dobranych pozycji oraz **streszczenie** w języku polskim i angielskim, w którym zawarte jest zwięzłe podsumowanie celu pracy, metod i wyników przeprowadzonych badań. Do pracy dołączony jest wykaz skrótów, spis tabel, spis rycin, spis fotografii oraz jeden załącznik przedstawiający klasyfikację TNM, 8 edycja UICC.

Przedstawiona do recenzji praca jest bardzo ciekawa i niezwykle obszerna. Autorka założyła sobie i zrealizowała liczne cele wymagające przeprowadzenia ogromnej pracy badawczej i wykonania bardzo licznych analiz. Jest to niewątpliwie znaczące studium nad rakiem wielopostaciowym płuca. Prawdopodobnie w związku z tak licznymi obliczeniami Autorka nie ustrzegła się niedopowiedzeń lub błędów. W kilku miejscach opis zastosowanych metod badawczych jest niepełny, również niektóre uzyskane przez Nią wyniki przedstawione są jedynie w formie ostatecznego podsumowania (brak tabel źródłowych). Jednak zgłoszone przeze mnie zastrzeżenia nie umniejszają

wartości pracy. Jest to pierwsze w Polsce tak obszerne badanie nad bardzo różnorodnym i skomplikowanym pod względem diagnostycznym, prognostycznym, predykcyjnym i terapeutycznym guzem jakim jest rak wielopostaciowy płuca. Praca ta jest interesująca poznawczo i wiele jej aspektów może mieć zastosowanie praktyczne. Jest to własny oryginalny dorobek naukowy Doktorantki. Przedstawiona do recenzji dysertacja stanowi rozwiązanie założonego oryginalnego problemu naukowego oraz potwierdza dużą wiedzę teoretyczną Kandydatki.

Rozprawa spełnia wymogi stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych. Dlatego mam zaszczyt przedstawić Wysokiej Radzie Naukowej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc wniosek o dopuszczenie jej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. n. med. Barbara Górnicka

1581822
Prof. dr hab. n. med.
Barbara Górnicka
specjalista patomorfolog i cytopatolog
Warszawa, ul. Nasielska 30/7