



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

**ZAKŁAD PATOMORFOLOGII KLINICZNEJ
KATEDRY PATOMORFOLOGII i IMMUNOLOGII KLINICZNEJ**

Kierownik: dr hab. med. Aldona Woźniak

ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

tel.: 61 869 14 66
fax: 61 869 15 09
e-mail: patomorf@ump.edu.pl
www.patklin.ump.edu.pl

Poznań, dnia 02 grudnia 2019 roku

**Recenzja rozprawy doktorskiej lek. med. Małgorzaty Malinowskiej
pt.: „Mikroskopowe i immunohistochemiczne czynniki prognostyczne oraz
potencjalnie predykcyjne w raku wczesnym żołądka”**

Centrum Onkologii Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Rak gruczołowy jest najczęstszym nowotworem złośliwym żołądka i stanowi ponad 90% wszystkich nowotworów złośliwych tego narządu. Jest też, mimo tendencji spadkowej liczby zachorowań, na piątym miejscu pod względem występowania nowotworów złośliwych na świecie i trzecim pod względem umieralności. Polska należy do krajów o średniej zachorowalności na raka żołądka (7 miejsce u mężczyzn i 12 miejsce u kobiet). W roku 2016 według danych Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN) wykryto 5396 nowych przypadków tego nowotworu. Pod względem umieralności, wg danych KRN z 2016 roku, rak żołądka jest czwartą u mężczyzn i szóstą u kobiet przyczyną zgonu.

Leczenie chirurgiczne od wielu lat stanowi podstawową metodę terapii raka żołądka. Najczęściej wykonywana jest całkowita lub częściowa gastrektomia z limfadenektomią. Złe rokowanie u chorych z rakiem żołądka wynika z dużego zaawansowania tego nowotworu w momencie jego wykrycia. Znaczny odsetek chorych na etapie rozpoznania nie może być leczonych chirurgicznie z intencją wyleczenia. Na podstawie klinicznego stopnia zaawansowania (cTNM) pacjenci kwalifikowani są do leczenia paliatywnego i otrzymują adjuwantową chemio- i/lub radioterapię.

Najlepszą drogą poprawy wyników leczenia chorych na raka żołądka jest więc wczesna diagnostyka zmian przedrakowych i raka we wczesnej postaci. Pięcioletnie przeżycie chorych z rakiem żołądka w stopniu zaawansowania pT1 (AJCC/UICC) wynosi 83-97%, podczas gdy w przypadkach znacznie zaawansowanych spada i wynosi około 25%. Chorzy z ryzykiem rozwoju raka żołądka, powinni być poddani

regularnym okresowym badaniom endoskopowym z pobraniem biopsji do badania histopatologicznego. Zapewni to, w przypadkach dysplazji (nowotworzenia śródnabłonkowego) dużego stopnia lub raka wczesnego lepszą selekcją chorych do endoskopowego śluzówkowego lub podśluzówkowego wycięcia zmiany. W ostatnich latach uwaga badaczy skierowana jest również, na lepsze poznanie morfologiczno-molekularnych czynników ryzyka rozwoju raka żołądka, pozwalających na jego wczesne wykrycie i skuteczne leczenie operacyjne z intencją wyleczenia.

Uważam za bardzo cenne, podjęcie przez Doktorantkę szerokiej analizy mikroskopowych i immunohistochemicznych czynników prognostycznych oraz potencjalnie predykcyjnych we wczesnym raku żołądka. Analiza ta przyczyni się do lepszego poznania przebiegu choroby nowotworowej żołądka i może owocować opracowaniem modeli diagnostycznych i terapeutycznych poprawiających odległe wyniki leczenia i umożliwiających częstsze zastosowanie chirurgii endoskopowej związanej ze znacznie wyższą jakością życia w okresie pooperacyjnym.

Celem przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej była:

1. analiza czynników prognostycznych i potencjalnie predykcyjnych we wczesnym raku żołądka,
2. badanie zależności pomiędzy stanem przedrakowym a wczesnym rakiem żołądka,
3. badanie zależności pomiędzy cechami makroskopowymi i mikroskopowymi raka żołądka a immunohistochemicznymi czynnikami adhezji komórek nowotworowych - E-kadheryną i beta-kateniną,
4. badanie zależności pomiędzy markerami supresorowej (TP53) i mutatorowej (MSH2) karcinogenezy.

Materiał badawczy stanowiło 104 chorych z rakiem żołądka (50 z rakiem wczesnym i 54 z rakiem zaawansowanym) leczonych chirurgicznie w Klinice Górnego Odcinka Układu Pokarmowego Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Curie-Skłodowskiej w Warszawie w latach 1999-2005. Wszyscy chorzy, z uwagi na klinicznie ocenioną resekcyjność guzów nowotworowych na podstawie badań obrazowych (cTNM), zostali zakwalifikowani do leczenia chirurgicznego z intencją wyleczenia. W 103 przypadkach materiał do badania histopatologicznego stanowił preparat pooperacyjny, w 1 przypadku błona śluzowa usunięta w trakcie endoskopii.

Każdy przypadek opracowano w jednolity sposób według zasad obowiązujących w Zakładzie Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej Centrum

Onkologii. Materiał operacyjny utrwalono w 10% zbuforowanej formalinie. Reprezentatywne wycinki z guza i otaczającej błony śluzowej zatopiono w parafinie. Następnie krojono je na skrawki grubości 4µm, które barwiono hematoksyliną i eozyną oraz używano do badań immunohistochemicznych. Badania immunohistochemiczne przeprowadzono z wykorzystaniem panelu monoklonalnych przeciwciał (firmy DAKO i Ventana). Odczyny immunohistochemiczny oceniano według kryteriów przyjętych przez Polskie Towarzystwo Patologów.

Raka wczesnego żołądka rozpoznawano u mężczyzn 10 lat wcześniej niż raka zaawansowanego, natomiast u kobiet nie stwierdzono różnic w wieku występowania raka wczesnego i zaawansowanego. W 42% przypadków raka wczesnego żołądka stwierdzono raka śródśluzówkowego, w którym dominował gruczolakorak wysokozróżnicowany (G1, G2). W pozostałych przypadkach był to rak podśluzówkowy, w którym podobnie jak w raku zaawansowanym, częściej rozpoznawano raka niskozróżnicowanego (G3).

Najczęstszym typem makroskopowym w raku wczesnym, był typ powierzchniowy płaski i zapadnięty (IIb, IIc), który stanowił 70% tych nowotworów. Przerzuty do węzłów chłonnych stwierdzono w 10% raka wczesnego i 67% raka zaawansowanego. Istotnie statystycznie różnice ($p=0,01362$) stwierdzono między brakiem immunohistochemicznej ekspresji jądrowej TP53 (-) w raku śluzówkowym a jej obecnością w raku podśluzówkowym TP53 (+). Stwierdzono również istotnie statystycznie różnice w ekspresji MSH2 ($p=0,045$) między typami makroskopowymi raka wczesnego: polipowatym, powierzchniowym uniesionym i płaskim (I, IIa, IIb) i rakiem wysokozróżnicowanym (G1, G2) z niestabilnością mikrosatelitarną (MSI) a typem makroskopowym powierzchniowym zapadniętym i typem drążącym (IIc, III) i rakiem niskozróżnicowanym (G3, ze słabą kohezją komórek, śluzowokomórkowym) i stabilnym (MSS). Wykryto także istotnie statystycznie różnice w ekspresji MSH2 ($p=0,035$) między rakiem wczesnym z niestabilnością mikrosatelitarną (MSI) a rakiem zaawansowanym i stabilnym (MSS). Natomiast nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między lokalizacją ekspresji E-kadheryny (błonowa vs cytoplazmatyczna) w zależności od typu makroskopowego raka wczesnego oraz przerzutów ($p=0,109$).

Na podstawie uzyskanych wyników i analizy statystycznej lek. med. Małgorzata Malinowska wyłoniła dwa modele raka wczesnego żołądka:

Model I charakteryzuje się:

- a. typem makroskopowym polipowatym oraz typem powierzchniowym uniesionym i płaskim (typ: I, IIa i IIb),
- b. typem histologicznym wysokozróżnicowanym (G1, G2),
- c. naciekaniem ograniczonym do błony śluzowej (rak śródśluzówkowy),
- d. odczynami immunohistochemicznymi takimi jak TP53 (-), MSH2 (-) czyli z utratą immunohistochemicznej ekspresji, co odpowiada rakom z niestabilnością mikrosatelitarną (MSI).

Model II charakteryzuje się:

- a. typem makroskopowym powierzchniowym zapadniętym i typem drążącym (typ: IIc i III),
- b. typem histologicznym niskozróżnicowanym (G3), ze słabą kohezją komórek, śluzowokomórkowym),
- c. naciekaniem błony podśluzówkowej (rak podśluzówkowy)
- d. immunohistochemiczną ekspesją TP53 (+) i MSH2 (+), czyli brakiem utraty ekspresji, co odpowiada rakom stabilnym (MSS).

Ponadto analiza wyników wykazała, iż cechy makroskopowe, mikroskopowe i immunohistochemiczne raka wczesnego śluzówkowego różnią się w statystycznie istotny sposób od raka podśluzówkowego i zaawansowanego. Uzyskane wyniki upoważniają do zaproponowania leczenia endoskopowego, wycięcia śluzówkowego lub podśluzówkowego, dysplazji dużego stopnia i wybranych przypadków raka wczesnego (model I) w odróżnieniu od raka podśluzówkowego i zaawansowanego, dla których metodą z wyboru powinno być leczenie chirurgiczne.

Ostateczna decyzja co do wyboru metody terapii, zabiegu endoskopowego czy operacji, nie może opierać się wyłącznie na badaniu patomorfologicznym. Powinna być ona podjęta po łącznej analizie badania patomorfologicznego, endoskopowego i badań obrazowych pozwalających ocenić kliniczny stopień zaawansowania (cTNM) nowotworu.

Oceniana rozprawa doktorska, licząca 115 stron, napisana jest zgodnie ze schematem przewidzianym dla prac badawczych. Składa się z następujących części: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, wnioski, dyskusja, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim i bibliografia.

Tekst pracy zawiera 17 tabel, 49 rycin i 3 wykresy. Piśmiennictwo obejmuje 240 publikacji ogłoszonych w recenzowanych wydawnictwach zagranicznych i 2

zagraniczne strony internetowe oraz 4 publikacje ogłoszone w recenzowanych wydawnictwach polskich i 1 polską stroną internetową. 58 z 247 pozycji piśmiennictwa pochodzi z ostatnich dziesięciu lat. Publikacje starsze są często publikacjami źródłowymi dla omawianych zagadnień.

Rozprawa doktorska wykonana jest starannie poczynając od zaplanowania badań, na opracowaniu graficznym kończąc. We wstępie lek. med. Małgorzata Malinowska wykazała się dużą wiedzą z zakresu epidemiologii, etiopatogenezy, patomorfologicznych czynników prognostycznych i predykcyjnych w raku żołądka. Omówiła też implikacje terapeutyczne i rokownicze, związane z uznanymi patomorfologicznymi czynnikami prognostycznymi i predykcyjnymi. Dyskusja udowodniła, że posiada umiejętność interpretowania wyników i rozpatrywania ich w kontekście z danymi z prawidłowo dobranej literatury.

Cele i założenia pracy zostały w całości zrealizowane. Postawione wnioski wynikają z przeprowadzonych przez doktorantkę badań.

Rozprawa doktorska lek. med. Małgorzaty Malinowskiej stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego, a Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną i umiejętnościami praktycznymi w zakresie patomorfologicznej diagnozy, rokowania i monitorowania przebiegu leczenia chorych na raka żołądka. W moim osądzie rozprawę doktorską lek. med. Małgorzaty Malinowskiej należy wyróżnić również za pedantyczne przestrzeganie wszelkich standardów wykonywanych metod badawczych i rzetelną wyważoną ocenę wyników badań w oparciu o najnowsze metody statystyczne.

Chciałbym tutaj podkreślić, że rozprawa doktorska lek. med. Małgorzaty Malinowskiej jest jednym z pierwszych tak obszernych opracowań dotyczącym diagnostyki i strategii leczenia wczesnego raka żołądka w polskim piśmiennictwie. Wyniki tej rozprawy doktorskiej mogą mieć znaczenie praktyczne w prognozowaniu przebiegu pooperacyjnego i opracowaniu strategii leczenia wczesnego raka żołądka. Opracowane przez Doktorantkę dwa modele wczesnego raka żołądka umożliwiają zaproponowanie leczenia endoskopowego, wycięcia śluzówkowego lub podśluzówkowego, dysplazji dużego stopnia i wybranych przypadków raka wczesnego (model I) w odróżnieniu od raka podśluzówkowego (model II) i raka zaawansowanego, dla których metodą z wyboru powinno być tradycyjne leczenie chirurgiczne.

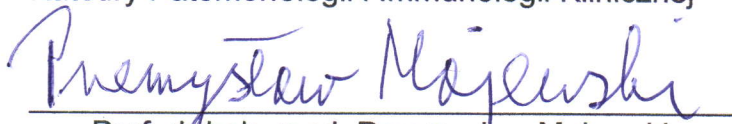
Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na nieliczne uchybienia a mianowicie:

- W tekście pracy znalazłem błędy w numeracji rycin. Ryciny początkowo numerowane są począwszy od ryciny 1 do 44 a następne ryciny w końcowej części pracy to ponownie rycina 7 do 11;
- W tekście pracy znalazłem również błędy w numeracji tabel. Autorka zamieściła dwie różne tabele 15 i końcową tabelę 16 a prawidłowa numeracja tych tabel to tabela 15, tabela 16 i tabela 17.
- Uważam, że Autorka powinna również ujednolicić w tekście pracy nazewnictwo typu makroskopowego wczesnego raka żołądka, żeby było zgodne z klasyfikacją makroskopową wczesnego raka żołądka przedstawioną na rycinie 4.

Powyższe uwagi nie wpływają na ocenę wartości niniejszej rozprawy doktorskiej. Rozprawę doktorską lek. med. Małgorzaty Malinowskiej pt.: „Mikroskopowe i immunohistochemiczne czynniki prognostyczne oraz potencjalnie predykcyjne w raku wczesnym żołądka” oceniam, jako bardzo dobrą i uważam, że spełnia w całej rozciągłości warunki stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego zwracam się do Rady Naukowej Centrum Onkologii Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie o wszczęcie dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uważam równocześnie, że rozprawa doktorska przygotowana przez lek. med. Małgorzatę Malinowską zasługuje na wyróżnienie nagrodą.

Zakład Patomorfologii Klinicznej
Katedry Patomorfologii i Immunologii Klinicznej


Prof. dr hab. med. Przemysław Majewski