



**INSTYTUT GRUŹLICY I CHORÓB PŁUC
ZAKŁAD PATOMORFOLOGII**

Kierownik Zakładu: dr hab. n. med. Renata Langfort, prof. nadzw.
ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa
tel.(48)(22) 43 12 257, fax (48)(22) 43 12 427

Praca na stopień doktora medycyny

Lek. med. Piotr Wiśniewski

Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej

Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie

W Warszawie

pt.: „Ocena wydolności diagnostycznej badania cytologicznego materiału uzyskanego drogą EBUS I EUS w raku płuca”.

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Włodzimierz T. Olszewski

RECENZJA

Rak płuca jest obecnie najczęstszą przyczyną zgonów z przyczyn nowotworowych. Co roku na świecie odnotowuje się ok. 55/100 000 nowych zachorowań i ok. 45/100 000 zgonów.

Pomimo obserwowanego w ostatnich latach powolnego spadku liczby zachorowań, co wiąże się z wprowadzaniem restrykcyjnego zakazu palenia papierosów i zwiększającą się świadomością dotyczącą szkodliwości tego nałogu, nadal stanowi ogromny problem i ciągle jest uważany za źle rokujący nowotwór. Pięć lat przeżywa 11-15% pacjentów. Złe rokowanie jest związane z późną wykrywalnością choroby i brakiem skutecznych metod leczenia. Zdecydowana większość przypadków (ok. 80-85%) jest rozpoznawana w późnym okresie choroby, gdy najbardziej skuteczne leczenie, jakim jest zabieg operacyjny nie jest możliwe. Pozostaje wówczas stosowanie chemio- bądź radioterapii, lub obydwu połączonych metod, ale niestety żadna z nich nie jest wystarczająco dobra. W ostatnich latach pojawiły się nowe perspektywy, budzące nadzieje na wydłużenie czasu wolnego od progresji choroby i dłuższe przeżycia osób z zaawansowanym niedrobnokomórkowym rakiem płuca (NDRP). Warunkiem skuteczności ich działania jest wykrycie mutacji aktywujących w komórkach raka, przede wszystkim mutacji w genie *EGFR* lub rearanżacji w genie *ALK*.

Identyfikacja różnych biomarkerów o znaczeniu predykcyjnym, których stwierdzenie umożliwia wprowadzenie terapii celowanych, w istotny sposób wpłynęły na zmianę algorytmu postępowania diagnostycznego wśród pacjentów z zaawansowanym pierwotnym rakiem płuca. Wymaga on nie tylko wykrycia nowotworu i określenia czy rak jest drobno- czy nie drobnokomórkowym, ale w przypadku nieoperacyjnej postaci NDRP konieczne jest również ustalenie podtypu nowotworu (rak gruczołowy vs płaskonabłonkowy) i zabezpieczenie materiału do badań molekularnych.

W zdecydowanej większości przypadków rozpoznanie raka płuca opiera się na badaniu mikroskopowym małych wycinków lub materiału cytologicznego uzyskanych najczęściej drogą bronchofiberoskopii. Ze względu na

unikatowy charakter i ograniczone możliwości wykonania wielu badań dodatkowych, niezwykle znaczenia nabiera racjonalny sposób postępowania z pobranym materiałem, na podstawie którego należy ustalić nie tylko rozpoznanie histopatologiczne ale także wykonać testy molekularne.

W ciągu ostatnich lat, badania EBUS i EUS stały się podstawą w ocenie stopnia zaawansowania raka płuca, zastępując bardziej inwazyjne metody chirurgiczne oceny węzłów chłonnych śródpiersia, przede wszystkim mediastinoskopię. Wprowadzenie możliwości wykonania biopsji w czasie rzeczywistym (EBUS-TNA, EUS-FNA) dodatkowo przyczyniło się do znacznej poprawy oceny stopnia zaawansowania raka płuca.

Zagadnieniem wydajności badań cytologicznych uzyskanych metodą EBUS i EUS w diagnostyce raka płuca zajął się w swojej pracy doktorskiej lek. med. Piotr Wiśniewski. Dodatkowo, celem pracy Doktoranta była ocena przydatności materiału cytologicznego do badań immunohistochemicznych i molekularnych w diagnostyce niedrobnokomórkowego raka płuca oraz analiza trudności diagnostycznych.

Autor poddaje retrospektywnej analizie preparaty cytologiczne pobrane metodą EBUS i EUS w Klinice Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej Centrum Onkologii-Instytut z okresu 2 lat (od 1 stycznia 2013 do 31 grudnia 2014 r.), barwione standardowo HE. Materiał pochodził od chorych, którzy byli poddani rutynowej diagnostyce, związanej z niezwyfikowanym histologicznie guzem płuca, od chorych z powiększonymi węzłami chłonnymi śródpiersia o nieokreślonym charakterze, od osób z podejrzeniem wznowy po przebytej operacji z powodu NDRP oraz od chorych z rozpoznaniem NDRP, w celu określenia stopnia zaawansowania choroby i kwalifikacji do ewentualnego leczenia operacyjnego.

Retrospektywnej ocenie konsultacyjnej poddano 710 aspiratów uzyskanych metodą EBUS i 18 badań otrzymanych metodą EUS (w sumie 2970 rozmazów, archiwizowanych z Zakładzie Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej CO-I), które pochodziły od 324 pacjentów (146 kobiet i 178 mężczyzn).

Oprócz ustalenia rozpoznania mikroskopowego i kwalifikacji do badań immunocytochemicznych, Doktorant określał także przydatność materiału cytologicznego do badań molekularnych oraz trudności diagnostyczne jakie napotymano w trakcie oceny materiału.

Przeprowadzona analiza preparatów mikroskopowych pozwoliła na wyciągnięcie 5 istotnych wniosków. Autor stwierdził, że badania EBUS i EUS są użyteczne w diagnostyce nowotworów płuca, a szczególnie w ocenie stopnia zaawansowania patomorfologicznego pierwotnego raka płuca, co jest potwierdzeniem dotychczasowych doniesień w piśmiennictwie. U 94% pacjentów z pierwotnym rakiem płuca badania EBUS i EUS pozwoliły na uzyskanie diagnostycznego materiału.

Ponadto Doktorant zauważył, że materiał uzyskany tą metodą zwykle jest wystarczający do ustalenia typu histologicznego raka, jak również pozwala na stosowanie badań IHC w celu określenia podtypu NDRP i różnicowania z przerzutem nowotworu z innego narządu.

W badanej grupie 324 chorych u 198 (61,1%) stwierdzono występowanie komórek nowotworowych, u 106 pacjentów (32,7%) nie wykazano komórek nowotworowych, ale materiał zawierał elementy komórkowe utkania węzła chłonnego, więc był materiałem diagnostycznym. Tylko w 20 przypadkach (6,2%) rozmazy uznano za niediagnostyczne. Rozmazy zawierały prawie wyłącznie elementy morfotyczne krwi lub zbyt małą liczbę diagnostycznych elementów komórkowych, bądź były źle technicznie.

Tylko u 33 pacjentów z rozpoznaniem NDRP nie udało się ustalić jego podtypu na podstawie cech cytologicznych. Cenna jest obserwacja, że ponowna ocena rozmazów cytologicznych nie wykazała istotnych rozbieżności z pierwotnymi rozpoznaniem, a w żadnym przypadku nie stwierdzono wyników fałszywie

dotatnich. Ocena konsultacyjna różniła się od pierwotnej diagnozy tylko w 3,5% badań, ale rozbieżności nie miały wpływu na postępowanie z pacjentem.

Szczegółowa analiza pozwoliła na omówienie trudności związanych z rozpoznaniem, z jakimi może się zetknąć nawet doświadczony patomorfolog. Przede wszystkim wynika ona ze złej jakości technicznej materiału, trudności w interpretacji zmian metaplastycznych z wysoko dojrzałą postacią raka płaskonabłonkowego, jak również z niewłaściwą oceną zmienionych makrofagów, które mogą przypominać komórki wysoko dojrzałego gruczolaka.

Wniosek, stwierdzający przydatność preparatów cytologicznych do badań molekularnych, zwłaszcza we współczesnej diagnostyce NDRP jest niezwykle ważny, pozwala bowiem wyłonić grupę chorych kwalifikujących się do terapii celowanej, bez konieczności pobierania materiału tkankowego. W prezentowanej pracy aż 98% rozmazów cytologicznych z rozpoznaniem gruczolaka i NDRP typu NOS kwalifikowało się do badań molekularnych.

Ostatni wniosek mówi o roli doświadczenia patomorfologa w ocenie materiału cytologicznego oraz współpracy z klinicystą. Niewątpliwie jest to bardzo istotne. Badania cytologiczne są niezwykle trudne, gdyż patomorfolog stawia rozpoznanie na podstawie tylko wyglądu komórek. Należy pamiętać że wiele spośród chorób płuc, zwłaszcza przewlekłych chorób śródmiąższowych, ale również zapalnych i krążeniowych może doprowadzać do tzw. reaktywnej atypii, która może być fałszywie zinterpretowana jako nowotwór. O podobnych trudnościach w analizowanym materiale wspomina Doktorant.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska liczy 76 stron maszynopisu i zawiera wyczerpujący „Wstęp”, w którym Autor szeroko omawia zagadnienia związane z epidemiologią, rozpoznaniem i oceną stopnia zaawansowania raka płuca. Przedstawia kryteria cytologiczne istotne dla rozpoznania głównych postaci raka płuca oraz omawia najistotniejsze reakcje immunohistochemiczne wykorzystywane w określeniu postaci morfologicznej raka płuca, jak również w różnicowaniu z przerzutami nowotworów pozapłucnych. We wstępie została przedstawiona także ocena stopnia zaawansowania raka płuca wg TNM (7 edycja) oraz podstawowe badania molekularne wykonywane w raku płuca.

Trzy cele pracy odpowiadają założeniom metodologicznym rozprawy, które zostały zawarte w części poświęconej materiałom i metodom. „Wyniki i ich omówienie” stanowią najobszerniejszy fragment pracy, w którym znalazły się 4 wykresy oraz 8 tabel, szczegółowo przedstawiające zasady przeprowadzonego badania. Kolejny rozdział poświęcony „Omówieniu trudności diagnostycznych i dyskusji” jest podsumowaniem wyników pracy. Rozprawa kończy się zwięzłym streszczeniem oraz spisem tabel, wykresów i ilustracji użytych w pracy, jak również tabelą stosowanych skrótów i zwrotów. W dołączonych załącznikach znalazła się szczegółowa klasyfikacja histologiczna nowotworów płuca wg WHO z 2015 r, klasyfikacja TNM (7 edycja), opis grup węzłów chłonnych istotnych w ocenie cechy pN klasyfikacji TNM wg WHO oraz korelacja między klasyfikacją TNM a stopniem zaawansowania raka.

W pracy wykorzystano 67 pozycji piśmiennictwa, dobrane adekwatnie do badanego zagadnienia.

Wybrany temat pracy ma istotne znaczenie praktyczne, przede wszystkim ze względu na potwierdzenie przydatności metody EBUS i EUS nie tylko w określeniu stopnia zaawansowania raka płuca, ale również w wykorzystaniu jej do badań genetyczno-molekularnych koniecznych do podjęcia decyzji związanych z leczeniem. Biorąc pod uwagę fakt rozpowszechnienia obydwu metod, które są rutynowo wykonywane w celu rozpoznania raka płuca, przeprowadzone badania stanowią cenny wkład w pogłębienie wiedzy dotyczącej

„oceny wydolności diagnostycznej badania cytologicznego drogą EBUS i EUS”.

Poza nie budzącą wątpliwości stroną merytoryczną pracy, opartej na dużym, reprezentatywnym materiale, nasuwa się kilka uwag.

1. „Spis treści” obejmuje tytuły tylko głównych części pracy, pomijając podrozdziały.
2. W pierwszym zdaniu rozprawy, w części dotyczącej epidemiologii, Doktorant podaje liczbę „nowych zachorowań na pierwotny nowotwór złośliwy płuca”, w następnym zdaniu stwierdza: „Pod względem występowania jest to najczęstszy nowotwór złośliwy w Polsce...”. W ten sposób umyka informacja, że nowotworem tym jest rak płuca.
3. Zastrzeżenie budzi stosowanie w całej pracy skrótu „EUS-TBNA”. TBNA określa sposób pobrania materiału drogą nakłucia przez ścianę oskrzela (*transbronchial needle aspiration*), w związku z tym jest stosowane w połączeniu z EBUS, natomiast w odniesieniu do EUS, biopsji przezprzełykowej przyjętym skrótem jest najczęściej FNA (*fine needle aspiration*) lub NA (*needle aspiration*) („Pulmonologia interwencyjna” pod red. K. Śladka, 2016).
Ponadto, początkowo Autor używa dużych liter (TBNA), a w dalszej części pracy małych (tbna), co może być mylące dla czytelnika.
4. Tabela 1 umieszcza kopię algorytmu postępowania diagnostycznego w zaawansowanej postaci NDRP zalecaną przez WHO (2015). Ponieważ jest to schemat, więc lepszy byłby termin „Rycina” zamiast „Tabela”. Przed opublikowaniem pracy, proponowałabym uzyskać zgodę autorów na przedstawienie algorytmu, bądź jego modyfikację.
5. W wielu miejscach Doktorant umieszcza sformułowanie „rak płuc”, również w odniesieniu do nazwy kliniki, w której był pobierany materiał oceniany w pracy. Płuco jest narządem parzystym i zwykle, pisząc o nowotworze płuca, podobnie jak nerki należy używać liczby pojedynczej.
6. Część poświęconą diagnostyce immunohistochemicznej raka płuca Autor zatytułował „Barwienia immunohistochemiczne..”. Metody immunocytochemiczne czy immunohistochemiczne nie są barwieniem a raczej reakcją jaką ocenia się w mikroskopie świetlnym, do której dochodzi pomiędzy zastosowanym przeciwciałem a badanym białkiem, przy zastosowaniu różnych metod wizualizacji. W przyszłej publikacji, proponowałabym użyć terminu „badania” lub „reakcje immunohistochemiczne”.
7. W tym samym rozdziale, Doktorant pisze: „Ponieważ immunofenotyp TTF1 (-) i p40 (-) jest typowy dla przerzutów raków gruczołowych do płuca, niezbędna jest również korelacja z danymi klinicznymi”. Sformułowanie „typowy” nie jest właściwe, należy bowiem pamiętać, że zarówno niektóre z pierwotnych raków gruczołowych płuca, ale także inne postaci morfologiczne (np. rak wielkokomórkowy neuroendokrynnny, raki z gruczołów ślinowych) mogą wykazywać podobny immunofenotyp.
8. W rozdziale zatytułowanym „Badania molekularne w diagnostyce raka niedrobnokomórkowego płuca”, Autor pisze o wykrywaniu rearanżacji genu *ALK* za pomocą testu FISH lub za pomocą reakcji RT-PCR. Warto jednak również pamiętać, że obecnie powszechnie jest stosowana kwalifikacja immunohistochemiczna, polegająca na ocenie ekspresji białka ALK, a w przypadku dodatniej reakcji dopiero wykonuje się badanie FISH. Informacja ta jest istotna, również w kontekście recenzowanej pracy, w której Doktorant zwraca uwagę na konieczność racjonalnego dysponowania materiałem

oligobiopsyjnym i cytologicznym. Ocena immunohistochemiczna białka ALK jest obecnie wymagana w przypadkach braku mutacji w genie *EGFR*.

9. Również na końcu „Streszczenia” Autor stwierdza „...że 98% rozmazów raka gruczołowego i raka niedrobnokomórkowego NOS kwalifikuje się do badań molekularnych EGFR i ALK”. Ponieważ rozmazy cytologiczne nie zostały dotychczas zwalidowane do oceny ekspresji ALK, prawdopodobnie Autor ma na myśli materiał zawarty w cytobloczkach.
10. Ostatnią uwagą jest duża liczba tzw. literówek, które nie mają znaczenia dla strony merytorycznej pracy ale w przypadku przygotowywania pracy do publikacji wymagają większej staranności.

Wymienione uwagi nie mają znaczenia dla ogólnie pozytywnej oceny recenzowanej pracy, która spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora określone w art.13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65. Poz. 5 z późn. Zm.) i wnoszę do Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytut o dopuszczenie lek. med. Piotra Wiśniewskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Renata Langfort, prof. nadzw. IGiChP

Zakładu Patomorfologii
Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc

dr hab. n. med. Renata Langfort
profesor nadzwyczajny