

Dr hab. n. med. Dariusz Grzanka, prof. UMK  
Kierownik Katedry Patomorfologii Klinicznej  
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera  
w Bydgoszczy, UMK w Toruniu

Bydgoszcz, dn. 27.02.2020 r.

## Recenzja

rozprawy na stopień doktora nauk medycznych lek. Wojciecha Kuncmana  
pt. „Badania heterogenności ognisk pierwotnych i synchronicznych przerzutów w raku piersi”  
(praca wykonana w Zakładzie Patologii Katedry Onkologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi  
pod kierunkiem dr hab. n. med. Katarzyny Taran)

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana lek. Wojciecha Kuncmana należy do prac z zakresu medycyny i dotyczy niezwykle istotnego oraz aktualnego, zarówno w aspekcie klinicznym, jak i społecznym, problemu jakim są nowotwory piersi, w kontekście efektywnego rozwoju diagnostyki i terapii onkologicznej, zwłaszcza tej ukierunkowanej na molekularny profil indywidualnego pacjenta. Autor podjął się oznaczenia immunohistochemicznej ekspresji białek o uznanej (ER, PR, Ki-67, HER2) oraz potencjalnej (BCL2, cyklina D1, E-kadheryna, SLUG i SNAIL, GCDPF-15, PD-L1, PRL-3) wartości predykcyjnej i/lub prognostycznej dla pacjentek z rakiem piersi, celem oceny heterogenności ognisk pierwotnych i przerzutów synchronicznych do pachowych węzłów chłonnych oraz przeprowadzania teoretycznych rozważań odnośnie możliwych implikacji klinicznych tych oznaczeń.

W tradycyjnym ujęciu, niejednorodność guzów piersi powstałych u różnych pacjentów (ang. intertumoral heterogeneity) udokumentowana została w odniesieniu do ich histologii, profilu wrażliwości na leczenie oraz rezultatu postępowania klinicznego. Następnie, dzięki rozwojowi technik wysokoprzepustowych, takich jak sekwencjonowanie nowej generacji, udało się ukazać bardziej rzeczywisty zasięg tej heterogenności, która - względem ekspresji kluczowych biomarkerów (ER, PR, HER2, Ki-67) - stała się podstawą do molekularnej klasyfikacji nowotworów piersi, a tym samym dla podejmowania decyzji odnośnie stosowania terapii celowanej. Sytuację jeszcze bardziej komplikuje heterogenna ekspresja tych (i innych) biomarkerów wewnątrz guza (ang. intratumoral heterogeneity), której złożoność oraz implikacje kliniczne zaczęto doceniać stosunkowo niedawno. Zaznacza

się ona również w ogniskach wtórnych w stosunku do guza pierwotnego. W tym ostatnim przypadku zwraca się uwagę na konieczność uwzględnienia lokalizacji zmian oraz ich synchroniczność lub sekwencyjność, ze względu na fakt, że nowotwór zmienia się w czasie, jak i w zależności od miejsca przerzutowania. Sugeruje się, że ta przestrzenna, jak i czasowa niejednorodność wewnątrznowotworowa istnieje w zakresie znacznie przekraczającym powszechne przewidywania, choć w mnogości doniesień z piśmiennictwa zaznaczają się też liczne kontrowersje, w tym głosy przeciwne. Tym bardziej uważam, że podjęcie przez Doktoranta tej **tematyki badawczej** jest merytorycznie uzasadnione i jak najbardziej wpisuje się w nurt aktualnych, światowych badań nad rakiem piersi i towarzyszących im debat. Szczególnie wysoko oceniam to, że badane przez Doktoranta białka obejmują nie tylko te o uznanej wartości predykcyjnej i/lub prognostycznej dla pacjentów z rakiem piersi, ale również inne, znacznie słabiej scharakteryzowane w kontekście założeń pracy, ale równocześnie o potwierdzonym związku z fundamentalnymi mechanizmami rozwoju i progresji choroby nowotworowej, w tym m.in. z przejściem epitelialno-mezenchymalnym.

Rozprawa doktorska lek. Wojciecha Kuncmana przygotowana została w formie przejrzystej, liczącej 135 stron monografii, podzielonej na poszczególne rozdziały (ich numeracja ma charakter dwu, trzy lub czterostopniowy) według schematu powszechnie przyjętego dla tego typu opracowań, z wyraźnym podziałem na dwie zasadnicze części: teoretyczną i empiryczną. Taka struktura dysertacji jest adekwatna do podjętych przez Doktoranta celów badawczych i należy podkreślić, że zachowano w niej właściwe proporcje. Część teoretyczną rozprawy otwiera 37 stronicowe **Wprowadzenie** będące wnikliwym i aktualnym opracowaniem przeglądowym z zakresu tematyki badawczej. Przedstawiono w nim kolejno epidemiologię raka piersi oraz jego patomorfologię, ze szczególnym uwzględnieniem morfologicznej i molekularnej klasyfikacji oraz oceny zaawansowania klinicznego. W dalszej kolejności scharakteryzowano zjawisko heterogenności raków piersi, jak również mechanizmy tworzenia przerzutów, zwłaszcza w odniesieniu do wspomnianego nowotworu. Ostatni podrozdział tej części pracy poświęcono charakterystyce ocenianych w niej białek, dla których Doktorant zaproponował bardzo trafny podział na 3 grupy: „białek o przeważającej funkcji proliferacyjnej”, „białek powiązanych z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym” oraz „innych białek mających wpływ na proces przerzutowania i przebieg choroby nowotworowej, w tym poprzez oddziaływanie z układem odpornościowym”. Ten umowny podział nadaje przejrzystość nie tylko tej części rozprawy, ale również ułatwia

późniejszą analizę uzyskanych wyników. Wstęp teoretyczny dokumentuje niewątpliwie znaczną wiedzę Doktoranta w przedmiocie rozprawy oraz jego umiejętność doboru informacji naukowych i piśmiennictwa na potrzeby wykazania celowości podjętych badań. Śledzenie przedstawianych zagadnień ułatwia czytającemu 5 tabel i 1 diagram, przy czym ten ostatni winien być opatrzony numerem/-ami piśmiennictwa, na podstawie którego został sporządzony. W tej części dysertacji napotkałem również inne, drobne uchybienia (często o charakterze edytorskim), które jako recenzent mam obowiązek wymienić, lecz chciałbym podkreślić, że nie umniejszają one mojej pozytywnej oceny tego rozdziału:

- zgodnie z powszechnie przyjętą nomenklaturą ludzkie geny powinny być zapisywane kursywą i wielkimi literami
- pod symbolami m.in.: HER2, EGFR, PDGFR, IGF-1R kryją się receptory dla odpowiednich czynników wzrostu, a nie same czynniki wzrostu
- angielskie nazwy powinny być stosowane tylko wtedy, gdy brak jest polskich odpowiedników (m.in. Tabela 1, claudin-1)
- wielokrotnie pojawia się nieprawidłowy zapis „E-kadheryna”
- kilkakrotne tłumaczenie tych samych skrótów w tekście (np. EMT, CGH, ASCO)

**Założenia i cele pracy** przedstawione zostały w sposób jasny i bardzo czytelny, a ich treść jest zgodna z tematem rozprawy i ciekawa, zarówno z poznawczego, jak i klinicznego punktu widzenia. Cele pracy ujęto w następujące punkty:

1. Ewaluacja ekspresji wybranych białek o przeważającej funkcji proliferacyjnej (ER, PR, Ki-67, HER2, BCL-2, cyklina D1), białek związanych z przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym (E-kadheryna, SLUG i SNAIL) oraz białek potencjalnie wpływających na proces przerzutowania i przebieg choroby nowotworowej, w tym poprzez oddziaływanie z układem odpornościowym (GCDFP-15, PD-L1, PRL-3).
2. Ocena heterogenności ognisk pierwotnych i synchronicznych przerzutów w raku piersi.
3. Ukazanie możliwych związków ekspresji poszczególnych białek w badanych lokalizacjach oraz próba wstępnej analizy prawdopodobnie łączących je mechanizmów.
4. Poszukiwanie potencjalnych implikacji klinicznych ewaluacji immunoekspresji badanych białek w ogniskach pierwotnych i synchronicznych przerzutach w raku piersi.

Na potrzeby realizacji celów pracy, do badań włączono grupę 67 pacjentek z pierwotnym rakiem piersi z przerzutami w węzłach chłonnych pachowych (zgoda Komisji Bioetycznej nr RNN/12/16KE). Uzyskany materiał pooperacyjny opracowano według standardowej procedury diagnostycznej do uzyskania bloczków parafinowych, które posłużyły do konstrukcji mikromacierzy tkankowych, wykorzystanych następnie do badań immunohistochemicznych. Kryteria wykluczenia obejmowały współistnienie innych nowotworów, obecność przerzutów odległych i sekwencyjnych, mikroraka, mikroprzerzutów do węzłów chłonnych, rozległej martwicy oraz bardzo obfitego nacieku zapalnego w guzie pierwotnym. Te i inne informacje Doktorant zawarł w 8 stronicowym rozdziale ***Materiały i metody***, wzbogaconym o 2 tabele i 5 fotografii. Opis przeprowadzonych procedur jest jasny i dość wyczerpujący, choć tym czego mi zabrakło jest charakterystyka kliniczno-patomorfologiczna grupy badanej oraz określenie reprezentatywności próby na skonstruowanych mikromacierzach. Wiadomo bowiem, że heterogenność ocenianych tkanek względem różnych markerów białkowych jest pewnym ograniczeniem stosowania mikromacierzy tkankowych, stąd warto każdorazowo zaznaczać liczbę ocenianych rdzeni tkankowych pojedynczej próby, która oczywiście może wynosić 1, choć niewątpliwie analiza 2 lub więcej histiospotów zwiększa wiarygodność uzyskanych wyników. Rozdział kończy się wymienieniem prawidłowo dobranych metod statystycznych.

Analizę uzyskanych odczynów immunohistochemicznych przedstawiono w rozdziale ***Wyniki*** w postaci jasnych i zwięzłych opisów, 6 tabel i 7 reprezentatywnych fotografii, jak również graficznie, za pośrednictwem 15 diagramów, przy czym dokumentacja fotograficzna, w moim odczuciu, mogłaby być nieco bogatsza. Oceny immunoekspresji ER, PR, Ki-67, HER2, BCL2, E-kadheryny, SLUG i SNAIL, GCDFP-15, PD-L1 oraz PRL-3 w guzie pierwotnym i synchronicznych przerzutach do węzłów chłonnych dokonano odpowiednio u 47, 44, 42, 49, 42, 23, 21, 50, 22, 21 pacjentów. Chciałbym w tym miejscu podkreślić, że przeprowadzenie analizy aż tylu białek wymagało znacznego nakładu pracy na etapie standaryzacji przeciwciał, wykonania oznaczeń, a zwłaszcza oceny odczynów immunohistochemicznych. W toku przeprowadzonej ewaluacji wykazano istotne statystycznie zależności pomiędzy ekspresją ER, PR, SLUG i SNAIL oraz E-kadheryny w ogniskach pierwotnych raka piersi i synchronicznych przerzutach w węzłach chłonnych pachowych. Ujawniono ponadto aż 20 korelacji pomiędzy badanymi parametrami, w tym 3 w obrębie guzów pierwotnych, 11 pomiędzy ogniskami pierwotnymi a wtórnymi oraz 6 w przerzutach. Niewątpliwym walorem

tego rozdziału są dobrze opracowane podsumowania uzyskanych wyników, które znacznie ułatwiają czytelnikowi ich analizę. Atutem pracy jest również ciekawa, dobrze przeprowadzona 21-stronicowa **Dyskusja**, w której Doktorant bardzo skrupulatnie odniósł się do wyników własnych w kontekście prawidłowo dobranej literatury przedmiotu. Podobnie dobrze oceniam przedstawione w pracy **Wnioski**, które znajdują pokrycie w zastosowanej metodzie badawczej oraz uzyskanych wynikach i odpowiadają na wyznaczone cele. Osobiście jednak połączyłbym wnioski 1 i 3, gdyż ich sens jest właściwie identyczny, przy czym ten drugi opatrzony jest tylko dodatkowym komentarzem. W szczególności zgadzam się z wnioskowaniem, że wyniki przeprowadzonej analizy heterogenności zmian pierwotnych i wtórnych raka piersi mogą stanowić argument za potrzebą dalszej personalizacji leczenia chorych, a ocena przerzutów synchronicznych w węzłach chłonnych pachowych wydaje się być cennym uzupełnieniem ewaluacji ogniska pierwotnego.

**Bibliografia** pracy jest obszerna, liczy aż 286 pozycji przedstawiających zagadnienia powiązane tematycznie z rozprawą. Cytowane prace to, poza 1 wyjątkiem, źródła wyłącznie anglojęzyczne z okresu 1973-2019, przy czym większość z ostatniego dziesięciolecia. Mnogość dobrze dobranych i aktualnych prac wskazuje na rzetelność i dociekliwość Doktoranta w gromadzeniu i analizowaniu danych ze światowego piśmiennictwa. Ta część pracy została starannie przygotowana, spotkałem się jedynie z pojedynczym brakiem podania roku publikacji (w pozycji nr 222) oraz brakiem numeru woluminu i stron (w pozycji nr 278). Zbędne wydaje mi się natomiast podawanie daty ukazania publikacji (dzień/miesiąc), tym bardziej, że nie jest to konsekwentnie i jednolicie stosowane w całym wykazie piśmiennictwa. Są to jednak tylko drobne uwagi o charakterze edytorskim.

Kolejny rozdział pracy stanowi **Aneks** zawierający alfabetyczny wykaz skrótów i akronimów wykorzystanych w tekście, a także spis tabel, diagramów i fotografii. Rozprawę doktorską kończy **Streszczenie w języku polskim i angielskim**, które stanowią jej wartościowe podsumowanie.

Chciałbym podkreślić, że przedłożona mi do recenzji monografia pt. „Badania heterogenności ognisk pierwotnych i synchronicznych przerzutów w raku piersi” stanowi oryginalny oraz wartościowy wkład w nauki medyczne i ma potencjalnie aplikacyjny charakter. Przedstawione nieliczne uwagi w żadnym stopniu nie wpływają na jak najbardziej pozytywną ocenę całej pracy, która spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim. Na tej podstawie składam do Rady Naukowej w dyscyplinie nauk medycznych

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi **wniosek o dopuszczenie Pana lek. Wojciecha Kuncmana do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie, biorąc pod uwagę trafność wyboru tematu badań oraz potencjalnie aplikacyjny charakter uzyskanych wyników wnoszę do Wysokiej Rady o wyróżnienie Pana lek. Wojciecha Kuncmana stosowną nagrodą.

  
KIEROWNIK  
Katedry Patomorfologii Klinicznej  
dr hab. Dariusz Brzanka, prof. UMK