UNIWERSYTET MEDYCZNY im. KAROLA MARCINKOWSKIEGO w POZNANIU

KATEDRA PATOMORFOLOGII KLINICZNEJ

Kierownik: prof. dr hab. Przemysław Majewski

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 15 grudnia 2017 roku

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Alicji Charkiewicz pt.: „Diagnostyka i znaczenie prognostyczne mikroprzerzutów w węzłach chłonnych w raku jelita grubego"

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Rak jelita grubego to jeden z najczęściej diagnozowanych nowotworów w Polsce, jest drugim, co do częstości występowania nowotworem złośliwym u kobiet i trzecim u mężczyzn. Obserwuje się ciągły wzrost zachorowań na ten nowotwór. Stanowi on nadal wiodącą przyczynę zgonów na nowotwory złośliwe, zajmując drugie miejsce pod względem umieralności u obu płci.

Główną przyczynę śmierci pacjentów po radykalnym leczeniu chirurgicznym raka jelita grubego nie stanowi zwykle ognisko pierwotne guza, lecz efekty spowodowane wznową choroby lub powstaniem przerzutów.

Podstawą prognozowania przebiegu choroby nowotworowej i doboru optymalnej metody leczenia jest określenie stopnia zaawansowania nowotworu. Do najistotniejszych niezależnych czynników rokowniczych, w raku jelita grubego, zaliczamy, między innymi: stopień miejscowego naciekania ściany jelita przez guz, obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych, obecność depozytów nowotworowych, obecność przerzutów odległych.

Agresywność raka jelita grubego i gorsze rokowanie jest związane z głębszą penetracją ściany jelita przez nowotwór, bezpośrednim naciekaniem do innych narządów lub struktur, obecnością i liczbą przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych oraz przerzutami odległymi.

Powszechnie stosowane rutynowe metody oceny histopatologicznej nie są wystarczające do czułej detekcji komórek nowotworowych, zlokalizowanych w węzłach chłonnych. Badania wykorzystujące techniki immunohistochemiczne

wykazały, że u około 20-30% pacjentów, u których nie wykryto przerzutów nowotworowych w węzłach chłonnych w rutynowym badaniu histologicznym, zidentyfikowano w węzłach chłonnych mikroprzerzuty nowotworowe.

Zwiększenie czułości identyfikacji mikroprzerzutów ma swoje implikacje kliniczne ze względu na możliwość reklasyfikacji oceny w systemie pTNM cechy pN0 do pN1, co w konsekwencji prowadzi do zmiany toku postępowania terapeutycznego.

Uważam za bardzo cenne, podjęcie przez Doktorantkę szerokiej analizy węzłów chłonnych w celu wykrywania mikroprzerzutów nowotworowych. Analiza ta przyczyni się do lepszego poznania przebiegu choroby nowotworowej jelita grubego i może owocować opracowaniem skutecznej metody diagnostycznej oceniającej stopień zaawansowania nowotworu oraz wdrożeniem skutecznej terapii pooperacyjnej u tych pacjentów.

Celem przedłożonej mi do oceny rozprawy doktorskiej była:

1. ocena wpływu obecności mikroprzerzutów w regionalnych węzłach chłonnych na rokowanie (czas 3-letniego oraz całkowitego przeżycia) u chorych z rakiem okrężnicy i odbytnicy;
2. identyfikacja mikroprzerzutów w regionalnych węzłach chłonnych za pomocą techniki półseryjnego skrawania oraz metod irnmunohistochemicznych u chorych z rakiem jelita grubego w aspekcie ich potencjalnego znaczenia w ocenie stopnia zaawansowania nowotworu oraz doboru odpowiedniej terapii;
3. analiza zależności pomiędzy statusem regionalnych węzłów chłonnych (obecność lub brak mikroprzerzutów) a patomorfologicznymi czynnikami rokowniczymi określanymi w utkaniu raka jelita grubego: typ histologiczny, stopień zróżnicowania histopatologicznego, stopień zaawansowania, obecność mikropączkowania w strefie brzeżnej raka, inwazja naczyń limfatycznych, inwazja naczyń krwionośnych i naciekanie przestrzeni okołonerwowej, pod względem próby identyfikacji grupy pacjentów ze zwiększonym ryzykiem obecności mikroprzerzutów w regionalnych węzłach chłonnych;
4. określenie grupy najistotniejszych czynników patomorfologicznych wpływających na czas całkowitego przeżycia u pacjentów z rakiem jelita grubego.

Do badań wykorzystano wycinki tkanki z guza pierwotnego jelita grubego, około okrężniczej i około odbytniczej tkanki tłuszczowej oraz regionalnych węzłów chłonnych wcześniej zdiagnozowanych, jako pN0 w rutynowej diagnostyce histopatologicznej. Łącznie, analizom poddano 1041 regionalnych węzłów chłonnych niezajętych nowotworowo. Materiał badany pochodził od 79 chorych na raka jelita grubego.

Wstępnie, pacjenci zostali podzieleni na 2 grupy: grupa I - 42 chorych (650 węzłów) bez przerzutów w węzłach chłonnych pN0 oraz grupa II - 37 pacjentów ze stwierdzonymi w barwieniu H&E przerzutami w części węzłów chłonnych pN1 lub pN2 (558 węzłów pN0 i 167 węzłów z makroprzerzutami).

W pierwszym etapie, tkanki guza pierwotnego jelita grubego oraz około okrężnicza, około odbytnicza tkanka tłuszczowa i regionalne węzły chłonne zostały poddane retrospektywnej ocenie przy użyciu rutynowych metod histopatologicznych i dodatkowo reakcji immunohistochemicznej z CD31, podoplaniną i S100 w celu weryfikacji i/lub rozszerzenia pierwotnej diagnozy.

W drugim etapie materiał z każdego niezajętego nowotworowo węzła chłonnego (pN0) został skrojony półseryjnie z 3 poziomów, po 2 siostrzane skrawki grubości 4μm. Różnica pomiędzy poziomami wynosiła 250μm. Następnie jeden skrawek z każdego poziomu barwiono metodą H&E i oceniano w mikroskopie świetlnym. Pozostałe skrawki z węzłów chłonnych zostały przeznaczone do badań immunohistochemicznych.

Identyfikacja mikroprzerzutów w regionalnych węzłach chłonnych została przeprowadzona za pomocą metody immunohistochemicznej z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko cytokeratynie 20. Preparaty zostały ocenione w mikroskopie świetlnym w celu stwierdzenia obecności lub braku cytokeratyno-reaktywnych komórek z jednoczesną oceną morfologiczną ich cech złośliwości.

Wyniki badań klinicznych, histopatologicznych i immunomorfologicznych zostały poddane dokładnej analizie statystycznej.

Badania przeprowadzono u 79 chorych na raka jelita grubego poddanych leczeniu operacyjnemu w latach 2001-2011. Dominującym typem raka jelita grubego w badanej grupie był gruczolakorak, którego rozpoznano u 65 chorych (82,3%). Mniejszy odsetek stanowił rak gruczołowy śluzotwórczy, który został rozpoznany u 10 chorych (12,7%), zaś gruczolakorak śluzotwórczy częściowo

śluzokomórkowy stwierdzono u 2 chorych (2,4%). Rak neuroendokrynny dobrze zróżnicowany został zdiagnozowany u 1 chorego (1,3%), podobnie jak gruczolakorak galaretowaty, który również został rozpoznany u 1 chorego (1,3%).

We wszystkich badanych przypadkach ocenę histologiczną przeprowadzono zgodnie z zaleceniami Polskiego Towarzystwa Patologów.

Realizując cele pracy Doktorantka uzyskała następujące wyniki:

1. Ogniska cytokeratyno-pozytywnych komórek mierzących mniej niż 2 mm, które określono jako mikroprzerzuty, zidentyfikowano w 51 (4,9%) węzłach chłonnych pobranych od 22 (27,8%) pacjentów. Spośród wszystkich pacjentów (42 chorych) z niezajętymi nowotworowo węzłami chłonnymi pN0 (650 węzłów). Mikroprzerzuty zidentyfikowano u 14 (33,3%) chorych w 33 (5,1 %) węzłach chłonnych. Natomiast w grupie obejmującej 37 chorych z makroprzerzutami w części węzłów chłonnych, wykazano, że spośród pozostałych 391 uprzednio zdiagnozowanych negatywnych węzłów chłonnych mikroprzerzuty są obecne w 18 węzłach (4,6%) uzyskanych od 8 (21,6%) chorych.
2. Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy ekspresją CK20 w kierunku identyfikacji mikroprzerzutów a liczbą pozyskanych i przebadanych regionalnych węzłów chłonnych (p=0,839). Wyniki analizy pokazały, że średnia liczba pozyskanych i przebadanych węzłów chłonnych - 15,30 (mediana=15, zakres 4-34) u każdego chorego w grupie pacjentów, u których stwierdzono mikroprzerzuty była podobna do średniej liczby węzłów chłonnych - 15,68 (mediana=15, zakres 3-48) w grupie pacjentów z węzłami negatywnymi dla mikroprzerzutów.
3. W niniejszej pracy oceniono wskaźniki zaawansowania histopatologicznego chorych na raka jelita grubego, jako potencjalne czynniki rokownicze pomocne w identyfikacji grupy pacjentów z wysokim ryzykiem obecności mikroprzerzutów w regionalnych węzłach chłonnych. Pączkowanie na obrzeżach guza pierwotnego było obecne u 11 chorych (13,9%). Inwazję naczyń żylnych zaobserwowano w 8 przypadkach (10,1%). Inwazję naczyń limfatycznych uwidoczniono u 12 chorych (15,2%). Inwazję okołonerwową wykazano w 16 guzach (20,2%).
4. W przeprowadzonych analizach stwierdzono zależność istotną statystycznie pomiędzy grupami wyznaczonymi na podstawie statusu węzłów chłonnych z

uwzględnieniem mikroprzerzutów a inwazją okołonerwową (p=0,002). Najwyższy odsetek przypadków naciekania przestrzeni okołonerwowej odnotowano w grupie IV (50%) i III (34,48%). W obrębie grupy I i II inwazję okołonerwową zaobserwowano jedynie u 2 pacjentów, kolejno 3,57% i 7,14%.

5. Pozostałe wyniki analiz porównawczych nie wykazywały istotności statystycznej dla czynników takich jak: płeć, wiek (punkt graniczny 65 lat), lokalizacja zmiany nowotworowej, stopień naciekania guza, inwazja naczyń żylnych i limfatycznych. Natomiast w ocenie korelacji pomiędzy określonymi grupami wyznaczonymi na podstawie statusu węzłów chłonnych z uwzględnieniem mikroprzerzutów a pączkowaniem w strefie brzeżnej guza (p=0,094) oraz depozytami nowotoworowymi (p=0,101) była widoczna różnica, jednak nie osiągnęła ona wartości istotnej statystycznej. Zaobserwowane zależności były związane ze zdecydowanie większą częstością identyfikacji tych parametrów u chorych z makroprzerzutami w węzłach chłonnych.

6. W analizie zależności pomiędzy czasem całkowitego przeżycia a grupami chorych wyznaczonymi na podstawie statusu węzłów chłonnych z uwzględnieniem mikroprzerzutów stwierdzono istotnie statystyczny związek obecności makroprzerzutów i/lub mikroprzerzutów z krótszym czasem całkowitego przeżycia (p=0,048). Obecność mikroprzerzutów (grupa II) była związana z najkrótszym czasem całkowitego przeżycia (mediana=31 miesięcy, zakres 4-79 miesięcy). Czasy przeżycia różniły się znacznie pomiędzy chorymi w grupie III (mediana=37 miesięcy, zakres 1-160 miesięcy) i IV (mediana=48 miesięcy, zakres 6-112 miesięcy) w stosunku do pacjentów z grupy I (mediana=51 miesięcy, zakres 1-163 miesięcy), którzy wykazywali najdłuższy czas całkowitego przeżycia.
7. W analizie 3-letniego czasu przeżycia w zależności od wyznaczonych grup, obecność pozytywnych węzłów chłonnych dla makroprzerzutów i/lub mikroprzerzutów wykazywała istotny statystycznie związek ze zmniejszonym odsetkiem przeżyć (p=0,025). Najniższy odsetek przeżyć 3-letnich (50%) odnotowano w grupie II, którą determinowały obecne mikroprzerzuty bez makroprzerzutów. Nieco lepszy odsetek przeżycia trzech lat od momentu resekcji guza nowotworowego obserwowano w grupie III (51,72%) i IV (75%). Najwyższy odsetek przeżych 3-letnich (85,71%) wykazała grupa I z

negatywnymi węzłami.

8. W wieloczynnikowej analizie regresji proporcjonalnego hazardu Coxa opracowano optymalny model prognostyczny, który był naj mocniej związany z czasem całkowitego przeżycia chorych. Obejmował on następujące czynniki: grupę II - pacjenci bez makroprzerzutów i ze stwierdzonymi mikroprzerzutami (p=0,033), stopień naciekania guza (p=0,009), przerzuty do węzłów chłonnych (p=0,065) oraz depozyty nowotworowe (p=0,011).

Na podstawie analizy wyników mgr Alicja Charkiewicz wyciągnęła następujące wnioski:

1. Obecność mikroprzerzutów w regionalnych węzłach chłonnych u pacjentów z rakiem okrężnicy i odbytnicy jest niezależnym, niekorzystnym czynnikiem rokowniczym co do 3-letniego i całkowitego czasu przeżycia.
2. Zastosowanie techniki półseryjnego krojenia i metod immunohistochemicznych wyraźnie zwiększa częstość identyfikacji mikroprzerzutów w węzłach chłonnych u pacjentów z rakiem jelita grubego, co pozwala na reklasyfikację ich statusu z pN0 do pN1 oraz na skorzystanie z dodatkowych korzyści leczenia wynikających z możliwości zastosowania terapii adiuwantowej.
3. Uznane lub domniemane patomorfologiczne czynniki rokownicze określane w utkaniu raka jelita grubego nie są przydatne w identyfikacji grupy pacjentów ze zwiększonym ryzykiem obecności mikroprzerzutów w regionalnych węzłach chłonnych.
4. W wieloczynnikowej analizie Cox'a wytypowano grupę niekorzystnych czynników prognostycznych, obejmującą mikroprzerzuty w węzłach chłonnych, stopień naciekania guza nowotworowego, makroprzerzuty w węzłach chłonnych oraz depozyty nowotworowe, które były najistoniej związane z czasem całkowitego przeżycia chorych.

Oceniana rozprawa doktorska, licząca 97 stron, napisana jest zgodnie ze schematem przewidzianym dla prac badawczych. Składa się z następujących części: wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski, streszczenie w języku angielskim, wykaz skrótów, spis tabel, rycin oraz rycin/fotografii i piśmiennictwo.

Tekst pracy zawiera 15 tabeli, 15 rycin i 16 rycin/fotografii. Piśmiennictwo obejmuje 132 publikacje ogłoszone w recenzowanych wydawnictwach zagranicznych oraz 7 publikacji ogłoszonych w recenzowanych wydawnictwach polskich. 72 z 139 pozycji piśmiennictwa pochodzi z ostatnich dziesięciu lat. Publikacje starsze są publikacjami źródłowymi dla omawianych zagadnień.

Rozprawa doktorska wykonana jest starannie począwszy od zaplanowania badań, na opracowaniu graficznym kończąc. We wstępie mgr Alicja Charkiewicz wykazała się dużą wiedzą z zakresu epidemiologii, etiopatogenezy, czynników prognostycznych i predykcyjnych w raku jelita grubego. Omówiła też implikacje terapeutyczne związane z uznanymi czynnikami prognostycznymi i predykcyjnymi. Dyskusja udowodniła, że posiada umiejętność interpretowania wyników i rozpatrywania ich w kontekście z danymi z prawidłowo dobranego piśmiennictwa.

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

Rozprawa doktorska mgr Alicji Charkiewicz stanowi samodzielne rozwiązanie problemu naukowego, a Doktorantka wykazała się dużą wiedzą teoretyczną i umiejętnościami praktycznymi w zakresie szeroko pojętej analizy patomorfologicznej diagnozy, rokowania i monitorowania przebiegu leczenia chorych na raka jelita grubego. W moim osądzie rozprawę doktorską mgr Alicji Charkiewicz 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 mgr Alicji Charkiewicz jest jednym z pierwszych tak obszernych opracowań dotyczącym znaczenia prognostycznego, wykrywania mikroprzerzutów w węzłach chłonnych w raku jelita grubego w polskim piśmiennictwie. Wyniki tej rozprawy doktorskiej mogą mieć znaczenie praktyczne w prognozowaniu przebiegu pooperacyjnego i opracowaniu strategii leczenia skojarzonego raka jelita grubego.

Jedynym uchybieniem zaważonym przeze mnie jest brak streszczenia w języku polskim.

Rozprawę doktorską mgr Alicji Charkiewicz pt.: „Diagnostyka i znaczenie prognostyczne mikroprzerzutów w węzłach chłonnych w raku jelita grubego" oceniam, jako bardzo dobrą i uważam, że spełnia w całej rozciągłości warunki stawiane rozprawom doktorskim. Dlatego zwracam się do do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o wszczęcie dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uważam równocześnie, że rozprawa doktorska przygotowana przez mgr Alicję Charkiewicz zasługuje na wyróżnienie nagrodą.

KIEROWNIK
Katedry Patomorfologii Klinicznej
P. Majewski
Prof. dr hab. Przemysław Majewski