Dr hab. n. med. Rafał Wiesław Stec
Klinika Onkologii
Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie
Ul. Szaserów 128, 01-141 Warszawa
e-mail: drrafals@wp.pl

Warszawa, dnia 08 sierpnia 2018 r.

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

lek. Magdaleny Pogorzelskiej

pt. „Ocena wartości predykcyjnej sCD4, sCD8, sCD25, IL-2 w leczeniu chorych na czerniaka w IV stadium klinicznego zaawansowania choroby poddawanych terapii anty-CTLA4".

Na świecie odnotowuje się rocznie około 232 000 zachorowań na czerniaki rocznie z tendencją wzrostową częstości zachorowań zarówno w Polsce, jak i na świecie. W Polsce rocznie diagnozuje się około 1400 nowych przypadków czerniaków u mężczyzn oraz 1700 przypadków u kobiet. Ryzyko zachorowania rośnie wraz z wiekiem, osiągając szczyt w ósmej dekadzie życia. Czerniaki charakteryzują się najwyraźniej zaznaczonym trendem wzrostowym wśród wszystkich nowotworów złośliwych (współczynnik zachorowalności w populacji kaukaskiej rośnie o ok. 3-7% rocznie). Pomimo, że częstość zachorowań na czerniaki jest znacznie niższa w porównaniu do innych nowotworów złośliwych, to jednak odpowiadają one za około 80% zgonów z powodu wszystkich nowotworów skóry łącznie.

Najlepiej poznanym czynnikiem predysponującym do zachorowania na czerniaki jest promieniowanie ultrafioletowe (UVR). Do pozostałych istotnych klinicznie czynników zalicza się stałe drażnienie mechaniczne lub chemiczne, predyspozycje genetyczne, takie jak np. rodzinny zespół znamion atypowych

(*familial atypical mole syndrome*, FAMS) oraz mutacje w genach *CDKN2A*, *BRCA 1* i *CDK4*.

Czerniaki w 25% powstają na podłożu wcześniej istniejących znamion, jednakże zdecydowana większość z nich rozwija się w obrębie zmian skórnych powstałych *de novo*. Wczesnymi objawami czerniaka może być zmiana rozmiaru, zabarwienia bądź kształtu znamienia, zgrubienie, a także swędzenie lub wystąpienie krwawienia.

Rozpuszczalne formy antygenów (ang. *soluble, s*), takie jak sCD4, sCD8, sCD25, są wykrywalne w osoczu, surowicy krwi, tkankach i płynach ustrojowych i mogą pełnić różne funkcje. Uwalnianie rozpuszczalnych form antygenów sCD4, sCD8 i sCD25, nazywanych często markerami proliferacji dochodzi w trakcie aktywacji limfocytów T.

W leczeniu czerniaków stosuje się m.in. immunoterapię ipilimumabem, którego skuteczność kliniczna została potwierdzona w badaniach 2. i 3. fazy. Ipilimumab jest to pierwsze w pełni humanizowane przeciwciało klasy IgG1 skierowane przeciwko receptorowi CTLA-4 obecnemu na powierzchni limfocytów T. Mechanizm jego działania związany jest z blokadą powstania kompleksu CTLA-4:B7, odwracając hamujący wpływ receptora CTLA-4 na układ immunologiczny. Efektem jego zastosowania jest wydłużona i zintensyfikowana odpowiedź immunologiczna wywołana obecnością antygenów pochodzących z komórek nowotworowych.

Kluczowym elementem nowoczesnej strategii onkologicznej także u chorych na czerniaki jest stosowanie terapii ukierunkowanych molekularnie w tym immunoterapii, tylko w tych grupach chorych, w których rzeczywiście określona terapia może być skuteczna m.in. poprzez poszukiwanie czynników predykcyjnych.

Doktorantka podjęła bardzo ważny temat związany z poszukiwaniem czynników predykcyjnych dla terapii anty-CTLA-4 (ipilimumab) u chorych na czerniaki. Wnikliwe rozważania związane z tym tematem stanowią istotny wkład

w rozwój nowoczesnej onkologii spersonalizowanej, która stanowi oparcie i podstawę dla podejmowania odpowiednich decyzji klinicznych. Z jednej strony znalezienie czynników predykcyjnych pozwala na identyfikację tej grupy pacjentów, która może odnieść największą korzyść z leczenia, a z drugiej pozwala na ograniczenie niepotrzebnych kosztów leczenia.

Doktorantka w swojej pracy określiła cztery precyzyjnie sformułowane i kluczowe cele:

1) ocena stężeń sCD4, sCD8, sCD25, IL-2 w surowicy krwi chorych na czerniaka w IV stadium klinicznego zaawansowania choroby przed rozpoczęciem terapii anty-CTLA-4;
2) ocena odsetka odpowiedzi na leczenie oraz czasu całkowitego przeżycia w grupie chorych na czerniaka w IV stadium klinicznego zaawansowania choroby poddawanych terapii ipilimumabem;
3) ocena korelacji pomiędzy stanem sprawności wg WHO, wiekiem zachorowania, płcią, lokalizacją zmiany pierwotnej oraz liczbą linii chemioterapii przed rozpoczęciem immunoterapii ipilimumabem chorych na czerniaka w IV stadium klinicznego zaawansowania choroby poddawanych terapii ipilimumabem a czasem całkowitego przeżycia tych pacjentów w celu określenia wartości predykcyjnej tych parametrów;
4) ocena korelacji pomiędzy stężeniami sCD4, sCD8, sCD25, IL-2 w surowicy krwi chorych na czerniaka w IV stadium klinicznego zaawansowania choroby poddawanych terapii ipilimumabem a czasem całkowitego przeżycia tych pacjentów w celu określenia wartości predykcyjnej tych parametrów.

Materiał badawczy stanowiła krew żylna (2 próbówki po 5 ml) pobrana z pojedynczego nakłucia od 40 pacjentów z rozpoznanymi czerniakami skóry (z grupy badawczej wyłączono chorych z rozpoznaniem czerniaka gałki ocznej,

pomimo pierwotnej kwalifikacji tej grupy pacjentów do programu EAP z uwagi na brak skuteczności klinicznej ipilimumabu) w IV stadium klinicznego zaawansowania choroby leczonych w Białostockim Centrum Onkologii im. Marii-Curie Skłodowskiej w Białymstoku, Centrum Onkologii-Instytutu M.C. Skłodowskiej w Warszawie, Centrum Onkologii - Instytutu M.C. Skłodowskiej Oddział w Krakowie, Centrum Onkologii w Katowicach zakwalifikowanych do leczenia przeciwciałem anty-CTLA-4 wg określonych przez Doktorantkę kryteriów. Wszyscy pacjenci wyrazili świadomą zgodę na pobranie krwi i wykonanie oznaczeń. Na projekt badawczy uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

Doktorantka w swojej pracy zastosowała następujące metody badawcze: metoda Sandwich ELISA (oznaczenie stężeń w surowicy krwi: sCD4, sCD8, sCD25 oraz IL-2).

Użyte przez Doktorantkę metody analiz statystycznych: metoda Kaplana-Meiera (analiza czasu przeżycia całkowitego), model proporcjonalnego hazardu Coxa oraz test log-rank (analiza statystyczna zależności pomiędzy stanem sprawności wg WHO, wiekiem zachorowania, płcią pacjenta, lokalizacją zmiany pierwotnej, liczbą linii chemioterapii przed rozpoczęciem terapii ipilimumabem, sCD4, sCD8, IL-2, sCD25, a całkowitym czasem przeżycia chorych), analiza jednoparametryczna metodą proporcjonalnych hazardów Coxa (wykonana w przypadku uzyskania widocznej separacji krzywych przeżycia świadczącej o zaistnieniu trendu w teście log-rank) zostały dobrane w sposób prawidłowy i zgodny z zasadami opracowania wyników, także dla małych grup. Zgodnie z założeniami testów statystycznych, do ostatecznej analizy włączono chorych ze znaną datą zgonu (jedynie 24 chorych).

Lek. Magdalena Pogorzelska w swojej pracy badawczej uzyskała następujące wyniki:

1. Udowodniła znamienną statystycznie zależność pomiędzy stanem sprawności wg skali WHO przed rozpoczęciem terapii ipilimumabem, a czasem przeżycia całkowitego (*p=0,012*);
2. Stwierdziła znamienną zależność pomiędzy wiekiem w momencie zachorowania a przeżyciem całkowitym chorych na zaawansowanego czerniaka leczonych ipilimumabem (dla grupy pacjentów w wieku powyżej mediany [powyżej 50 roku życia, *p=0,03*] wynik jednoparametrycznej analizy przeżycia metodą proporcjonalnych hazardów Coxa);
3. Wykazała brak wpływu płci na przeżycie chorych na zaawansowanego czerniaka leczonych ipilimumabem (*p= 0,248*);
4. W analizie dwóch głównych lokalizacji czerniaka (kończyny i tułów) stwierdziła, że zarówno lokalizacja zmiany pierwotnej na tułowiu jak i również lokalizacja kończynowa nie mają wpływu na czas całkowitego przeżycia badanej grupy chorych (dla lokalizacji kończynowej *p=0,88*, dla lokalizacji na tułowiu *p=0,57*);
5. Nie wykazała zależności pomiędzy liczbą linii wcześniejszego leczenia systemowego przed rozpoczęciem terapii ipilimumabem a czasem przeżycia całkowitego grupy chorych, w której zastosowano ten lek (*p= 0,58*);
6. Analizując wyniki Doktorantka wykazała, że wzrost stężenia sCD4 w surowicy krwi przed rozpoczęciem leczenia ipilimumabem istotnie wpływa na czas całkowitego przeżycia chorych na zaawansowanego czerniaka, zatem istnieje istotna zależność pomiędzy zwiększonym stężeniem sCD4 w surowicy krwi przed rozpoczęciem leczenia ipilimumabem a czasem przeżycia całkowitego chorych na zaawansowanego czerniaka (*p= 0,012*);
7. Stwierdziła, że istnieje istotna zależność pomiędzy zwiększonym stężeniem sCD8 w surowicy krwi przed rozpoczęciem leczenia

ipilimumabem a czasem przeżycia całkowitego chorych na zaawansowanego czerniaka (wyniki jednoparametrycznej analizy przeżycia metodą proporcjonalnych hazardów Coxa, *p=0,004*; w teście log-rank *p=0,11*);

8. Nie wykazała znamiennego wpływu stężenia sC25 w surowicy krwi pacjentów z grupy badanej na czas przeżycia całkowitego (*p= 0,96*);
9. Nie udało się Doktorantce oznaczyć stężenia IL-2 w surowicy krwi pacjentów z grupy badanej, pomimo stwierdzenia prawidłowych stężeń w dołkach z próbami i rozcieńczeniami oraz trzykrotnemu powtórzeniu analizy przy zmniejszonym rozcieńczeniu.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wyciągnęła wnioski, które były zgodne z założonymi celami:

1. Stwierdzono istotną zależność pomiędzy: stanem sprawności chorych ocenianym wg skali WHO, stężeniem sCD4, sCD8 w surowicy krwi chorych na zaawansowanego czerniaka poddawanych terapii ipilimumabem ocenianym przed rozpoczęciem leczenia tym lekiem a czasem całkowitego przeżycia tych chorych. Może to świadczyć o predykcyjnej roli powyższych parametrów w odniesieniu do zastosowania terapii anty-CTLA-4 u chorych na zaawansowanego czerniaka.
2. Nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy wiekiem zachorowania, płcią, lokalizacją zmiany pierwotnej, liczbą linii leczenia przed rozpoczęciem immunoterapii, stężeniem sCD25 w surowicy krwi a czasem całkowitego przeżycia chorych na zaawansowanego czereniaka poddawanych terapii anty-CTLA-4, zatem powyższe parametry nie wykazują przydatności jako czynniki predykcyjne w tej sytuacji klinicznej.
3. Nie stwierdzono podwyższonego stężenia IL-2 w surowicy krwi chorych przed rozpoczęciem leczenia ipilimumabem. Być może wynika to ze

znacznej niestabilności IL-2 lub też nie odgrywa ona bezpośredniej roli w odpowiedzi na terapię anty-CTLA-4. Ze względu na stwierdzone w badaniach własnych wysokie wyjściowe stężenia sCD25,który pełni rolę receptora dla IL-2, można wysunąć hipotezę, iż powstają kompleksy IL-2-receptor(sCD25), uniemożliwiające ocenę stężenia IL-2 w surowicy krwi chorych przed rozpoczęciem leczenia ipilimumabem.

4. Czas całkowitego przeżycia chorych na zaawansowanego czerniaka poddawanych terapii ipilimumabem wydaje się być wydłużony w porównaniu do historycznych kohort chorych poddawanych innym formom leczenia systemowego, w tym w szczególności chemioterapii paliatywnej. Pojedyncze przypadki wieloletnich remisji u chorych na zaawansowanego czerniaka mogą potwierdzać rolę immunologicznych mechanizmów w rozwoju tej choroby i jednocześnie dawać nadzieję na dalszą poprawę wyników leczenia w przyszłości przy zastosowaniu nowych, udoskonalonych form immunoterapii.

Pod względem formalnym rozprawa doktorska zawiera 142 strony, 22 tabele, 14 rycin i 208 pozycji piśmiennictwa oraz została podzielona na typowe dla dysertacji elementy: wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski, literatura źródłowa, streszczenia w języku polskim i w języku angielskim, spis tabel oraz spis rycin.

Doktorantka w swojej pracy wykazała się dojrzałym warsztatem naukowym, umiejętnością syntetycznego i logicznego myślenia, które świadczą o znajomości zasad planowania i przeprowadzania badań naukowych. Na podkreślenie zasługuje fakt współpracy Doktorantki w ramach czterech ważnych ośrodków onkologicznych: Białostockiego Centrum Onkologii im. Marii-Curie Skłodowskiej w Białymstoku, Centrum Onkologii-Instytutu M.C. Skłodowskiej w Warszawie, Centrum Onkologii- Instytutu M.C. Skłodowskiej Oddział w Krakowie, Centrum Onkologii w Katowicach.

W dyskusji lek. Magdalena Pogorzelska oceniła i porównała swoje wyniki z danymi literaturowymi w sposób rzetelny i odpowiedni, krytycznie odnosząc się do własnych wyników i danych przytoczonych ze źródeł literaturowych, co świadczy z jednej strony o jej dużej wiedzy, a z drugiej o umiejętnym sposobie interpretacji. Piśmiennictwo jest nowoczesne, anglojęzyczne zawierające kluczowe pozycje dotyczące przedstawionego zagadnienia, które zostało zacytowane we właściwym miejscu, chociaż wydaje się że jest nieco za obszerne (208 pozycji piśmiennictwa).

Chciałbym także zaznaczyć, że oceniana przeze mnie praca może mieć swoje istotne implikacje kliniczne związane z identyfikacją czynników predykcyjnych nowoczesnych, ale kosztownych terapii, które w zasadniczy sposób mogą wpłynąć na wybór grupy pacjentów leczonych ipilimumabem, co doskonale wpisuje się w onkologię spersonalizowaną.

Po szczegółowym zapoznaniu się całością pracy jednoznacznie stwierdzam, że nie mam istotnych uwag obniżających jej poziom.

W ocenie rozprawy doktorskiej z obowiązku recenzenta znalazłem następujące drobne uchybienia, które znacząco nie umniejszają jej wartości:

1. mała liczebność grupy badanej, na ten fakt Doktorantka zwróciła uwagę w przedstawionej pracy; do ostatecznej analizy zakwalifikowano jedynie 24 chorych ze znaną data zgonu, ale brak jest w literaturze światowej badań prospektywnych na dużych populacjach chorych;
2. błędy stylistyczne i opisowe wymagające korekty:

- str. 73: „Oznaczając stężenie IL-2 zgodnie wcześniej opisaną metodyką nie udało się oznaczyć " – błąd stylistyczny;

- str. 74: „na przestrzeni ostatnich lat niezmiennie wskazują, iż aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w surowicy krwi chorych jest niezależnym negatywnym czynnikiem prognostycznym " - powinno być „na przestrzeni ostatnich lat niezmiennie wskazują, iż wysoka aktywność dehydrogenazy

mleczanowej (LDH) w surowicy krwi chorych jest niezależnym negatywnym czynnikiem prognostycznym";

- str. 75: „w przypadku prawidłowego aktywność LDH" – powinno być „w przypadku prawidłowej aktywności LDH";

- str. 82: „młodych (rozpoznanie ustalone poniżej 20 roku życia) paradoksalnie obserwowano lepsze przeżycia pomimo stwierdzenia powyższych cech" – powinno być „młodych (rozpoznanie ustalone poniżej 20 roku życia) paradoksalnie obserwowano dłuższe przeżycia pomimo stwierdzenia powyższych cech";

- w pracy wielokrotnie powtarzana jest nieprawidłowa forma stylistyczna: „pacjentów z zaawansowanym czerniakiem - powinno być „pacjentów chorych na zaawansowanego czerniaka"; m.in. str. 57, 64, 70, 72, 74, 82, 83, 84, 92, 93, 94; także na str. 80: „w tym m. in. u pacjentów z rakiem trzustki oraz rakiem jelita grubego poddawanych klasycznej chemioterapii" – powinno być „w tym m. in. u pacjentów chorych na raka trzustki oraz raka jelita grubego poddawanych klasycznej chemioterapii" oraz „ ale również w przypadku pacjentów z rakiem nerki [140] i z rakiem płuca [53]" – powinno być „ale również w przypadku pacjentów chorych na raka nerki [140] i raka płuca [53]"; str. 88 i 90 „sCD4 w surowicy krwi stwierdzono u chorych z zaawansowanym rakiem piersi" – powinno być „sCD4 w surowicy krwi stwierdzono u chorych na zaawansowanego raka piersi"; str. 89 „pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów" – powinno być „pacjentów chorych na reumatoidalne zapalenie stawów"; str. 90 „przypadku pacjentów z białaczką włochatokomórkową" – powinno być „przypadku pacjentów chorych na białaczkę włochatokomórkową";

- str. 85: „wyniosła ok. 10 miesięcy, podczas gdy w niniejszej pracy mediana przeżycia była niemal o połowę niższa (6 miesięcy)" - powinno być „wyniosła

ok. 10 miesięcy, podczas gdy w niniejszej pracy mediana przeżycia była niemal o połowę krótsza (6 miesięcy)".

Pomijając moje drobne uwagi, przedstawiona do oceny rozprawa spełnia ustawowe wymogi na stopień doktora nauk medycznych.

Należy podkreślić, że badanie zostało zaplanowane, wykonane i opisane na wysokim poziomie merytorycznym oraz naukowym i jestem przekonany, że zasługuje na wyróżnienie.

W związku z powyższym z pełnym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie lek. Magdaleny Pogorzelskiej do dalszych etapów procedury przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med. Rafał Stec