



Warszawa, dnia 04 sierpnia 2020 r.

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych
mgr Doroty Kamińskiej

pt. „**Ocena nacieku zapalnego z limfocytów T cytotoksycznych (CTLs) w**
raku żołądka w korelacji z wybranymi parametrami
kliniczno-histopatologicznymi”.

Rak żołądka nadal jest istotnym problemem onkologicznym na całym świecie. Wg danych epidemiologicznych jest on piątym najczęściej rozpoznawanym nowotworem i trzecim pod względem umieralności. Możliwości leczenia jak i rokowanie, podobnie jak innych nowotworów układu pokarmowego są ograniczone. W przypadku rozsiewu choroby nowotworowej jak i również braku możliwości leczenia radykalnego (choroba nieresekcyjna lub pacjent nieoperacyjny) jedyną możliwością leczenia jest terapia systemowa. Jedną z metod leczenia systemowego jest immunoterapia, która w ciągu ostatnich kilku lat stała się głównym celem badaczy w onkologii. Obejmuje ona adoptywną terapię komórkową, leczenie oparte na przeciwciałach monoklonalnych oraz szczepionki przeciwnowotworowe. Szczególne miejsce zajmuje terapia prowadzona za pomocą modyfikowanych genetycznie limfocytów T, która polega na wprowadzeniu genów kodujących chimeryczne receptory antygenowe (ang. Chimeric Antigen Receptors – CARs) do limfocytów pobranych od chorego. Receptory te pozwalają na specyficzne rozpoznanie komórek nowotworowych i po związaniu na ich powierzchni indukują cytotoksyczność limfocytów, prowadząc do zabicia komórki nowotworowej.

Najważniejsze mechanizmy immunologiczne uczestniczące w obronie przeciwnowotworowej obejmują cytotoksyczność limfocytów Tc, komórek NK i komórek NKT, cytotoksyczność pobudzanych makrofagów i neutrofilów,



cytotoksyczność komórkową zależną od dopełniacza, cytotoksyczność zależną od przeciwciał oraz aktywność cytokin zależna od wielu grup, np. interferonów, interleukin, nadrodziny TNF.

Ważnym elementem układu odpornościowego związanego z ograniczeniem rozprzestrzeniania się nowotworu są limfocyty T z bezpośredniego otoczenia guza, tzw. limfocyty naciekające guz (TILs - *Tumor-Infiltrating Lymphocytes*). Są one heterogenną grupą różnych komórek układu odpornościowego obejmującą między innymi limfocyty T cytotoksyczne, które bezpośrednio lub poprzez cytokiny (IFN- γ oraz TNF- α) mogą niszczyć komórki nowotworowe.

W pewnych grupach chorych przy zastosowaniu immunoterapii inhibitorami punktu kontrolnego można uzyskać długoletnie, całkowite remisje choroby równoznaczne z jej kontrolą, a nawet wyleczeniem.

W celu poprawienia efektywności immunoterapii konieczne natomiast jest poszukiwanie czynników predykcyjnych. W wielu renomowanych, światowych ośrodkach naukowych poszukuje się czynników predykcyjnych dla nowoczesnych terapii onkologicznych w tym immunoterapii, których obecność jest często warunkiem dopuszczenia do powszechnego stosowania. Z jednej strony pozwala to na stosowanie immunoterapii wyłącznie u chorych, u których rzeczywiście jest ona skuteczna, a z drugiej pozwala na znaczne zmniejszenie kosztów nierzadko bardzo drogich terapii.

Wnikliwe rozważania związane z tym tematem stanowią istotny wkład w rozwój współczesnej patomorfologii, która stanowi oparcie i podstawę dla podejmowania odpowiednich decyzji klinicznych w onkologii.



Doktorantka podjęła ciekawy i co ważne praktyczny temat związany z oceną nacieku zapalnego z limfocytów T cytotoksycznych (CTLs) w raku żołądka oraz jego korelacją z określonymi parametrami kliniczno-histopatologicznymi.

Doktorantka w swojej pracy określiła precyzyjnie cztery cele:

1. Ocena nacieku zapalnego z limfocytów T cytotoksycznych (CTLs) w raku żołądka.
2. Ocena odsetka limfocytów T cytotoksycznych w stosunku do całej populacji limfocytów T i w stosunku do ich subpopulacji (limfocytów pomocniczych i regulatorowych) w nacieku zapalnym żołądka.
3. Ocena zależności pomiędzy liczbą CTLs naciekających guz nowotworowy a wybranymi parametrami kliniczno-patologicznymi.
4. Ocena nacieku zapalnego z limfocytów T cytotoksycznych w raku żołądka w korelacji z przeżyciem pacjentów.

Analizą objęto materiał histopatologiczny 87 pacjentów leczonych chirurgicznie z powodu nowotworów żołądka w latach 2005-2015 w II Klinice Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Materiał został poddany obróbce i analizie histopatologicznej w Zakładzie Patomorfologii Ogólnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Materiał oceniono pod kątem obecności nacieku zapalnego z limfocytów T i skorelowano z parametrami kliniczno-patologicznymi takimi jak: wiek i płeć pacjentów, ocenę makroskopową, średnicę i lokalizację guza, typ histologiczny nowotworu, stopień złośliwości histologicznej, stopień zaawansowania anatomo-klinicznego (pT), typ nowotworu według klasyfikacji Laurena, obecność przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych (pN) jak i przerzutów odległych (pM), naciek do naczyń limfatycznych i naczyń krwionośnych, naciek okołonерwowy, stopień desmoplazji oraz stopień infekcji *Helicobacter pylori*.

Mgr Dorota Kamińska szczegółowo opisała metody przygotowania skrawków do barwienia, schemat postępowania w barwieniu hematoksyliną-eozyną (H+E), schemat postępowania w barwieniach immunohistochemicznych



(IHCH), barwienie manualne (dla CD103, Foxp3), barwienie automatyczne na aparacie Benchmark XT (dla przeciwciał CD3, CD4, CD8) oraz ocenę mikroskopową barwień, którą niezależnie wykonały 3 osoby: doktorant, promotor oraz patomorfolog. Całość, co zasługuje na szczególne podkreślenie świadczy o ogromnym wkładzie pracy Doktorantki w przygotowywany projekt, a zamieszczenie czytelnych o wysokiej jakości fotografii preparatów znacznie uatrakcyjnia rozprawę doktorską i zwiększa przyjemność jej studiowania.

Do przeprowadzenia badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku nr R-I-002/30/2019.

Użyte przez Doktorantkę metody analiz statystycznych: test korelacji rang Spearmana, test Kruskala-Wallisa, test mediany dla wielu grup niezależnych (program statystyczny GraphPad Prism) oraz test Kaplana-Meiera (programu Statistica 13.3) zostały dobrane w sposób prawidłowy i zgodny z zasadami statystycznymi opracowania wyników, także dla małych grup.

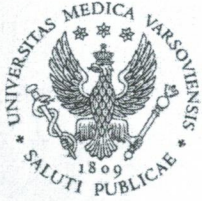
Mgr Dorota Kamińska w swojej pracy badawczej uzyskała następujące wyniki:

1. Zaobserwowała większy naciek (odsetek) z limfocytów CD8⁺ niż z limfocytów CD103⁺ zarówno w podścielisku frontu inwazji jak i w podścielisku głównej masy guza (front – 119 limfocyty CD8⁺/dpw; główna masa guza – 183 limfocyty CD8⁺/dpw vs front – 77 limfocytów CD103⁺/dpw, główna masa guza – 85 limfocytów CD103⁺/dpw). Liczba limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ i CD103⁺ pomiędzy podścieliskiem frontu inwazji, a podścieliskiem w głównej masie guza w obu przypadkach wykazała znamienne zależności ($p=0,0001$), które są wprost proporcjonalne.
2. Wykazała, że liczba limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ (119/dpw) w raku żołądka w podścielisku frontu inwazji była znacznie większa niż



limfocytów CD4⁺ (88/dpw). Podobnie w głównej masie guza odsetek limfocytów CD8⁺ (183/dpw) był znacznie większy niż limfocytów CD4⁺ (98/dpw), natomiast liczba limfocytów CD103⁺ była niższa niż porównywanych limfocytów CD4⁺ w obu lokalizacjach (front - 77 limfocytów CD103⁺/dpw, główna masa guza - 85 limfocytów CD103⁺/dpw). Ponadto potwierdziła dodatnią korelację pomiędzy odsetkiem analizowanych limfocytów T cytotoksycznych, a limfocytów T pomocniczych (dla limfocytów CD8⁺: $p=0,005$ we fronce i $p=0,009$ w głównej masie guza; dla CD103⁺: $p=0,014$ we fronce i $p=0,008$ w głównej masie guza).

3. W analizie statystycznej odsetka badanych limfocytów T cytotoksycznych CD8⁺ i CD103⁺ Doktorantka stwierdziła istotne statystycznie zależności z subpopulacją limfocytów T regulatorowych zarówno w podścielisku frontu inwazji: $p=0,0002$ i $p=0,0001$, jak i w głównej masie guza: w obu przypadkach wartość p wynosiła $0,0001$. Wykazała także, że średnia liczba limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ była znacznie wyższa zarówno w podścielisku frontu inwazji (37,02) jak i w podścielisku głównej masy guza (24,74) w porównaniu do ocenianych limfocytów regulatorowych Foxp3⁺ (front - 24,74, główna masa guza - 18,86). Z kolei średni odsetek limfocytów CD103⁺ był większy od limfocytów Foxp3⁺ tylko w głównej masie guza, natomiast we fronce wartości były prawie identyczne.
4. Zaobserwowała, że wprawdzie średnia liczba limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ zarówno w podścielisku frontu inwazji jak i w głównej masie guza była znacznie większa u pacjentów ≥ 60 r.ż. niż u pacjentów < 60 r.ż. (front - 41,04 wobec 30,17 limfocytów CD8⁺/dpw; główna masa guza - 39,02 wobec 34,73 limfocytów CD8⁺/dpw), ale bez uzyskania znamienności statystycznej. Podobny brak znamiennej zależności uzyskała w przypadku limfocytów CD103⁺, gdzie liczba limfocytów naciekających guz nowotworowy bez względu na obszar była wyższa u pacjentów powyżej 60 roku życia (front - 27,14 wobec 19,73 limfocytów CD103⁺/dpw; główna masa guza - 24,67 wobec 22,30 limfocytów CD103⁺/dpw).



5. W grupie chorych na raka żołądka stwierdziła, że zarówno w podścielisku frontu inwazji jak i w głównej masie guza nowotworowego, średnia liczba limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ i limfocytów CD103⁺ była niższa u kobiet niż u mężczyzn. Niemniej istotność statystyczną wykazała wyłącznie pomiędzy liczbą limfocytów CD8⁺ w głównej masie zmiany nowotworowej ($p=0,021$). Zależność ta dotyczyła mężczyzn, u których liczba limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ była wyższa w podścielisku głównej masy guza.
6. Testy statystyczne, które zastosowała Doktorantka nie wykazały znamienności pomiędzy obecnością badanych limfocytów, a lokalizacją guza nowotworowego w przypadku CD8⁺ w podścielisku frontu inwazji i głównej masy guza oraz w przypadku CD103⁺ we froncie. Wyjątek stanowiła liczba limfocytów CD103⁺ w głównej masie nowotworu, która była znamienne związane z jego lokalizacją ($p=0,020$).
7. W przeanalizowanej grupie chorych zauważyła znacząco większą liczbę zarówno limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ jak i limfocytów CD103⁺ naciekających guz zarówno w podścielisku frontu inwazji jak i w podścielisku głównej masy guza w przypadku jeżeli średnica zmiany nowotworowej wynosiła $\geq 5\text{cm}$, ale bez istotnych statystycznie różnic.
8. Nie znalazła zależności pomiędzy obecnością badanych limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ i CD103⁺, a stopniem złośliwości histologicznej nowotworu.
9. W swoich badaniach wskazała na brak znamiennej zależności pomiędzy średnią liczbą limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ oraz CD103⁺ zarówno w podścielisku frontu inwazji jak i w podścielisku w masy głównej guza u pacjentów chorych na gruczolakoraka bez komponenty śluzowej (*adenocarcinoma*) w porównaniu do pacjentów chorych na gruczolakoraka z komponentą śluzową (*adenocarcinoma mucinosum*).



10. Nie potwierdziła związku pomiędzy typem nowotworu wg klasyfikacji Laurena a obecnością limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ i CD103⁺.
11. Wykazała istotną statystycznie zależność pomiędzy obecnością limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ we fronce i masie głównej guza, a zaawansowaniem nowotworu (cecha T, odpowiednio $p=0,023$ i $p=0,027$) oraz pomiędzy obecnością limfocytów CD103⁺ we fronce guza, a zaawansowaniem nowotworu (cecha T, $p=0,026$). Zaobserwowała, że liczba ocenianych limfocytów wzrastała wraz ze stopniem zaawansowania guza pierwotnego (cecha T). Zależności tej nie wykazano jedynie w przypadku limfocytów CD103⁺ w głównej masie guza ($p=0,163$). Największa średnia liczba badanych limfocytów CD8⁺ i CD103⁺ zarówno we fronce jak i w głównej masie guza występowała u pacjentów, u których nowotwór naciekał otrzewną trzewną lub sąsiadujące struktury (cecha pT4).
12. Nie znalazła znamienego statystycznie powiązania pomiędzy obecnością limfocytów CD8⁺ i CD103⁺, a obecnością przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.
13. Nie wykazała zależności pomiędzy liczbą limfocytów CD8⁺ i CD103⁺, a obecnością przerzutów odległych. Jedną z przyczyn może być większość zakwalifikowanych pacjentów, u których nie wystąpiły przerzuty odległe (61/87 chorych).
14. Zaobserwowała także brak korelacji pomiędzy obecnością limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ i CD103⁺ w podścielisku frontu inwazji oraz w podścielisku masy głównej guza, a szerzeniem się nowotworu drogą naczyń limfatycznych.
15. Nie znalazła istotnych statystycznie zależności zarówno we fronce inwazji jak i w głównej masie guza, pomiędzy obecnością limfocytów cytotoksycznych CD8⁺, CD103⁺ a szerzeniem się nacieku nowotworowego drogą naczyń krwionośnych.



16. Zaobserwowała, że obecność limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ wiąże się w sposób znamieny statystycznie z obecnością nacieku okołonerkowego w podścielisku głównej masy zmiany nowotworowej ($p=0,011$). Zależności tej nie znalazła w przypadku limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ we froncie inwazji oraz limfocytów CD103⁺ we froncie i w głównej masie guza.
17. Nie znalazła istotnej statystycznie zależności pomiędzy obecnością badanych limfocytów cytotoksycznych (CD8⁺, CD103⁺) a stopniem desmoplazji.
18. Zauważyła, że średnia liczba limfocytów cytotoksycznych zarówno CD8⁺ jak również CD103⁺ była wyższa u pacjentów bez infekcji *H.pylori* (front - 39,51 limfocytów CD8⁺/dpw główna masa guza - 38,87 limfocytów CD8⁺/dpw; front - 26,44 limfocytów CD103⁺/dpw główna masa guza - 24,61 limfocytów CD103⁺/dpw) niż u pacjentów z zakażeniem bakterią (front - 32,45 limfocytów CD8⁺/dpw główna masa guza - 31,95 limfocytów CD8⁺/dpw; front - 20,80 limfocytów CD103⁺/dpw główna masa guza - 20,45 limfocytów CD103⁺/dpw), ale bez uzyskania znamienności statystycznej.
19. Nie potwierdziła związku pomiędzy naciekiem zapalnym badanych limfocytów cytotoksycznych (CTLs) a całkowitym przeżyciem pacjentów.

Na podstawie uzyskanych wyników Doktorantka wyciągnęła wnioski, które były odpowiedziami na założone cele:

1. Obserwuje się większe naciekanie limfocytów T cytotoksycznych CD8⁺ u pacjentów chorych na raka żołądka płci męskiej, co może oznaczać że naciek z CTLs zależy jest również od konstytucji ustroju.
2. Istotna zależność u pacjentów chorych na raka żołądka pomiędzy liczbą limfocytów T CD103⁺ naciekających główną masę guza, a lokalizacją tego nowotworu może świadczyć, iż intensywność nacieku z CTLs związana jest z umiejscowieniem guza nowotworowego.



3. Wzrost liczby limfocytów CTLs wraz z głębokością naciekania raka w ścianie żołądka może oznaczać, iż nacieki limfocytów T cytotoksycznych jest uwarunkowany czasem jaki jest potrzebny do uruchomienia ich mechanizmów cytotoksycznych/aktywności bądź z czasem jaki musi upłynąć aby CTLs mogły przeniknąć w głębsze warstwy nowotworu.
4. Obserwowana w niniejszej pracy zależność statystyczna pomiędzy liczbą CTLs a naciekami okołonerwowymi może wskazywać, iż dochodzi do sygnalizacji rekrutującej limfocyty T cytotoksyczne podczas naciekania okołonerwowego przez komórki nowotworowe w raku żołądka.
5. Obszerniejsze badania w zakresie limfocytów T cytotoksycznych naciekających nowotwór mogą być pomocne w diagnostyce raka żołądka oraz mogą stać się potencjalnymi celami immunoterapii tego nowotworu.

Pod względem formalnym rozprawa doktorska zawiera 141 strony, 142 pozycje piśmiennictwa oraz została podzielona na typowe dla dysertacji elementy: wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja i omówienie wyników, wnioski, streszczenia w języku polskim i w języku angielskim, literatura źródłowa, spis tabel, spis rycin, oraz spis fotografii.

Mgr Dorota Kamińska w swojej pracy wykazała się dojrzałym warszatem naukowym, umiejętnością syntetycznego i logicznego myślenia, które świadczą o znajomości zasad planowania i przeprowadzania badań naukowych. Na podkreślenie zasługuje fakt współpracy Doktorantki z Kliniką Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku i zrozumienie problemu jakim jest interdyscyplinarność leczenia onkologicznego, jako niezbędnego elementu nowoczesnej onkologii.



Nie ma także wątpliwości odnośnie wkładu pracy Doktorantki, który był znaczący i w dużej mierze samodzielny, chociaż pod nadzorem Promotora.

W dyskusji mgr Dorota Kamińska oceniła i porównała swoje wyniki z danymi literaturowymi w sposób rzetelny i odpowiedni, co świadczy z jednej strony o jej dużej wiedzy, a z drugiej o umiejętnym sposobie interpretacji. Konieczne jest krytyczne podsumowanie dyskusji odnoszące się do własnych wyników w relacji do ograniczeń wynikających z jednoosobowej pracy oraz liczby chorych jak i również heterogenności badanej grupy.

Piśmiennictwo jest nowoczesne, głównie anglojęzyczne zawierające kluczowe pozycje dotyczące przedstawionego zagadnienia, które zostało zacytowane we właściwym miejscu, chociaż wydaje się, że jest nieco za obszerne.

Praca jest niewątpliwie ciekawa, ale w dalszym etapie wymaga walidacji zewnętrznej, większej liczby chorych zakwalifikowanych do badania oraz bardziej homogenicznej grupy. Oczywiście jest to przyszłość i być może dalszy kierunek rozwoju naukowego Doktorantki.

Chciałbym także zaznaczyć, że oceniana przeze mnie praca może mieć swoje ważne implikacje kliniczne w odniesieniu do planowania nowoczesnej immunoterapii związane z identyfikacją chorych na raka żołądka, którzy mogliby odnieść korzyść z tego typu leczenia, jak i również do rokowania. Dotychczas immunoterapia (inhibitory punktu kontrolnego) w nowotworach układu pokarmowego poza wyjątkami nie jest aktywna w sposób zadowalający, stąd konieczność poszukiwania docelowej grupy chorych.

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. Wstęp: bardzo szczegółowy, można by było z powodzeniem go skrócić, jest trochę za długi i zbyt obszernie opisuje nie tylko przedstawione zagadnienie, ale wszystko co dotyczy raka żołądka;



2. Strona 9 – „Z kolei w 2012 r. znajdował się na 5. miejscu u mężczyzn i 8. miejscu u kobiet”. – mamy nowsze dane z Krajowego Rejestru Nowotworów, obecnie z 2017 roku;
3. Strona 50, 51 – „Ocena ogólna grupy badanej” – brakuje mediany oraz zakresu obserwacji chorych od momentu zabiegu operacyjnego. Jest to bardzo istotne, zwłaszcza jeżeli chodzi o korelację z cechą M1 (przerzutami odległymi). Wiadomo, że pacjentów u których w trakcie stopniowania przedoperacyjnego stwierdza się cechą M1 nie leczymy miejscowo, operacyjnie, natomiast może istnieć związek przyczynowo - skutkowy pomiędzy immunologicznym mikrośrodowiskiem guza pierwotnego, a pojawieniem się przerzutów odległych. W wielu nowotworach taki związek zaobserwowano. Czas również odgrywa tutaj ważną rolę.
4. Strona 60 – „Zależność ta dotyczyła mężczyzn, u których liczba limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ była wyższa w podścielisku głównej masy guza niż w podścielisku frontu inwazji (Tabela 14, 15)” – w tabeli umieszczono porównanie analizy statystycznej z grupą kobiet w podścielisku masy głównej guza, a nie mężczyzn w podścielisku frontu inwazji – powinno to zostać doprecyzowane;
5. Strona 66 – „wielkość zmiany nowotworowej była $\geq 5\text{cm}$ ” – powinno być „średnica zmiany nowotworowej była $\geq 5\text{cm}$ ” – jest to bardziej precyzyjne określenie, które zostało użyte w tabeli dotyczącej tego podrozdziału (w słowniku PWN wielkość to: „długość, szerokość i wysokość lub głębokość czegoś materialnego”, a nie wyłącznie średnica), często oczywiście w języku potocznym mówiąc o wielkości mamy na myśli najdłuższy wymiar;
6. Strona 82 – „pomiędzy obecnością limfocytów CD8⁺ i CD103⁺, a obecnością przerzutów do okolicznych węzłów chłonnych” – lepszym i bardziej „onkologicznym” sformułowaniem jest „regionalnych węzłów chłonnych”;



WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Klinika Onkologii

7. Dyskusja – konieczne jest jej krytyczne podsumowanie o którym wspomniałem wcześniej;
8. Błędy stylistyczne i opisowe wymagające korekty:

- str. 49, 50, 73, 115 i dalsze : „pacjenci z rakiem żołądka” – błąd stylistyczny; powinno być pacjenci chorzy na.....lub pacjenci z rozpoznana chorobą nowotworową....

- str. 52: „isistotne” – powinno być „istotne”;

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 naukowym oraz mam nadzieję, że wyniki zostaną opublikowane po stosownej korekcie w czasopiśmie ze współczynnikiem oddziaływania.

W związku z powyższym z pełnym przekonaniem wnioskuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku o dopuszczenie mgr Doroty Kamińskiej do dalszych etapów procedury przewodu doktorskiego.

Kierownik Kliniki Onkologii

Dr hab. n. med. Rafał Wesoły Stęć
Dr hab. n. med. Rafał Wesoły Stęć