

OCENA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH LEK.MED.
ROMANA MONCZAKA PT. „ZGODNOŚĆ REAKCJI IMMUNOHISTOCHEMICZNYCH W
BADANIACH CYTOLOGICZNYCH I HISTOPATOLOGICZNYCH U CHORYCH Z RAKIEM PIERSI”

PROMOTOR PRACY: PROFESOR DR HAB. ANDRZEJ MARSZAŁEK

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu wydała zgodę na
prowadzenie badań uchwałą 776/13 z dnia 5 września 2013 roku

Przedstawiona mi do oceny praca na stopień doktora nauk medycznych lekarza medycyny Romana Monczaka dotyczy badań podstawowych z dziedziny raka piersi, który stanowi ogromny problem społeczny, ale również ekonomiczny. Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet w Polsce. W ostatnich latach — według Krajowego Rejestru Nowotworów — liczba zachorowań przekroczyła 16 500 rocznie (standaryzowany współczynnik zachorowalności około 52/100 000) i wzrosła w ostatnich dwóch dekadach o około 10 000. W Polsce rak piersi jest od kilku lat drugą — po raku płuca — przyczyną zgonów spowodowanych przez nowotwory złośliwe wśród kobiet (liczba zgonów — około 5500 rocznie, standaryzowany współczynnik umieralności — około 14,5/100 000).

Dzięki dynamicznemu rozwojowi technik biologii molekularnej oraz nowoczesnych metod diagnostycznych, w ciągu ostatnich dwóch dekad leczenie raka piersi uległo istotnemu wzbogaceniu o leki ukierunkowane molekularnie oraz terapię celowaną za pomocą przeciwciał monoklonalnych. Decyzja o wyborze leczenia miejscowo zaawansowanego i rozsianego raka piersi w ogromnej mierze zależy od profilu molekularnego raka, którego poznanie pozwoliło na wyodrębnienie czterech podtypów nowotworu: luminalny A, luminalny B, HER -2 pozytywny oraz potrójnie negatywny. Precyzyjną charakterystykę portretów molekularnych raka piersi można znaleźć w ocenianej przeze mnie dysertacji.

Stworzenie wielodyscyplinarnych zespołów terapeutycznych umożliwiło kompleksowe zajęcie się chorym na nowotwór piersi. Zadania wysokospecjalistycznego konsylium obejmują: i) kwalifikacje pacjenta do leczenia zabiegowego, chemioterapii lub radioterapii; ii) ustalenie planu leczenia; iii) ustalenie rodzajów terapii, które będą stosowane; oraz iv) wybór koordynatora leczenia. Z punktu widzenia polskiego i międzynarodowego prawa najważniejszym, koniecznym

warunkiem umożliwiającym wdrożenie onkologicznych procedur terapeutycznych jest precyzyjny wynik badania histopatologicznego. Niestety w składzie członków konsylium podanej na stronie ministerstwa nie znalazłem specjalisty z dziedziny patomorfologii co budzi mój zdecydowany sprzeciw. Moim zdaniem tylko ścisła współpraca pomiędzy patologiem i innymi uczestnikami konsylium umożliwi dobór optymalnego leczenia raka piersi w oparciu o wyniki badań klinicznych i radiologicznych oraz precyzyjne rozpoznanie histopatologiczne połączone z diagnostyką immunohistochemiczną. Pomimo istnienia jednoznacznych zaleceń postępowania z materiałem tkankowym, gwarantujących wysoką powtarzalność i wiarygodność uzyskiwanych wyników w praktyce klinicznej dość często zdarzają się sytuacje, w których istnieje konieczność oparcia decyzji terapeutycznych na wynikach badań materiału cytologicznego pozyskanego na biopsji cienkoigłowej. Niestety, jak dotąd, nie ma optymalnego algorytmu postępowania w wyżej wymienionych przypadkach co powoduje antynomię otrzymanych wyników. Stąd podjęcie tematyki badawczej, która mogłaby przyczynić się do stworzenia nowego, rzetelnego, zwalidowanego standardu postępowania z materiałem cytologicznym uważam za całkowicie uzasadniony.

Przedstawiona mi do oceny praca ma układ typowy dla rozpraw doktorskich i składa się ze wstępu, celu pracy, materiałów i metod, wyników, dyskusji, wniosków, streszczenia w języku polskim i angielskim, spisu literatury oraz aneksu zawierającego 16 tabel. We wstępie twórca dysertacji przedstawił w obszerny sposób tematykę raka piersi koncentrując się na epidemiologii, populacyjnym programie profilaktyki raka piersi oraz leczeniu. W dalszej części tego rozdziału Autor podkreślił istotność analizy czynników predykcyjnych i prognostycznych przed podjęciem decyzji terapeutycznej. Należy dodać, iż we wstępie Autor dysertacji poruszył bardzo ważny temat braku wzorca postępowania odniesieniu do badania immunocytochemicznego, wskazując na liczne kontrowersje powszechnie obowiązujące w sposobie postępowania w tej materii. Informacje te poparte są cytowaniami klasycznych i aktualnych pozycji piśmiennictwa światowego. Wprawdzie część poruszanych zagadnień zostało potraktowanych przez Autora dość ogólnie, ale w mojej opinii przedstawiona wiedza jest wystarczająca nawet dla słabiej zorientowanego czytelnika. Zaprezentowane we wstępie zagadnienia i kolejność ich omawiania stanowi logiczny ciąg dobrze prowadzący czytelnika w tematykę i cel pracy.

Głównym celem pracy była wielostronna i skrupulatna analiza materiału histopatologicznego i cytologicznego pochodzącego z guza pierwotnego od chorych z rakiem piersi. Cel ten autor pracy postanowił zrealizować stawiając sobie trzy szczegółowe zadania badawcze: i) ocenę zgodności reakcji immunohistochemicznych w preparatach cytologicznych i histopatologicznych, ii) ocenę zgodności ustalenia portretów molekularnych (podtypu immunohistochemicznego IH4) w badaniach cytologicznych i histopatologicznych oraz iii) ocenę przydatności badań cytologicznych i immunocytochemicznych w diagnostyce pierwotnego i przerzutowego raka piersi, przy braku materiału histopatologicznego. Z punktu widzenia klinicysty wybór tematu został właściwie uzasadniony i nie mam w tej sprawie najmniejszych zastrzeżeń. Ponadto Doktorant podjął trud przeanalizowania i omówienia technicznych aspektów przeprowadzonych doświadczeń i analiz, które mogą w przyszłości posłużyć określeniu gruntownych algorytmów postępowania z materiałem cytologicznym, szczególnie w sytuacjach konieczności podjęcia decyzji terapeutycznych opartych o materiał pobrany na drodze biopsji cienkoigłowej.

Metodyka realizacji założonych celów pracy została opisana w sposób dość jasny i przejrzysty. Do badań włączono 47 pacjentek, które spełniały założone przez Dr Monczaka kryteria uczestnictwa w projekcie. W charakterystyce grupy badanej uwzględniono wiek kobiet, od których uzyskano materiał histopatologiczny i cytologiczny oraz wielkość guza. W analizie histopatologicznej oceniano rozpoznanie histopatologiczne, stopień złośliwości histologicznej oraz ekspresję receptorów estrogenowych, progesteronach oraz receptora HER2. Następnie Autor umieścił informację o Ośrodkach, w których wykonano badania w ramach diagnostyki podstawowej i pogłębionej oraz zabiegi chirurgiczne, a także badania histopatologiczne oraz immunohistochemiczne materiału pooperacyjnego lub pochodzącego z biopsji gruboigłowej. W dalszej części rozdziału autor szczegółowo opisuje metodykę utrwalania materiału biologicznego, w której wykorzystał formalinę i komercyjny utrwalacz tkankowy. Następnie w czytelny sposób opisał techniki barwienia immunohistochemicznego oraz przedstawił graficzną ocenę reakcji immunohistochemicznych w preparatach cytologicznych i histopatologicznych. Na szczególną uwagę zasługują bardzo dokładne opisy metod badawczych wsparte własnymi, barwnymi schematami poszczególnych metod oraz przykładowymi obrazami preparatów cytologicznych co powoduje, że nawet dla mniej

zaznajomionego z metodyką badań czytelnika stają się one zrozumiałe. Jedyna uwaga dotyczy ryciny 2, w której zamieszczono mało czytelne wartości skali wyrażonej w mikrometrach. Podobna uwaga dotyczy innych rycin zamieszczonych w rozdziale „Wyniki”. Pomimo, nielicznych uchybień, które opisałem powyżej, pozostała metodyka pracy jest bogata i nowoczesna. Uzupełnieniem do prawidłowo zademonstrowanych metod badawczych jest precyzyjne opisanie analizy statystycznej, w której dla budowania przedziału ufności dla pojedynczej proporcji wykorzystano metodę Coopera – Pearsona i testu McNemara dla oceny zmienności różnic dla sparowanych wyników badań. Podsumowując, generalnie uważam dobór metod użytych w dysertacji za prawidłowy, a cały rozdział oceniam bardzo wysoko.

Uzyskane wyniki zostały opisane bardzo dobrze, przejrzyste i zilustrowane ponad 30 rycinami, w skład których wchodziły, schematy, wykresy i kolorowe obrazy analiz immunohistochemicznych i immunocytochemicznych. W sumie Autor dysertacji przeanalizował kilkaset preparatów uznanych za wartościowe diagnostycznie (próg 100 jednoznacznych komórek nowotworowych) z materiału pochodzącego od 47 pacjentek, co świadczy o ogromie wykonanej pracy. Bardzo ciekawą część pracy stanowią wyniki przeprowadzonych doświadczeń, odnoszące się do możliwości wystąpienia wyników fałszywie dodatnich i ujemnych, szczególnie w oznaczaniu receptora estrogenowego i progesteronowi oraz fałszywie dodatnią nadekspresję receptora HER-2 (HER2-3+). Według opinii autora dysertacji i badaczy taka sytuacja związana jest z heterogennym charakterem guza w przypadku receptorów ER i PR oraz obecnością dominującego w badaniu histopatologicznym komponentu przedinwazyjnego o silnej nad ekspresji HER2. Wyniki badań ilustrują czasami skomplikowane ryciny, ale po zapoznaniu się ze szczegółowymi opisami stają się one zrozumiałe. Jedyną uwagę mam do braku wskaźników na rycinach obrazujących dodatnią reakcję immunohistochemiczną w komórkach raka zarówno w materiale histopatologicznym i cytologicznym oraz obecność mało czytelnych histogramów zawierających graficzne porównanie uzyskanych wyników. Są to właściwie jedyne uchybienia, które nie obniżają, bardzo dobrze ocenionej przeze mnie części dysertacji.

Uzyskane wyniki Autor przedyskutował w świetle dostępnego piśmiennictwa. W dyskusji zostały dokładnie omówione założenia przeprowadzonych badań i sposób ich realizacji. Doktorant pokusił się również o dość szczegółową analizę i omówienie technicznych aspektów prowadzonych doświadczeń. Ponadto, dyskusja jest bardzo

obszerna i rzetelna i obejmuje wszystkie aspekty uzyskanych wyników, łącznie z wykazaniem słabych i mocnych stron pracy. Rozdział ten jest merytorycznie wartościowy i świadczy o głębokiej znajomości badanej problematyki, a także dojrzałości Autora dysertacji w formułowaniu i analizowaniu zagadnień badawczych. Wnioski są zdefiniowane prawidłowo i znajdują potwierdzenie w przedstawionych wynikach pracy. W mojej opinii najważniejsze z nich to wnioski: 1a, 1c oraz 2 i 3, które w jasny sposób wskazują na: i) równoważność materiału cytologicznego i histopatologicznego w zakresie oceny immunocytochemicznej receptorów estrogenowych, progesteronach i E-kadheryny, 2) konieczność zachowania dużej ostrożności w przypadku oznaczeń ekspresji białek Ki-67 i p63 oraz iii) równoważność badań cytologicznych i immunocytochemicznych z histopatologicznymi co umożliwia ustalenie prawidłowego podtypu molekularnego i tym samym predestynuje do podjęcia decyzji terapeutycznych opartych o medycynę spersonalizowaną.

Pomimo pewnych, krytycznych uwag zgłoszonych przeze mnie moja opinia o przedstawionej rozprawie jest bardzo dobra. Doktorant zrealizował wszystkie postawione przed sobą cele badawcze. Zaprezentowane badania są oryginalne i stanowią istotny wkład w nowoczesną metodologię badań nad optymalizacją wyboru nowych standardów postępowania z materiałem cytologicznym. Godny podkreślenia jest również fakt, iż badania Autora dysertacji wpisują się w nurt *translational science*, czyli mariażu nauk podstawowych z klinicznymi procedurami terapeutycznymi. Jestem również pod wrażeniem ogólnej pomysłowości Doktoranta, Jego pracowitości oraz umiejętności technicznych. Praca napisana jest starannie, w bardzo dobrym stylu z nielicznymi błędami językowo—redakcyjnymi oraz uchybieniami w zakresie tłumaczenia skrótów – np. NCI – to Instytut do Walki z Rakiem. Na uwagę zasługuje bardzo dobra szata ilustracyjna, szczególnie bardzo dobrej jakości, kolorowe ryciny immunocytochemicznych reakcji, wykreowane dzięki własnej koncepcji Autora.

Podsumowując, przedstawiona mi dysertacja spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych z dyscypliny medycyna. Doktorant wykazał się dużą erudycją i umiejętnością przygotowania pracy naukowej oraz posiada bogaty warsztat badawczy oparty na nowoczesnej metodologii badań. Uwagi krytyczne zawarte w mojej recenzji nie mają wpływu na wysoka ocenę pracy, niemniej oczekuję, że Autor odniesie się do nich i wyjaśni wszystkie moje wątpliwości w trakcie publicznej obrony pracy. Uważam, że Doktorant osiągnął stopień dojrzałości

naukowej uprawniający Go o ubieganie się o stopień doktora i w związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Wydziału Lekarskiego II Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu o dopuszczenie LEK.MED. ROMANA MONCZAKA do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o przyjęcie pracy z wyróżnieniem.

Poznań, 16.02.2017

Prof. UM dr hab. med. Dariusz Łycki
RADIOTERAPEUTA-ONKOLOG
tel. 693 822 057
4289278

Dariusz Łycki