

Recenzja rozprawy doktorskiej

Lek. Katarzyny Sikory

pt.: „Rak wielopostaciowy płuca (*pleomorphic carcinoma*) – charakterystyka kliniczno-patologiczna, immunofenotyp, czynniki prognostyczne i predykcyjne”

W związku z uchwałą Rady Naukowej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc nr 46/2021 podjętą w dniu 16 listopada 2021 r. o powołaniu mnie na recenzenta w postępowaniu o nadanie stopnia doktora lek. Katarzynie Sikorze – tytuł rozprawy „Rak wielopostaciowy płuca (*pleomorphic carcinoma*) – charakterystyka kliniczno-patologiczna, immunofenotyp, czynniki prognostyczne i predykcyjne” mam zaszczyt przedstawić poniższą opinię.

Rozprawa doktorska ma charakter monografii i została opracowana z podziałem na 8 głównych rozdziałów obejmujących: *Wstęp, Założenia pracy, Cel pracy, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski*. Zawiera ponadto: *Streszczenie w języku polskim i języku angielskim, Piśmiennictwo* (105 pozycji), *Załączniki* (klasyfikacja TNM) oraz *Spis tabel* (56 pozycji), *Spis rycin i Spis fotografii*.

Celem pracy była retrospektywna analiza grupy chorych z rozpoznaniem raka wielopostaciowego, raka wrzecionowatokomórkowego i olbrzymiokomórkowego pod kątem korelacji cech morfologicznych i immunofenotypu wymienionych nowotworów z danymi klinicznymi oraz określenia czynników predykcyjnych i prognostycznych. Rak wielopostaciowy jest rzadkim pierwotnym nowotworem złośliwym płuc cechującym się gorszym rokowaniem w porównaniu do innych raków niedrobnokomórkowych. Wśród możliwych czynników etiologicznych wymienia się palenie tytoniu. Jest jednym z 5 podtypów raka mięsakowego, zgodnie z wytycznymi WHO definiowanym jako niskozróżnicowany rak niedrobnokomórkowy zawierający obok utkania raka gruczołowego, płaskonabłonkowego lub gruczołowego co najmniej 10% komponentu z komórek wrzecionowatych lub olbrzymiokomórkowego. Może być również zbudowany wyłącznie z utkania wrzecionowatokomórkowego lub olbrzymiokomórkowego. Stanowi ok. 0,1% raków niedrobnokomórkowych płuc i do 3% wszystkich przypadków operacyjnych raka niedrobnokomórkowego. Niski odsetek guzów tego typu jest przyczyną

trudności rozpoznawczych z powodu niedostatecznego doświadczenia patologów, co sprawia, że rak wielopostaciowy może być błędnie diagnozowany jako mięsakorak lub rak niedrobnokomórkowy neuroendokrynnny. Podobieństwo obrazu morfologicznego do mięsaka może być następstwem transformacji nabłonkowo – mezenchymalnej EMT, która obecnie stanowi przedmiot licznych badań nad możliwościami różnicowania komórkowego. Rak wielopostaciowy jest zwykle wykrywany w zaawansowanym stadium z obecnością przerzutów wewnątrzpłucnych oraz w okolicznych węzłach chłonnych i narządach odległych takich jak nadnercza, wątroba, kości i mózg. Podkreśla się również możliwość nietypowych lokalizacji wtórnych ognisk nowotworu w przewodzie pokarmowym, przestrzeni zaotrzewnowej, w nerkach i trzustce.

W badaniach obrazowych rak wielopostaciowy nie wykazuje charakterystycznych cech pozwalających na odróżnienie od innych typów raka niedrobnokomórkowego. Ze względu na różnorodność budowy mikroskopowej rozpoznanie raka wielopostaciowego z wycinków oligobiopsyjnych jest trudne. W drobnym fragmencie tkankowym można uwidocznć tylko część utkania np. składnik raka gruczołowego lub płaskonabłonkowego. Ostateczne rozpoznanie stawia się w trakcie badania histopatologicznego pooperacyjnego materiału tkankowego z uwzględnieniem licznych wycinków z guza. Podstawę rozpoznania stanowi obraz morfologiczny uzupełniany badaniami immunohistochemicznymi, które mogą być pomocne w identyfikacji komponentu nabłonkowego, jak również w diagnostyce różnicowej z uwzględnieniem przerzutów spoza układu oddechowego. W badaniach molekularnych stwierdza się zwykle dużą liczbę mutacji jak w innych rakach tytoniozależnych, przeciętnie 8,1/Mb, z jednoczesnym wzrostem ich ilości w przypadku obecności raka gruczołowego lub płaskonabłonkowego. Z klinicznego punktu widzenia najbardziej istotne są mutacje genu *KRAS* (27-39%), *EGFR* (9-22%), *TP53* (23-74%), *BRAF* (7%), *HER-2* (1,6%) obserwowane również w innych rakach niedrobnokomórkowych płuca oraz mutacja w eksonie 14 genu *MET*, która jest częściej opisywana w raku wielopostaciowym i ma związek z transformacją nabłonkowo-mezenchymalną. Mutacje genów *ALK* i *ROS1* nie mają istotnego znaczenia. Badanie immunologii raka wielopostaciowego pozwoliło na odkrycie ekspresji cząstki PD-L1 na komórkach guza w 50-90% przypadków, co obok leczenia operacyjnego lub chemioterapii z radioterapią rozszerza możliwości lecznicze tego typu raka płuca. Rokowanie w raku wielopostaciowym jest złe. Średnie przeżycie wynosi 17,4 miesiąca, podczas gdy dla innych raków niedrobnokomórkowych płuca wartość ta wynosi 80.3 miesiąca. Raki tego typu cechuje agresywny przebieg i większa niż w innych rakach niedrobnokomórkowych

SM

skłonność do szerzenia się wewnątrzplucnego drogą przestrzeni powietrznych tzw. STAS (*Spreading through airways spaces*). Wśród przyczyn gorszego rokowania w raku wielopostaciowym wymienia się transformację nabłonkowo-mezenchymalną, która wiąże się z większą zdolnością do migracji, naciekania podścieliska, wytwarzaniu macierzy zewnątrzkomórkowej i zwiększonej odporności na apoptozę. W warunkach fizjologicznych wymienione właściwości tkanki są podstawą min. gojenia ran, ale w przypadku nowotworów ułatwiają ich rozsiew. W aktywacji procesu transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej oraz w ekspresji ujemnych punktów kontroli immunologicznej istotną rolę odgrywa czynnik transkrypcyjny ZEB1 (*ang. zinc-finger E-box binding homebox 1*), który hamuje transkrypcję E-kadheryny. Z powyższych danych może wynikać potencjalna rola markerów transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej (E-kadheryny, wimentyny i ZEB1), jako czynników prognostycznych.

Z uwagi na niską częstość występowania rak wielopostaciowy jest względnie mało poznanym typem raka niedrobnokomórkowego płuca, dlatego wybór tematu rozprawy doktorskiej uważam za jak najbardziej właściwy i trafny.

Doktorantka za cel pracy wyznaczyła:

1. Analizę morfologiczną raków wielopostaciowych, wrzecionowatokomórkowych i olbrzymiokomórkowych, określenie cech histologicznych: rodzaju i ilości komponentów nabłonkowego i mięsakowatego, ocenę rozległości martwicy, nasilenia nacieku zapalnego, obecności zatorów z komórek raka w świetle naczyń krwionośnych i limfatycznych oraz naciekania opłucnej.
2. Ocenę immunofenotypu w oparciu i odczynu immunohistochemiczne: AE1/AE3, TTF1, p40, E-kadheryny, wimentyny i ZEB1
3. Ocenę ekspresji białka PD-L1 w komponencie nabłonkowym i mięsakowatym oraz korelację z typem histologicznym, immunofenotypem i ekspresją E-kadheryny, wimentyny i ZEB1.
4. Analizę zjawiska szerzenia się raka przestrzeniami powietrznymi STAS i jego korelację z ekspresją PD-L1
5. Ustalenie czynników prognostycznych i predykcyjnych, które mogą mieć znaczenie dla określenia przebiegu choroby i leczenia pacjenta.

Doktorantka wybrała do analizy 107 przypadków raków wielopostaciowych wraz z danymi klinicznymi, po przeprowadzeniu ścisłej weryfikacji pierwotnych rozpoznań. Pochodziły one z materiału archiwalnego Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie



chorych operowanych z powodu raka płuca w latach 2000-2019. Z pierwotnie większej grupy chorych wyłączone z analizy 5 przypadków rozpoznanych ostatecznie jako mięsakoraki oraz 2 złożone raki niedrobnokomórkowe neuroendokrynne. Badania nie objęły również chorych po przebytej chemioterapii neoadiuwantowej i adjuwantowej (w wywiadzie rak jelita grubego). Wśród badanych nowotworów stwierdzono 100 przypadków raka wielopostaciowego, 5 przypadków raka olbrzymiokomórkowego i 2 raki wrzecionowatokomórkowe.

Materiałem do badań były preparaty mikroskopowe barwione hematoksyliną i eozyną do oceny morfologicznej z uwzględnieniem określenia typu histologicznego raka, komponentu nabłonkowego i mięsakowatego, rozległości naciekania z uwzględnieniem inwazji opłucnej, martwicy, zajęcia naczyń i przestrzeni powietrznych płuca oraz bloczki parafinowe, z których skrawano preparaty do wykonania odczynów immunohistochemicznych. Doktorantka zastosowała panel przeciwciał dobrany precyzyjnie zgodnie z założeniami pracy badawczej. Obejmował on cytokeratynę AE1/AE3, TTF1, p40, E-kadherynę, wimentynę i ZEB1 pod kątem immunofenotypu składnika nabłonkowego i markerów transformacji nabłonkowo-mezenchymalnej. W dalszej kolejności Doktorantka oceniała ekspresję PD-L1 używając klonu 22C3.

Charakterystyka kliniczna chorych z rakiem wielopostaciowym została wnikliwie przeprowadzona i wykazała przewagę mężczyzn (67M/40K), przewagę osób starszych (mediana 65lat) i palaczy tytoniu (92,6%). Guzy zlokalizowane były głównie obwodowo (78,5%) i częściej w płatach górnych (powyżej 50%). Średnia wielkość guzów wynosiła 5,5cm. Chorych leczono operacyjnie z zastosowaniem lobektomii (87%) i w jednym przypadku tumorektomii. Większość chorych (70/107) pozostała w obserwacji IGiCHP. Czas do wystąpienia wznowy wyniósł przeciętnie 2,6 lat, a do wystąpienia przerzutów 1,24 lata. Wyniki analizy klinicznej zostały w czytelny sposób przedstawione na wykresach i zgrupowane w tabelach.

Najczęstszym typem składnika nabłonkowego był rak płaskonabłonkowy (46%), nieco rzadziej spotykano raka gruczołowego i mieszanego. W 20,5% przypadków nie uwidoczniło zróżnicowanego komponentu nabłonkowego włączając do tej grupy raki wrzecionowatokomórkowe i olbrzymiokomórkowe. Niski stopień zróżnicowania składnika nabłonkowego przejawiający się podobieństwem do komponentu mięsakowatego był przyczyną trudności w określeniu udziału procentowego poszczególnych składników. Zaobserwowano istotną cechę morfologiczną mającą wpływ na progresję nowotworu, a mianowicie obecność utkania nabłonkowego typu mieszanego raka płaskonabłonkowo-



gruczołowego wiązała się z krótszym przeżyciem całkowitym OS. Również gorsze rokowanie dotyczyło utkania wielkomórkowego i wrzecionowatomórkowego, podczas gdy komponent raka płaskonabłonkowego stanowił niezależny czynnik zmniejszający ryzyko wystąpienia wznowy lub zgonu.

Analiza statystyczna wykazała, że martwica w guzie wiązała się krótszym czasem wolnym od choroby DFS.

W badanej grupie raków wielopostaciowych zdecydowanie częstsza była inwazja naczyń krwionośnych niż limfatycznych (73% do 48%), za wyjątkiem raków z komponentem gruczołowo-płaskonabłonkowych, gdzie zaobserwowano częściej zatory w naczyniach limfatycznych.

Wyniki reakcji immunohistochemicznych zostały szczegółowo opisane i udokumentowane rycinami potwierdzającymi wysoką jakość odczynów. Pani Doktor wykazała, że odczyny immunohistochemiczne są pomocne w odróżnieniu raka wielopostaciowego od innych typów raka niedrobnokomórkowego płuca, w szczególności cytokeratyna AE1/AE3 i E – kadheryna identyfikują komponent nabłonkowy, a odczyny TTF-1 i p40 mogą wskazywać na kierunek różnicowania. Rozlana reakcja cytoplazmatyczna dla wimentyny wybarwia komórki pleomorficzne w raku wielopostaciowym, co wydaje się być kluczowe dla rozpoznania tego typu raka w drobnych materiałach oligobiopsyjnych.

Szczegółowa analiza badanych raków wykazała wysoką ekspresję markerów przemiany nabłonkowo-mezenchymalnej (EMT) tj. wimentyny i ZEB1, przy jednocześnie obniżonej ekspresji E-kadheryny, co potwierdza aktywację procesu EMT w powstawaniu raka wielopostaciowego. Nie uzyskano dodatknej korelacji ekspresji markerów EMT z rokowaniem oraz związku ze STAS i ekspresją PD-L1. W części badanych raków z krótszym czasem przeżycia wolnego od choroby DFS nie zaobserwowano ekspresji markerów EMT. Otwiera to drogę do dalszych badań w tym zakresie w celu poszukiwania znaczenia klinicznego.

Cennym wnioskiem z przeprowadzonych badań a udziałem PD-L1 jest wykazanie zwiększonej jego ekspresji (TPS >50-42%), co czyni tę część ważnym czynnikiem predykcyjnym. Jednocześnie zaobserwowany związek pomiędzy dodatnią ekspresją PD-L1 i martwicą w guzie a krótszym czasem przeżycia wolnym od choroby oraz przeżyciem całkowitym, pozwolił na wyodrębnienie grupy chorych z koniecznością ścisłego nadzoru onkologicznego w celu wykrycia nawrotów.

Jul

Analiza morfologiczna w korelacji z danymi klinicznymi wskazała na zjawisko STAS (szerzenie się nowotworu przestrzeniami powietrznymi) jako niezależną cechę części (39%) raków wielopostaciowych z wyższym stopniem zaawansowania choroby, nie związaną z inwazją naczyń, rozległością martwicy, typem histologicznym utkania i odsetkiem komponentu mięsakowatego oraz ekspresją markerów EMT. Pani Doktor w dyskusji podkreśliła znaczenie kryteriów oceny STAS (niski i wysoki) zaproponowanych przez Uruga i wsp. w poszukiwaniu znaczenia rokowniczego. Obecność STAS wiąże się z gorszym parametrem DFS w analizie jednoczynnikowej ($p < 0,05$), podczas gdy w analizie wieloczynnikowej wartość prognostyczna STAS co do nawrotu choroby jest zmienna, co wskazuje na jego wartość rokowniczą, ale w połączeniu z innymi parametrami.

Istotnym końcowym wnioskiem z przeprowadzonych badań jest wskazanie czynników prognostycznych dla przeżycia całkowitego (OS), które obejmują: -w analizie jednoczynnikowej: stopień zaawansowania III/IV ($p=0,014$), inwazję naczyń krwionośnych ($p=0,048$), inwazję naczyń limfatycznych ($p=0,028$) i mieszany typ komponentu nabłonkowego (gruczołowo-płaskonabłonkowy) ($p=0,003$).

-w analizie wieloczynnikowej niezależnymi predyktorami są: stopień zaawansowania III/IV ($p=0,037$) oraz mieszany typ komponentu nabłonkowego (gruczołowo-płaskonabłonkowy) ($p=0,003$)

i czynników prognostycznych dla przeżycia całkowitego DFS:

-w analizie jednoczynnikowej: stopień zaawansowania III/IV ($p=0,011$), nasilenie martwicy ($p=0,004$), inwazję naczyń limfatycznych ($p=0,036$) i obecność STAS ($p=0,01$) i obecność wysokiego STAS ($p=0,006$)

-w analizie wieloczynnikowej niezależnymi predyktorami są: martwica $> 25\%$ ($p=0,015$), typ komponentu nabłonkowego (lepiej rokuje rak płaskonabłonkowy) ($p=0,013$) i brak ekspresji wimentyny w komponente mięsakowatym ($p=0,022$).

Rozprawa została napisana w sposób niezwykle staranny i dokładny, zgodny ze stanem aktualnej wiedzy. Zarówno wyniki badań jak i wnioski przedstawiono w logiczny, zwięzły sposób. Na uwagę zasługuje dyskusja, która została podzielona na rozdziały zgodne z kolejnymi badanymi parametrami. Zaprezentowana jest w sposób interesujący i jednocześnie dojrzały pod względem naukowym. Publikacje cytowane w dyskusji (105 pozycji literaturowych) są w pełni adekwatne do treści. Oceniana rozprawa pozwoliła zaprezentować również szeroką i gruntowną wiedzę pani Doktor z zakresu patologii nowotworów płuc. Dzięki dużej grupie przebadanych guzów można przypuszczać, że wyniki pracy są reprezentatywne dla ogółu raków wielopostaciowych.

Za wzór można postawić redakcję rozprawy, w tym również dobór danych w licznych tabelach. Rozprawa jest przejrzysta i łatwa w „nawigacji” do istotnych informacji zawartych w tekście. Doktorantka wzbogaciła pracę trafnie wybranymi mikrofotografiami dobrej jakości, które mogą posłużyć jako materiał dydaktyczny dla patologów poszukujących obrazów porównawczych.

W całej pracy napotkałam kilka nieistotnych z merytorycznego punktu widzenia błędów językowych.

W mojej opinii rozprawa doktorska „Rak wielopostaciowy płuca (*pleomorphic carcinoma*) – charakterystyka kliniczno-patologiczna, immunofenotyp, czynniki prognostyczne i predykcyjne” spełnia wymogi stawiane pracom na stopień doktora nauk medycznych. W związku z powyższym składam wniosek do Rady Naukowej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc o dopuszczenie pani Doktor Katarzyny Sikory do dalszych etapów przewodu doktorskiego.