

dr hab. n. med. Grzegorz Budziński
Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Naczyniowej
I Transplantacyjnej
Śląski Uniwersytet Medyczny-SUM
Katowice

Katowice 10.04.2021

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

lekarz Joanny Ligockiej

pt: „Wynik leczenia chorych na raka pęcherzyka żółciowego z uwzględnieniem roli błonowych mikrocząsteczek nowotworowych”

Rak pęcherzyka żółciowego należy do najczęstszych nowotworów złośliwych dróg żółciowych. Każdego roku w Polsce wykrywa się około 1500 nowych przypadków, głównie u osób powyżej 60 roku życia. Oznacza to, że nowotwór ten znajduje się w drugiej dziesiątce listy najczęściej diagnozowanych nowotworów. Niemniej naukowcy poświęcają mu wiele uwagi, gdyż cechuje się bardzo agresywnym przebiegiem, a badania te skupiają się przede wszystkim na jego etiologii i wczesnej diagnostyce.

Etiopatogeneza raka pęcherzyka żółciowego wciąż nie jest znana. Wiadomo jednak, że w grupie jego wysokiego ryzyka rozwoju są osoby cierpiące na kamicy pęcherzyka żółciowego. Szacuje się, że kamica występuje nawet u więcej niż 20% populacji Europy i wzrasta wraz z wiekiem populacji. Przyczynia się do tego dodatkowo rosnąca liczba osób otyłych, cierpiących na cukrzycę i/lub zaburzenia gospodarki lipidowej. Zwykle pierwsze objawy tej choroby pojawiają się wtedy, gdy jest już w zaawansowanym stadium. Zazwyczaj rak jest wykrywany wcześniej u pacjentów operowanych z powodu kamicy pęcherzyka żółciowego. Ocenia się, że nawet u przeszło 80% chorych na nowotwór pęcherzyka żółciowego współwystępuje kamica. Natomiast wśród wszystkich cholecystektomii wykonanych z wstępnym rozpoznaniem kamicy pęcherzyka żółciowego, to tylko u 2 % pacjentów rak jest wykrywany przypadkowo w badaniu histopatologicznym. Rokowania w raku pęcherzyka wykrytego w początkowym stadium są bardziej optymistyczne, niż w stadium późnym, niemniej i tak nie należą do pomyślnych. W związku ze starzejącym się społeczeństwem, należy spodziewać się wzrostu zapadalności na ten nowotwór, dlatego tak ważne jest jego wczesne rozpoznanie i specjalistyczna opieka nad pacjentem już od samego początku. Ze względu na skryty i bezobjawowy

w początkowym okresie przebieg choroby, to tylko ok. 25 % chorych w momencie rozpoznania ma szansę na radykalne leczenie operacyjne. Czulość diagnostyczna wzrasta w zaawansowanym stadium choroby, ale wtedy jest już najczęściej za późno na leczenie radykalne. Stąd wynika potrzeba opracowania nowych narzędzi diagnostycznych we wczesnym wykrywaniu tego raka. Mogą to być tzw. błonowe mikrocząsteczki nowotworowe (MPs), które są fragmentami komórek nowotworowych uwolnionych do krwioobiegu, gdzie następnie na podstawie oznaczenia w płynnej biopsji (surowica) mogą stanowić wczesny i swoisty „marker” dla nowotworu danego narządu.

Z takim zagadnieniem, a mianowicie wczesnym wykrywaniem raka pęcherzyka żółciowego, jego wczesną diagnostyką i sposobami leczenia postanowiła się zmierzyć Doktorantka w swojej dysertacji. Materiał badawczy przedstawiony do analizy obejmował tylko chorych z ośrodka, w którym Doktorantka pracuje, tj. Kliniki Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Wątroby WUM w Warszawie.

Przedstawiona mi do oceny praca, obejmująca w całości 111 stron, ma typowy układ. Przedstawiona została w formie klasycznej rozprawy na stopień doktora nauk medycznych. Recenzujący prezentuje ponownie swoje zadowolenie z tego formatu pracy, ponieważ pozwala to uniknąć kontrowersyjnej w rozumieniu recenzenta powszechnie stosowanej praktyki „salami slice” w dysertacjach opierających się na dorobku publikacyjnym. Praca poprzedzona jest spisem treści, wykazem stosowanych skrótów, spisem tabel i rycin, które ułatwiają śledzenie dalszej treści. Na początku Autorka umieściła streszczenia w języku polskim i angielskim.

We **wstępie** obejmującym 23 stronie tekstu Autorka przedstawiła w sposób wyczerpujący zagadnienia związane z rakiem pęcherzyka żółciowego. Omówiła epidemiologię, etiologię i czynniki ryzyka. Oprócz powszechnie znanych takich jak kamica żółciowa, otyłość, zaburzenia metaboliczne, szczególną uwagę zwróciła na problem polipów pęcherzyka żółciowego z możliwością ich transformacji do raka. Następnie dużą uwagę poświęca metodom diagnostycznym zarówno w zakresie technik obrazowych i zabiegom diagnostycznym. Zebrane dane mogłyby stanowić ciekawą publikację o typie monografii dotyczącej epidemiologii, diagnostyki i możliwości leczenia raka pęcherzyka żółciowego. Bardzo szczegółowo omawia klasyfikację TNM z jej 8 modyfikacją AJCC z 2017r, która to stopień zaawansowania raka, uzależnia od ilości węzłów chłonnych w obrębie więzadła wątrobowo-

dwunastniczego (cecha N), gdzie pozostałe węzły chłonne należy traktować jako cechę M, czyli przerzuty odległe. Warunkuje to przynależność do grupy klinicznego zaawansowania, a tym samym determinuje radykalność procedury operacyjnej. Jak wiadomo, jedynym postępowaniem leczniczym jest leczenie operacyjne, któremu poświęca też dużo uwagi- opisuje kryteria radykalności leczenia, jak również omawia sposoby leczenia paliatywnego, w tym terapii adjuwantnej. Na koniec wstępu Autorka opisuje rolę mikrocząsteczek (MPs) we współczesnej diagnostyce nowotworów. Powołując się na najnowsze publikacje opisuje ich znaczenie we wczesnej diagnostyce raka piersi, jajnika, endometrium i raka płaskonabłonkowego. Wykazano szereg MPs również jako swoisty panel dla pierwotnego raka wątroby (HCC) i dróg żółciowych. Szczególna analiza tego panelu wykazała że trzy MPs (CD133+gp38+, EpCAMCD133+gp38+, CD44v6+CD133+) były szczególnie podwyższone w grupie chorych na nowotwory dróg żółciowych i były niskie wśród chorych na HCC.

Cele Autorka zawarła we wstępie jako: ocenę wyników leczenia chorych na raka pęcherzyka żółciowego, przydatność metod diagnostycznych w ocenie stopnia zaawansowania raka oraz podjęła próbę oceny roli MPs w diagnostyce i predykcji zgonu chorych z rakiem pęcherzyka żółciowego.

W części: **Materiał i metody** Doktorantka przedstawia na licznych rycinach i tabelach analizę retrospektywną 104 pacjentów leczonych w latach 2014-2017 z powodu raka pęcherzyka żółciowego. Spośród nich, 27 chorych o różnym stopniu zaawansowanego raka włączono do prospektywnej analizy (grupa 2). Grupę kontrolną stanowiło 23 ambulatoryjnie ocenionych pacjentów bez choroby nowotworowej. Surowica pacjentów była oceniana ilościowo za pomocą cytometrii przepływowej na obecność mikrocząsteczek MPs (Homburg-Niemcy).

W retrospektywnej części badania analizowano dane pochodzące od 104 pacjentów z rakiem pęcherzyka żółciowego. Spośród 80 operowanych (76,9%), 44 (55,0%) pacjentów miało operację z intencją wyleczenia, a 36 (45,0%) operację paliatywną. Pozostałych 24 pacjentów (23,1%) było leczonych zachowawczo. Analiza jednoczynnikowa wykazała wpływ przedoperacyjnej podwyższonej liczby płytek), aktywności GGT i ALP, oraz brak przerzutów nowotworowych w węzłach i przerzutów odległych w pooperacyjnej ocenie histopatologicznej. Analiza wieloczynnikowa potwierdziła brak przerzutów nowotworowych do węzłów chłonnych jako niezależny czynnik lepszego rokowania u chorych poddanych radykalnej

operacji. Różnica mediany przeżycia w zależności od obecności komórek nowotworowych w węzłach chłonnych wyniosła 10,0 miesięcy (34,5 miesiąca vs. 24,5 miesiąca). Natomiast analiza przeżycia pacjentów w zależności od okoliczności rozpoznania raka pęcherzyka żółciowego wykazała medianę przeżycia 24 miesięcy, gdy rozpoznanie postawiono przypadkowo w badaniu histopatologicznym po cholecystektomii wykonywanej z innych wskazań, oraz 10 miesięcy, gdy podejrzewano raka pęcherzyka żółciowego na podstawie objawów klinicznych i badań obrazowych ($p < 0,001$). Analiza wpływu chemioterapii adjuwantowej wykazała jej pozytywny wpływ na przeżycie w pierwszym roku po operacji.

W analizie prospektywnej porównano 27 pacjentów będących w różnych stadiach zaawansowania choroby nowotworowej i 23 ochotników bez choroby nowotworowej. Wykazano statystycznie istotnie większą liczbę MPs CD133+gp38+ w grupie badanej niż w grupie kontrolnej. Wytyczony punkt odcięcia na poziomie 11,8 dla analizowanej MPs charakteryzował się dużą czułością i średnią swoistością dla wykrywania raka pęcherzyka żółciowego (81,5% i 52,2%). Różnorodność grupy badanej pozwoliła następnie na ocenę wykorzystania MPs do określenia stopnia zaawansowania klinicznego choroby nowotworowej i samego guza, występowania przerzutów w węzłach chłonnych i przerzutów odległych.

Podsumowując, radykalna operacja to jedyna realna szansa na przedłużenie życia chorych na raka pęcherzyka żółciowego. Pacjenci bez przerzutów nowotworowych w węzłach chłonnych więzadła wątrobowo-dwunastniczego są grupą o najlepszym rokowaniu. Klasyczne narzędzia diagnostyczne nie są wystarczająco czułe w diagnostyce wczesnych zmian nowotworowych. Dodatkowe narzędzia diagnostyczne, takie jak MPs, mogą usprawnić rozpoznawanie i ułatwić proces selekcji pacjentów do operacji oraz mogą być niezależnym narzędziem do oceny rokowania.

W **dyskusji** obejmującej 18 stron tekstu, Autorka ponownie analizuje i interpretuje czynniki, które miały wpływ na wyniki leczenia chorych z rakiem pęcherzyka żółciowego. Na podstawie własnego zebranego materiału potwierdza światowe dane epidemiologiczne tej choroby, zwraca szczególną uwagę na trudności diagnostyczne we wczesnym okresie zachorowania. Istotnym spostrzeżeniem jest bardzo wysoki odsetek rozpoznań w zaawansowanej fazie choroby, co wiąże Doktorantka z opóźnieniem leczenia operacyjnego kamicy pęcherzyka żółciowego, nawet już w okresie objawowym. Wskazuje tym samym na brak narzędzi

diagnostycznych w różnicowaniu przewlekłej kamicy pęcherzyka żółciowego z potencjalnie rozwijającym się jego rakiem. Wobec takiej sytuacji braku wczesnej diagnostyki, w wielu krajach rozwiniętych świata, znaczenia nabiera trend cholecystektomii profilaktycznej u chorych z bezobjawową kamcią pęcherzyka żółciowego. Podstawą takiego postępowania jest wspomniany powyżej fakt, że wieloletnia kamica pęcherzyka żółciowego jest uznanym i najważniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju raka pęcherzyka żółciowego i jest stwierdzana u około 85,0% chorych z tym nowotworem. Wynikającym kolejnym wnioskiem jaki wysunęła Doktorantka jest termin ponownej operacji po pierwotnej cholecystektomii - radykalizacji zabiegu- który powinien odbyć się w okresie 4 do 8 tygodni po cholecystektomii, a w ośrodku w którym był zbierany materiał mediana wynosiła 10 tygodni. Dodatkowym czynnikiem w wykonywaniu cholecystektomii profilaktycznej jest rozwój technik laparoskopowych i bezpieczeństwo tej procedury. W leczeniu operacyjnym podkreśla, iż jedynym skutecznym sposobem w „intencji” wyleczenia jest dokładna chirurgia onkologiczna pola wątrobowo-dwunastniczego. Stąd wniosek, iż czym mniejsze zaawansowanie kliniczne raka, tym operacja radykalna typ R0 i R1 są możliwe do wykonania. By te cele osiągnąć, należy dysponować nowymi narzędziami diagnostycznymi umożliwiającymi postawienie wczesnej diagnozy raka pęcherzyka żółciowego. Tym narzędziem mogą być tzw mikrocząsteczki (MPs) wytypowane z szerokiego ich panelu. Autorka w prezentowanej pracy po raz pierwszy postanowiła wytypować z szerokiego panelu MPs dla nowotworów wątroby potencjalnie swoiste dla raka pęcherzyka żółciowego. Takimi okazały się dwie MPs: CD133+gp38+ oraz EpCAM+gp38+. Wyznaczony dla CD133+gp38+ punkt optymalnego odcięcia na poziomie 11,8 wykazał bardzo wysoką czułość i średnią swoistość (81,5% i 52,2%) dla wykrywania raka pęcherzyka żółciowego. Kolejne jego wzrosty wskazywały na większy stopień zaawansowania klinicznego choroby. Oczywiście, zastosowanie do tej MPs na podstawie analizy wieloczynnikowej takich parametrów jak: inne MPs, CA- 19,9 ; współczynnika neutrofilii do limfocytów-(NLR), pozwala potencjalnie zwiększać czułość i swoistość w wykrywaniu wczesnego raka pęcherzyka żółciowego.

Metody statystyczne do oceny uzyskanych wyników zastosowano właściwie.

Piśmiennictwo obejmuje 250 pozycji, głównie z ostatniego okresu, a załączone pozycje i ich odniesienia w tekście adekwatnie wiążą się z omawianą problematyką.

Wnioski końcowe recenzenta: Przedstawiona do oceny dysertacja jest o prawidłowej konstrukcji merytorycznej. Założone cele Doktorantka realizuje przy pomocy dobrze dobranych metod badawczych, szczególnie w analizie wszystkich potencjalnych czynników w grupie retrospektywnej w rozpoznaniu wczesnego raka pęcherzyka żółciowego. W grupie prospektywnej (n=27), wyodrębnionej z badanej grupy 104 chorych Autorka zastosowała nowe narzędzie badawcze w wykrywaniu wczesnego raka pęcherzyka żółciowego jakim jest potencjalnie swoiste dla niego MPs. Dokonała tego w porównaniu z grupą zdrowych ochotników, gdzie na podstawie wyznaczenia punktu odcięcia wartości krzywej ROC, który ustanowiła na poziomie 11,8 z dużym prawdopodobieństwem można rozpoznać wczesnego raka pęcherzyka żółciowego. W mojej opinii, analiza retrospektywna z prospektywnym badaniem jej części chorych w kierunku obecności i poziomu wybranych MPs może stanowić wielki przyczynek do wczesnego rozpoznania raka pęcherzyka żółciowego.

Jako recenzent jestem jeszcze zmuszony do wykazania drobnych uchybień w konstrukcji pracy pod względem edytorskim; jest ich mało, są to pojedyncze błędy literowe i stylistyczne, które bez wątplenia Autorka sama zauważy i poprawi przygotowując pracę do druku w renomowanym czasopiśmie. W celu przejrzystości pracy proponowałbym używać skrótów dla niektórych słów-kluczy w tej rozprawie: a mianowicie skrót dla raka pęcherzyka żółciowego: GBC (powszechnie stosowany w piśmiennictwie, analogicznie do HCC czy CCC), proponowałbym też nadać robocze nazwy dla oznaczanych MPs

Powyższe uwagi nie podważają wysokiej oceny rozprawy, jednocześnie wnioskuję do Wysokiej Rady mając na uwadze jej nowatorskość i możliwe duże znaczenie we wczesnej diagnostyce raka pęcherzyka żółciowego o wyróżnienie powyższej dysertacji.

Rozprawa lek. Joanny Ligockiej w pełni odpowiada wszelkim wymogom stawianym dysertacjom doktorskim, czyli spełnia warunki określone w art. 13.Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (DZ.U.nr 65.poz 595 z późn.zm.) w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (DZ.U. z 2018r. poz 1669 z późn.zm), co upoważnia mnie do wystąpienia z wnioskiem do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. n. med.
Grzegorz BUDZINSKI
specjalista chirurgii ogólnej, naczyniowej
i transplantologii klinicznej

