

lek. Joanna Ligocka

**Wyniki leczenia chorych na raka pęcherzyka żółciowego z
uwzględnieniem roli błonowych mikrocząsteczek
nowotworowych**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Waldemar Patkowski

Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Wątroby

I Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2021



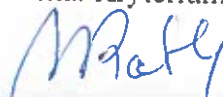
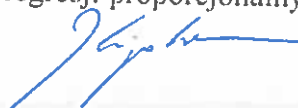
STRESZCZENIE

Wyniki leczenia chorych na raka pęcherzyka żółciowego z uwzględnieniem roli błonowych mikrocząsteczek nowotworowych

Chirurgiczne leczenie chorych na raka pęcherzyka żółciowego pozostaje jedyną skuteczną metodą umożliwiającą wyleczenie. Ze względu na bezobjawowy i agresywny charakter nowotworu jedynie około 25,0% chorych w momencie rozpoznania ma szansę na radykalną operację. Klasyczne metody diagnostyczne pozwalają na prawidłowe rozpoznanie u nie więcej niż 88,0% przypadków. Jednak czułość metod diagnostycznych wzrasta wraz ze stopniem zaawansowania raka. Stąd potrzeba poszukiwania nowych narzędzi diagnostycznych umożliwiających wczesne rozpoznanie raka pęcherzyka żółciowego. Zainteresowanie budzą oznaczane na drodze płynnej biopsji błonowe mikrocząsteczki nowotworowe (*Microparticles*, MPs), które są fragmentami komórek nowotworowych uwolnionymi w procesie pobudzenia lub śmierci komórki maczynnej.

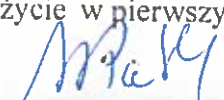
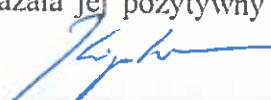
Celem pracy była ocena procesu diagnostycznego, wyników leczenia i przeżycia chorych na raka pęcherzyka żółciowego oraz określenie roli MPs w diagnostyce i rokowaniu chorych na raka pęcherzyka żółciowego.

Analizą retrospektywną objęto 104 pacjentów leczonych w latach 2014-2017 z powodu raka pęcherzyka żółciowego w Klinice Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Wątroby Centralnego Szpitala Klinicznego, Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (CSK, UCK WUM). Spośród nich, 27 chorych poddanych radykalnej cholecystektomii włączono do prospektywnej analizy. Grupę kontrolą stanowiło 23 ambulatoryjnie ocenionych pacjentów bez choroby nowotworowej. Krew pacjentów była oceniana ilościowo za pomocą cytometrii przepływowej na obecność czterech MPs (CD133+gp38+, EpCAM+gp38+, EpCAM+CD133+, EpCAM+CD133+gp38+). Badanie zostało przeprowadzone we współpracy z Kliniką Hepatologii i Gastroenterologii w Homburgu (Niemcy). Punktami końcowymi analizy była śmierć pacjenta i nawrót raka pęcherzyka żółciowego. Do porównania grup pod względem zmiennych jakościowych i ilościowych zastosowano odpowiednio test χ^2 lub U Manna-Whitneya. W przypadku rozkładu normalnego wykonano test t-studenta. Całkowity czas przeżycia i przeżycie wolne od choroby nowotworowej określono za pomocą krzywych Kaplana-Meiera. Różnice przeżycia między grupami porównano za pomocą testu log-rank. Przeżycie wolne od choroby nowotworowej zdefiniowano jako okres od radykalnej operacji do nawrotu nowotworu lub śmierci. Wpływ analizowanych zmiennych na całkowite przeżycie i przeżycie wolne od wznowy określono na podstawie metody regresji proporcjonalnych hazardów Coxa. Kryterium włączenia do analizy



wieloczynnikowej była istotność statystyczna uzyskana w analizach jednoczynnikowych. Modele wieloczynnikowe wyznaczono metodą eliminacji wstecznej. Współczynnik ryzyka (*Hazard Ratio*, HR) i obszar pod krzywą (*Area Under the Curve*, AUC) przedstawiono z 95% przedziałem ufności (*Confidence Interval*, CI). Optymalne punkty odcięcia dla wybranych zmiennych wyznaczono na podstawie przebiegu krzywych ROC (*Receiver Operating Characteristics*, ROC). Istotność statystyczną ustalono na poziomie $p=0,05$. Do analiz wykorzystano program STATISTICA 13 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA).

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. Przeżycie 6-miesięczne, 1, 3 i 5-letnie dla całej analizowanej grupy wyniosło odpowiednio 79,8%, 56,7%, 21,6% i 0,0%, przy medianie przeżycia 15,0 miesięcy (7,0-30,2 miesiąca). Mediana przeżycia w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu wyniosła odpowiednio 23,8 miesięcy, 21,3 miesięcy, 15,0 miesięcy i 9,5 miesięcy, odpowiednio dla stopnia I, II, III i IV ($p < 0,001$). W zależności od radykalności operacji mediana przeżycia wyniosła 29,7 miesiąca dla chorych poddanych radykalnej operacji i 9,0 miesięcy dla chorych poddanych nieradykalnej operacji ($p < 0,001$). Analiza jednoczynnikowa wykazała wpływ przedoperacyjnej podwyższonej liczby płytek krwi (PLT: HR=9,0; 95% CI 1,5-42,4; $p=0,014$), aktywności gamma glutamylotranspeptydazy (GGTP: HR=1,6; 95% CI 1,1 -2,4; $p=0,015$) i aktywności fosfatazy alkalicznej (ALP: HR=2,9; 95% CI 1,4-5,9; $p=0,004$) oraz brak przerzutów nowotworowych w węzłach chłonnych (HR=0,4; 95% CI 0,2-0,9; $p=0,005$) i obecność przerzutów odległych w pooperacyjnej ocenie histopatologicznej (HR=9,1; 95% CI 2,2-37,3; $p < 0,001$). Analiza wieloczynnikowa potwierdziła brak przerzutów nowotworowych do węzłów chłonnych jako niezależny czynnik lepszego rokowania u chorych poddanych radykalnej operacji (HR=0,3; 95% CI 0,1-0,9; $p=0,028$). Różnica mediany przeżycia w zależności od obecności komórek nowotworowych w węzłach chłonnych wyniosła 10,0 miesięcy (34,5 miesiąca vs. 24,5 miesiąca; $p=0,001$). Nawrót choroby nowotworowej obserwowano u 50,0% chorych poddanych radykalnej operacji. W tej grupie czas wolny od choroby nowotworowej wyniósł 18,0 miesięcy, a mediana przeżycia 22,1 miesięcy i była o 8,7 miesiąca krótsza niż dla całej grupy po resekcji radykalnej (30,8 miesięcy). Analiza przeżycia pacjentów w zależności od okoliczności rozpoznania raka pęcherzyka żółciowego wykazała medianę przeżycia 23,8 miesięcy, gdy rozpoznanie postawiono przypadkowo w badaniu histopatologicznym po cholecystektomii wykonywanej z innych wskazań oraz 10,0 miesięcy, gdy podejrzewano raka pęcherzyka żółciowego na podstawie objawów klinicznych i badań obrazowych ($p < 0,001$). Analiza wpływu chemioterapii adiuwantowej wykazała jej pozytywny wpływ na przeżycie w pierwszym roku po operacji



(87,5% vs. 80,0%), jednak nie miała wpływu na przeżycie ogólne (mediana przeżycia 31,1 miesiący vs. 31,6 miesiący). Wśród pacjentów z przypadkowo rozpoznany rakiem pęcherzyka żółciowego, którzy zostali poddani radykalnemu leczeniu operacyjnemu, stwierdzono wzrost częstości występowania nacieku na struktury okołopęcherzykowe wraz ze wzrostem zaawansowania guza ocenionym podczas pierwotnej operacji cholecystektomii: T1b - 50,0%; T2 - 77,8%; T3 - 88,5% (T1b vs. T2/T3 $p=0,018$). Optymalny czas od pierwotnej cholecystektomii do wtórnej radykalnej operacji określono na 60,0 dni (AUC=0,523; 95% CI 0,295-0,862; $p=0,332$) z czułością 83,3% i swoistością 55,5%.

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 (33,9 vs. 11,4; $p=0,029$). Punkt odcięcia na poziomie 11,8 dla analizowanej MPs charakteryzował się dużą czułością i średnią swoistością dla wykrywania raka pęcherzyka żółciowego, odpowiednio 81,5% i 52,2% (AUC=0,681; 95% CI 0,533-0,830; $p=0,017$). 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. Przekroczenie punktu odcięcia dla MPs CD133+gp38+ z dokładnością większą niż 70,0% określało kliniczne zaawansowanie guza w stadium TNM III/IV, przy zaledwie 3,7% ryzyku błędu. Dodatkowo, bardzo wysoka czułość i swoistość MPs CD133+gp38+ w odniesieniu do wykrywania przerzutów odległych raka pęcherzyka żółciowego pozwoliła na wykrycie 88,9% chorych z przerzutami odległymi oraz 83,3% chorych bez przerzutów. Dwie MPs: CD133+gp38+ i EpCAM+gp38+, z dokładnością prawie 60,0% określały zaawansowanie miejscowe choroby. Co więcej, dzięki bardzo wysokiej swoistości MPs EpCAM+gp38+ z dokładnością 85,7% mogliśmy wykryć pacjentów bez przerzutów nowotworowych do węzłów chłonnych. Trzy MPs (CD133+gp38+, EpCAM+gp38+ oraz EpCAM+CD133+gp38+) okazały się niezależnymi czynnikami prognostycznymi ryzyka zgonu u chorych z rakiem pęcherzyka żółciowego.

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.



prof. dr hab. n. med.
Waldemar Patkowski
specjalista chirurgii ogólnej, onkologicznej
i transplantologii klinicznej
4710067