

## Ocena pracy doktorskiej lekarza Marii Urbanowicz

Temat rozprawy:

### **Correlation of tumour-stroma ratio (TSR) and clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) after adjuvant radiotherapy**

Nowotwory głowy i szyi stanowią heterogenną grupę guzów, w której przebieg biologiczny i rokowanie zależą od bardzo wielu czynników takich jak: umiejscowienie, czy też rodzaj tkanki z której się wywodzą (np. błona śluzowa jamy ustnej, gardło, migdałki, ślinianki, tkanki twarde (kości i zęby)). W obszarze głowy i szyi działa także bardzo wiele różnych czynników kancerogennych od czynników mechanicznych, chemicznych, socjo-społecznych do czynników biologicznych z podkreśleniem infekcji wirusami brodawczaka ludzkiego (HPV). Najczęstszym nowotworem tej okolicy jest rak płaskonabłonkowy o złożonej „ścieżce” zdarzeń molekularnych prowadzącej do jego rozwoju. Obecnie nie ma pojedynczych i w pełni powtarzalnych markerów molekularnych pozwalających na precyzyjne określenie rokowania w tym nowotworze. Stosowana obecnie 3 stopniowa klasyfikacja stopnia złośliwości histologicznej raka płaskonabłonkowego ma bardziej znaczenie statystyczne (prawie 80% guzów jest zaliczanych do stopnia 2) niż rzeczywisty czynnik rokowniczy. Stąd powstała potrzeba szukania nowych markerów prognostycznych, szczególnie w odniesieniu do oceny „inwazyjności” poszczególnych guzów. Bardzo ważnym polem poszukiwań były klasyfikacje obejmujące relacje raka płaskonabłonkowego do otaczającego podścieliska np. klasyfikacja Anerotha, Batsakisa i Luny pierwotnie odnosząca się do raka płaskonabłonkowego krtani, a następnie ocena (skala punktowa) histopatologicznej oceny „Tumour front grading”, czyli ocena stopnia „wnikania” guza do podścieliska. Należy podkreślić, że w diagnostyce i ocenie rokowania oraz zastosowanego odpowiedniego schematu leczenia nowotworów wieku rozwojowego takich jak: zwojak zarodkowy (neuroblastoma), czy też nerczak zarodkowy (nephroblastoma – guz Wilmsa), w ramach obowiązujących klasyfikacji, oceniana jest obecność i odsetek zrębu guza w odniesieniu do powierzchni nowotworu lub jego innych niż zrąb komponentów (np. komponentu blastemicznego i nabłonkowego w nephroblastoma).

Badania autorki wpisują się w poszukiwania nowych, niezależnych czynników rokowniczych w raku płaskonabłonkowym okolicy głowy i szyi, związanych z rolą i znaczeniem wzajemnych relacji guza i jego zrębu.

Rozprawa doktorska ma układ typowy i jest napisana poprawnym językiem angielskim. Praca ta porusza bardzo ważny problem oceny nowej grup czynników rokowniczych u chorych z rakami płaskonabłonkowymi okolicy głowy i szyi. Jak wskazuje autorka nowotwory okolicy głowy i szyi stanowią siódmy, co do częstości nowotwór na świecie. Z kolei 5 letni okres przeżycia obserwowany jest u około 50% chorych z rakiem płaskonabłonkowym jamy ustnej. Nowotwór ten w obszarze Azji (np. w Indiach i Sri Lance) stanowi główną przyczynę śmierci z powodu nowotworów. Rak płaskonabłonkowy okolicy głowy i szyi wywodzi się z nabłonka błony śluzowej jamy ustnej i górnych dróg oddechowych. We wstępie autorka wskazuje na różnice w biologii, jak i działaniu potencjalnych czynników kancerogennych w różnych obszarach głowy i szyi, takich jak jama ustna, jej część gardłowa, gardło, czy też krtań. Zaznacza także, iż zależnie od umiejscowienia mogą to być czynniki fizyczne i chemiczne, takie jak kontakt z tytoniem (palenie i żucie), betelem (żucie), a także zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV) z grupy wysokiego ryzyka.

Autorka opisuje także systemy leczenia chorych z rakami płaskonabłonkowymi okolicy głowy i szyi z uwzględnieniem leczenia chirurgicznego oraz radioterapii, a także chemioterapii. Oddzielny podrozdział poświęca wskazaniom do leczenia adjuwantowego, efektom ubocznym oraz wynikom leczenia.

W dalszej części wstępu autorka wskazuje na znaczenie oceny wzajemnej relacji guza z jego zrębem określanym jako stosunek ilościowy obszaru nowotworu i podścieliska (Tumour-stroma ratio – TSR). Guzy o wysokim odsetku zrębu (Stroma high tumor (>50%)) w cytowanym piśmiennictwie charakteryzowały się niekorzystnym rokowaniem, w odróżnieniu od nowotworów o niższej zawartości zrębu (<=50%).

W kolejnym podrozdziale lekarz Maria Urbanowicz opisuje rolę i potencjalne znaczenie prognostyczne oceny liczby leukocytów naciekających guz (Tumor-infiltrating leucocytes - TILs). Szczegółowo przedstawiając udział limfocytów linii T (w tym CD8, CTL, T-helper (TH1) NK oraz komórek TH2, a także limfocytów T regulatorowych (Tregs) oraz limfocytów linii B.

Cele pracy zostały przedstawione w sposób czytelny i logiczny. Autorka postanowiła przeanalizować TSR i jego prognostyczną wartość u chorych z rakiem płaskonabłonkowym głowy i szyi, u których przeprowadzono zabieg operacyjny pierwotnego guza i zastosowano adjuwantową RT lub CRT oraz ponadto ustalić punkt odcięcia dla TRS, który najlepiej oddzieli pacjentów z SHT od tych z SLT pod względem prognostycznym, biorąc pod uwagę DFS i OS. Ponadto autorka postanowiła ocenić wartość prognostyczną liczby leukocytów naciekających guz (TILs) i zbadać wzajemną zależność pomiędzy TSR, a reakcją układu immunologicznego.

Materiał badawczy stanowiło 91 biopsji (bloczków parafinowych) od pacjentów z rakiem gardła, krtani oraz warg i jamy ustnej leczonych w Wielkopolskim Centrum Onkologii w Poznaniu. Kliniczne dane dotyczące ww. chorych takie jak: data rozpoznania, data rozpoczęcia cyklu leczenia, okres obserwacji, czas pojawienia się wznowy, czy też przerzutów oraz okres obserwacji i przeżycia uzyskano z systemu informatycznego Szpitala. Autorka opisuje także bardzo szczegółowo dobór poszczególnych chorych i prezentuje listę przyczyn wykluczeń pacjentów z grupy badawczej. Ocenę stosunku obszaru nowotworu i podścieliska (TSR) dokonano posługując się skalą półilościową i przedstawiono jako odsetek komponentu podścieliska w ocenianym polu. Do oceny liczby leukocytów naciekających guz (TILs) posłużono się skalą półilościową w obszarze reprezentującym naciek nowotworu. TILs naciekające podścielisko (sTILs) i naciekające utkanie samego guza (iTILs) zostały ocenione oddzielnie, a ich liczba wyrażona jako odsetek do podścieliska lub tkanki właściwej guza. W odniesieniu do oceny badań immunohistochemicznych CD3, CD4, CD8, CD20, CD68 i CD163 i liczby dodatnich komórek posłużono się także trzystopniową skalą półilościową. W rozdziale „Materiał i Metody” autorka bardzo szczegółowo opisuje system oceny powyższych parametrów. Do oceny statystycznej uzyskanych wyników badań lekarz Maria Urbanowicz posłużyła się testami nieparametrycznymi testem Spearman log rank, Manna-Whitneya, testami oceny ryzyka w odniesieniu do długości czasu przeżycia bez choroby i czasu przeżycia całkowitego, a także przedstawiła linie przeżycia na podstawie analizy wg. metody Kaplana-Meiera.

Zaprezentowana metodyka badań pozwala, moim zdaniem na obiektywną ocenę badanych parametrów, lecz bardzo restrykcyjny system wykluczeń znacznie ogranicza liczbę pacjentów z grupy badawczej.

W pracy znajduje się 7 tabel i 12 wykresów, w tym zdjęcia mikroskopowe, głównie w rozdziale „Wyniki badań”.

W tym obszernym rozdziale autorka przedstawia szczegółowo wyniki poszczególnych etapów przeprowadzonych badań. W odniesieniu do badań TSR nie stwierdziła istotności statystycznej w odniesieniu do badanych parametrów kliniczno-patologicznych. Zaobserwowała natomiast trend do dłuższych przeżyć u chorych z nowotworami o ubogim podścielisku (SLT) w porównaniu z grupą chorych z guzami o bogatym podścielisku (SHT). W badaniu tzw. punktu odcięcia autorka stwierdziła, iż w odniesieniu do znaczenia prognostycznego punkt odcięcia na poziomie 40% wydaje się być bardziej najbardziej adekwatny do podziału na guzy o ubogim podścielisku (SLT) w porównaniu do nowotworów z bogatym podścieliskiem (SHT). W dostępnych publikacjach opisujących wyniki badań relacji SLT do SHT punkt odcięcia proponowano na poziomie 50%.

Autorka udowodniła ponadto statystycznie istotną różnicę pomiędzy gęstością nacieku związanych z podścieliskiem leukocytów naciekających guz (sTILs) w guzach o obfitym podścielisku (SHT) i ubogim podścielisku (SLT). Zaobserwowała większą liczbę sTILs w SLT w porównaniu do SHT. Wykazała także statystycznie istotną różnicę w liczbie związanych z podścieliskiem limfocytów B znakowanych przeciwciałem CD20 (sCD20) i średnich wartości tych limfocytów (CD20) pomiędzy guzami o obfitym podścielisku (SHT) i ubogim podścielisku (SLT). Ponadto stwierdziła odwrotną zależność pomiędzy liczbą związanych z podścieliskiem limfocytów B znakowanych przeciwciałem CD20 (sCD20) a stosunkiem ilościowym obszaru nowotworu i podścieliska (TSR) i między średnią liczbą limfocytów znakowanych przeciwciałem CD20 (CD20) i TSR. W guzach o obfitym podścielisku obserwowała mniejszą liczbę sCD20 i mniejszą średnią liczbę komórek CD20 dodatnich w nacieku. Wykazała także, iż niższe ryzyko zgonu wiąże się z istotnie statystycznie większą liczbą nacieku limfocytów T pomocniczych (Th) w podścielisku (sCD4). W odniesieniu do wyników badanych markerów immunohistochemicznych z pozostałymi parametrami histoklinicznymi autorka nie uzyskała istotnych statystycznie zależności.

W rozdziale rozprawy obejmującym „Dyskusję”, autorka wnikliwie i szeroko omawia uzyskane dane odnosząc je do wyników innych autorów. W podrozdziale dotyczącym stosunku ilościowego obszaru nowotworu i podścieliska (TSR) autorka szczegółowo przedstawia zawarte w piśmiennictwie wyniki badań wskazujące na punkt odcięcia komponentu zrębowego  $> 50\%$  dla guzów o niekorzystnym rokowaniu. Podkreśla także, że w części publikacji uzyskane wyniki nie są walidowane oraz to, że stosowane są różne metody pomiaru komponentu zrębowego i nowotworowego co nie pozwala na jednoznaczne porównanie tych danych.

W kolejnym podrozdziale przeprowadza szeroką dyskusję w odniesieniu do TSR w raku płaskonabłonkowym okolicy głowy i szyi (HNSCC). A na podstawie własnych badań wskazuje, że punkt odcięcia komponentu zrębowego  $\leq$  i  $> 40\%$  różnicujący guzy z obfitym podścieliskiem (SHT) z nowotworami z ubogim podścieliskiem (SLT) spowoduje, że potencjalnie większa liczba chorych będzie zaliczona do grupy wysokiego ryzyka i odpowiednio leczona. Dalej lekarz Maria Urbanowicz podkreśla, że ocenę TSR można łatwo przeprowadzić na podstawie rutynowo wykonanych preparatów barwionych hematoksyliną i eozyną i dołączyć do innych czynników oceny ryzyka guza.

W podrozdziale dotyczącym leukocytów naciekających guz (TILs) autorka wskazuje związek procesów zapalnych i rozwoju nowotworów. W cytowanym piśmiennictwie odsetek limfocytów naciekających raka płaskonabłonkowego (TILs) i limfocytów naciekających samo podścielisko raka płaskonabłonkowego (sTILs) okolicy głowy i szyi (HNSCC) miał znaczenie prognostyczne i stanowił niezależny czynnik rokowniczy w odniesieniu do wystąpienia miejscowych nawrotów. Badania lekarz Marii Urbanowicz również wykazały tę zależność.

W obszernym podrozdziale dotyczącym liczby i roli limfocytów linii T w nacieku w obrębie guza autorka wskazała na duże znaczenie prognostyczne nacieku różnych typów limfocytów tej linii. W tej części „Dyskusji” omówiła szczegółowo rolę limfocytów T oznaczonych jako CD4 podkreślając aktywność immuno-stymulującą CD4 typu Th1 i immunosupresyjną CD4 typu Th2 i Tregs (T regulatory lymphocytes).

Lekarz Maria Urbanowicz udowodniła, iż niższe ryzyko zgonu wiąże się z istotnie statystycznie większą liczbą nacieku limfocytów T pomocniczych (Th) w podścielisku (sCD4), co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez część cytowanych autorów. Autorka zaproponowała także ciekawą hipotezę tłumaczącą to zjawisko,

lecz nie mogła jej poprzeć własnymi wynikami ponieważ nie identyfikowała typów limfocytów CD4 w przeprowadzonych badaniach.

W odniesieniu do roli i znaczenia liczby limfocytów linii B w nacieku w obrębie guza, szeroko opisanej w kolejnym podrozdziale, autorka wskazała, że desmoplastyczny (zwiókniały) zrąb guza może znacząco utrudniać naciekanie go przez takie komórki układu immunologicznego jak limfocyty linii B. W badaniach swoich udowodniła, że liczba związanych z podścieliskiem limfocytów B, znakowanych przeciwciałem CD20 (sCD20) i średnich wartości tych limfocytów, (CD20) jest mniejsza w guzach o obfitym podścielisku (SHT) w odniesieniu do nowotworów o ubogim podścielisku (SLT). Obserwacja ta znalazła potwierdzenie w części cytowanych publikacji.

W kolejnym podrozdziale lekarz Maria Urbanowicz omówiła rolę i znaczenie związanych z guzem makrofagów (TAMs).

W końcowym podrozdziale „Dyskusji” autorka zaprezentowała dendrogramy uzyskane na podstawie analizy klasterowej pozwalającej na ocenę zależności pomiędzy grupami uzyskanych wyników.

Na podstawie uzyskanych wyników badań i przeprowadzonej dyskusji autorka sformułowała następujące wnioski, które ściśle odpowiadają postawionym celom pracy.

Przeprowadzone badania wykazały obecność trendu związanego z dłuższym czasem przeżycia wolnym od choroby (DFS) i dłuższym czasem całkowitego przeżycia (OS) u chorych z guzami o ubogim podścielisku (SLT) w odniesieniu do pacjentów z nowotworami o obfitym podścielisku (SHT).

Punkt odcięcia 40%, pozwala bardziej adekwatnie niż punkt odcięcia 50% określić rokowanie u chorych z guzami o ubogim podścielisku (SLT) w odniesieniu do pacjentów z nowotworami o obfitym podścielisku (SHT).

Zdecydowanie mniejsze ryzyko zgonu (dłuższy czas przeżycia bez choroby i dłuższy całkowity czas przeżycia) zostało zaobserwowano u chorych z nowotworami o większej liczbie Th (sCD4) naciekających podścielisko.

Większa liczba limfocytów B w podścielisku w guzach o ubogim podścielisku wiąże się z lepszym rokowaniem .

w podsumowaniu

Ocena stosunku ilościowego obszaru nowotworu i podścieliska (TSR) jest potencjalnie wartościowym czynnikiem rokowniczym u chorych z rakiem płaskonabłonkowym okolicy głowy i szyi (HNSCC) po chirurgicznym wycięciu pierwotnego guza i adjuwantowej radio lub chemioterapii.

Piśmiennictwo z uwzględnieniem najnowszej literatury zawiera 66 pozycji i zostało starannie dobrane oraz wykorzystane w pracy.

Z obowiązku recenzenta chciałbym wskazać na drobne niedociągnięcia w przedstawionej mi do oceny pracy. W związku z tym, że dysertacja jest napisana po angielsku należy zdecydować, czy ma to być język angielski brytyjski (np. tumour), czy też amerykański (np.tumor). Ponadto w streszczeniu pracy (po polsku) znajduje się sporo ułomności stylistycznych.

Oceniając wysoko rozprawę doktorską, praktyczny aspekt podjętej pracy, jej wykonanie i opracowanie, zgłaszam do Szanownej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu wnioski o dopuszczenie lekarza Marii Urbanowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego, jednocześnie wnioskując o wyróżnienie pracy.

Z wyrazami szacunku

Prof. dr hab. n. med. Józef Kobos

**Prof. dr hab. n. med. JÓZEF KOBOS**  
specjalista patomorfolog  
i patologii onkologicznej  
91-849 Łódź, ul. Niemojewskiego 23 m. 26  
tel. 42 656-45-73 8957480

*Józef Kobos*