

KATEDRA I ZAKŁAD PATOMORFOLOGII KLINICZNEJ UNIwersYTETU MEDYCZNEGO W LUBLINIE

Kierownik: Prof. dr hab. n. med. Justyna Szumiło
20-090 Lublin, ul. Jaczewskiego 8b, tel. (81) 448 65 30; 448 65 32 fax (81) 448 65 31
e-mail: patomorfologia@umlub.pl www.patomorfologia.lublin.pl

Ocena

rozprawy doktorskiej lek. Roberta Dziury

pt. „Analiza wyników zastosowania immunoterapii anty-PD-1

u chorych z zaawansowanym czerniakiem

**z uwzględnieniem oceny wartości prognostycznej wybranych parametrów
klinicznych, wyjściowych parametrów układu leukocytarnego krwi obwodowej
oraz ekspresji produktów białkowych genów naprawczych systemu MMR”**

**z Collegium Medicum Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach
wykonanej pod kierunkiem promotora prof. dr hab. n. med. Stanisława Gózdźia
i promotor pomocniczej dr n. med. Jolanty Smok-Kalwat**

Ze względu na nasilające się zmiany klimatyczne i zwiększającą się ekspozycję na promieniowanie ultrafioletowe czerniak skóry staje się coraz poważnym problemem kliniczno-diagnostyczny. Leczeniem z wyboru pozostaje chirurgiczne usunięcie zmiany, jednak w czerniakach zaawansowanych konieczne jest stosowanie leczenia systemowego, przy czym coraz większe znaczenie mają immunoterapia i leczenie ukierunkowane molekularnie. W nurt badań nad czynnikami rokowniczymi oraz warunkującymi skuteczność immuoterapii anty PD-1 w zaawansowanym czerniaku wpisuje się rozprawa doktorska lekarza Roberta Dziury.

Rozprawa liczy 160 stron wydruku komputerowego. Ma układ typowy i uwzględnia wszystkie części składowe przewidziane dla prac tego rodzaju. Obszerny wstęp (39 stron) został podzielony na dwie części. W pierwszej Pan Robert Dziura szczegółowo przedstawia zagadnienia związane z etiopatogenezą czerniaka, uwzględnia stosowane metody diagnostyczne i współczesne opcje terapeutyczne, opisuje także czynniki prognostyczne. Natomiast w drugiej części, prezentuje informacje dotyczące immunologii i immunoterapii nowotworów, w tym immunoterapii ukierunkowanej na immunologiczne punkty kontrolne oraz znaczenia systemu naprawy błędnie sparowanych zasad i niestabilności mikrosatelitarnej w patogenezie nowotworów, a także przybliży metody oceny zaburzeń czynności genów uczestniczących w procesie naprawy.

Wstęp jest poprzedzony przez spis treści oraz spis zastosowanych w dysertacji akronimów z wyjaśnieniami w językach angielskim i polskim.

Następnie Doktorant precyzyjnie formułuje trzy cele podjętych badań, którymi są:

- analiza wyników leczenia pacjentów z zaawansowanym czerniakiem przy zastosowaniu immunoterapii anty-PD-1 prowadzona w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w Kielcach oraz identyfikacja czynników wpływających na rokowanie,
- ocena zależności pomiędzy wyjściowym poziomem parametrów leukocytarnych krwi obwodowej a długością czasu przeżycia całkowitego i czasu przeżycia wolnego od progresji oraz ustalenie znaczenia rokowniczego poszczególnych subpopulacji leukocytów,
- ocena ekspresji białek systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (MMR) u chorych z zaawansowanym czerniakiem oraz ustalenie znaczenia rokowniczego obecności lub utraty ich ekspresji.

Kolejny rozdział dotyczący Materiału i metod badań, na które Kandydat uzyskał zgodę lokalnej komisji bioetycznej. Grupa badana liczyła 50 chorych z zaawansowanym czerniakiem zakwalifikowanych do leczenia immunoterapią anty-PD-1 (programy lekowe z niwolumabem i pembrolizumabem) w Świętokrzyskim Centrum Onkologii w Kielcach w okresie 1.07.2016-30.06.2019. Leczenie i jego monitorowanie prowadzono wg wytycznych obowiązującego programu lekowego Ministerstwa Zdrowia. Przy ocenie odpowiedzi radiologicznej na leczenie stosowano skalę RECIST 1.1/iRECIST. Zakończenie leczenia następowało w momencie stwierdzenia progresji, zgonu lub nieakceptowalnej toksyczności. Oceny obrazowej dokonywano po 12 tygodniach.

Doktorant przeanalizował szczegółowo dokumentację medyczną pacjentów z poradni specjalistycznych Centrum pod kątem takich informacji kliniczno-patologicznych jak: wiek chorych, stan sprawności, stopień zaawansowania choroby, liczba zajętych okolic, lokalizacja zmian przerzutowych, poziomu LDH oraz parametry układu leukocytarnego morfologii krwi obwodowej (wartości bezwzględne neutrofili, limfocytów, eozynofili, monocytów, bazofili; wartości względne: neutrofili, limfocytów, eozynofili, monocytów, bazofili, wyjściowa liczba leukocytów, wskaźnik neutrofilowo-limfocytarny). Następnie określił czas całkowitego przeżycia (OS) i czas przeżycia wolny od progresji (PFS) w badanej grupie pacjentów. Obserwację grupy zakończył 30 czerwca 2020 roku.

Badania immunohistochemiczne z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciwko białkom systemu naprawy błędnie sparowanych zasad (MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2) przeprowadził w Zakładzie Patologii Nowotworów Świętokrzyskiego Centrum Onkologii na archiwalnym materiale z blozków parafinowych na aparacie Omnis (Dako).

Doktorant opisał także szczegółowo analizę statystyczną, którą oparł na prawidłowo dobranych i zastosowanych testach z wykorzystaniem programu komputerowego R wersja 3.6.2 (R Core Team 2019).

Najobszerniejszą i najważniejszą częścią pracy jest rozdział dotyczący wyników. Został on uzupełniony o 28 tabel oraz 20 rycin. Doktorant rozpoczyna od charakterystyki badanej grupy, uwzględniając wiek, płeć i stan ogólny pacjentów, lokalizację ogniska pierwotnego i przerzutów, wyjściowe stadium zaawansowania a także status mutacji genu BRAF. Następnie szczegółowo podał informacje dotyczące leczenia, odpowiedzi na leczenie i występujących powikłań oraz charakterystykę ocenianych parametrów układu leukocytarnego krwi obwodowej i zestawienie wyników badań immunohistochemicznych produktów białkowych genów naprawczych systemu MMR w czerniaku. W dalszej części przedstawił wyniki analizy czasu całkowitego przeżycia i czasu przeżycia wolnego od progresji w odniesieniu do parametrów klinicznych, powikłań immunoterapii, parametrów leukocytarnych krwi obwodowej i ekspresji białek systemu MMR, a także analizę własności predykcyjnych parametrów leukocytarnych.

Wykazał, że u pacjentów, którzy otrzymywali immunoterapię w pierwszej linii 3-letnie przeżycie całkowite wynosiło 38%, mediana czasu przeżycia całkowitego – 18,1 miesiąca, natomiast odsetek pacjentów bez potwierdzonej progresji w ciągu 3 lat od leczenia wynosił 19% a mediana czasu przeżycia wolnego od progresji – 4,9 miesiąca. Parametry te były zdecydowanie gorsze przy zastosowaniu immunoterapii jako leczenia drugiej linii. Negatywne znaczenie rokownicze miały: gorszy stan sprawności (ECOG 1), wiek (<55 lat), stopień zaawansowania (M1c+M1d) i liczba zajętych okolic (≥ 3). Doktorant stwierdził także, zależność między obiektywną odpowiedzią radiologiczną na leczenie (CR+PR) lub kontrolą procesu (SD+PR+CR) a zmniejszeniem ryzyka zgonu, odpowiednio o 86% i 88%. Powikłania immunologiczne po leczeniu wystąpiły u 40% chorych. Pojawienie się powikłań 1. lub 2. stopnia wg skali CTCAE wiązało się 63% zmniejszeniem ryzyka zgonu i poprawą odsetka przeżyć w poszczególnych latach. W analizie jednoczynnikowej oraz korygowanej w stosunku do zaawansowania wyjściowego stwierdził korelację całkowitej liczby neutrofili (ANC), względna liczba neutrofili (RNC) i wskaźnika neutrofilowo-limfocytarnego (NLR) z krótszym czasem przeżycia całkowitego. Negatywne znaczenie rokownicze w odniesieniu do czasu przeżycia wolnego od progresji wykazywały: całkowita liczba leukocytów (WBC), całkowitej liczby neutrofili (ANC), względna liczba neutrofili (RNC) i wskaźnik neutrofilowo-limfocytarny (NLR). Wzrastający poziom względnej liczby neutrofili RLC miał korzystne

znaczenie rokownicze i istotny związek z dłuższą medianą przeżycia całkowitego i przeżycia wolnego od progresji.

Najwyższą wartość rokowniczą miał poziom wskaźnika neutrofilowo-limfocytarnego (NLR). Optymalny punkt odcięcia negatywnie korelujący z długością czasu przeżycia całkowitego określił na $\geq 4,1$, natomiast wartości $\geq 4,5$ były tymi dla których istotnie wzrastało ryzyko zgonu w ciągu roku od rozpoczęcia immunoterapii ($p=0,0002$). U chorych z brakiem ekspresji białek naprawczych systemu MMR Doktorant nie obserwował obiektywnej odpowiedzi na leczenie. Nie wykazał także istotnego wpływu ekspresji na długość czasu całkowitego przeżycia. Natomiast mediana czasu przeżycia wolnego od progresji w grupie bez ekspresji białek MLH1 i PMS2 była istotnie niższa (3 miesiące vs. 9 miesięcy, $p=0,03$).

Następną częścią dysertacji jest Dyskusja, która liczy 29 stron. Została ona podzielona na trzy części analogicznie do zakładanych celów badań. Pierwsza koncentruje się wokół analizy przeżyć pacjentów z zaawansowanym czerniakiem poddanych immunoterapii anty PD-1, a druga wokół poszukiwania biomarkerów predykcyjnych i prognostycznych przydatnych w postępowaniu z pacjentami z zaawansowanym czerniakiem, trzecia natomiast dotyczy znaczenia rokowniczego ekspresji białek systemu naprawy błędnie sparowanych zasad w czerniaku i innych nowotworach. We wszystkich częściach Doktorant swobodnie konfrontuje wyniki badań własnych z uzyskanymi przez innych autorów, uwzględniając kluczowe badania kliniczne. Wyjaśnia także prawdopodobne przyczyny stwierdzanych rozbieżności. Dyskusja jest napisana w sposób interesujący i logiczny, świadczący o gruntownym zapoznaniu się z literaturą przedmiotu i dużej wiedzy Doktoranta.

Wyniki badań zostały podsumowanie w pięciu wnioskach, które odpowiadają celom postawionym przez Doktoranta. Są to:

1. Istotny wpływ na długość czasu przeżycia całkowitego i wolnego od progresji chorych z zaawansowanym czerniakiem ma wyjściowy stan sprawności pacjentów, wiek <55 r.ż., liczba zajętych okolic (≥ 3) oraz stopień zaawansowania. Najważniejsze negatywne czynniki prognostyczne to zły stan sprawności z obecnością rozsiewu nowotworowego do wielu narządów, w tym z przerzutami do mózgu.
2. Zastosowanie przeciwciał anty-PD-1 w drugiej linii leczenia, szczególnie po wcześniejszych inhibitorach iBRAF+iMEK, jest mniej skuteczne niż terapia pierwszej linii i wiąże się z niższym odsetkiem odpowiedzi oraz krótszym czasem przeżycia całkowitego.

3. Występowanie powikłań immunologicznych nie pogarsza długoterminowych efektów leczenia przeciwciałami anty-PD-1, a obecność powikłań stopnia 1. i 2. wiąże się ze zmniejszeniem ryzyka zgonu chorych.
4. Znaczenie prognostyczne u chorych z zaawansowanym czerniakiem wykazuje wyjściowa liczba neutrofilów i limfocytów, a wzrastająca wartość wskaźnika neutrofilowo-limfocytarnego koreluje istotnie statystycznie z krótszym czasem przeżycia całkowitego oraz przeżycia wolnego od progresji.
5. W przypadku chorych z zaawansowanym czerniakiem nie potwierdzono znaczenia prognostycznego i predykcyjnego występowania zaburzeń czynności genów naprawczych systemu MMR.

Kolejną częścią dysertacji jest obszerny spis piśmiennictwa liczący 195 pozycji. Zawiera on głównie pozycje anglojęzyczne, w tym autorów polskich, w większości opublikowane w ciągu ostatnich 5-6 lat. Piśmiennictwo zostało trafnie dobrane i zestawione w sposób uporządkowany pod względem logicznym i stylistycznym.

Dysertację kończą streszczenia w języku polskim i angielskim oraz spisy tabel i rycin.

W mojej opinii, przedstawiona do recenzji rozprawa jest osiągnięciem oryginalnym i wartościowym. Lek. Robert Dziura zebrał duży i spójny materiał badawczy w oparciu o bazę danych macierzystej jednostki, który wzbogacił o przeprowadzane na potrzeby swojej pracy odczyny immunohistochemiczne. Jasno sformułował cele pracy a hipotezy badawcze zweryfikował w oparciu o prawidłowo zaplanowaną i wykonaną analizę statystyczną. Wstęp i dyskusja wskazują na dobrą znajomość zagadnień poruszanych w dysertacji. Uzyskane wyniki mogą mieć znaczenie praktyczne. Praca jest napisana w sposób uporządkowany i przejrzysty. Na szczególne podkreślenie zasługuje bardzo dobra polszczyzna, którą posługuje się pan Robert Dziura. Nie znalazłam większych błędów, a te które zauważyłam są często wynikiem działania edytora tekstu. Ponadto, Doktorant wykazał się dużą odpornością na pseudonaukowe zastępowanie wyrazów czy składni polskiej – angielską, co niestety jest coraz rzadszą cechą u młodych naukowców.

Mam także kilka uwag dotyczących manuskryptu. Jako patologowi brakuje mi udokumentowania trzeciej części badań zdjęciami z preparatów mikroskopowych prezentujących immunoekspresję białek systemu naprawy błędnie sparowanych zasad azotowych w czerniaku. Podniosłyby one niewątpliwie walory merytoryczne i estetyczne pracy, mimo rozczarowującego braku znaczenia prognostycznego tych białek. Nie znalazłam informacji, skąd Doktorant czerpał wiedzę o statusie i metodzie wykrywania mutacji BRAF

w czerniakach u badanych pacjentów. Pan Dziura użył w metodyce stwierdzenia „...materiały histopatologiczne utrwalane w bloczkach parafinowych...”, co można uznać za prawidłowe w znaczeniu filozoficznym, jednak dla patologa jest błędne, ponieważ materiały do badań histopatologicznych rutynowo utrwalane są w zbuforowanej formalinie. Ponadto, wszystkie skróty stosowane w tabelach i rycinach (w tytułach i treści) powinny być każdorazowo wyjaśniane pod tabelą/ ryciną (patrz np. tabela 18). Wygodniejsze dla czytelnika jest także, o ile to możliwe, zamieszczanie pełnych tabel na jednej stronie niż ich dzielenie (patrz tabela 15).

Powyższe uwagi nie wpływają jednak negatywnie na ogólną ocenę dysertacji lek. Roberta Dziury.

Podsumowując, duży i interesujący materiał badawczy, walory naukowe i praktyczne pracy oraz doskonała znajomość zagadnień zaprezentowana przez lekarza Roberta Dziurę, upoważniają mnie do stwierdzenia, że oceniana dysertacja w pełni odpowiada warunkom stawianym rozprawom na stopień doktora.

W związku z tym wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Nauk Medycznych *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach o dopuszczenie lekarza Roberta Dziury do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lublin, dnia 20 kwietnia 2021 r.

Prof. dr hab. n. med. Justyna Szumiło

