



Dziękuję
Wydziału Wojskowo-Lekarskiego
wpłynęło dn. 2015-06-25

UNIWERSYTET MEDYCZNY podpis *On* Idz. 1361

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

Zakład Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej

Ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław

Tel.: (71) 7343960; Fax.: (71) 7343968

dr hab. n. med. Agnieszka Hałoń, prof. nadzw.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

lek. med. ŁUKASZA PAKUŁY

z Oddziału Anestezjologii i Intensywnej Terapii WSS im. Mikołaja Kopernika w Łodzi
pt. „Badanie ekspresji hamulców immunologicznych CTLA-4 i PD-1 w limfocytach T
w okresie okołoperacyjnym u chorych na raka piersi”
wykonanej pod kierunkiem dr hab. n. med. Agnieszki Kołacińskiej

I. Temat pracy i zidentyfikowanie zadania badawczego

Rak piersi jest najczęstszym nowotworem złośliwym i stanowi najczęstszą przyczynę zgonów spowodowanych nowotworami u kobiet zarówno w Polsce, jak i w większości rozwiniętych krajów świata. Stanowi 10,9% wszystkich nowo zdiagnozowanych zachorowań zarejestrowanych w Krajowym Rejestrze Nowotworów w latach 2001–2011 i jest drugą, zaraz po raku płuc, chorobą onkologiczną najczęściej rozpoznawaną w tym okresie u Polaków (zarówno kobiet, jak i mężczyzn).

W ostatnich latach wiele uwagi w patobiologii raka piersi poświęcono mechanizmom apoptozy, neoangiogenezy, zaburzeniom cyklu komórkowego czy procesom związanym z migracją komórek oraz zdolnością do inwazji i przerzutowania pod kątem reakcji kinetyczno-mechanicznych implikowanych złożonymi reakcjami biochemicznymi. Z mniejszą intensywnością jak do tej pory badano zagadnienia immunologiczne: hamulce immunologiczne, obecność nacieków limfocytarnych w guzie (TILs – tumor infiltrating lymphocytes) czy wreszcie immunoterapię.

Personalizacja leczenia w onkologii jest nieodłącznym procesem przebiegającym równoległe do badań nad biologią nowotworów, w tym raka piersi, a olbrzymie nadzieje pokładane są już nie tyle w postępie technik chirurgicznych, ale przede wszystkim w poszukiwaniu i konstruowaniu nowych klas leków przeciwnowotworowych, w tym inhibitorów hamulców immunologicznych.

W piśmiennictwie światowym istnieje ograniczona liczba publikacji dotyczących badań ekspresji białek z grupy hamulców immunologicznych w okresie okołoperacyjnym u chorych w raku piersi. Dominują publikacje związane z pewną i udowodnioną immunogennością czerniaka, raka nerki, pęcherza moczowego czy płuca.

Opracowania, u którego podstaw leżałyby założenia przyjęte przez Autora w polskim piśmiennictwie brak. Rozwiewa to ewentualne wątpliwości, czy podejmowanie tej tematyki jest uzasadnione i pożądane. Bez wątpienia warto podjąć tematykę odnoszącą się właśnie do tego zagadnienia, ponieważ ma ono niebywale poglądowy i dydaktyczny aspekt. Po lekturze wstępu i wynikających z niego konsekwencji odnośnie treści rozprawy nie mam wątpliwości, że tak określone przez Autora zadanie badawcze jest zasadne i potrzebne.

Agnieszka Hałoń
Zakład Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej
ul. Borowska 213, 50-556 Wrocław
Telefon: (71)7343961; Fax: (71)7343968

II. Cel badawczy, przedmiot pracy i przyjęta metodologia

Wybór tematu pracy doktorskiej i określenie celu zadania badawczego budzi już we wstępie zainteresowanie i oczekiwania dotyczące efektu końcowego rozprawy.

Recenzowana praca jest syntetyczna, zwięzła i oszczędna – a nawet bardzo oszczędna – objętościowo zważywszy na fakt, że jej przedmiotem jest temat bardzo szeroki, a mianowicie rola układu odpornościowego w niezwykle heterogenicznej jednostce kliniczno-patologicznej, jaką jest rak piersi. W sposób naturalny prowokuje to pytanie, czy Doktorant posiadał cechę badawczą odzwierciedlającą ceną umiejętność ważenia kwestii wyboru informacji najistotniejszych i syntezy w miejscach, w których jest ona pożądana, i nie sprawi, że narazi go to na zarzut powierzchowności z hasłowym i migawkowym podejściem do tematu. Odniosłam jednak wrażenie, że **Autorowi udało się wykonać zadanie** w zakresie wspomnianych wyborów zagadnień wartościowych i mniej istotnych z punktu widzenia podjętej problematyki zagadnień immunologicznych w raku piersi, a w konsekwencji **znakomicie powiodła się selekcja materiału poglądowego i badawczego**, na podstawie której budował swoją wiedzę. Rozważania prowadzone są w sposób wyselekcjonowany i rozprawa nie jest nasycona „elementami zbędnymi”.

III. Ocena systematyki pracy i zawartości poszczególnych rozdziałów

Przedstawiona mi do recenzji praca ma typowy, klasyczny dla tego typu opracowań układ i liczy – zaledwie – 76 stron maszynopisu. Opracowanie podzielone jest na następujące rozdziały: *Spis treści*, *Wstęp* (13 stron), *Cel pracy* (2 strony), *Pacjenci i metody* (8 stron), *Wyniki* (7 stron), *Dyskusja* (10 stron), *Wnioski* (2 strony), *Aneksy i wyjaśnienia* (3 strony), *Piśmiennictwo* (13 stron) oraz *Streszczenie w języku polskim i angielskim* (odpowiednio 6 i 7 stron). **Zabrakło mi** zdecydowanie dwóch elementów publikacji: (1) *Wykazu skrótów* – byłby niezwykle pomocny w naszpikowanym trudną, w tym anglojęzyczną nomenklaturą tekście oraz (2) *Spisu rycin i tabel* – bardzo przydatnego w tak bogato ilustrowanych opracowaniach.

Wstęp jest zwarty, skoncentrowany, stanowi syntezę poglądów na temat heterogenności i immunogenności raka piersi, wybranych hamulców immunologicznych oraz ewolucji zabiegów operacyjnych węzłów chłonnych pachowych w tej chorobie. Oparty jest o dobrze dobrane piśmiennictwo, które uwzględnia zarówno pierwsze, już historyczne, ale niezwykle interesujące publikacje, jak i najnowszą wiedzę w zakresie tematyki badawczej. Rozdział jest przejrzysty, zrozumiały i stanowi doskonały „background”, nawet – a może zwłaszcza – dla czytelników, którzy nie zajmują się na co dzień tą tematyką. Rozdział ten, choć nie szokuje nowościami, **wskazuje na sporą i uporządkowaną wiedzę Doktoranta w zakresie obranej tematyki badawczej i ma dużą moc edukacyjną i dydaktyczną.**

Na uwagę zasługuje bogaty w dane z już nieomal historii medycyny podrozdział **Immunogenność raka piersi**, z którego wprost czerpać można wiedzę dotyczącą podwalin tych zagadnień, a nawet osiągnięć Noblowskich odkrywców koncepcji nadzoru immunologicznego. Niezwykle doceniam tę „erudycyjną” wstawkę Autora – świadczy o Jego szerokich horyzontach i chęci wykraczania poza wiedzę stricte medyczną.

Jako patomorfolog diagnozujący materiały pooperacyjne raka piersi zwróciłam szczególną uwagę na podrozdział wstępu dotyczący ewolucji zabiegów operacyjnych dotyczących węzłów chłonnych ze zmianą paradygmatu i znacznym ograniczeniem zakresu chirurgii węzłowej z jednoczesną poprawą wskaźników przeżycia chorych. Autor bardzo trafnie i w sposób uporządkowany umieścił w nim ważny z punktu widzenia nowoczesnej kliniki komentarz i interpretację tego faktu, co świadczy o wnikliwej analizie tematu oraz głębokim zrozumieniu opisywanych pojęć i zjawisk.



Cele pracy są wyjątkowo proste i czytelne. Zostały jasno sformułowane i wynikają wprost z przygotowania merytorycznego i klinicznego Autora. Wartościowe i bardzo sensowne jest również krótkie autorskie uzasadnienie podjęcia badań (ostatni akapit Wstępu, strona 17).

Pacjenci i metody. Badanie zostało dobrze zaplanowane, a dobrane przez Doktoranta metody i techniki badawcze (bardzo zgrabnie i syntetycznie przedstawione i scharakteryzowane) pozwoliły na zrealizowanie założonego celu badań, w którym finalnie wzięło udział 35 pacjentek. Rozdział został napisany wyczerpująco i stanowił bardzo dobrą podstawę do uzyskania wyników. Jedyne zastrzeżenie – czy niezależne od Autora? – to bardzo skromna liczebność grupy badanej, a przecież pacjentki pochodzą z ośrodka, w którym chirurgia piersi jest zabiegiem powszechnym. Skąd ograniczenie czasowe rekrutacji pacjentek – operowane od września do grudnia 2013? Z pierwotnie zaplanowanej grupy badanej Doktorant wykluczył chore na raka piersi m. in. ze współistniejącą lub przebytą chorobą autoimmunologiczną i innymi zaburzeniami immunologicznymi – czy wobec tego to do tej drugiej grupy zalicza się pacjentka z wirusowym zapaleniem wątroby typu C? Domyślam się, że zapewne przewlekłym (choć nie jest to podane), ale w której fazie zakażenia? Ciekawym jest również, że w grupie badanej nie ma ani jednej pacjentki z rakiem piersi o stopniu złośliwości histologicznej G1. I kwestia analizy statystycznej – czy Doktorant sam przeprowadził obliczenia statystyczne?

Wyniki. Skoncentrowany i esencjonalny rozdział został sensownie napisany, choć w mojej ocenie brakuje tu wyraźnego podziału na dwie części: dotyczące wyników związanych z PD-1 i wyników związanych z CTLA-4 – taki podział byłby zdecydowanie bardziej czytelny. Zwraca uwagę fakt, że Autor nie tylko omawia otrzymane wyniki, ale jednocześnie ilustruje je rycinami i tabelą. Proste, ale czytelne ryciny pozwalają na zapoznanie się z wynikami w przejrzystej formie, co – nie ukrywam – znacznie ułatwiło zgłębienie i przestudiowanie efektów przeprowadzonych analiz. Całość rozdziału stanowi dowód rzetelnej analizy najważniejszych badanych parametrów. Obserwacje poczynione przez Doktoranta mają istotne implikacje kliniczne.

Co do oceny histopatologicznej badanych przypadków – choć nie było to przedmiotem pracy – byłoby niezwykle interesujące, gdyby do oceny standardowych parametrów histopatologicznych dodać choćby ogólną ocenę mikroskopową towarzyszącego rakom zapalnego nacieku limfocytarnego i jego typów (znakomicie zresztą przedstawionych przez Doktoranta na *Rycinie 1*) i również skorelować z badanymi hamulcami immunologicznymi.

Dyskusja. Autor porównał i przedyskutował otrzymane wyniki z wynikami innych autorów posługując się biegłą wiedzą dostępną głównie – o ile nie wyłącznie – w anglojęzycznym piśmiennictwie. Wyczerpująco, z naukową dojrzałością, ale i krytycyzmem przeanalizował wszystkie uzyskane wyniki i zaprezentował swoje opinie i sugestie na tle wyników badań i obserwacji innych autorów. Rozdział napisany jest syntetycznie, Autor formułuje swoje uwagi i komentarze w sposób klarowny i wnikliwy, ale jednocześnie dość powściągliwy i rozważny. Akcentuje własne poglądy i przemyślenia dotyczące wartości analizowanych parametrów. Podkreśla praktyczne implikacje wyników pracy poparte danymi z piśmiennictwa, co jest istotnym walorem recenzowanej rozprawy doktorskiej. Dyskusja jest rzeczą by można – choć Autor chirurgiem nie jest – chirurgicznie zwięzła i konkretna. Czytałam ją i analizowałam z dużym zainteresowaniem, doceniając zwłaszcza momenty, w których Autor świadomy jest niedostatków pracy (Dyskusja str. 44). Konkluzje Autora i finał badania ukazują świadomość badacza, że przeprowadzone analizy mają zaledwie charakter wstępny i mogą stanowić podstawę do dalszych badań na zdecydowanie większych grupach chorych. W moim odbiorze, rozdział ten stanowi cenny i jeden z najlepszych elementów rozprawy.

Wnioski. Dwa krótkie, esencjonalne wnioski końcowe świadczą, że – zgodnie z zasadami rozprawy doktorskiej – autor osiągnął założone cele. Wnioski nie są szokująco odkrywczymi, ale są

spójne, proste i bardzo rzeczowe. Ponad wszystko mają znakomite znaczenie praktyczne i niosą potężny, choć skoncentrowany ładunek informacji klinicznej.

Wniosek drugi jest niebywale praktyczny i ma charakter utylitarny: zawiera wręcz sugestie możliwego postępowania klinicznego z pacjentką i wskazówki odnośnie rodzajów terapii.

IV. Styl wypowiedzi, redakcja pracy i przyjęta terminologia

Praca napisana jest językiem poprawnym, z użyciem prawidłowej stylistyki i terminologii. Czynienie zadość językowej poprawności i elegancji idzie w parze z dobrym standardem sztuki argumentacji i polemiki. Styl wypowiedzi wskazuje na to, że Autor jest przekonany do swoich poglądów, że są one przemyślane oraz że jest ich w stanie sprawnie bronić.

Sposób edycji pracy jest prawidłowy i bardzo staranny, co doceniając, zwrócę jednak uwagę na fakt, że razi nieco wielkość czcionki (zbyt duża...) – tekst może sprawiać wrażenie mało profesjonalnego.

Z obowiązku recenzenta wskazać zmuszona jestem na nieliczne błędy nomenklaturowe, interpunkcyjne i edytorskie, które nie wpływają na wysoką merytoryczną ocenę i nie umniejszają istotnych osiągnięć pracy.

W szczególności należy uściślić następujące kwestie:

- 1) zamiast hasła „*literatura medyczna*” (literatura wszak kojarzy się nam jednoznacznie z literaturą piękną...) zalecałabym stosowanie terminologii „*piśmiennictwo medyczne*” (Wstęp, Podrozdział 1.2.1 - str. 10 wers 2; Dyskusja str.36 wers 7);
- 2) w Tabeli 1 (Pacjenci i Metody, strona 27) przy liczbie pacjentek $N=35$ w oknie ocena stopnia złośliwości G suma pacjentek nie jest równa 35: G2 u 19 pacjentek i G3 u 12 pacjentek to łącznie 31 pacjentek – jaki stopień złośliwości histologicznej miały pozostałe 4 raki ?
- 3) w rozdziale Pacjenci i Metody, podrozdziale 3.4. Ocena histopatologiczna (strona 25, wers 7) niepoprawnie użyto sformułowania „poziom receptorów” ER i PR – w przypadku oceny immunohistochemicznej nie mówimy o *poziomie*, ale o nasileniu i intensywności reakcji barwnej (ekspresji białka w komórce).

V. Dokumentacja materiału badawczego i wykorzystanie piśmiennictwa

Pracę ilustrują 2 dość ascetyczne, ale bogate w istotne treści tabele oraz 11 rycin-wykresów, które bardzo obrazowo i czytelnie prezentują analizowane parametry.

Cytowane piśmiennictwo jest imponujące: dobrze dobrane, właściwie związane z tematyką pracy, w większości anglojęzyczne i odpowiednio wykorzystane w konstrukcie wstępu i dyskusji. Zwraca uwagę fakt, że na 104 cytowane pozycje aż 85 (82%) to publikacje pochodzące z lat 2011-2015, z tego aż 25 pozycji (24%) pochodzi z bieżącego 2015 roku! Zaledwie 7 pozycji (6.6%) to prace pochodzące sprzed 2000 roku. Jako pozytywny uznaję również fakt, że Autor nie ma tendencji (i słusznie) do cytowania wszystkiego, co zostało odnośnie do danej kwestii napisane. Potrafi zatem selekcjonować materiał badawczy i polemiczny stosownie do jego wagi i znaczenia.

VI. Ocena zawartości merytorycznej pracy - podsumowanie

1. Po lekturze Dysertacji jednoznacznie stwierdzam, że uzyskane w rozprawie wyniki są spójne i ważne dla podjętej problematyki badawczej. Doktorant udowodnił, że potrafi samodzielnie sformułować i rozwiązać problem naukowy, dobrze dobrać i opanować techniki pracy, które posłużyły do uzyskania wyników na dobrym poziomie, a także przeprowadzić rzeczową dyskusję swoich wyników z wynikami innych grup badawczych.



2. **Pragnę podkreślić**, że w pracy znalazłam to, czego mogłam oczekiwać po przemyślanych (choć bardzo syntetycznych) uwagach wprowadzających, określających tematykę badania, jego założenia cele, metody i spodziewany efekt. **Autor działa metodycznie, systematyka podjętej problematyki i sposób przedstawiania analizowanego materiału badawczego wskazuje, że Autor dużo wie i sprawnie porusza się w zagadnieniu immunogenności raka piersi.** Wiedzę tę wykorzystał pisząc rzetelną, dobrze udokumentowaną pracę doktorską, czym udowodnił, że potrafi prowadzić samodzielnie pracę naukową na zadowalającym poziomie. Rozprawa jest dobrym punktem wyjścia do dalszego doskonalenia warsztatu badawczego i prowadzenia samodzielnych projektów naukowych, zwłaszcza w już zapoczątkowanym temacie.

3. Stwierdzam, że **praca pod względem merytorycznym, metodologicznym i warsztatowym zasługuje na pozytywną ocenę.** Jest to opracowanie na pierwszy rzut oka proste i jednowymiarowe, w istocie jednak niebywale pracochłonne, rzetelne i oddające dobrze problemy kompleksowego leczenia chorych na raka piersi. Odbieram ją jako solidną, pogłębioną, staranną i wyważoną. Praca stanowi bardzo cenne obserwacje lekarza praktyka, rzucające nawet nie nowe, ale w ogóle jakiegokolwiek światło na zagadnienie bardzo słabo dotychczas wyrażone i prezentowane w polskim piśmiennictwie.

VII. WNIOSEK KOŃCOWY

Po wnikliwej lekturze dysertacji Pana lek. Łukasza Pakuły oceniam ją wysoko. Jest to obszerne opracowanie materiału badawczego przy użyciu nowoczesnych metod posiadające ponadto niekwestionowany wymiar praktyczny, co w przypadku pracy naukowej lekarza jest zaletą bezsporną.

Zdaniem recenzenta, oceniana praca lekarza Łukasza Pakuły pt. „Badanie ekspresji hamulców immunologicznych CTLA-4 i PD-1 w limfocytach T w okresie okołoperacyjnym u chorych na raka piersi” spełnia kryteria przypisane rozprawom na stopień naukowy doktora przez Ustawę o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym.

Dlatego zwracam się z pełnym przekonaniem do Rady Wydziału Wojskowo - Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie Pana Łukasza Pakuły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Z wyrazami szacunku
dr hab. n. med. Agnieszka Hałoń, prof. nadzw.

Wrocław, 19 czerwca 2015 r.