



Prof. dr hab. Piotr P. Stępień
UNIwersytet Warszawski
Instytut Genetyki i
Biotechnologii

ul. Pawińskiego 5A

02-106 Warszawa

tel. (22) 659-2240

fax. (22) 658-4176

email: stepien@ibb.waw.pl

6 grudnia 2016

Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Michaliny Dąbrowskiej pt. "Wielkoskalowe analizy ekspresji i metylacji genów gruczołu krokowego w poszukiwaniu biomarkerów diagnostycznych raka tego narządu".

Rak gruczołu krokowego (RGK) stanowi ok. 15% wszystkich nowotworów złośliwych u mężczyzn, i jest drugim co do częstości zachorowań mężczyzn na nowotwory powodującym na świecie ok. 300 tys. zgonów rocznie. W Polsce 5-letnie przeżycie wśród pacjentów z rakiem gruczołu krokowego wynosi 22,3%.

Jednym z istotnych problemów w diagnostyce i leczeniu raka prostaty jest heterogenność genetyczna komórek wewnątrz guza i brak dobrych metod wczesnego wykrywania zmian nowotworowych o charakterze złośliwym. Badanie poziomu PSA (antygeny specyficzny dla RGK) w osoczu zostało w 2014 roku usunięte z rekomendacji przez USA, Kanadę i Australię. Powodem takiego działania jest fakt, że aż dla 11 do 20 % pacjentów diagnoza jest fałszywie pozytywna, a dla 40 do 56 % pacjentów będzie prowadzić do agresywnego, chirurgicznego leczenia obarczonego wieloma skutkami ubocznymi. Co więcej, brak jest dowodów, że badania przesiewowe poziomu PSA zmniejszają śmiertelność z powodu raka prostaty. Warto podkreślić, że powyższe decyzje budzą kontrowersje, niemniej rozpoznanie prowadzone jest najczęściej na podstawie badania PSA, badania palpacyjnego i wreszcie na podstawie biopsji wieloigłowej, dostarczającej materiału do badań cytologicznych i molekularnych.

Pomimo faktu, że biopsje wielordzeniowe polepszają wykrywalność PGK, liczne powikłania jak krwotoki, zakażenia i kłopoty z oddawaniem moczu sugerują, że istnieje pilna potrzeba poszukiwania markerów molekularnych PGK prowadzących do uzyskania metody diagnostycznej pozwalającej na prawidłową ocenę zmian w prostatie i uniknięcie niepotrzebnych zabiegów prostatektomii. Co więcej, ważne jest pytanie czy możliwe jest wykrywanie zmian molekularnych w tak zwanej strefie pola wpływu (field effect) czyli w wycinkach prostaty sąsiadujących z rejonami nowotworowymi.

Jest to wyzwanie dla biologii molekularnej i z powyższych powodów zajęcie się tą problematyką przez panią mgr Michalinę Dąbrowską było w pełni uzasadnione. Celem badań opisanych w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej było ustalenie czy istnieją statystycznie istotne różnice w ekspresji określonych genów oraz różnice w metylacji promotorów w raku prostaty w stosunku do otaczającej kontrolnej tkanki tego gruczołu.

Autorka skorzystała z bogatego materiału doświadczalnego w postaci biopatów uzyskanych w praktyce klinicznej Centrum Onkologii w Warszawie, które niezależnie były charakteryzowane histologicznie.

Na szczególne uznanie zasługuje przeprowadzona przez doktorantkę bardzo skrupulatna analiza statystyczna wyników. W ocenie uzyskanych danych brano pod uwagę nie tylko stosunek intensywności sygnałów czyli tzw. FC (Fold change), ale generowano krzywe ROC (Receiver Operating Characteristic), oznaczając czułość metody i specyficzność. Pole pod krzywą ROC oznaczane jako AUC (Area Under Curve) obrazuje jakość analizowanych zmiennych diagnostycznych : im większa wartość AUC tym większa jest trafność uzyskanych wyników.

Pierwszym etapem pracy było poszukiwanie genów, których ekspresja zmienia się i różnicuje diagnostycznie tkanki rakowe (RGK) od tkanek łagodnego rozrostu prostaty (BPH). Badania wykonano na materiałach od 58 pacjentów poddanych chirurgicznemu usunięciu prostaty: 39 z rakiem prostaty i 19 z łagodnym rozrostem prostaty. Profile ekspresji genów wykonano z wykorzystaniem metod wysokoprzepustowych: mikromacierzy firmy Illumina. Uzyskane wyniki dla 12 najbardziej różnicujących genów weryfikowano dodatkowo za pomocą techniki RT-PCR.

Z badań mikromacierzowych autorka uzyskała dane dla 12 transkryptów, dla których stosunek intensywności sygnałów był większy od 3,0, zaś wartość parametru FDR (false discovery rate) była mniejsza od 0.05. Z tej dwunastki dla trzech badanych genów : HOXC6, AMACR i PCA3 wartości AUC były większe od 0,8. W tkankach uzyskanych w wyniku prostatektomii badanie to trafnie wskazuje 90% próbek z rakiem prostaty i wynik ten jest zgodny z danymi opublikowanymi przez inne grupy badawcze. Z drugiej strony, autorka stwierdziła jednak znaczące nakładanie się poziomów ekspresji tych trzech genów w analizowanych prostatkach z łagodnym rozrostem od tkanek z zerową zawartością komórek nowotworowych.

Metylacja DNA stanowi istotny mechanizm modulacji ekspresji genów i komórki nowotworowe charakteryzują się istotnymi zmianami w profilach metylacji. Autorka postanowiła zbadać metylację za pomocą automatycznej platformy Infinium Human Methylation 450 BeadChip, która analizuje 27,578 indywidualnych wysp CpG rozrzuconych w 14,495 genach. Wadą pracy jest brak jakichkolwiek szczegółów na ten temat, zarówno w rozdziałach Metody, jak i w Wynikach. Zapewne metodami informatycznymi autorka selekcjonowała dane z platformy odnoszące się jedynie do rejonów promotorowych.

Uzyskane wyniki pozwoliły na stwierdzenie, że poziom metylacji pięciu promotorów pozwala na różnicowanie raka prostaty od łagodnego rozrostu prostaty na poziomie AUC pomiędzy 0,54 a 0,899. Co charakterystyczne, ten zestaw genów nie zawiera żadnego genu charakteryzującego się zmianami ekspresji opisanymi przez autorkę w pierwszej części pracy. Po analizie swoich danych, doktorantka zaproponowała optymalny trójgenowy klasyfikator oparty na metylacji promotorów RARB, HES5 i c5orf4, który osiągnął wartość AUC 0,909 i pozwolił trafnie wskazać 50% próbek raka prostaty w materiale z biopsji i w 100% próbek pochodzących z prostatektomii.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska wpisuje się w światowe badania poszukujące użytecznych klinicznie markerów raka prostaty i z tego powodu jest cennym uzupełnieniem tych poszukiwań. Na uwagę zasługuje nie tylko opublikowanie wyników autorki w czasopiśmie British Journal of Cancer, ale także zacytowanie tej publikacji w artykule przeglądowym na temat metylacji DNA w nowotworach prostaty C.E.Massiego, I.G. Millsa i

A.G. Lyncha w Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. Oznacza to, że wyniki uzyskane przez doktorantkę zostały docenione przez innych badaczy.

Z obowiązku recenzenta zmuszony jestem wskazać pewne niedociągnięcia rozprawy. W moim przekonaniu dyskusja wyników niedostatecznie przedstawiła problem uzyskiwania przez różne grupy badawcze różnych zestawów genów charakterystycznych dla raka prostaty. Chętnie usłyszałbym komentarz na ten temat w trakcie obrony.

Drugim pytaniem jest dlaczego do badań autorka nie stosowała i nie sugerowała użycia do badań płynu po masażu prostaty lub po ejakulacji, według literatury stanowi to nieinwazyjna metodę badania komórek prostaty, w tym oczywiście poziomów białek i kwasów nukleinowych.

Trzecie pytanie dotyczy oceny ekspresji genu PCA3, który był opisywany w pracach innych grup badawczych jako biomarker raka prostaty wykazujący $FC=2.1$. Autorka najpierw stwierdza, że jej badania mikromacierzowe nie wykryły znamiennych statystycznie różnic w poziomach ekspresji PCA3, potem jednak sugeruje, że z jej badań wynika, że PCA3 różnicuje BPH od RGK z ponad 70% czułością i 100% specyficznością. Stwierdzenia te wydają się być wzajemnie sprzeczne i wymagają wyjaśnienia.

Powyższe niedociągnięcia nie umniejszają mojej wysokiej oceny rozprawy doktorskiej pani mgr Michaliny Dąbrowskiej. Praca przedstawia ważne badania molekularne dotyczące nowotworu stanowiącego poważne zagrożenie zdrowia i życia pacjentów, zaś uzyskane wyniki są bardzo wartościowe. Praca spełnia wszystkie wymogi określone w art. 26 Ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 poz. 1852 ze zm.) przewidziane dla prac doktorskich i dlatego wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie o dopuszczenie pani mgr Michaliny Dąbrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in red ink, consisting of stylized, flowing letters, likely representing the name of the reviewer or official.