



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Katedra i Zakład Genetyki

prof. dr hab. Maria M. Sąsiadek

Wrocław, 30. 01. 2017

Recenzja

rozprawy doktorskiej pani magister

Michaliny Dąbrowskiej pt. „Analizy ekspresji i metylacji wybranych genów gruczołu krokowego w poszukiwaniu biomarkerów diagnostycznych raka tego narządu” przygotowana na podstawie decyzji Rady Naukowej Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie.

Rozprawa doktorska pani mgr Michaliny Dąbrowskiej jest wynikiem Jej badań nad poszukiwaniem molekularnych markerów raka stercza.

Autorka podjęła się badań nad tym problemem, gdyż małoinwazyjne metody diagnostyczne w raku stercza nie dają satysfakcjonujących wyników. Obecnie podstawą do postawienia podejrzenia tego nowotworu jest podwyższony poziom PSA, badanie palpacyjne i badanie USG gruczołu krokowego oraz coraz częściej stosowane badanie rezonansem magnetycznym. Kolejnym krokiem w rozpoznaniu RGK jest badanie histopatologiczne materiału pobieranego podczas biopsji stercza, metodą TRUS (TransRectal UltraSound). Celem poprawy wykrywalności RGK opracowane zostały schematy pobierania materiału do badania histopatologicznego, zmierzające do zwiększenia prawdopodobieństwa pobrania komórek z obszaru w którym zlokalizowany jest nowotwór. Została również opracowana stosowana obecnie powszechnie, skala dla oceny złośliwości RGK, czyli skala Gleasona. Wyniki analizy guza za pomocą tej skali razem z oceną stopnia klinicznego zaawansowania choroby są obecnie podstawą do określenia ryzyka indywidualnego pacjenta oraz wyboru schematu postępowania klinicznego. Mimo jednak wprowadzania coraz to nowych, optymalizowanych schematów pobierania materiału z biopsji do badań histopatologicznych, czułość i swoistość tej metody nie jest satysfakcjonująca.

Dlatego też trwają badania nad identyfikacją nowych markerów molekularnych raka stercza, które mogłyby ułatwić i zwiększyć wykrywalność RGK.

Przedstawiona do recenzji praca obejmuje 77 stron z tradycyjnym podziałem na streszczenie, wstęp, cel pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję, wnioski oraz piśmiennictwo.

Ocena rozprawy doktorskiej:

W krótkim wstępie Autorka szczegółowo przedstawiła teoretyczne podstawy zagadnień, którymi zajęła się w swojej pracy badawczej. Pierwszy rozdział wstępu poświęciła na zwięzłe omówienie technologii wielkoskalowych i ich wykorzystania dla poszukiwań markerów molekularnych choroby. Omówiła pokrótce mikromacierze ekspresyjne i metylacyjne, a następnie przedstawiła koncepcje poszukiwania i wykorzystania markerów molekularnych w chorobach nowotworowych. Kolejne podrozdziały wstępu poświęciła na syntetyczne omówienie epidemiologii, metod wczesnego wykrywania RGK, klasyfikacji histopatologicznej guza w oparciu o skalę Gleasona oraz zasad oceny zaawansowania klinicznego choroby.

Autorka więcej uwagi poświęciła omówieniu markerów molekularnych RGK. W tabeli przedstawiła znane biomarkery molekularne RGK, oznaczane w surowicy, moczu i tkankach stercza. Szczegółowo omówiła znaczenie badań PSA we wczesnym wykrywaniu RGK oraz konsekwencje epidemiologiczne wprowadzenia tego markera do rutynowego postępowania profilaktycznego. Kolejno, przedstawiła pokrótce nowe markery o potencjalnym znaczeniu dla postępowania klinicznego tj. Prostate Health Index (PHI), a także PCA3 (Prostate Cancer Antigen).

Autorka analizę stanu wiedzy dotyczącej markerów obecnie stosowanych i wprowadzanych do wczesnej diagnostyki RGK podsumowała stwierdzeniem, że mimo wieku lat badań nad omawianym zagadnieniem i ogromnemu postępowi w zakresie wczesnej diagnostyki RGK, sposób wzrastania RGK nie w postaci guza, ale „palczastego” rozrostu, sprawia, że mimo stosowania zaawansowanych metod pobierania materiału w trakcie biopsji stercza, ujemny wynik badania histopatologicznego nie daje 100% pewności, że u pacjenta nie rozwija się nowotwór.

Dlatego też uznała za zasadne, aby przeprowadzić zaawansowane badania molekularne w celu z zależenia nowych, efektywnych molekularnych markerów RGK.

Wstęp stanowi zwięzłe, ale dokładne omówienie poruszanych zagadnień, w oparciu o szeroką i aktualną literaturę i pozwala czytelnikowi na zapoznanie się z problemami, na których Doktorantka skupia się w swojej pracy badawczej. Przedstawiona analiza aktualnej sytuacji w zakresie wczesnej diagnostyki RGK oraz najnowszej literatury nie pozostawia wątpliwości, że decyzja Doktorantki o kierunku prowadzonych badań jest w pełni uzasadniona zakresem obecnej wiedzy, zarówno z naukowego, jak i medycznego punktu widzenia.

Celem rozprawy doktorskiej pani mgr Dąbrowskiej była identyfikacja markerów molekularnych raka stercza i opracowanie testu wspomagającego diagnostykę tego nowotworu poprzez analizę poziomu metylacji i ekspresji wybranych genów w komórkach RGK oraz tkance stercza, bez nacieku nowotworowego.

Pani mgr Dąbrowska oparła swoje badania na wynikach badań wielkoskalowych ekspresji i metylacji genów gruczołu krokowego, przeprowadzonych przez zespół kierowany przez pana

prof. J. Ostrowskiego. Na podstawie analizy wyników badań wielkoskalowych Doktorantka wytypowała do badania poziomu metylacji osiem genów, a do badania ekspresji 12 genów oraz siedem genów wybranych na podstawie analizy literatury. Analizie poddała DNA wyizolowane zarówno komórek RGK jak i prawidłowych, pobranych od tego samego pacjenta.

Badania były finansowane z grantu NCN N N403 177340.

W rozdziale pt. „Materiały i metody” Doktorantka scharakteryzowała na wstępie badane grupy chorych. Materiał do badań został zgromadzony w Kinice Urologii CMKP, przez dr Antoniewicza, dr Dobrucha i prof. Borówkę. Badania zostały przeprowadzone na tkankach gruczołu krokowego, pobranych podczas prostatektomii od 58 chorych (59 z rozpoznaniem RGK oraz 19 z łagodnym przerostem prostaty (BHP-benign prostatic hyperplasia) z miejsc objętych naciekiem nowotworowym i miejsc nieobjętych takimi zmianami.

Badania przeprowadzono również na 227 próbkach DNA wyizolowanych z jednego rdzenia tkankowego, pobranych od 227 mężczyzn w trakcie 13-miejscowej biopsji stercza, przeprowadzonej z powodu podwyższonego PSA w surowicy i/lub nieprawidłowych wyników badań DRE i TRUS. Na podstawie wyników badania histopatologicznego pozostałych 12 rdzeni, pacjenci zostali zaszeregowani do 3 kolejnych grup, w zależności od zaawansowania zmiany.

Oceniając ten fragment rozprawy doktorskiej chciałabym podkreślić, że Doktorantka przebadala relatywnie dużą grupę pacjentów oraz przeprowadziła logiczny podział na podgrupy badane. Autorka szczegółowo omówiła zarówno metody pobrania materiału do badań, jak i scharakteryzowała zawartość komórek nowotworowych w badanym materiale. Są to bardzo ważne elementy prowadzonych badań, gdyż złe lub niedokładnie opracowane grupy badane mogą być przyczyną niepowodzenia całego badania i uniemożliwić uzyskanie wiarygodnych i rzeczywistych wyników.

W rozdziale „Metody” pani Dąbrowska opisała szczegółowo stosowane metody, rozpoczynając od opisu zasad przygotowania materiału do badania histopatologicznego i metod barwienia. Kolejno omówiła zasady izolacji RNA i DNA z tkanek oraz z materiału z biopsji, ocenę jakości uzyskanego RNA i DNA, reakcję odwrotnej transkrypcji RT-PCR, ilościową reakcję PCR (qPCR), badanie poziomu metylacji genomowego DNA oraz technikę metylo-specyficznego qPCR.

Badania wielkoskalowe (analiza ekspresji i metylacji) zostały przeprowadzone w serwisie Illumina: aROS (w Danii).

Podsumowując, należy stwierdzić, że Doktorantka przeprowadziła badania stosując najnowocześniejsze metody badań molekularnych. Ze sposobu opisanego wszystkich powyżej wspomnianych metod przez Doktorantkę można jednoznacznie wnosić, że jest wysokiej klasy specjalistką w zakresie stosowanych technik.

W rozdziale „Wyniki” Doktorantka omówiła szczegółowo wyniki kolejnych etapów pracy badawczej.

W toku realizacji pierwszego etapu badań, pani Dąbrowska przeprowadziła badania na materiale uzyskanym z makrobiopsji stercza, poszukując genów, których stopień ekspresji i metylacji najbardziej różnicował tkanki raka gruczołu krokowego od tkanek stercza z łagodnym przerostem. Do badań szczegółowych Doktorantka wytypowała 12 genów, których ekspresja była najbardziej zróżnicowana w badaniach wielkoskalowych, 6 izoform genu *KLK3*, wybranych na podstawie analizy literatury oraz dwa geny stanowiące punkt odniesienia (których poziom ekspresji jest niezmienny w tkankach stercza). Badania przeprowadziła na 19 próbkach BHP, 27 próbkach nie zawierających komórek nowotworowych, pochodzących od pacjentów z rakiem stercza, oraz z tkanek zawierających: poniżej 10% komórek nowotworowych oraz zawierających od 30 do 90% komórek dysplastycznych. Stosując metodę qPCR Autorka stwierdziła, że sześć genów wykazuje obniżoną i siedem genów wykazuje podwyższoną ekspresję w komórkach pacjentów z rakiem stercza w porównaniu do komórek pochodzących od pacjentów z BHP. Następnie Doktorantka wygenerowała krzywe ROC (Receiver Operating Characteristics). W ten sposób określiła 9 genów (*AMACR*, *HOXC6*, *PCA3*, *TARP*, *c15orf48*, *LOM3*, *NELL2*, *PTGS1*, *RNF112*), których ekspresja różnicowała z bardzo wysoką skutecznością (AUC pomiędzy 0.909 a 0.98) tkanki pochodzące od pacjentów z BHP a RGK.

Kolejno pani Dąbrowska przeprowadziła badania mające na celu weryfikację wyników uzyskanych w pierwszym etapie badań. W tym celu porównała ekspresję wytypowanych genów w rdzeniach biopsji igłowej stercza pochodzących od 37 pacjentów ze zmianami przedinwazyjnymi i 131 z RGK. Najwyższe wartości AUC Autorka obserwowała dla ekspresji genów *AMACR*, *HOXC6* i *PCA3*. Uzyskane dane pozwoliły Autorce na opracowanie trójgenowego klasyfikatora raka gruczołu krokowego.

Drugą część omawianej pracy stanowiły badania nad poziomem metylacji promotorów wybranych genów, jako klasyfikatora RGK. Podobnie, jak w pierwszym etapie pracy, Doktorantka oparła się na wynikach wcześniej przeprowadzonych przez zespół w którym pracuje, badań wielkoskalowych. Do badań metoda MS-PCR wybrała 8 genów, które najlepiej różnicowały tkanki raka stercza od łagodnego przerostu. Materiał do badań został wyselekcjonowany, podobnie jak do badań nad poziomem ekspresji, w zależności od zawartości komórek nowotworowych w tkance. Na podstawie uzyskanych wyników Autorka opracowała krzywe ROC i wykazała, że znamienne różnice metylacji występowały dla genów *APC*, *RARB*, *TACC2*, *DGKZ* i *HES5*. Kolejno Doktorantka na podstawie wyników 1 i 2 etapu badań opracowała klasyfikator trójgenowy (*RARB*, *HES5*, *c5orf4*).

Podsumowując ten etap rozprawy chciałabym podkreślić, że Doktorantka przeprowadziła bardzo dobrze przygotowane i opracowane badania. Zwraca uwagę fakt, że pani mgr Dąbrowska dużą wagę przywiązała do badań histopatologicznych i właściwej klasyfikacji histopatologicznej badanych tkanek. Jest to szczególnie warte podkreślenia, gdyż, jak nadmieniałam powyżej w takich badaniach bez prawidłowej klasyfikacji badanych tkanek nie można osiągnąć sukcesu. Zwraca również uwagę fakt, że Doktorantka jest nie tylko biegłym biologiem molekularnym, ale też posługuje się wprawnie narzędziami statystycznymi do analizy uzyskanych wyników. W wyniku przeprowadzonych badań Doktorantka opracowała dwa klasyfikatory RGK, jeden oparty na analizie ekspresji, a drugi na analizie metylacji genów, zidentyfikowanych w toku prowadzonych badań.

W dyskusji pani mgr Dąbrowska omówiła wyniki swoich badań w odniesieniu do szerokiej literatury. Przedstawiła podobieństwa i różnice w prowadzonych badaniach oraz uzyskanych wynikach. Podsumowując stwierdziła, że wyniki jej badań, podobnie, jak i badań innych autorów wskazują, że klasyfikatory oparte na analizie profili metylacji DNA sterczą są „trafniejsze” niż oparte na pomiarze ekspresji genów.

Przeprowadzone badania Autorka podsumowuje jednym wnioskiem, mówiącym, że „analiza metylacji promotorów wybranych genów może stanowić czuły i specyficzny test diagnostyczny RGK, wspomagający badanie mikroskopowe z biopsji igłowych narządu”. Ten powściągliwy wniosek, wyprowadzony z bardzo dużych i zaawansowanych badań molekularnych w raku sterczą dowodzi umiejętności Doktorantki do krytycznej analizy uzyskanych wyników oraz powściągliwości w formułowaniu wniosków.

Doktorantka powołuje się na 130 pozycje literaturowe. Jest to aktualna literatura (w większości opublikowana w ostatnich 10 latach) i dotycząca sedna poruszanych zagadnień. Ta liczba cytowanych publikacji dowodzi znajomości przez Doktorantkę literatury przedmiotu, umiejętności korzystania z licznych i różnorodnych źródeł wiedzy, świadcząc jednocześnie o Jej umiejętności krytycznej oceny źródeł.

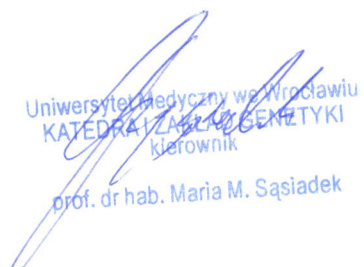
Podsumowując całość rozprawy należy podkreślić, że całość badań została bardzo profesjonalnie nie tylko przeprowadzona, ale i przedstawiona. Autorka zilustrowała rozprawę czytelnymi ilustracjami oraz dobrze skonstruowanymi tabelami.

Wyniki badań, będących podstawą ocenianej dysertacji stanowią część badań omówionych w publikacji pt „DNA methylation status is more reliable than gene expression at detecting cancer in prostate biopsy”, Paziewicz A., Dąbrowska M., Goryca K., Dobruch J., Mikula M., Jarosz D., Zapala L., Borowka A, Ostrowski J*, British J of Cancer, (2014) 111, 781-789.

W mojej ocenie rozprawa doktorska mgr Michaliny Dąbrowskiej spełnia wymogi, stawiane tego typu rozprawom i zwracam się do Rady Naukowej Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie. o dopuszczenie pani magister

Michaliny Dąbrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz o wyróżnienie jej pracy nagrodą.

Chciałabym, w uzasadnieniu wniosku o wyróżnienie dysertacji, podkreślić, że zarówno cel pracy Doktorantki, zakres i sposób przeprowadzonych badań, waga uzyskanych wyników oraz znaczenie opublikowanych artykułów znacznie przewyższają wymogi, jakie są stawiane rozprawom doktorskim i mają potencjalnie znaczenie aplikacyjne.


Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KATEDRA IZMÓW GENETYKI
Kierownik
prof. dr hab. Maria M. Sasiadek