

RECENZJA

rozprawy doktorskiej lekarza Sylwii Szpak-Ulczoł pt.: Poszukiwanie genomycznej sygnatury przerzutów odległych w raku brodawkowatym tarczycy.

Doktorantka podjęła się poszukiwania molekularnych czynników prognostycznych w raku brodawkowatym tarczycy, z zastosowaniem nowoczesnych metod biologii molekularnej, w tym analizy ekspresji genów z zastosowaniem mikromacierzy. Temat ten wpisuje się w zakres długoletnich badań ośrodka kierowanego przez promotora pracy, Panią profesor Barbarę Jarząb.

Rozprawa liczy 109 stron, ma typowy układ prac promocyjnych i składa się z następujących rozdziałów: Wstęp, Cel Pracy, Materiał i Metody, Wyniki, Dyskusja, Streszczenie, Piśmiennictwo.

W pracy brakuje wykazu skrótów, który powinien być umieszczony na początku, a jego brak utrudnia czytanie pracy. Np. na stronie 25 i późniejszych, Doktorantka pisze o badaniu wskaźników ekspresji TDS i BRS, które to skróty wyjaśnione są dopiero 20 stron dalej.

Wstęp wprowadza zwięźle w zagadnienia raka brodawkowego tarczycy. Szczególny nacisk położono na molekularną patogenezę tego raka, korelacje molekularno-patologiczne i -kliniczne oraz czynniki rokownicze. Doktorantka przedstawiła obecnie stosowane systemy klasyfikacji i oceny ryzyka zgonu u pacjentów z rakiem tarczycy. Ostatnim podrozdziałem wstępu jest przegląd piśmiennictwa na temat znaczenia rokowniczego niektórych zmian molekularnych, to jest: mutacji genów *BRAF*, *RAS*, *TERT* i rearanżacji genów *RET/PTC*, który stanowi tło i uzasadnienie podjęcia badań przedstawionych w rozprawie.

Cel pracy został sformułowany jako zidentyfikowanie sygnatury genowej powiązanej z przerzutowaniem odległym w raku brodawkowatym tarczycy i jako taki nie został osiągnięty.

Praca została wykonana na łącznej grupie 189 chorych, jednak analiza eksploratywna dotyczyła mniejszych grup, ze względu na rozciągnięcie badań w czasie i odmienny rodzaj zastosowanych mikromacierzy ekspresyjnych. Przyznam, że miałam trudności w rozszyfrowaniu jakie grupy badano, pod jakim kątem i w jakim kontekście. Ryc 5 mówi o grupie 44 chorych w części I, 72 chorych w części II (przy czym grupa 72 chorych zawiera grupę 44 chorych z części I). Są to te same lub podobne mikromacierze hybrydizowane niejednocześnie, jednak nie jest jasne, czy zostały one powtórzone dla 44 chorych, czy były po prostu razem analizowane statystycznie. Rozeznania nie ułatwia termin „reanaliza mikromacierzowa”, który jest często używany w rozdziale Materiał, a nie został wyjaśniony. Np. w tekście na str. 29 widnieje stwierdzenie, że grupa 72 chorych została poddana analizie na mikromacierzach, a w powiązanej tab 8, że grupa ta została poddana reanalizie mikromacierzowej – a może była to re- lub analiza statystyczna? Podobnie, dlaczego analiza statystyczna próbek badanych na mikromacierzach HUGene (odrębna grupa 53 chorych), to reanaliza, skoro to nowa grupa, wcześniej nie badana? (str 73).

Największą grupę stanowiło 125 pacjentów, u których określono wskaźnik zróżnicowania i wskaźnik podobieństwa do raka z mutacją *BRAF*.

Liczba pacjentów z rakiem brodawkowatym, który był przedmiotem niniejszej rozprawy, była mniejsza niż wymienione grupy. W przypadku I grupy (44 pacjentów) było to 30 raków, w

tym 5 (20%) z przerzutami odległymi. W przypadku grupy 72 pacjentów, było to 46 raków brodawkowatych, w tym 10 z przerzutami odległymi. Znacząca zaś była jednolita grupa walidacyjna, która liczyła 86 raków brodawkowatych, w tym 20% z przerzutami odległymi.

Fakt, że analizowane grupy pacjentów są niewielkie, mógł wpłynąć na końcowy negatywny wynik tych analiz.

Ta praca opiera się na złożonych, wieloetapowych i nowoczesnych metodach molekularnych wraz z zaawansowaną analizą statystyczną. W szczególności, techniki mikromacierzy i QPCR są stosowane w ośrodku kierowanym przez Promotora od kilkunastu lat i zespół ten ma bardzo duże doświadczenie w tym zakresie. Również dobór genów referencyjnych do tych analiz jest własnym dorobkiem ośrodka. W zakresie analiz statystycznych, ośrodek współpracuje ze specjalistami z Politechniki Śląskiej oraz również ma własne duże doświadczenie. To badanie naukowe jest badaniem zespołowym i mam wątpliwości, czy powinno być przedmiotem pracy doktorskiej.

W opisie metod wyszczególnione są osoby, które przeprowadziły poszczególne etapy prac, mikromacierze zostały wykonane przez zespół pod kierownictwem dr Małgorzaty Oczko-Wojciechowskiej; analiza statystyczna prowadzona była przez prof. Krzysztofa Fajarewicza, dr Michała Jarzaba i dr Aleksandrę Pfeifer. W konsekwencji, nieuniknione jest, że od tych wykonawców pochodzi opis metod i dokumentacja wyników, w tym graficzna. Doktorantka podaje, że przeprowadziła analizę kliniczną i brała udział w części laboratoryjnej przygotowującej RNA i reakcje QPCR.

Na str. 41 jest informacja, że analizy statystyczne „wykonano korzystając z własnych procedur opracowanych w środowisku Matlab”. Nie jest jasne czyje były te własne procedury. Uważam, że metody mikromacierzowe i statystyczne nie powinny być opisane tak dokładnie w tej pracy doktorskiej, ponieważ wykonywały je inne osoby. Bardziej odpowiednie byłoby powołanie się na wcześniejsze publikacje wychodzące z ośrodka, a przedstawiające te metody.

Co do istoty, opis metod nie budzi zastrzeżeń, poza tym, że nie odpowiada na pytanie postawione wyżej. Na str 35 jest napisane, cytuję: „u chorych, u których wykonano analizę na mikromacierzach (HGU133 i -Plus 2.0, w sumie 72 badania mikromacierzowe), analizy dokonano łącznie”. W tej pracy były różne analizy i cała praca jest analizą. Czy chodzi, odpowiednio, o hybrydyzację i analizę statystyczną?

W rozdziale **Wyniki** przedstawiono początkowo listę 89 genów potencjalnie mających związek z przerzutowaniem odległym w grupie raków z analizy I – nie jest jasne, czy to były tylko raki brodawkowe czy wszystkie 44. Do walidacji wybrano 32 geny, które miały m.in. „związek z przygotowaniem” (str. 56). Nie rozumiem, co to znaczy. Geny te nie potwierdziły się w grupie walidacyjnej.

Na grupie powiększonej do 72 chorych, zidentyfikowano 19 genów potencjalnie mających związek z przerzutowaniem odległym. Brakuje informacji, ile z tych genów pokrywało się z genami z I analizy, czyli jak dalece listy genów różniły się od siebie po powiększeniu grupy o 28 przypadków (63%). To pozwoliłoby na oszacowanie wpływu małych liczebności grup na negatywny wynik. Analizę na grupie 53 chorych zaniechano po uzyskaniu wstępnych wyników.

W **Dyskusji** zawartej na 6 stronach maszynopisu Doktorantka przedstawia piśmiennictwo dotyczące badań mikromacierzowych w raku tarczycy, pochodzące również z ośrodka gliwickiego, w których to badaniach była współautorem. Prezentowane są również efekty poszukiwań sygnatur genowych w innych nowotworach.

Dyskusja jest ogólnie trudną częścią publikacji naukowej. Dodatkową trudność mogą stanowić negatywne wyniki tej rozprawy. Stąd zapewne krótkie omówienie wyników przedstawionych w rozprawie, które zajmuje 1,5 strony. Dyskusja jest pisana w formie liczby mnogiej i prezentuje wyniki i badania ośrodka, co jeszcze bardziej podkreśla wieloautorstwo pracy.

W pracy naukowej nie powinno się używać sformułowań typu: „podchodziliśmy optymistycznie, mogliśmy liczyć na powodzenie badań, pragnęliśmy odkryć nowe czynniki, dołożyliśmy starań”, które jak rozumiem mają wytłumaczyć podjęcie badań. Intencje nie podlegają ocenie. Ocenie podlega jakość badań i krytyczna analiza wyników, a także ich interpretacja w ramach dyskusji. W tej dyskusji brakuje próby wyjaśnienia negatywnych wyników. Na to mogą się składać różne czynniki, przede wszystkim względnie małe badane grupy, o czym wspominałam wyżej lub kwestie metodyczne. Inną przyczyną mogą być różne alternatywne szlaki molekularne odpowiadające za progresję nowotworu. Na każdym etapie powstawania przerzutu działa wiele już opisanych szlaków molekularnych, można by pokusić się o sprawdzenie, czy geny opisane jako znaczące w przerzutowaniu, były obecne w przedstawionych analizach. To, że nie były znamienne, nie znaczy że nie odgrywają roli, szczególnie jeśli weźmie się pod uwagę restrykcyjne podejście statystyczne w tej pracy.

Doktorantka mogłaby wspomnieć o innych czynnikach decydujących o przerzutowaniu, np. immunologicznych lub zmianach w śródbłonku naczyń. Jeśli mowa o przerzutach odległych, są też w literaturze dane na temat receptywnego środowiska odległego narządu i faktu uśpienia przerzutów w ok. 50% przypadków. Zatem, nie wszystko zależy od profilu ekspresji nowotworu, a dyskusja poprowadzona w tym kierunku byłaby ciekawa.

Na końcu Dyskusji przedstawiono 3 wnioski, dotyczące znaczenia wskaźnika TDS, BRS oraz negatywnego wyniku tej pracy, które są poprawne.

Przedstawiona praca jest pracą zespołową. Zasadnicze eksperymenty oraz analiza statystyczna, a co za tym idzie, prezentacja wyników (tabelaryczna i graficzna), były wykonane przez inne osoby. Doktorantka opracowała materiał kliniczny i wykonała część eksperymentów. Na podstawie informacji przedstawionych przez Doktorantkę, uważam że Jej wkład w te rozprawę jest niewystarczający. Dyskusja, w której Autor rozprawy ma szansę na wykazanie krytycznego podejścia do wyników i swobody operowania piśmiennictwem, ma braki w tym zakresie i jest najsłabszą częścią przedstawionej pracy.

Podsumowując, pragnę podkreślić, że temat rozprawy mógł być trudny dla klinicysty ze względu na stronę metodyczną, a Pani dr Szpak-Ulczoł osobiście wykonała część eksperymentów PCR, co rzadko ma miejsce w przypadku klinicysty w Polsce. Dlatego, mimo ogólnej negatywnej oceny, zwracam się do wysokiej Rady Naukowej NIO-PIB o dalsze procedowanie, aby dać szansę Doktorantce na odpowiedź, przedstawienie własnego punktu widzenia i obronę.

Prof. dr hab. med. Jolanta Kupryjańczyk

9.01.2020

