

Recenzja pracy doktorskiej lek. Sylwii Szpak-Ulczo
pt: „Poszukiwanie genomowej sygnatury przerzutów odległych w raku
brodawkowym tarczycy”
z Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie

Przypadł mi w udziale akademicki obowiązek zrecenzowania pracy doktorskiej Sylwii Szpak-Ulczo pt. „Poszukiwanie genomowej sygnatury przerzutów odległych w raku brodawkowym tarczycy”, powierzony przez Radę Naukową Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie. Rozprawa doktorska Sylwii Szpak-Ulczo jest próbą znalezienia genomowej sygnatury przerzutowania w raku tarczycy.

Prace w tej dziedzinie trwają od lat i dotychczas nie ma spektakularnych rezultatów. Również ta praca doktorska nie przynosi odpowiedzi na pytanie czy można przewidzieć, który rak tarczycy (i ewentualnie kiedy) da przerzuty odległe. Mimo to, należy docenić sposób podjęcia tego tematu i wysiłek włożony w jego realizację.

Odrębnym zagadnieniem, które w obecnym czasie staje się coraz bardziej aktualne, jest często pojawiający się problem, w jaki sposób z badań wieloautorskich, a czasami wielośrodkowych, wyodrębnić - w postaci dysertacji - te badania, które stanowią odrębny dorobek autora, jednocześnie kandydata do awansu naukowego na podstawie właśnie tych badań. Bezwzględnie minęły czasy, gdy poszczególni autorzy publikowali badania wykonane wyłącznie przez samych siebie, artykuły jednoautorskie. Obecnie w wielu dziedzinach medycyny pracują rozbudowane zespoły naukowców, z których każdy wykonuje pewien element badań, sumujący się z innymi elementami tychże analiz, wykonanych przez innych. Utrudnia to w sposób istotny takie przedstawienie opracowywanego zagadnienia, które jednoznacznie wskazywałoby na dorobek i czynności wykonane wyłącznie przez konkretnego badacza. Oczywiście, takie przedstawienie procesu przeprowadzania badań nie jest niemożliwe, choć zawsze bardzo trudne.

Autorka w tekście pracy wyraźnie podkreśla, które części pracy są jej osobistym wkładem, a które są wynikiem pracy innych członków zespołu ośrodka gliwickiego bądź Politechniki Śląskiej. Nieczęsto zdarza się, aby lekarz klinicysta prezentował wyniki badań molekularnych, które wykonał osobiście, a nie zlecił etatowym pracownikom pracowni biologii molekularnej. Doktorantka sama wykonała analizę ilościowej reakcji PCR na grupie 86 próbek raka brodawkowego tarczycy od etapu izolacji i przygotowania RNA z tkanek, poprzez projektowanie starterów, syntezę krzywych standardowych, syntezę cDNA, aż do

zasadniczej reakcji QPCR i pozyskania danych do analiz. Mikromacierze analizowane w pracy były wykonywane przez zespół dr hab. med. Małgorzaty Oczko-Wojciechowskiej, jednak jak zaznacza Doktorantka, brała czynny udział w pozyskaniu materiału genetycznego do tej reakcji.

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska opisuje badania, które miały charakter wieloetapowy i wyraźnie widać, że powstawała w dłuższym okresie czasu. Zawarte w pracy dwie analizy mikromacierzowe, analiza QPCR i obliczenie niedawno wprowadzonych do piśmiennictwa światowego wskaźników TDS (Thyroid Differentiation Score) i BRS (BRAF/RAS score) z całą pewnością mogą stanowić materiał na kilka odrębnych publikacji.

Praca autorki liczy 109 stron i jest podzielona na części zawierające Wstęp, Cel, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusję, Streszczenie i Piśmiennictwo. Zawiera 20 tabel i 15 rozbudowanych rycin.

Część teoretyczna (Wstęp) napisana została w sposób ciekawy i szczegółowy i bazuje na najnowszej literaturze światowej. Autorka dokładnie omówiła molekularną patogenezę raka brodawkowego oraz czynniki rokownicze, a w szczególności prognostyczną wartość mutacji genów *BRAF*, *RAS*, *TERT*, oraz niektórych genów fuzyjnych. Na pochwałę zasługuje również dokładna analiza kliniczna opracowana przez Doktorantkę, przedstawiona w formie tabel.

Analiza statystyczna danych z mikromacierzy stanowi duże wyzwanie, co też zrozumiałe jest, że odbywała się we współpracy z zespołem Politechniki Śląskiej. Aby jednak analiza statystyczna mogła zostać przeprowadzona, konieczne było właściwe opracowanie danych klinicznych i dobre zrozumienie przez klinicystę analiz bioinformatycznych. Osobistym wkładem Doktorantki, jak podała w pracy, było opracowanie danych klinicznych dla chorych opisywanych w poszczególnych badanych grupach, bez których niemożliwa byłaby analiza danych mikromacierzowych i obliczenie wskaźników stopnia zróżnicowania raka brodawkowego tarczycy (TDS) i tak zwanej skali BRAF/RAS (BRS) w odniesieniu do raków dających przerzuty odległe. Jest to niewątpliwie pionierskie podejście, jak dotąd nie wykonywano bowiem podobnych analiz w stosunku do tej konkretnej grupy chorych.

Należy w tym miejscu dodać, że przy obliczaniu obu wskaźników, dokonano modyfikacji w porównaniu z metodą zaproponowaną pierwotnie przez autorów The Cancer Genome Atlas, mianowicie nowa metoda nie wymagała informacji o statusie mutacyjnym próbek w zakresie ewentualnych mutacji BRAF^{V600E} lub mutacji genów *RAS*. O trudności w oznaczaniu ww. wskaźników można wnioskować na podstawie tylko nielicznych doniesień w

piśmiennictwie światowym powtarzających to oznaczenie. Aby takie oznaczenia wykonywać, należy dysponować surowymi danymi mikromacierzy i mieć możliwości dokonania ich statystycznej analizy, co musi odbywać się w stosownej współpracy ze specjalistami. Nowoczesne analizy bioinformatyczne to niezwykle złożone algorytmy, a ich prawidłowe opracowanie wymaga rozległej wiedzy matematycznej i statystycznej. Nie dziwi więc fakt, że Doktorantka, aby poprawnie zrealizować wyznaczone w badaniach cele, korzystała z pomocy wykwalifikowanych specjalistów, konsekwentnie wzbogacając przy tym swoje kompetencje i przygotowując dysertację w opisaną analizę i stosowne do niej ryciny.

W śledzeniu wieloetapowości pracy pomaga rycina 5 (str. 25), którą można przyjąć jako drogowskaz w śledzeniu pracy. Pierwszy etap, czyli analiza ponad 40 mikromacierzy, wyłoniła geny kandydackie do profilu różnicującego raka brodawkowate tarczycy o zaawansowaniu miejscowym od raków dających przerzuty odległe. Geny wytypowane ten sposób zostały zwalidowane na innej, niezależnej grupie badanej. Metodą QPCR Doktorantka sprawdziła 28 wytypowanych genów. Analiza statystyczna nie wykazała znamiennej różnicy w ekspresji genów w grupach chorych z przerzutami i bez przerzutów odległych. Dalszy etap pracy to powtórzenie analizy mikromacierzowej na szerszej grupie chorych, po optymalizacji metod informatycznych. Poprzez sprawdzenie wyników na nowej większej liczbie chorych zwiększyła się wiarygodność wyniku pracy.

Materiał przedstawiony w pracy obejmuje 189 pacjentów z rakiem brodawkowatym tarczycy, u których śródoperacyjnie pobrano materiał do badań, w tym 46 próbek raka tarczycy, który dał przerzuty odległe. W poszczególnych etapach badań grupy te są jednak mniej liczne. Zmiana liczebności grup badanych może stanowić pewną trudność w śledzeniu analizy wyników. Doktorantka tłumaczy konieczność takiego postępowania faktem zastosowania różnego typu mikromacierzy i odmiennych dla poszczególnych mikromacierzy sposobów normalizacji danych.

Autorka nie znalazła sygnatury genomowej, która różnicowałaby raka brodawkowatego dającego przerzuty odległe od raka o zaawansowaniu miejscowym. Poszukiwania te były wieloetapowe, co dowodzi staranności poszukiwań. Fakt, że takiej sygnatury nie znaleziono, nie umniejsza wartości pracy i może być polem do dalszych poszukiwań. Wspomniany brak istotności może wynikać ze stosunkowo niewielkich grup przebadanych pacjentów. Należy jednak podkreślić, że częstość występowania zmian przerzutujących w przypadku raka brodawkowatego tarczycy wynosi przeciętnie tylko 15-20% wszystkich przypadków. Zebranie tak licznej grupy pacjentów, jak przedstawiona w

obecnej pracy, nawet w prężnie funkcjonującym ośrodku gliwickim, jest dużym osiągnięciem zarówno dla pojedynczego badacza, jak i całego zespołu.

Z obowiązku recenzenta chciałbym podzielić się kilkoma uwagami dotyczącymi pracy i sposobu jej przygotowania. Moje wątpliwości budzi Dyskusja (licząca w sumie 6 stron), w której wyniki zostały omówione, jak wydaje się, zbyt zdawkowo. Brak jest próby opisu ekspresji choćby niektórych z 28 wytypowanych genów analizowanych metodą QPCR. Ponadto, Dyskusja powinna być bardziej polemiczna i mniej powinno być w niej opisów cudzych dokonań, natomiast więcej zestawienia własnych uzyskanych wyników z innymi na podobny temat. Podejrzewam, że wpływ na taką formę Dyskusji miało nieuzyskanie wyników statystycznie znamiennej i nieznalezienie poszukiwanej sygnatury genomowej. Ponadto, nawet w przypadku otrzymania braku istotnych statystycznie wyników, można by pokusić się o zasugerowanie planu rozwoju projektu badawczego (dalsze techniki, uzupełnienie, cele). Zwraca uwagę brak spisu stosowanych skrótów; czytelność niektórych rycin pozostawia wiele do życzenia.

Podsumowując, jak już wspomniałem poprzednio, w dobie obecnej, poważne opracowania naukowe zawsze pozostają wieloautorskie. W przypadku ocenianej pracy Doktorantka bardzo wyraźnie zaznaczyła, które części badań były wykonane przez nią samą, a które wyniki pochodziły z badań bądź obliczeń innych autorów i stanowiły jedynie materiał, na którym Doktorantka dalej prowadziła swoje analizy. Dlatego też, bardzo dokładnie można określić, jak wiele pracy lek. Sylwia Szpak-Ulczoł włożyła w analizę kliniczną i jak mrówczą pracą było wykonanie tak wielu badań metodą analizy ilościowej reakcji PCR poprzez wszystkie etapy tej metody. Jeszcze raz w obecnej recenzji pragnę podkreślić, że lekarzom klinicyzom rzadko zdarza się osobiście wykonywać tego typu genetyczną pracę laboratoryjną. Jeśli doda się do tego wkład Doktorantki w opracowanie danych klinicznych, uważam, że już te dwa elementy, niezależnie od kilku innych stanowiły podstawę do przygotowania dysertacji doktorskiej, bez względu na fakt, iż analizy bioinformatyczne mające na celu wykorzystanie danych mikromacierzowych zostały wykonane przez innych badaczy.

Pewną niezręcznością mogło być zastosowanie w niektórych fragmentach tekstu do opisu własnych czynności i dokonań czasowników w liczbie mnogiej, co w pracy doktorskiej nigdy nie jest specjalnie pożądane. Nie zmienia to jednak faktu, że z pracy bardzo dokładnie wynika, co Doktorantka wykonywała i analizowała, a czego nie. Ponadto, wiadomo, kto te inne fragmenty badań zespołowych konkretnie wykonywał.

Jak już wspominałem, szalenie trudno zaplanować taką formę pracy doktorskiej, która uwzględniałaby w konkretnej sytuacji tylko własne metody i wyniki badań i analiz, a pomijałaby lub tylko cytowała metody i wyniki stosowane przez innych badaczy. Teoretycznie można by to zrobić, gdyby wyniki innych wykonawców były już w całości opublikowane. Skoro jednak tak nie było, uważam, że Doktorantka najlepiej jak mogła próbowała wybrnąć z tego trudnego zadania.

Nasuwa się również pewna uwaga ogólna, mianowicie analiza mikromacierzowa, przynajmniej w przypadku raków tarczycy - w moim przekonaniu - nie spełnia pokładanych nadziei. Inna sprawa to podejście do tzw. negatywnych wyników badań, tzn. wyników, które nie wykazały istotności statystycznej. Uważam, że należy je traktować na równi z wszystkimi innymi osiągniętymi wynikami, albowiem one także stanowią wkład do zasobów wiedzy na badany temat.

Z licznych konferencji endokrynologicznych znam osiągnięcia Pani Sylwii Szpak-Ulczoek jako doświadczonego klinicysty zajmującego się zagadnieniami raka tarczycy, podobnie jak cały zespół Pani Profesor Barbary Jarząb. Uważam, że praca doktorska Sylwii Szpak-Ulczoek spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom promocyjnym na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauk medycznych i - mimo pewnych niedociągnięć - zasługuje na pozytywne przyjęcie. Pragnę również podkreślić, że problematyka pracy, jak również wyrafinowane techniki analizy mikromacierzy stanowiły nie tylko dla Doktorantki, ale także dla mnie jako Recenzenta, poważne wyzwanie.

W świetle powyższych faktów, zwracam się do Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie o dopuszczenie lek. Sylwii Szpak-Ulczoek do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. med. Andrzej Lewiński
Specjalista chorób wewnętrznych,
endokrynologii
i endokrynologii i diabetologii dziecięcej
3764488
tel. 698 132 657

Łódź, 27.01.2020