



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego
w Poznaniu

**KATEDRA I KLINIKA ENDOKRYNOLOGII, PRZEMIANY MATERII
I CHOROÓB WEWNĘTRZNYCH**

Kierownik Katedry i Kliniki - Prof. dr hab. n med. Marek Ruchała

ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

endosk2@ump.edu.pl

tel. 61 869 13 30
fax. 61 869 16 82

Poznań, 23.01.2020r.

Prof. dr hab. n. med. Ewelina Szczepanek-Parulska
Katedra i Klinika Endokrynologii,
Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych
Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Przybyszewskiego 49
60-355 Poznań

Ocena rozprawy doktorskiej **lek. Michała Kalemby**
z Zakładu Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej
Centrum Onkologii Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie Oddział w Gliwicach
na podstawie rozprawy:

**„Związek polimorfizmów jednonukleotydowych w locus FOXE1
z rakiem brodawkowatym tarczycy”
(Promotor: Prof. dr hab. n. med. Barbara Jarzab)**

Zróżnicowany rak tarczycy (ZRT) rozwija się z komórki pęcherzykowej tarczycy, przy czym rak brodawkowaty tarczycy (PTC, ang. papillary thyroid carcinoma) stanowi 80-85% nabłonkowych, złośliwych nowotworów tarczycy w krajach rozwiniętych o prawidłowym zaopatrzeniu w jod. Etiologia tego schorzenia jest wieloczynnikowa i wciąż nie w pełni poznana. Narażenie na promieniowanie jonizujące w dzieciństwie, wiek, płeć żeńska i obciążony wywiad rodzinny są czynnikami zwiększającymi ryzyko wystąpienia ZRT. Ostatnie badania dostarczają ciekawych danych nt. wpływu otyłości i powiązanej z nią hiperinsulinemii na występowanie i stopień zaawansowania ZRT. Rozwój genetyki i nowoczesnych technik biologii molekularnej pociągnęły za sobą możliwość szerokiej oceny i identyfikacji czynników

genetycznych, mogących sprzyjać rozwojowi ZRT u danego pacjenta. Bardzo ciekawym zagadnieniem jest również, czy predyspozycja genetyczna może wpływać nie tylko na możliwość wystąpienia tego nowotworu, ale i wiązać się ze stopniem zaawansowania w momencie rozpoznania i rokowaniem. Wykrywalność raka tarczycy, a w szczególności PTC wzrosła gwałtownie bo o około 240% w ciągu ostatnich trzech dekad. W związku z poprawą diagnostyki, w ostatnich latach, istotnie zwiększył się także udział mikroraków, czyli zmian rozpoznawanych na etapie wielkości ogniska pierwotnego poniżej 1 cm. Rak brodawkowaty tarczycy jest najczęstszym nowotworem złośliwym układu endokrynnego; stanowi 96% w ogólnej liczbie nowych nowotworów gruczołów dokrewnych oraz odpowiada za 67% zgonów z powodu nowotworów gruczołów dokrewnych. Tymczasem wciąż niewiele wiadomo na temat konkretnych mutacji predysponujących do wystąpienia tego nowotworu. Zatem bardzo zasadne wydaje się podjęcie obranej tematyki przez Doktoranta. Przedmiotem recenzowanej pracy jest ocena związku pomiędzy występowaniem wybranych siedmiu polimorfizmów w obrębie sekwencji genu *FOXE1* a występowaniem PTC oraz stopniem jego zaawansowania w momencie rozpoznania (mikrorak vs. rak jawny klinicznie). Warto podkreślić, iż punktem wyjścia dla prowadzonych badań była współpraca doktoranta w ramach dużego projektu realizowanego w jednostce MILESTONE STRATEGMED. Wspomnę przy tym, iż doktorant jest też współautorem 6 publikacji z zakresu genetyki raka tarczycy. Jest ponadto współautorem polskich wytycznych diagnostyki i leczenia raka tarczycy, których powstania Pani Promotor jest inicjatorem i wiodącym autorem. Tym samym można stwierdzić, iż podjęty temat badawczy ma swoje źródło w doświadczeniach naukowych i zainteresowaniach badawczych doktoranta, a jego praca wpisuje się w prowadzone w macierzystym ośrodku na szeroką skalę badania nad genetycznymi determinantami nowotworów tarczycy a także koresponduje z tematyką działalności naukowo-klinicznej Promotora pracy. Jednocześnie, wpisują się one również w aktualne światowe trendy badawcze w endokrynologii. Jak sam Doktorant przyznaje w pracy, inspiracją dla jej powstania była międzynarodowa współpraca z prestiżowym ośrodkiem jakim jest Instytut Badań nad Rakiem w Ohio State University.

Choć rozprawa podlega ocenie jako monografia, nowatorski charakter badań i interesujące wyniki roją nadzieję na opublikowanie ich w dobrych czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu (co zresztą już wcześniej Doktorant częściowo uczynił). A zatem, biorąc pod uwagę powyższe argumenty, wybór tematu rozprawy uważam za słuszny oraz niezwykle interesujący zarówno z naukowego jak i klinicznego punktu widzenia, a ośrodek, w którym praca była realizowana, w pełni przygotowany do realizacji założeń rozprawy.

Przedstawione mi do oceny opracowanie ma układ typowy dla dysertacji doktorskich, liczy łącznie 103 strony i zawiera kolejno: stronę tytułową (1 strona), podziękowania (1

strona), dedykację (1 strona), spis treści (2 strony), wykaz skrótów (1 strona), wykaz tabel (3 strony), wykaz rycin (2 strony), wstęp (16 stron), założenia i cel pracy (1 strona), materiał (3 strony), metody (8 stron), opis metod statystycznych (3 strony), wyniki (34 strony), dyskusję (16 stron), wnioski (1 strona), wykaz piśmiennictwa (18 stron), a na końcu streszczenie w języku polskim (1 strona) i angielskim (1 strona).

We wstępie Doktorant dokonuje wprowadzenia do tematyki badań, dając czytającemu solidną podstawę w postaci dostępnych danych literaturowych nt. podziału histologicznego, czynników ryzyka, podstaw diagnostyki, oceny zaawansowania i możliwych metod leczenia PTC. Pozwolę sobie w tym miejscu na drobną uwagę dotyczącą zespołu związanego ze zwiększonym ryzykiem raka tarczycy przytaczanym przez Doktoranta - w polskiej literaturze powinno się pisać zespół Cowden, a nie Cowdena, bowiem ten eponim pochodzi od nazwiska 20-letniej pacjentki Rachel Cowden. Wśród wymienionych przez Autora czynników ryzyka PTC wskazałabym jeszcze kilka dodatkowych jak chociażby płeć żeńska czy otyłość. W Tabeli 2 we wstępie Autor przytacza rekomendowaną terminologię dla rozpoznań cytologicznych guzków tarczycy. Nie do końca dla mnie jednak zrozumiałym jest, dlaczego cytowane są rekomendacje z 2010r. a nie najnowsze z 2018r. To samo dotyczy Tabeli 4, gdzie przytoczono klasyfikację TNM, cytując rekomendacje z 2010r. Dlaczego nie te najnowsze? Ponadto, moją wątpliwość budzą wartości procentowe przytoczone jako ryzyko raka tarczycy w poszczególnych kategoriach biopsyjnych - np. w przypadku kategorii 5 (podejrzenie złośliwości) autor wskazuje, iż wynosi ono 30-50%, co wydaje się wartością zdecydowanie zaniżoną w stosunku do aktualnych danych. Zrozumiałym jest w kontekście tematu rozprawy, iż Autor w dalszej części skupia się głównie na dotychczasowej wiedzy nt. udziału czynników genetycznych w etiopatogenezie PTC oraz przytacza zidentyfikowane dotychczas mutacje sprzyjające powstawaniu raka tarczycy. Najwięcej uwagi Doktorant poświęca naturalnie genowi *FOXE1*, którego polimorfizmy były przedmiotem przedstawionej do oceny rozprawy. Bardzo podoba mi się z kolei fragment zawierający rozważania w temacie, iż o agresywności raka tarczycy nie decyduje rozmiar a jego potencjał złośliwości, który przejawia się skłonnością do przerzutowania a który może być warunkowany również poprzez podłoże genetyczne. Autor w ten sposób uzasadnia podjęcie swoich badań, które wpisują się w trend poszukiwania markerów pozwalających przewidzieć potencjał złośliwości nowotworu. Poza tym wstęp jest napisany jasno i czytelnie, a przedstawione w nim dane zarówno z badań klinicznych jak i eksperymentalnych są niezbędne dla interpretacji i właściwej oceny znaczenia badań Doktoranta w kontekście aktualnej wiedzy w tym temacie.

Założenia i cele pracy przedstawione zostały w sposób zwięzły. Cele są sprecyzowane w formie dwóch numerowanych punktów. Doktorant wskazuje tu konkretne siedem



polimorfizmów, których analiza była przedmiotem pracy. Zabrakło mi jednak w tym miejscu krótkiego uzasadnienia, czym kierował się Doktorant przy wyborze właśnie tych polimorfizmów, bowiem zapewne nie był ten wybór przypadkowy i miał swoje uzasadnienie chociażby w dostępnych danych literaturowych.

W dalszej części pracy Doktorant przechodzi do opisu materiału badawczego, charakteryzując swoją dużą grupę badaną (1883 pacjentów) i kontrolną (886 zdrowych ochotników) oraz kryteria włączenia do poszczególnych grup. Robi to w sposób klarowny, zwięzły i nie budzący większych zastrzeżeń. Nieco zamieszania w pracy wprowadza fakt, iż podgrupy, dla których badano poszczególne polimorfizmy nie były takie same pod względem liczby przebadanych pacjentów, co jednak Doktorant sam przyznaje, tłumacząc ten stan rzeczy. W mojej ocenie warto byłoby ponadto zawrzeć w opisie numer dokumentu zgody Komisji Bioetycznej na badania, na którą powołuje się Doktorant w tym rozdziale (może to mieć znaczenie przy publikacji wyników). Ponadto, wiek pacjentów w mojej ocenie należy zaokrąglać do pełnych liczb, a podawanie wieku w formie 33,25 roku nie znajduje praktycznego uzasadnienia. Pominęłabym też Rycinę 5, która prezentuje wyłącznie dwie mediany wieku dla grupy badanej i kontrolnej, nie wnosząc nic nowego ponad informację zawartą już w tekście.

W kolejnym punkcie rozprawy Doktorant przechodzi do opisu metod izolacji DNA, jego oceny jakościowej i ilościowej oraz szczegółowo opisuje zastosowane w pracy metody badania polimorfizmów z wykorzystaniem sond TaqMan. Opis jest zilustrowany rycinami, które z pewnością ułatwiają zrozumienie zastosowanych metod czytelnikowi o niewielkim doświadczeniu w stosowaniu technik biologii molekularnej. Świadczy to też o zrozumieniu zagadnienia przez Doktoranta, który będąc lekarzem, równie biegle wydaje się poruszać w terminologii i metodach analizy genetycznej. W kolejnym punkcie Doktorant przytacza zastosowane metody analizy statystycznej (test Chi2, iloraz szans, analizę równowagi Hardy-Weinberga, Web-Assotest, algorytm EM i wieloczynnikową regresję logistyczną), do których opisu i zastosowania nie wnoszę istotnych uwag.

W dalszej części rozprawy Autor przechodzi do zaprezentowania wyników swoich badań. Robi to w sposób czytelny, ilustrując je licznymi tabelami (łącznie 26 w pracy) i rycinami (łącznie 18 w pracy). Dodatkowo, zabiegiem ułatwiającym usystematyzowanie sobie wyników pracy jest ich podsumowanie na końcu rozdziału prezentującego wyniki. Pozwoliło to uniknąć często spotykanego w rozprawach doktorskich powielania podsumowania wyników w konkluzjach pracy. Tym samym wnioski z tej rozprawy są stosunkowo krótkie, przedstawione w czterech punktach i mają charakter właściwych wniosków. Na pochwałę zasługuje fakt, iż nie są one prostym powtórzeniem wyników, ale próbą ich interpretacji i nadania znaczenia

uzyskanym rezultatom. Ponadto stwierdzam, iż wnioski te wypływają z wyników uzyskanych przez Doktoranta oraz są właściwą odpowiedzią na pytania badawcze sprecyzowane w szczegółowych celach pracy. Najciekawszy wniosek zawiera spostrzeżenie, iż występowanie poszczególnych polimorfizmów *FOXE1* może mieć znaczenie dla progresji raka tarczycy (a dokładnie w tym badaniu - zaawansowania choroby w momencie rozpoznania). Co za tym idzie, czwarty – najbardziej daleko idący wniosek – sugeruje iż mikrorak tarczycy posiada odmienne determinanty genetyczne niż rak jawny klinicznie, co oczywiście wymaga potwierdzenia w dalszych badaniach. Opis wyników jest najobszerniejszym fragmentem pracy. Jest on bogato ilustrowany oraz wzbogacony tabelami, co ułatwia poruszanie się wśród mnogości przytaczanych przez Doktoranta wartości. Wykazano znamienne różnice w częstości występowania pięciu z siedmiu analizowanych polimorfizmów, najbardziej znamienne dla rs965513. Następnie przytoczono wyniki analizy równowagi Hardy-Weinberga oraz podjęto próbę analizy modeli dziedziczenia tych polimorfizmów. Wykazano ponadto, że badane polimorfizmy wykazują sprzężenie oraz badano częstość występowania poszczególnych haplotypów u chorych i w obrębie grupy kontrolnej. W dalszej kolejności obliczono iloraz szans dla poszczególnych polimorfizmów i ich najczęstszych haplotypów, identyfikując istotne różnice. Udało się zidentyfikować haplotyp ryzyka i haplotyp ochronny w odniesieniu do ryzyka zachorowania na raka tarczycy (OR odpowiednio 1,64 i 0,6). Nie wykazano natomiast związku tych polimorfizmów z płcią i wiekiem. Dla mnie szczególnie interesujących wyników dostarczyło porównanie mikroraków z rakami jawnymi klinicznie w odniesieniu do grupy kontrolnej, co pozwoliło na wskazanie istotnych różnic w rozkładzie genotypów dla trzech polimorfizmów. Autor prezentując wyniki zachowuje logiczny ciąg od rezultatów najprostszych analiz do najbardziej złożonych, co je systematyzuje. W dalszej kolejności pokazuje wyniki wieloczynnikowej regresji logistycznej. Porównanie tą metodą grupy badanej i kontrolnej wykazuje, iż na podstawie dostępnych danych genetycznych można zaledwie z umiarkowaną skutecznością przewidywać szansę zachorowania na raka tarczycy u danej osoby. Analiza wieloczynnikowej regresji logistycznej w całej grupie badanej oraz kontrolnej wykazała znaczenie polimorfizmu rs10983700 oraz wieku zachorowania, w przypadku mikroraka – wieku zachorowania, w przypadku raka jawnego klinicznie – polimorfizmu rs10983700. Natomiast w porównaniu raka jawnego klinicznie vs. mikroraka różnicował polimorfizm rs1877431.

Następnie na s. 77 Autor przechodzi do dyskusji wyników własnych w odniesieniu do danych literaturowych. Prowadzona jest ona w oparciu o 119 pozycji piśmiennictwa, w większości aktualnego (z ostatnich 10-ciu lat) i anglojęzycznego, stanowiących publikacje w czasopismach o międzynarodowym zasięgu. Powiązanie piśmiennictwa z tekstem jest

prawidłowe. Doktorant konfrontuje w niej wyniki swoich badań uzyskanych na populacji polskiej z wynikami uzyskanymi przez badaczy na innych populacjach (w tym amerykańskiej, hiszpańskiej, japońskiej, Polinezji francuskiej). Na poparcie związku występowania poszczególnych polimorfizmów genu *FOXE1* z ryzykiem wystąpienia raka tarczycy przytacza też wyniki najważniejszych meta-analiz. Omówienia dokonuje w poszczególnych akapitach, podsumowując dostępne dane literaturowe dla danego analizowanego przez siebie polimorfizmu i konfrontując je ze swoimi wynikami. Pozwala to uwypuklić nowatorskie elementy pracy doktorskiej, wśród których wskazuje iż przeprowadzona analiza dotyczy najliczniejszej jak do tej pory jednocześnie analizowanej liczny polimorfizmów zlokalizowanych w obrębie genu *FOXE1*. Co więcej, dotychczas w literaturze rzadko poruszano kwestię związku tych polimorfizmów z zaawansowaniem choroby w momencie rozpoznania. Doktorant stwierdza jednak iż haplotyp ryzyka i haplotyp ochronny najprawdopodobniej nie mają znaczenia dla agresywności choroby. Wykazuje się przy tym dużą dojrzałością naukową i umiejętnością krytycznego spojrzenia na własne rezultaty. Nie przecenia on ich znaczenia, wykazując się przy tym dystansem właściwym dla doświadczonych badaczy. W końcowej fazie dyskusji Doktorant nie zapomina o szeregu innych funkcji produktu genu *FOXE1* niż badana tu kwestia predyspozycji do raka tarczycy, co opisuje w sposób dość rozległy, świadczący o rozeznaniu w temacie. Nie pomija też kwestii mnie szczególnie bliskiej a mianowicie związku długości traktu poli-alaninowego FOXE1 z ryzykiem występowania dysgenezy tarczycy - w szczególności dziedzicznej formy hemiagenezy tarczycy - które było również przedmiotem badań polskich autorów. Dyskusja pokazuje jednak, że Doktorant potrafi wskazać i podkreślić nowatorskie aspekty swoich badań. Równie swobodnie porusza się zarówno w zagadnieniach klinicznych jak i endokrynologii molekularnej, co świadczy o Jego elastyczności i wszechstronności jako naukowca.

Na końcu pozwolę sobie na kilka uwag redakcyjnych. Mimo, iż rozprawa przygotowana jest bardzo czytelnie i starannie, Doktorant nie ustrzegł się nielicznych błędów literowych i drobnych błędów stylistycznych, np.:

- s. 13 - jest określania, powinno być określana
- s. 15 - powtórzenie: ...i zaawansowanie choroby. Zaawansowanie raka...
- s. 20 - ...predyspozycja do genetyczna do nowotworów...
- s. 23 - ...sprzężenie ze rodzinnym...
- s. 30 - Mediana. wieku dla grupy...
- s.33 - nowe próbówki...
- s. 34 - spektrofotometru
- s. 56 - Boldem zaznaczono...

- s. 62 - różnic w porywając znamienne...
- s. 74 - osób chorych. natomiast haplotypu... / ...młodszych. jednak wyniki...
- s. 77 - ...dla części z tych z tych genów związek...
- s. 80 - genotypów między całą grupa chorych... / ...a dokładnie z stężeniem hormonów TSH...
- s. 83 - ...wznowy w tym okresie czasu Pojawiło się...
- s. 102 - ...mikroraka różnicował polimorfizmu ...

Pragnę jednak podkreślić, że wymienione przeze mnie uwagi wynikają z obowiązku recenzenta, jednak nie utrudniają znacząco odbioru treści i nie rzutują w istotny sposób na wartość merytoryczną pracy. Stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny publikacja stanowiąca podstawę do ubiegania się o stopień doktora nauk medycznych została dobrze zaplanowana i zrealizowana. Całościowa ocena pracy przemawia za tym, że Doktorant potrafi stawiać nowatorskie pytania badawcze i konsekwentnie przeprowadzić badania naukowe w celu znalezienia na nie odpowiedzi. Wyniki pracy uważam za wartościowe w świetle najnowszego piśmiennictwa światowego, zarówno w aspekcie poznawczym jak i praktycznym. Wnikliwa analiza wyników, krytyczny charakter prowadzonej dyskusji i prawidłowość wyciąganych wniosków wskazują na opanowanie warsztatu naukowego przez Doktoranta i upoważniają do stwierdzenia, że Doktorant jest przygotowany do planowania i prowadzenia badań naukowych.

Pozytywnie oceniając przedstawioną mi rozprawę stwierdzam, iż odpowiada ona wymogom stawianym do uzyskania stopnia doktora nauk medycznych i w związku z tym mam zaszczyt wnieść do Wysokiej Rady Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie wniosek o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

P.S. Jako absolwentka Liceum Ogólnokształcącego im. Marii Skłodowskiej-Curie, w którego holu widniały wypowiedziane przez Nią słowa „Trzeba mieć wytrwałość i wiarę w siebie. Trzeba wierzyć, że człowiek jest do czegoś zdolny i osiągnąć to za wszelką cenę.”, za piękny ukłon w stronę patronki Instytutu uważam zamieszczenie Jej motta we wprowadzeniu do rozprawy i życzę Doktorantowi, aby swoją dalszą pracą wcielał je w życie.

Poznań, 23.01.2020r.

Ewelina Szczepanek-Parulska



Prof. dr hab. n. med.
Ewelina Szczepanek-Parulska
specjalista endokrynologii
i chorób wewnętrznych
PWZ 2506096