



Białystok, dnia 08.03.2021 r.

Ocena rozprawy doktorskiej
pt. „Morfologiczno-molekularny algorytm diagnostyczny
raka jelita grubego”
lek. Małgorzaty Kołos
z Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowego Instytutu Badawczego

Rak jelita grubego jest jednym z najczęściej występujących nowotworów w naszym kraju i w skali globalnej. W 2017 r. w kraju odnotowano ponad 18 tys. zachorowań i ponad 7,5 tys. zgonów. Na świecie w 2018 r. zarejestrowano ok. 1,8 mln nowych zachorowań oraz ponad 850 tys. zgonów. Zarówno w kraju, jak i w Europie nowotwór ten zajmuje 2 miejsce pod względem zachorowań na nowotwory i zgonów z jego powodu, przy czym zachorowalność na ten najczęstszy nowotwór złośliwy przewodu pokarmowego ciągle wzrasta. Ożywione badania nad etiologią tego nowotworu doprowadziły do identyfikacji szeregu czynników ryzyka. Dysponujemy również coraz większą wiedzą na temat biologii molekularnej i genetyki tego nowotworu. W ślad za tym, dokonują się znaczące postępy w leczeniu chorych na ten nowotwór. Skład zespołu wielodyscyplinarnego (MDT) podejmującego decyzje o sposobie leczenia stale się powiększa. Istotną rolę w podejmowaniu decyzji przez MDT odgrywają nie tylko klinicyści, ale również patomorfolodzy i genetycy. Niezwykle istotnym elementem określania sposobu leczenia jest raport patomorfologiczny i molekularny, który zgodnie z wytycznymi ASCO/CAP 2017 powinien zawierać m.in. ocenę mutacji RAS (KRAS i NRAS) i BRAF, a także ocenę niestabilności mikrosatelitarnej (MSI) u

chorych z zespołem Lyncha lub ze sporadycznymi rakami MSI-H. Z uwagi na fakt, że chorzy na raka jelita grubego migrują pomiędzy ośrodkami onkologicznymi, dokumentacja diagnostyczna powinna być jednolita, pełna i podlegać kontroli wewnętrznej i zewnętrznej oraz okresowej walidacji. Aktualnie w krajowym systemie opieki zdrowotnej nie ma obowiązującego wzorca raportu patomorfologicznego, który by zawierał poza oceną podstawowych parametrów oceny patomorfologicznej dane genetyczne i molekularne mające wpływ na wybór optymalnego leczenia systemowego chorych. Istnieje zatem pilna potrzeba stworzenia wzorca takiego raportu, który mógłby być zaimplementowany przez wszystkie ośrodki zajmujące się diagnostyką i leczeniem chorych na raka jelita grubego. Praca doktorska lek. Małgorzaty Kołos pt. „Morfologiczno-molekularny algorytm diagnostyczny raka jelita grubego” wpisuje się w nurt takich poszukiwań. Temat tej pracy jest zatem bardzo aktualny i wychodzi naprzeciw oczekiwaniom lekarzy zajmujących się leczeniem chorych na raka jelita grubego.

Przedłożona do oceny praca doktorska ma formę monografii, zawierającej 131 stron wydruku komputerowego. Ma układ typowy dla tego rodzaju rozpraw. W jej skład wchodzi 8 rozdziałów, które pojawiają się w następującej kolejności: „Wstęp”, „Wprowadzenie”, „Cel”, „Materiał i metody”, „Wyniki badań”, „Dyskusja”, „Wnioski”, „Piśmiennictwo”. Zasadniczy tekst pracy jest poprzedzony podziękowaniami autorki, streszczeniami w języku polskim i angielskim. Poza tym autorka zamieściła na końcu dysertacji 3-stronnicowy wykaz używanych skrótów, spis tabel i rycin oraz aneksy zawierające klasyfikację WHO zróżnicowania guzów jelita grubego, zasady stopniowania patomorfologicznego pTNM raków jelita grubego, wytyczne dotyczące raportowania wyników biomarkerów raka jelita grubego (w tym opcjonalnych badań immunohistochemicznych i genetycznych).

Rozprawę rozpoczyna, zawarty na 25 stronach wydruku komputerowego, rozdział „Wprowadzenie”, podzielony na podrozdziały, w których autorka kolejno opisuje

epidemiologię raka jelita grubego oraz zaburzenia molekularne i szlaki karcinogenezy, poświęcając sporo uwagi niestabilności chromosomowej (MSI), zaburzeniom metylacji wysp CpG oraz nowotworom o fenotypie CIMP. Omawia również rolę genu *p53* w etiopatogenezie raka jelita grubego. W dalszej części koncentruje się na roli czynników prognostycznych i predykcyjnych w diagnostyce patomorfologicznej i doborze terapii systemowej chorych na raka jelita grubego. Poświęca też swoją uwagę klasyfikacjom morfologiczno-molekularnym raka jelita grubego.

„Wprowadzenie” bardzo dobrze uzasadnia wybór celu pracy, który autorka określiła jako opracowanie przydatnej klinicznie ścieżki diagnostycznej chorych na raka jelita grubego, na podstawie typów morfologiczno-molekularnych. Autorka dysertacji wyraziła przypuszczenie, że algorytm uwzględniający dane kliniczne, obraz morfologiczny i badania IHC pozwoli dokonać podziału na grupy w zależności od etiopatogenezy i umożliwi wybór czynników predykcyjnych niezbędnych dla doboru optymalnej terapii celowanej. Doktorantka zaplanowała realizację celu pracy poprzez wykonanie panelu badań IHC, uwzględniających markery MSI i barwienia z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko TP53 a także określenie statusu genów *TP53*, *KRAS*, *BRAF*, *MMR*, metylację promotora *MLH1* i fenotyp CIMP.

Rozdział „Materiał i metody” zawarty jest na 10 stronach. W pierwszej jego części opisano materiał badawczy, który stanowiły 74 przypadki raka jelita grubego, pochodzące od pacjentów (40 kobiet, 34 mężczyzn) operowanych i leczonych w Klinice Chirurgii Gastroenterologicznej i Transplantacyjnej CSK MSWiA w Warszawie. Autorka bardzo dokładnie opisuje zasady badania makroskopowego i mikroskopowego, łącznie z elementami raportu synoptycznego oraz przedstawia kryteria MSI. W następnej części omawia zakres badania IHC obejmującego ocenę MSI i akumulację białka p53. W kolejnej części prezentuje wykorzystane w dysertacji badania molekularne, koncentrując się na ocenie MSI i identyfikacji mutacji w genach *KRAS* (ekson 2), *BRAF* (ekson 15) i *TP53* (eksyony 4-8), a

także statusu metylatora wysp CpG (CIMP) i metylacji promotora genu *MLH1*. Ostatnią część tego rozdziału zajmuje opis wykonanych przez doktorantkę analiz statystycznych, które nie budzą zastrzeżeń recenzenta.

„Wyniki badań” zostały zaprezentowane na 30 stronach wydruku komputerowego. Stanowią bardzo ważną część dysertacji. Autorka przedstawia w nich kolejno wyniki analiz klinicznych i patomorfologicznych, koncentrując się na typie histologicznym, stopniu dojrzałości G, stopniu zaawansowania patomorfologicznego wg WHO/AJCC/UICC oraz obecności pączkowania (tzw. *budding*). Następnie opisuje cechy MSI oraz wyniki badań IHC oraz molekularnych, dotyczące MSI oraz TP53, a także statusu genów *KRAS*, *BRAF*, metylacji CIMP i promotora *MLH1*. W dalszej części rozdziału przedstawia wyniki badań statystycznych dotyczące ocenianych parametrów. W końcowej części rozdziału doktorantka proponuje algorytm diagnostyczno-molekularny wynikający z ocenianych w ramach pracy doktorskiej parametrów diagnostycznych.

Zasobna w informacje i ciekawie przedstawiona „Dyskusja”, zawarta na 10 stronach maszynopisu, z właściwymi dobranymi odniesieniami do danych z piśmiennictwa krajowego i światowego, jest cenną częścią pracy doktorskiej.

Rozprawę wieńczy rozdział „Wnioski”. Zostały one przedstawione w 5 punktach. Częściowo są jednak powtórzeniem wyników, a nie wnioskami *sensu stricto*. Najciekawszy jest wniosek 5, który *de facto* stanowi odpowiedź na cel pracy.

Dobrze dobrane „Piśmiennictwo” zawiera 129 pozycji, które zostały przedstawione w porządku alfabetycznym. Można tu odnaleźć zarówno pozycje archiwalne, jak i najbardziej aktualne, z zachowaniem właściwych proporcji. Szkoda, że autorka nie uwzględniła numeracji publikacji, co ułatwiłoby czytającemu odnoszenie się do nich podczas lektury tekstu dysertacji.

Autorka zamieściła w dysertacji 16 uporządkowanych tabel i 8 przejrzystych rycin

zamieszczonych w tekście dysertacji oraz 17 bardzo ładnych zdjęć mikroskopowych wyłączonych poza właściwy teks i uwzględnionych jako aneks nr 5.

Zasadniczym walorem pracy jest opracowanie przez doktorantkę algorytmu diagnostyczno-molekularnego raków jelita grubego, którego podstawą jest ocena IHC ekspresji białka p53 i markerów MSI (MLH1, MSH2, MSH6). Algorytm ten zezwala na wyodrębnienie tych chorych na raka jelita grubego, u których ważnym elementem etiopatogenezy tego nowotworu jest MSI, która z kolei nie jest wskazaniem do wykonania molekularnej oceny statusu genów *KRAS* i *NRAS*. Zaproponowany przez doktorantkę algorytm diagnostyczno-molekularny zezwala zatem na skrócenie ścieżki diagnostycznej i może być użytecznym elementem w doborze właściwego leczenia ukierunkowanego na cele molekularne.

Z obowiązku recenzenta muszę zaznaczyć, że w pracy doktorskiej znalazłem nieliczne błędy literowe oraz pojedyncze lapsusy językowe, o których informację przekazałem doktorantce w formie ustnej. Nie mają one jednak wpływu na wartość dysertacji, którą oceniam wysoko.

Reasumując, praca doktorska lek. Małgorzaty Kołos jest opracowaniem bardzo ciekawym i wartościowym. Bez wątpienia, wzbogaca wiedzę o biologii raka jelita grubego i prezentuje pewną wartość aplikacyjną. Spełnia ustawowe wymogi stawiane rozprawom na stopień naukowy doktora nauk medycznych. Przedłożoną mi do oceny rozprawę oceniam wysoko, wobec czego do Rady Naukowej Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie - Państwowego Instytutu Badawczego kieruję wniosek o dopuszczenie lek. Małgorzaty Kołos do dalszych etapów przewodu doktorskiego i wyróżnienie recenzowanej dysertacji.

KIEROWNIK
Kliniki Onkologii
Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

prof. dr hab. med. Marek Wojtukiewicz