

Warszawa, 2019-02-28.

Prof. dr hab. med. Włodzimierz Baranowski
I Katedra i Klinika Ginekologii i Położnictwa
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Warszawa

OCENA

rozprawy „*Zbadanie przydatności genów i białek POSTN, FN1, MFAP5 i CLASP1 jako potencjalnych markerów prognostycznych w raku jajnika*”
przedstawionej przez
mgr Katarzynę Kujawę na stopień doktora nauk medycznych

Współcześnie rak jajnika jest najtrudniejszym wyzwaniem diagnostycznym i jednym z najtrudniejszych problemów terapeutycznych w ginekologii onkologicznej, czego dowodem jest najwyższa śmiertelność pacjentek spośród wszystkich chorych na nowotwory narządu płciowego. Światowe statystyki mówią o prawie 240 tys. nowych przypadków rozpoznania raka jajnika rocznie, z czego ponad 150 tys. kobiet umiera z powodu tego nowotworu. Rak jajnika najczęściej dotyka kobiet między 5 a 8 dekadą życia, a współczynnik zachorowalności wynosi od 9 do 17/100tys i jest najwyższy w krajach wysoko rozwiniętych - w Polsce rocznie diagnozuje się około 11 przypadków raka jajnika na 100tys. kobiet. Niepokojąca jest analiza światowych danych epidemiologicznych na przestrzeni ostatnich dekad, która dobitnie wskazuje na stały wzrost liczby zachorowań na raka jajnika, przy niezmiennie wysokim odsetku zgonów. Główną przyczyną niepowodzeń leczniczych u kobiet z rakiem jajnika, oprócz swoistej biologii tego nowotworu, jest późna diagnoza - około 70% raków jajnika jest wykrywanych w bardzo zaawansowanych (FIGO III i IV) stopniach klinicznych. Przyczyną tak późnego wykrywania raka jajnika są skąpo objawowy lub wręcz asymptomatyczny przebieg choroby oraz brak metod skринingowych, umożliwiających wczesne wykrywanie choroby.

Z klinicznego punktu widzenia, nawet coraz bardziej zaawansowane i radykalne leczenie chirurgiczne, chociaż pozostaje jednym z najważniejszych czynników prognostycznych, nie gwarantuje pomyślnego przebiegu choroby u ponad 80% chorych. W

związku z powyższym główny wysiłek badawczy skierowano przede wszystkim na poznanie biologii molekularnej tych guzów w nadziei znalezienia specyficznych markerów prognostycznych i predykcyjnych, a także molekuł mogących stanowić punkty uchwytu dla nowych chemioterapeutyków. W tle tych działań jest indywidualizacja i personalizacja leczenia pacjentek z tym nowotworem. Mimo intensywnych badań pozostaje jeszcze wiele „białych plam” w kwestii jednoznacznego ustalenia sekwencji wydarzeń molekularnych i gradacji ich ważności w łańcuchu onkogenezy w raku jajnika. W ostatnich dwóch dekadach pojawiły się doskonalsze, znacząco wydajniejsze narzędzia badawcze (mikromacierze cDNA, NGS) które znacząco poprawiły możliwości techniczne, jednak nie doprowadziły do przełomu w diagnostyce i leczeniu – jedynie białko HE4 weszło na stałe do arsenału diagnostycznego. Na tym tle podjęty przez doktorantkę problem ekspresji wybranych genów i ich produktów (na poziomie mRNA i białka) i oceny ich przydatności jako markerów diagnostyczno-predykcyjnych doskonale wpisuje się we współczesny nurt badań nad tym nowotworem.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma typowy dla rozpraw doktorskich układ rozdziałów - zawiera ich 8 plus suplement, a została spisana na 128 stronach.

Pierwszy rozdział pracy został poprzedzony wykazem skrótów – z uwagi na wybitnie molekularny charakter dysertacji, z rozbudowaną nomenklaturę molekularną, uważam tę część pracy za bardzo użyteczną i ułatwiającą percepcję treści zawartych w dalszych rozdziałach – jedyna uwaga to rozwinięcie skrótu FIGO w języku angielskim a nie oryginalnie we francuskim (tak jak w tekście pracy). W pierwszym rozdziale został zawarty starannie wyselekcjonowany „ładunek” współczesnej wiedzy na temat epidemiologii oraz swoistości histologicznej raka jajnika. Za najcenniejsze części tego rozdziału uważam podrozdziały na temat mikrośrodowiska w progresji raka jajnika oraz charakterystykę wybranych przez doktorantkę genów i ich produktów białkowych (CLASP1, FN1, MFAP5 i POSTN) uzasadniającą wybór tak zwanego targetu badawczego. Trzy ostatnie białka są związane z funkcją macierzy zewnątrzkomórkowej i są prawdopodobnie istotne dla specyficznego sposobu przerzutowania w raku jajnika. Dane piśmiennicze zawarte w tej części w pełni uzasadniają wybór tych właśnie genów. Chcę podkreślić umiejętność doktorantki w selekcji „szumu” informacyjnego - Doktorantka wybór poszczególnych informacji oparła o obiektywną analizę wartości publikacji (waga czasopisma naukowego) i ich aktualności. Ta część jako całość posiada bardzo dobrze rozłożone akcenty i jest bardzo dydaktyczna w dobrym znaczeniu tego słowa.

Rozdział drugi definiuje cel pracy. Został świadomie i racjonalnie sformułowany jako element szerszego programu badawczego, a bazował na wynikach wcześniejszych badań profilu ekspresji genów w ponad 100 próbkach raka jajnika. Doktorantka zdefiniowała 3 szczegółowe cele pracy - zdaniem recenzenta jako głównie klinicysty, najważniejszy cel został zdefiniowany w punkcie trzecim – próba znalezienia związku pomiędzy ekspresją wybranych genów a cechami histologicznymi i klinicznymi. W ostatecznym zamyśle dałoby to możliwość indywidualizacji leczenia uzupełniającego.

Rozdział trzeci zawiera charakterystykę badanego materiału klinicznego oraz opisuje, zastosowane przez doktorantkę, metody badawcze, zarówno z zakresu technik molekularnych jak i metody analizy statystycznej. Zwraca uwagę fakt, że wszystkie chore pochodziły z jednego ośrodka. Jako recenzent chciałbym podkreślić ścisłą współpracę doktorantki z wiodącymi pracowniami histopatologicznymi i molekularnymi w zakresie onkologii (Warszawa, Gliwice). Taka współpraca dodatkowo gwarantuje obiektywizację i rzetelność wyników. W tym też rozdziale zwraca uwagę doskonałą jakość rycin, zwłaszcza badań immunohistochemicznych. Zdaniem recenzenta w tym rozdziale można by zrezygnować z tak szczegółowego opisywania metod otrzymywania i oczyszczania RNA, oceny jego jakości, opisu RT-qPCR i metod immunohistochemicznych – są to techniki standaryzowane i stosowane powszechnie w pracowniach biologii molekularnej. Sensowne natomiast było umieszczenie w tym rozdziale wzorcowych obrazów IHC dla poszczególnych badanych białek.

W rozdziale czwartym zawarto bardzo szczegółową, obejmującą 25 stron maszynopisu, prezentację wyników przeprowadzonych badań. Zwracają uwagę znakomitej jakości obrazy analizy IHC preparatów oraz liczne ryciny, tabele i schematy stanowiące znakomitą formę zarówno analizy jak i prezentacji wyników. Zdaniem recenzenta niektóre tabele mogłyby być prostsze (tab. 22, tab. 23) – wyniki procentowe zaokrąglone do 0.1 i rezygnacja z liczb bezwzględnych. Użyte analizy statystyczne (zarówno analiza jednoczynnikowa, jak i analizy wieloczynnikowe) pozwoliły na uzyskanie wiarygodnych wyników na podstawie których możliwe było wyartykułowanie wniosków. Dodatkowym, aczkolwiek niespodziewanym, odkryciem metodycznym Doktorantki jest fakt, że używany w eksperymencie zestaw sond do detekcji transkryptu *CLASP1* najprawdopodobniej nie wykrywa tej makromolekuły, jakkolwiek zaobserwowano silną korelację między DSF i OS a CLASP1 zarówno na poziomie ekspresji genu jak i jego produktu białkowego.

Rozdział piąty rozprawy zatytułowany „Dyskusja” to 13 stronicowa rzeczywista konfrontacja uzyskanych przez doktorantkę wyników z rezultatami badań przedstawianymi w publikacjach światowych. Doktorantka umiejętnie, a więc jasno i jednoznacznie w obszernej dyskusji porównała i zinterpretowała uzyskane przez siebie wyniki z danymi piśmiennictwa światowego. Cenną właściwością tej części pracy jest ostrożność interpretacyjna wobec uzyskanych wyników, a czasami zaznaczona i świadoma „bezradność” w wytłumaczeniu pewnych rezultatów. Ze względu na jasność wyводу i jednoznaczność wypowiedzi, w opinii recenzenta ta część dysertacji, obok przeglądu piśmiennictwa, stanowi jej najlepszą część.

Według recenzenta zasadniczą tezą o znaczącej wartości naukowej i, być może, terapeutycznej jest twierdzenie, poparte dowodami doświadczalnymi, o istotnej roli mikrośrodowiska w progresji raka jajnika – w nieodległej przyszłości może to stanowić potencjalny cel terapeutyczny. Inną tezą Doktorantki udokumentowaną uzyskanymi wynikami badań jest korelacja między obecnością martwicy a DSF i OS - odmiennie od innych nowotworów, w raku jajnika nieobecność martwicy jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. Z recenzenckiego punktu widzenia istotny jest też wniosek o korzystnym wpływie maksymalnego zakresu operacji cytoredukcyjnej na przebieg choroby nowotworowej w tej grupie chorych. To stwierdzenie jest kolejnym potwierdzeniem konieczności dalszego doskonalenia umiejętności operacyjnych i wypełniania standardów protokołów operacyjnych w raku jajnika.

Mimo że praca ma układ prawie typowy dla dysertacji doktorskich, brak w niej wyraźnie wyodrębnionych wniosków. Zostały one omówione w podrozdziale „Podsumowanie”

Rozdział szósty i siódmy to dosyć obszerne streszczenie odpowiednio w języku polskim i angielskim – ta wersja wymaga korekty językowej. Wydaje się że tytuły streszczeń, zarówno w języku polskim jak i angielskim są bardziej poprawne niż tytuł rozprawy – razi zwłaszcza wyraz „Zbadanie”

Rozdział ósmy to spis aktualnego i historycznego piśmiennictwa – stanowi on istotne i cenne wzbogacenie prezentowanej pracy. Doktorantka zacytowała prawie 150 prac – w opinii recenzenta wykazała się umiejętnością selekcji, co w erze Internetu może nastęrczać dużych trudności. Rozprawa napisana jest bardzo poprawnym językiem, bez błędów literowych co świadczy i o skrupulatności doktorantki jak i o dużym wkładzie pracy włożonym w opracowanie dysertacji.

Wnioski końcowe

Doktorantka podjęła temat badawczy niezwykle interesujący z naukowego punktu widzenia i bardzo ważny klinicznie, niezwykle pracochłonny, trudny metodycznie. Efektem tej pracy jest bardzo dobra merytorycznie, technicznie opracowana bez zarzutu dysertacja doktorska. Biorąc powyższe pod uwagę stwierdzam, że spełnia ona wszystkie ustawowe wymogi stawiane rozprawom doktorskim i tym samym jest podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora nauk medycznych. Przedkładam zatem Wysokiej Radzie Naukowej Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie wniosek o dopuszczenie mgr Katarzyny Kujawy do dalszych części przewodu doktorskiego. **Jednocześnie, biorąc pod uwagę wymienione powyżej zalety tej pracy, wnioskuję o jej wyróżnienie.**

Prof. dr hab. med. Włodzimierz Baranowski