

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana lekarza medycyny Stanisława Supplitt pt. „Analiza transkryptomu w komórkach raka piersi – poszukiwanie markerów prognostycznych u pacjentek z różną odpowiedzią na leczenie”.

Leczenie TNBC ciągle stanowi wyzwanie dla onkologów. Jednym z powodów jest znaczna heterogenność tego podtypu nowotworów oraz ich duża dynamika progresji. Dodatkowo obecnie stosowane schematy chemioterapii mają ograniczoną skuteczność co prowadzi do wczesnej wznowy oraz postępu choroby, która kończy się zwykle fatalnie dla pacjentki. W niniejszej Dysertacji Doktorant podejmuje właściwy cel badań kompleksowych z zastosowaniem sekwencjonowania następnej generacji (RNA-Seq) w celu zróżnicowania TNBC, które uzyskały pCR w porównaniu do tej grupy pacjentek, gdzie terapia nie odniosła korzyści terapeutycznych. W wyniku przeprowadzonej zaawansowanej analizy Doktorant wytypował 9 genów, których ekspresja różniła się pomiędzy ww. grupami klinicznymi.

Przedstawiona do oceny praca doktorska liczy 101 stron. Ma budowę typową dla tego typu prac. Tekst uzupełniają oraz wzbogacają 6 tabel i 4 ryciny oraz jedna rycina schematyczna. Piśmiennictwo liczy 259 pozycji! Na końcu pracy są dołączone wykazy tabel oraz wykaz rycin i schematów.

WYKAZ SKRÓTÓW

W objaśnieniu skrótu: *MLPA – multiplex ligase-dependent probe amplification – amplifikacja sond zależna od ligacji* - drobny błąd “zależna” a powinno być “zależna”

WSTĘP

Wstęp rozpoczyna bardzo dobry i zwięzły opis globalnej oraz polskiej epidemiologii nowotworów. Następnie Doktorant słusznie zauważył, że wrastająca liczba nowych przypadków nowotworów wymaga zwiększenia wykrywalności poprzez zastosowanie nowoczesnych badań molekularnych, które umożliwiają wczesne wykrycie nowotworów oraz zaplanowanie leczenia poprzez poznanie molekularnego podłoża guza, a tym samym zastosowanie terapii celowanej. Wstęp jest napisany dobrze i przejrzysto oraz logicznie wprowadza czytelnika w zagadnienie.

NOWOTWORY JAKO HETEROGENNA GRUPA CHORÓB

W pierwszej części tego rozdziału Doktorant przedstawia przyczyny powstawania heterogenności nowotworów. Sygnalizuje heterogenność na poziomie pacjentów z tym samym rozpoznaniem histopatologicznym i heterogenność wewnątrz guza nowotworowego danego pacjenta oraz zmiany kompozycji molekularnej guza w trakcie przebiegu choroby. Rozdział kończy słuszne wskazanie przez Doktoranta na ciągłą ewolucję guza jako przyczynę niepowodzenia leczenia pomimo stratyfikacji chorych do terapii celowanej przed rozpoczęciem leczenia.

RAK PIERSI

Doktorant zaczyna ten rozdział od zwięzłego opisu epidemiologii oraz czynników ryzyka rozwoju raka piersi. Dalej wskazuje na heterogenności podtypów histopatologicznych oraz molekularnych raka piersi. W następującym podrozdziale Doktorant w punktach wymienia i opisuje czynniki ryzyka. Pewien drobny niedosyt pozostawia informacja o paleniu tytoniu bez podania odsetka ryzyka tj. „*generuje większe ryzyko rozwoju* [25].” zwłaszcza w kontekście zwiększającego się udziału kobiet korzystających z tej używki. Następny podrozdział Doktorant poświęca na charakterystykę protoonkogenów, który dodatkowo wzbogaca tabelką. Potem omawia znaczenie genów *HER2*, *RAS* oraz *c-MYC* w kancerogenezie raka piersi. W następnych podrozdziałach opisuje dziedziczne predyspozycje do rozwoju raka piersi oraz szczegółowo omawia kryteria kliniczno – rodowodowe stosowane w poradnictwie genetycznym. W tym fragmencie tekstu jest drobny błąd: „Do rozwoju nowotworu uwarunkowanego dziedziczną predyspozycją do konieczne są dwie mutacje:” w postaci dodatkowego „do”. Tę część dysertacji Doktorant kończy omówieniem ryzyka sporadycznego raka piersi.

W następnych podrozdziałach przejrzyście Doktorant przedstawia diagnostykę raka piersi w tym wywiad, badanie palpacyjne, badania obrazowe, biopsje czy badanie śródoperacyjne. Wymienia kolejno i opisuje podtypy histopatologiczne raka piersi wg. klasyfikacji WHO oraz omawia znaczenie badania immunohistochemicznego w ocenie ekspresji receptorów ER, PgR, *HER2* oraz ekspresji Ki-67. W kolejnym podrozdziale Doktorant zwięźle opisuje podtypy molekularne raka piersi wyróżnione na podstawie analizy ekspresji genów oraz odpowiadające im podtypy histomolekularne zdefiniowane za pomocą metod immunohistochemicznych, czyli tzw. klasyfikacja St. Galen. Następnie Doktorant szczegółowo opisuje biologię oraz strategię leczenia potrójnie ujemnego raka piersi, równocześnie wskazuje, na heterogenność tej grupy raków piersi jako powód braku

skuteczności zastosowanego leczenia. Doktorant przedstawia wyróżnione na podstawie badań cztery podtypy TNBC LAR oraz basal-like immunoactivated, basal-like immunosuppressed oraz mezenchymalny). Na koniec Doktorant wskazuje, że warunkiem skutecznego leczenia TNBC jest dokładne zdefiniowanie subtypów molekularnych. W następnym podrozdziale Doktorant opisuje szczegółowo możliwości terapeutyczne w poszczególnych podtypach raka piersi. Ostatnią część tego rozdziału Doktorant poświęcił zastosowaniu analizy transkryptomu w onkologii. Rozdział ten jest uporządkowany w postaci omówienia sześciu zagadnień, gdzie RNA-Seq ma zastosowanie: odkrywanie nowych biomarkerów, klasyfikacja, prognoza, monitorowanie skuteczności leczenia, personalizacja terapii oraz rola w immunoterapii. Tutaj pojawia się drobny błąd edytorski tj. ostatnie zagadnienie powinno być oznaczone numerem 6 a nie 7. Rozdział ten wieńczy tekst, gdzie Doktorant opisuje potrzebę identyfikacji nowych biomarkerów z wykorzystaniem transkryptomiki zgrabnie popierając swoje stwierdzenie przykładami z piśmiennictwa dotyczącymi raka jajnika oraz raka jelita grubego. Następnie w krótkim akapicie przystępnie opisuje metody bioinformatyki mające zastosowanie w analizie danych transkryptomicznych. Reasumując rozdział ten jest dobrze napisany i świadczy o dobrej znajomości tematu przez Doktoranta. Jednakże ten rozdział jest zbyt szczegółowy i powinien być o połowę krótszy. Obecnie zajmuje 35 stron (od 13 do 48 strony). Sugeruje przygotowanie pracy poglądowej na podstawie tego rozdziału.

CEL PRACY

Cel pracy doktorskiej jest bardzo jasno przedstawiony w pierwszych dwóch akapitach, a dodatkowo są ustrukturyzowane w postaci trzech punktów.

CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ

W tym rozdziale Doktorant przedstawia zwięzłą charakterystykę 46 pacjentek chorych na TNBC włączonych do badania.

MATERIAŁ I METODY

Rozdział Doktorant rozpoczyna od opisu procedury pobrania materiału tkankowego z wykorzystaniem biopsji gruboigłowej lub mamotomicznej. Potem Doktorant płynnie przechodzi do opisu zastosowanego leczenia przedoperacyjnego oraz oceny odpowiedzi wg.

RECIST 1.1 Dodatkowo tekst uzupełnia tabela zawierająca informacje dotyczące wieku pacjentek w chwili diagnozy, TNM przed i po leczeniu oraz odpowiedzi na zastosowane leczenie. W następnym podrozdziale jest opisana metodyka pozyskania danych zdeponowanych w bazach. Doktorant szczegółowo opisuje metodykę postępowania z materiałem, izolację RNA, przygotowania biblioteki oraz sekwencjonowania NGS (RNA-Seq). Całość opisu uzupełnia czytelny schemat. W kolejnym akapicie Doktorant opisuje obróbkę wstępną danych uzyskanych z RNA-Seq oraz opisuje proces integracji z danymi uzyskanym z baz danych oraz analizę statystyczną. W tym fragmencie odczuwa się brak schematycznego rysunku przedstawiającego całą integrację oraz analizę bioinformatyczną danych. Zwraca tutaj uwagę fakt wykorzystania różnorodnych i zaawansowanych metod obliczeniowych i testów poczynając od przygotowania danych, poprzez wytworzenie klasyfikatora, a skończywszy na korelacji uzyskanych profili z danymi klinicznymi. W tym rozdziale jest drobny błąd interpunkcyjny w postaci „,” po zdaniu (...) z *przeżywalnością całkowitą (overall survival – OS)*. a przed *w próbkach raka piersi pochodzących z TCGA*.

Resumując metodologia jest opisana klarownie i pomimo drobnych uchybień edytorskich ten fragment Dysertacji świadczy o poprawnie zaplanowanej i przeprowadzonej pracy laboratoryjnej oraz obrazuje bardzo duży wysiłek Doktoranta włożony w wykonanie niniejszej pracy a zwłaszcza w zastosowany potężny aparat bioinformatyczny.

WYNIKI

Wyniki badań przedstawiono w sposób jasny i klarowny. Tekst jest ilustrowany tabelami i wykresami. Odzwierciedla to systematyczny i bardzo duży wysiłek włożony przez Doktoranta w przedstawienie wyników.

Początek rozdziału poświęcony analizie częstości pCR w zaklasyfikowanych subtypach molekularnych badanych próbek (46) z wykorzystaniem klasyfikatora NTP uczonego na danych TCGA. Analiza jaką przeprowadził Doktorant zaklasyfikowała 13 badanych próbek jako podtyp LAR i 31 próbek jako podtyp non-LAR. W przypadku dwóch próbek uzyskano zbyt niską pewność predykcji. pCR zdecydowanie częściej (21, 84%) w podtypie non-LAR w porównaniu do LAR (4, 16%). Jednakże wyniki uzyskane przez Doktoranta nie były istotne statystycznie (0,054). Dodatkowo w następnym rozdziale wykonane porównanie jakości RNA wyizolowanego z materiału (FFPE) z własnej raków piersi do RNA pochodzącego z bazy TCGA (świeża tkanka) wskazuje na brak różnic pomiędzy tymi materiałami. Analiza ekspresji genów przeprowadzona przez Doktoranta wykazała, że 105 genów (6 obniżona ekspresja, 99

podwyższona ekspresja) wykazuje statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami pacjentów z RR a pCR. Dalsza analiza przeprowadzona przez Doktoranta wykazała, że 42 geny są związane z wrażliwością linii komórek raka piersi na: docetaksel, doksorubicynę, paklitaksel i cyklofosfamid. Następnie Doktorant wykorzystując trzy bazy danych zawierające dane single-cell RNA-seq pierwotnego raka piersi ustalił, że 24 z 42 genów ulegały silnej lub umiarkowanej ekspresji w komórkach nowotworowych. W kolejnym kroku Doktorant analizował wpływ wytypowanych 24 genów na OS pacjentek pochodzących z bazy TCGA co umożliwiło wykazanie związku 7 genów z krótszym OS oraz dwóch z dłuższym OS.

Jak wskazuje lektura rozdziału „Wyniki” procedury analityczne zostały poprawnie zaplanowane oraz układają się w logiczny ciąg. Na uwagę zasługuje również porównanie jakości RNA izolowanych przez Doktoranta, które zostało uwiarygodnione porównaniem z jakością RNA próbek pochodzących z bazy TCGA. Świadczy to o wysokim standardzie prowadzonych badań.

DYSKUSJA

Dyskurs naukowy jest prowadzony poprawnie. Na początku Dyskusji Doktorant przedstawia logiczne przesłanki o konieczności podjętego przez Siebie tematu Dysertacji. Następnie Doktorant wymienia znane czynniki genetyczne mające związek z opornością na chemioterapię umiejętnie cytując piśmiennictwo. W tym fragmencie jest drobna literówka w „(...) nadrodziny białe ABC” brakuje w wyrazie białek litery „k”. Doktorant płynnie przechodzi do omówienia swoich wyników tj. wytypowanych 9 genów na podstawie różnic w ekspresji w oparciu o opublikowane piśmiennictwo. Białka kodowane przez wspomniane geny wchodzące w skład profilu wytypowanego przez Doktoranta uczestniczą w szeregu procesów takich jak transport ksenobiotyków przez transportery ABC (ABCA3, ABCC11), cytochromów (CYB5A) oraz białek kontrolujących polaryzację komórek (KCNE4). Również wyniki uzyskane przez Doktoranta dotyczące *ApoD*, *ARHGEF38* i *SPDEF* są zgodne z piśmiennictwem, jako obiecujące biomarkery prognostyczne niekorzystnej prognozy w przypadku raka piersi. Następnym genem wytypowanym przez Doktoranta jest *MUCL1*, który również jest związany z opornością na chemioterapię oraz złym przebiegiem choroby, poprzez indukcję przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego. Ostatnim genem wchodzącym w skład profilu uzyskanego przez Doktoranta jest gen *PRR15*, którego znaczenie jest nie wyjaśnione a kwerenda piśmiennictwa przeprowadzona przez Doktoranta wskazuje na sprzeczne doniesienia ws. funkcji tego genu. Warto podkreślić, że Doktorant w całej Dyskusji umiejętnie korzysta z

danych literaturowych, solidnie podpierając wnioski opublikowanymi badaniami, co zwiększa wiarygodność prezentowanych wyników. Resumując wytypowany przez doktoranta panel genowy niesie ze sobą duży potencjał diagnostyczny. W związku z powyższym można uznać temat jak i całą pracę za nowatorską.

Uzyskane wyniki są więc przyczynkiem do dalszego fermentu intelektualnego, którego rezultatem jak miemam być dalsze badania, w tym walidacji ekspresji wytypowanego profilu na szerszej grupie TNBC z wykorzystaniem np. metody RT-qPCR. Prowadzenie badań nad TNBC jest wielce uzasadnione, ponieważ wciąż wyniki leczenia tego podtypu znacznie jak słusznie napisał we Wstępie Doktorant odbiegają od reszty podtypów raka piersi. Cel jaki i temat badań powziętych przez Doktoranta są więc wielce uzasadnione.

WNIOSKI

Wnioski odpowiadają na założone cele i świadczą o dobrej konstrukcji całej pracy. Prace uzupełnia poprawnie skonstruowane i zwarte streszczenie w języku polskim i angielskim. Dysertację wieńczy uporządkowane 259 pozycji piśmiennictwa oraz Wykaz tabel i wykresów.

Resumując należy podkreślić, że całość badań została bardzo dobrze zaplanowana i profesjonalnie przeprowadzona. Świadczy to o dobrej organizacji pracy oraz dobrym "warsztacie naukowym" Doktoranta. Dla realizacji zamierzonych celów doktorant wykorzystał zaawansowane techniki biologii molekularnej oraz złożoną i kompleksową analizę bioinformatyczną. Wyniki zostały przedstawione za pomocą licznych ilustracji, tabel i wykresów.

W mojej ocenie rozprawa doktorska Pana lekarza medycyny Stanisława Supplitt spełnia wymogi stawiane tego typu rozprawom i zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Medyczne Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o dopuszczenie Pana lekarza medycyny Stanisława Supplitt do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w Art. 187 ust. 1-4 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tj. Dz.U. z 2018r, poz.1668).