

UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
I Katedra Chirurgii Ogólnej
i Klinika Chirurgii Ogólnej,
Onkologicznej i Gastroenterologicznej
ul. Kopernika 40, 31-501 Kraków

Dr hab. n. med. Antoni Szczepanik

I Katedra Chirurgii

Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego

W Krakowie

Recenzja

Otrzymana do recenzji praca doktorska jest zatytułowana „*Nadekspresja ARID1A/BAF250a w raku inwazyjnym gruczołu piersiowego*”, a jej autorem jest lekarz Łukasz Szpon. Promotorem pracy jest dr hab. Anil Kumar Agrawal, prof. nadzw., drugim promotorem prof. dr hab. Michał Jeleń, a badania przeprowadzono w Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu.

Praca dotyczy ważnego i aktualnego tematu zaburzeń epigenetycznych w patogenezie i przebiegu raka piersi. Koncepcja mutacji genowych jako czynnika prowadzącego do rozwoju raka lub wpływających na przebieg choroby i rokowanie jest znana od wielu lat. Znacznie później zwrócono uwagę na czynniki epigenetyczne, a więc te, które wpływają na odczytywanie materiału genetycznego komórki. Należą do nich metylacja DNA, acetylacja, deacetylacja i metylacja histonów, a w końcu produkcja białek determinujących modelowanie chromatyny. Te główne, ale nie jedyne mechanizmy epigenetyczne wpływają na aktywację protoonkogenów czy dezaktywację genów supresorowych. Zjawiska te nie są dotąd dobrze poznane w przypadku poszczególnych nowotworów, dlatego projekt badania i jego temat są bardzo interesujące i potencjalnie mogą wnieść nowe fakty w badania nad patogenezą raka piersi. *De facto* zaburzenia ekspresji białka BAF250a

są efektem mutacji genu ARID1a, co jest przykładem nakładania się mutacji genowych i zmian epigenetycznych. Mutacje genu ARID1a najczęściej prowadzą do zahamowania ekspresji produkowanego białka, stąd większość badaczy ocenia ekspresję białka jako wykładnik mutacji genu. Powyższe rozważania potwierdzają celowość i aktualność tematu badań.

Przedstawiona praca ma charakter klasycznej rozprawy doktorskiej. Dzieli się na wstęp, założenia i cel pracy, omówienie materiału i metod, wyniki, dyskusję i wnioski. Pracę kończą streszczenia w języku polskim i angielskim, piśmiennictwo i spis tabel i rycin. Liczy 52 strony tekstu, zawiera 9 rycin i 11 tabel. W pracy autor powołuje się na 72 pozycje piśmiennictwa, w większości międzynarodowego, obejmującego ważniejsze pozycje z ostatnich lat. Piśmiennictwo cytowane jest właściwie, choć kolejność alfabetyczna spisu literatury i utrzymanie jednolitego formatu cytacji nie jest dla autora priorytetem. Również spis tabel w pozycji 2 i 3 cytuje tę samą tabelę co nie jest zgodne ze stanem faktycznym. Układ pracy jest przejrzysty i prawidłowy, a poszczególne podrozdziały ułożone są w logicznym porządku. Język w większości jest poprawny, a wywód logiczny.

Przed wstępem doktorant zamieszcza spis treści. Z obowiązku recenzenta zwracam uwagę że mylnie podaje tytuł podrozdziału 1.6, który w tekście pracy brzmi „Klasyfikacja histologiczna WHO” i ten tytuł byłby prawidłowy. Po spisie treści następuje spis najważniejszych skrótów. Ta część wymagałaby głębszego zastanowienia, bo tłumaczenie niektórych ze skrótów jest niespójne. Na przykład najważniejszy dla pracy skrót ARID1A jest źle przetłumaczony, natomiast znacznie lepsze jego tłumaczenie znalazłem na stronie 19 w wierszu 14 i 15. Zdaję sobie sprawę z niezwyklej trudności tłumaczeń bardzo hermetycznych skrótów specjalistycznych, a i ocena jakości tłumaczenia może być bardzo subiektywna. Natomiast powtarzając tłumaczenie lub rozwijając skrót w tekście pracy, za każdym razem należy stosować to samo brzmienie.

Autor we wstępie pracy po zwięzłym uzasadnieniu wyboru tematu badań przechodzi do omówienia problematyki związanej z rakiem piersi. Ciekawie przedstawia rys historyczny rozpoznawania i leczenia tego nowotworu. Na stronie 7 wyraża opinię, że zmodyfikowana radykalna mastektomia stanowi standard postępowania w raku piersi do chwili obecnej. Taki pogląd jest pewnym nadużyciem, gdyż w chirurgii raka

piersi dąży się od około 20 lat do ograniczenia interwencji chirurgicznej zarówno w zakresie gruczołu piersiowego jak i układu chłonnego. Żadne poważne zalecenia w krajach rozwiniętych nie zalecają zabiegu Pateya czy jego modyfikacji jako standardu.

W podrozdziale 1.4 doktorant umieszcza biopsję aspiracyjną cienkoigłową węzłów chłonnych wśród badań histopatologicznych, a powinno się ją wymienić w grupie badań cytologicznych. Następujący podrozdział 1.5 w mojej opinii powinien być poszerzony o omówienie klasyfikacji patologicznej raka piersi. Autor omawia tam klasyfikację kliniczną, a w tabeli 1 zatytułowanej klasyfikacja kliniczna umieszcza klasyfikację kliniczno-patologiczną. Zabieg ten nie jest w żaden sposób skomentowany i wprowadza czytelnika w błąd.

Część druga wstępu dotyczy budowy chromatyny i mechanizmów regulujących odczytywanie informacji genetycznej. Doktorant szczególnie skupia się na roli kompleksu SWI/SNF. Omawia w tym kontekście rolę białka ARID1A i innych składowych wyżej wymienionego kompleksu. Przedstawiony stan wiedzy świadczy o dogłębnym zapoznaniu się autora z literaturą przedmiotu. Poszczególne zagadnienia opisuje w sposób przemyślany i w miarę przystępny. W tej części można dopatrzeć się jedynie niewielkich niezręczności, jak na przykład użycie na stronie 21 terminu „geny normalnie represjonowane przez chromatynę”. Nie wpływa to jednak na pozytywną ocenę tej części rozprawy doktorskiej.

Kolejna część obejmuje założenia i cel pracy. Autor już wcześniej przedstawił założenia teoretyczne pracy i w części trzeciej podaje kilka ogólnych stwierdzeń uzupełniających założenia. Precyzuje również cel pracy, którym jest (cytuję): „zbadanie nadekspresji białka BAF250A, które jest integralnym członkiem ludzkiego kompleksu SWI/SNF, w raku gruczołu piersiowego oraz jego związku z klinicznym przebiegiem, cechami patologicznymi, jak również określeniem rokowania chorych na ten nowotwór złośliwy.” Świadomie cytuję cel pracy, gdyż ma to związek z kilkoma komentarzami i pytaniami do przedstawionej pracy.

Po pierwsze wyjaśnienia wymaga dlaczego autor bada nadekspresję białka BAF250A w nowotworze, podczas gdy dotychczasowe badania mówią „In human cancer, ARID1A possesses not only features of a gatekeeper, regulating cell cycle progression, but also features of a caretaker, preventing genomic instability (Wu RC

i wsp *Cancer Biol Ther* 2014)”, czyli, że ekspresja tego białka ma ogólnie rzecz biorąc działanie hamujące rozwój nowotworu. Znakomita większość badaczy ocenia obniżenie ekspresji. Po drugie: jak będzie definiował „nadekspresję” ?.

Kolejne pytania i uwagi będą przedstawione w kontekście wyników.

Czwartą część pracy stanowi materiał i metody. W tej części autor wyczerpująco omawia metodykę badania immunohistochemicznego ekspresji ARID1A w preparatach parafinowych. Kolejne kroki procedury opisane są bardzo dokładnie. Natomiast wątpliwość budzi informacja o 92 zdrowych próbkach kontrolnych. Doktorant nie definiuje skąd pobrał materiał, czy są to próbki z tkanek piersi nieobjętych nowotworem od tych samych chorych, czy może innych tkanek, czy tkanek od innych chorych? Brak takiej informacji uważam za niedopatrzenie.

Część piątą pracy rozpoczyna omówienie wyników badań. Wyniki przedstawione są w formie rozbudowanych tabel i wykresów, a także syntetycznie opisane. Nie wiem jakie było uzasadnienie dla przedstawienia tabel wyłącznie w języku angielskim, skoro praca napisana jest po polsku. W tabeli 3 doktorant wskazuje też, że analizował 12 przypadków raka nieinwazyjnego (czyli około 10% badanej grupy) podczas gdy temat pracy wyklucza takie przypadki. W badanej grupie średnią wartość ekspresji oceniono na 79,4 %, podczas gdy w grupie kontrolnej na 64,5%. Różnica między tymi grupami była znamienna statystycznie. Doktorant dokonał analizy związków statystycznych wybranych czynników klinicznych z ekspresją białka ARID1. Nie stwierdzono różnic w ekspresji badanego czynnika pomiędzy różnymi grupami wiekowymi, w zależności od statusu menopauzalnego czy lokalizacji guza pierwotnego. Ekspresja ARID1A nie różniła się również pomiędzy guzami o różnej wielkości czy typie histologicznym. Wprawdzie autor nie porównuje bezpośrednio różnic pomiędzy stopniami zaawansowania wg klasyfikacji TNM, ale z przedstawionych danych można wnosić, że nie ma w badanej grupie różnic w ekspresji ARID1 również między stopniami zaawansowania. Pewną trudność w statystycznej identyfikacji różnic pomiędzy podgrupami jest nierównomierny rozkład poszczególnych czynników. Przykładowo brak jest guzów T3, a tylko u jednej pacjentki stwierdzono guz T4. Podobnie, większość stanowią pacjentki z zaawansowaniem węzłowym N0 i N1, 109 ze 119 osób. W otrzymanym egzemplarzu pracy nie znalazłem w wynikach danych o statusie receptorowym

guzów. Prawdopodobnie tabele te zostały przypadkowo usunięte, gdyż w dyskusji i wnioskach autor powołuje się na te wyniki. Również nie stwierdza zależności pomiędzy ekspresją receptorów estrogenowych i progesteronowych a ekspresją ARID1A. Naturalnym uzupełnieniem prezentowanych badań byłaby analiza ekspresji ARID1A jako czynnika rokowniczego. Kilkakrotnie poszukiwałem tej analizy, bo przywołany wcześniej cel pracy sugerował rozważania o rokowaniu chorych w kontekście ekspresji BAF250a/ARID1A. Jednak jej brak nie dyskredytuje przedstawianej pracy.

Doktorant w dyskusji analizuje uzyskane wyniki w kontekście danych z literatury. Jest to zadanie trudne, bo większość wyników badań z literatury przedmiotu jest przeciwstawna. Taki stan rzeczy może wynikać z faktu, że obniżenie ekspresji ARID1A obserwowane jest u 2-6% chorych w zależności od badanej grupy. Dlatego głównie analiza w rozprawie doktorskiej dotyczyła chorych z wysoką ekspresją ARID1A, co rzutowało na rezultaty. Autor wykazał umiejętność krytycznego spojrzenia na uzyskane wyniki, ale też potrafił znaleźć dla nich prawdopodobne teoretyczne uzasadnienie. Wnioski kończące pracę zostały wyciągnięte logicznie i są sformułowane w sposób prawidłowy.

Podsumowując przedstawioną mi do recenzji pracę stwierdzam, że jest to rozprawa oparta o interesujące założenia i porusza ważny i nie do końca zbadany problem. Wnosi nowe informacje do stanu wiedzy nad rolą mechanizmów epigenetycznych w raku piersi. W całości oceniam pracę lekarza Łukasza Szpona pozytywnie pomimo uwag i pytań zawartych w tej recenzji. Wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Lekarsko-Stomatologicznego Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu o dopuszczenie kandydata do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Uważam, że publiczna obrona tej rozprawy będzie właściwym miejscem dla przedyskutowania poruszonych przeze mnie problemów.

Kraków 9 lutego 2019

