

Prof. dr hab. med. Wojciech Biernat
Katedra i Zakład Patomorfologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk, dnia 9 maja 2014 roku

**Ocena pracy doktorskiej lek. Michała Bieńkowskiego zatytułowanej
„Znaczenie amplifikacji EGFR w glejaku wielopostaciowym”**

Glejak wielopostaciowy (*glioblastoma*, GB) jest najczęstszym i najbardziej złośliwym pierwotnym nowotworem ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Jego złe rokowanie i wynikające stąd częste niepowodzenia kliniczne u leczonych chorych z tym nowotworem powodują niegasnące zainteresowanie neuropatologów oraz onkologów zajmujących się terapią guzów OUN. Postępy w leczeniu tego guza są zauważalne w ostatniej dekadzie i w dużej mierze wynikają z poszerzenia naszej wiedzy o molekularnym podłożu rozwoju tego glejaka. Można tu przede wszystkim wymienić rolę jaka w terapii w leczeniu skojarzonym odgrywa metylacja genu kodującego metylotransferazę O⁶-metyloguanylo-DNA (MGMT). Niebagatelną sprawą jest także ocena pełni zaburzeń molekularnych (profil genetyczny guza), który może determinować zarówno rokowanie, jak i wpływać na konkretne, indywidualne decyzje terapeutyczne u chorych z GB. W ten szeroki strumień badań wpisuje się przedstawiona mi do oceny rozprawa na stopień doktora nauk medycznych lekarza Michała Bieńkowskiego. Wbrew tytułowi pracy, Doktorant nie skoncentrował się w swoich badaniach tylko nad amplifikacją genu *EGFR* w GB, ale także podjął się zadania korelacji tego zaburzenia z innymi, dość często występującymi alteracjami molekularnymi w tym nowotworze. Znajduje się bowiem w tym badaniu także analiza mutacji genów *TP53* oraz *IDH1* i delecje genu *CDKN2a/p16* wraz z analizą ekspresji wariantu 3 genu *EGFR* (EGFRvIII, zwanego także de2-7EGFR lub deltaEGFR).

Przedstawiona mi do oceny rozprawa ma układ niezbyt typowy dla tego rodzaju publikacji. Jest bowiem dokładnym tłumaczeniem publikacji, jaka ukazała się w czasopiśmie PLOS ONE, którą opublikowano w roku ubiegłym (2013; 8:e65444). Zawiera ona wersję polską i angielską pracy umieszczone na 57 stronach wraz z kserokopią oryginału, która stanowi załącznik do rozprawy.

Forma przedstawienia rozprawy na stopień doktora nauk medycznych, jaką dopuszcza obecna modyfikacja ustawy - Prawo o szkolnictwie wyższym, ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 18 marca 2011 roku – czyni moją rolę recenzenta niewątpliwie łatwiejszą, gdyż wspomniana publikacja Doktoranta przeszła już etap recenzji w trakcie publikacji w renomowanym czasopiśmie PLOS ONE. Skupię się zatem na najważniejszych z mojego punktu widzenia walorach i niedostatkach, jakie w niej znajduję. Niewątpliwie najistotniejszą kwestią zawartą w publikacji i rozprawie lek. Bieńkowskiego jest uwypuklenie zjawiska polisomii *EGFR*, jako niosącego potencjalne implikacje terapeutyczno-kliniczne dla chorych z GB. Była ona bowiem negatywnym czynnikiem u chorych z amplifikacją *EGFR*, czego nie stwierdzono w grupie bez amplifikacji. Jej rozpoznanie umożliwia opracowana metoda analizy ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR), alternatywna dla metody FISH, która stanowi indywidualne osiągnięcie Doktoranta i jeden z głównych tematów zawartych w jego publikacji i rozprawie.

Jak wspomniałem układ rozprawy jest odzwierciedleniem publikacji w PLOS ONE, i w związku z tym wstęp jest bardzo zwięzły, co moim zdaniem może powodować pewien niedosyt, gdyż rozprawa doktorska, pozbawiona ograniczeń objętościowych charakteryzujących artykuły w czasopiśmie, stanowi także pewne monograficzne źródło wiedzy na temat, którego doktorat dotyczy.

Materiał do badań Doktoranta stanowiły fragmenty tkankowe wycinków z guzów mózgow pobranych operacyjnie od 83 chorych z GB. Opis metodyki zawiera charakterystykę uzyskania DNA i RNA (oraz cDNA) z tkanki świeżo mrożonej. Doktorant opisał także metodę oceny liczby kopii genu *EGFR* ilościowym PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR), zarówno standardową, jak i tę zaplanowaną i wykonaną przez siebie, oraz metodą hybrydyzacji in situ (FISH). Tę ostatnią wykonał na preparatach z odpowiednich przypadków, które były procesowane rutynowo, tzn. utrwalane w formalinie i zatopione w formę bloków parafinowych. Należy podkreślić wysokie standardy warsztatowe pracy, do których należy m.in. analiza materiału poddawanego analizom molekularnym pod kątem zawartości tkanki guza. Ogranicza to bowiem efekt „rozcieńczenia” DNA nowotworowego przez elementy nienowotworowe podścieliska i nacieku zapalnego. Znacząco zmniejsza to uzyskanie błędnych wyników analiz genetycznych.

Część metodyczną kończy opis techniki sekwencjonowania genów *IDH1* i *TP53* w celu wykrycia ich mutacji oraz metodę qRT-PCR zastosowaną do oceny utraty *CDKN2a* oraz ekspresji *EGFRvIII*.

Najistotniejszymi wynikami uzyskanymi przez Doktoranta było stwierdzenie związku amplifikacji genu *EGFR* z gorszym rokowaniem u chorych w młodszym wieku i poddanych radioterapii oraz dłuższego przeżycia chorych z delecją *CDKN2A* jedynie w przypadku obecności amplifikacji *EGFR*.

Dyskusja jest dość zwięzła i merytoryczna. Zawiera bowiem istotne kwestie dotyczące uzyskanych wyników i w sposób wyważony konfrontuje je z dostępnym piśmiennictwem. Ostrożność w formułowaniu ocen i poprawny dobór tego

piśmiennictwa świadczą moim zdaniem o dojrzałości naukowej i krytycyzmie lek. Bieńkowskiego, także w stosunku do uzyskanych przez siebie wyników.

Reasumując, nie mam większych zastrzeżeń do strony merytorycznej opisanych badań nad zaburzeniami molekularnymi w analizowanej serii chorych z GB. Można sugerować, że pewnym niedostatkim jest brak analizy stanu genu MGMT, gdyż, jak wspomniałem na wstępie, jego aktywność może wywierać wpływ na długość przeżycia tych chorych w przypadku stosowania leczenia uzupełniającego. Zastrzeżenia te jednak nie wpływają negatywnie na mają bardzo pozytywną ocenę całości rozprawy.

Z mniej istotnych uwag należy wspomnieć nieliczne nieprawidłowości redakcyjne wynikające z tłumaczenia tekstu z oryginalnej pracy anglojęzycznej na język polski, które znalazłem w pracy Doktoranta.

Po szczegółowej ocenie przedstawionej mi pracy lek. med. Michała Bieńkowskiego, jestem przekonany, że pomimo wspomnianych uwag krytycznych spełnia ona w pełni wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych. Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lekarza Michała Bieńkowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, ze względu na wysoki poziom merytoryczny, optymalny dobór metodyki badań oraz zwięzły, jasny i zrozumiały sposób przekazu, jak również opublikowanie jej w renomowanym czasopiśmie (IF=3.730), wnoszę o wyróżnienie niniejszej pracy.

