

Warszawa, dn. 13.09.2019

## Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. Bartłomieja Tomasika

p.t. „*Identyfikacja i zastosowanie krążących mikroRNA w monitorowaniu powikłań radioterapii u chorych na raka gardła środkowego*”

**Ocena wyboru tematu dysertacji:** Wybrany przez Doktoranta temat rozprawy jest ważny z praktycznego punktu widzenia oraz wpisuje się w aktualny kierunek poszukiwań w badaniach translacyjnych dotyczących radioterapii u chorych na raka gardła środkowego.

Składa się to na ostatnio szeroko badaną tematykę „*personalized dose prescription*”. Przy takim indywidualnym podejściu do przepisania dawki, możliwość wcześniejszego oszacowania, jaką najniższą dawkę można choremu przepisać, aby wyleczyć nowotwór i jednocześnie zmniejszyć ryzyko powikłań ma kluczowe znaczenie. Ma to szczególne znaczenie w przypadku obecnie wzrastającej zachorowalności na HPV-zależne raki gardła środkowego, których rokowanie i przebieg kliniczny wskazuje na możliwość deeskalacji dawki. Może też pozwolić na wyselekcjonowanie chorych, u których eskalacja dawki może być wskazana i bezpieczna. Obecnie przepisywanie dawki opiera się na danych dotyczących stopnia zaawansowania nowotworu, możliwości podania odpowiednio wysokiej dawki w stosunku do tolerancji narządów krytycznych. Wiemy jednak, że mimo spełnienia wszystkich kryteriów dozymetrycznych przepisywania dawki, u niektórych chorych wystąpią powikłania o nasileniu wyższym niż oczekiwane lub nieoczekiwane wyniki funkcjonalny radioterapii okaże się bardzo dobry. Wpływają na to z pewnością czynniki genetyczne i molekularne, o których radioterapeuta przygotowujący plan leczenia nie ma wiedzy. Stąd badania translacyjne, dotyczące możliwości identyfikacji biomarkerów, które mogą uzupełnić wiedzę na ten temat i pozwolić w przyszłości na przepisywanie dawki radioterapii w sposób zindywidualizowany mają potencjalnie wysoką wartość poznawczą. Dodatkowo, Doktorant, jak wynika z jego wcześniejszych osiągnięć i publikacji ma już dużą wiedzę i doświadczenie w prowadzeniu badań translacyjnych nad oceną biomarkerów ze szczególnym uwzględnieniem mikroRNA w przewidywaniu powikłań radioterapii, co dodatkowo podnosi

wartość jego badań. Oceniam więc podjęcie tematu dysertacji przez Doktoranta jako przemyślane, wynikające z jego już licznych badań, oraz wpisujące się w nurt aktualnego podejścia do radioterapii chorych na raka gardła środkowego.

**Układ pracy:** Przedstawiona mi do oceny rozprawa ma układ typowy dla tego typu opracowań. Obejmuje 169 stron maszynopisu w układzie typowym, wstęp, cele pracy, materiały i metoda, wyniki, dyskusja, wnioski, piśmiennictwo, streszczenie, i załączniki. Szczególnie cenny z punktu widzenia czytelnika jest starannie przygotowany wykaz skrótów. Praca napisana jest w sposób przystępny i rzeczowy, terminologia użyta jest poprawna. Niektóre zagadnienia, jak np. przygotowanie i opracowanie materiału do badań molekularnych były dla mnie obce, jednak Autorowi udało się w sposób bardzo przystępny je opisać, co świadczy o tym, że sam bardzo dobrze rozumie te zagadnienia i umie swoją wiedzę dobrze przekazać. Z obowiązku recenzenckiego muszę zasugerować jednak, żeby w swoich przyszłych pracach naukowych Doktorant starał się unikać kolokwializmów, które pewnie wynikają jeszcze z młodości Autora, np. na str. 74 użycie sformułowania „techniki poradziły sobie bardzo dobrze”, na str. 120 „borykamy się z problemem” i kilka innych jest rażące w pracy naukowej. Osobiście jednak czytałam tę pracę z przyjemnością i nie miałam żadnych trudności z rozumieniem toku wywodu Doktoranta.

We **Wstępie** Doktorant omówił zagadnienia związane z tematem badań dysertacji. Omówienie to jest oparte na najnowszej wiedzy w tej dziedzinie i świadczy o doświadczeniu i dużej wiedzy Doktoranta w zakresie badań translacyjnych oraz radioterapii nowotworów regionu głowy i szyi. Bardzo doceniam, że nie ma tu zbędnych informacji i wszystkie są uzasadnieniem podjęcia tematu pracy, co jest niezwykle rzadkie i tym bardziej cenne w tego typu opracowaniach. Dodatkowo, jest to zilustrowane ciekawymi i bardzo informacyjnie nośnymi rycinami autorstwa Doktoranta.

Autor sformułował 4 **Cele** pracy: 1. Identyfikacja miRNA o wartości prognostycznej dla wystąpienia nasilonej kserostomii 90 dni po zakończeniu RT u chorych na raka gardła środkowego i ocena wartości predykcyjnej tej sygnatury. 2. Identyfikacja zależnych od infekcji HPV miRNA krążących w surowicy pacjentów z rozpoznaniem raka gardła środkowego. 3. Ocena częstości występowania HPV-zależnych raków gardła środkowego w regionie łódzkim. 4. Porównanie profilu powikłań po RT w zależności od statusu HPV. Osobiście jestem zwolenniczką prac bardziej homogennych. Uważam, że cel 1y był już na tyle interesujący i nośny poznawczo, że wyznaczanie tych celów dodatkowych nie było

potrzebne i mogło być tematem innych prac. W tej pracy wybrano inną formułę, moim zdaniem niepotrzebną, tym bardziej, że co do realizacji celu 3ego mam wątpliwości. W rozdziale **Material i Metoda** Doktorant szczegółowo scharakteryzował badaną grupę, zastosowane metody badania, ze szczególnym uwzględnieniem technik laboratoryjnych, metody i zakres obserwacji oraz zastosowane metody statystyczne. Przedstawienie metod statystycznych świadczy o tym, że Autor jest ekspertem w tej dziedzinie. Opis grupy walidacyjnej i eksperymentalnej jest bardzo przejrzysty. Badanie miało charakter prospektywny. Do badania włączono ostatecznie 111 chorych napromienianych radykalnie w skojarzeniu z leczeniem systemowym lub nie z powodu raka gardła środkowego w 3 ośrodkach radioterapii, w Łodzi, Radomiu i Kielcach. Punktem oceny końcowej było wystąpienie nasilonej kserostomii 90 dni po zakończeniu radioterapii w zależności od poziomu ekspresji miRNA mierzonej w trakcie radioterapii oraz po podaniu 20 Gy. Nasilona kserostomia 90 dni po radioterapii była zdefiniowana jako odpowiedzi  $\geq 3$  wybierane przez pacjentów w 4 punktowej skali Likerta zawartej w kwestionariuszu EORTC QLQ-H&N35. Jest to przedstawione nieprecyzyjnie, bo nie wszystkie pytania w tej skali dotyczą kserostomii, niektóre odpowiedzi z wynikiem równym lub wyższym 3 np. kaszel czy martwienie się własnym wyglądem mogłyby świadczyć o istnieniu innych powikłań lub problemów, niż kserostomia i fałszować wyniki. To chyba było oceniane inaczej i wymaga to sprecyzowania. Nie jest też jasne, czy odpowiedź  $\geq 3$  w zakresie jednego pytania dotyczącego kserostomii była tak samo klasyfikowana jak podanie wszystkich odpowiedzi z wynikiem  $\geq 3$  w tym temacie.

Dla mnie jako radioterapeuty, informacja ogólna, że wszyscy chorzy byli napromieniani radykalnie i plany leczenia była realizowane techniką IMRT wg współczesnych zaleceń co do dawek podawanych na narządy krytyczne jest niewystarczająca. Chorzy byli leczeni w 3 różnych ośrodkach, więc schematy radioterapii, np. co do przyspieszenia (skrócenia całkowitego czasu radioterapii), czy dawki całkowitej i frakcyjnej mogły się różnić. Wiadomo, że taka zmienna, wpływa w sposób znaczący na wystąpienie kserostomii. Nie można więc wykluczyć, że ta zmienna, jeśli nie była uwzględniona w analizach mogła mieć wpływ na końcowy wynik. Myślę, że taka informacja powinna być uwzględniona, w opisie materiału i jeśli wystąpiły różnice, to uwzględniona w analizie statystycznej. Możliwe, że nie było takich różnic, ale praca zyskałaby na przejrzystości gdyby taką informację podano.

**Wyniki:** Doktorant zrealizował 1y cel swojej pracy, identyfikując dwa rodzaje mikroRNA, miR-425-5p oraz miR-185-5p, których poziom ekspresji mierzony w surowicy pacjentów

przed rozpoczęciem RT oraz w trakcie terapii (po podaniu 20 Gy) miał istotną wartość prognostyczną dla wystąpienia nasilonej kserostomii zdefiniowanej j.w. 90 dni po zakończeniu RT. Dodatkowo wykazał, że poziom ekspresji let-7b-5p oraz miR-140-3p mierzony w surowicy pacjentów przed rozpoczęciem RT pozwala identyfikować chorych, u których nowotwór związany jest z infekcją HPV. Poziom ekspresji krążącego miR-150-5p był zależny od promieniowania jonizującego, ulegając istotnemu zmniejszeniu wraz ze wzrostem dawki. Zastosowanie metody qPCR poprawiało wykrywalność raków HPV-zależnych w porównaniu do metody IHC.

Profil powikłań zgłaszanych przez pacjentów w trakcie i po zakończeniu RT nie różnił się istotnie w zależności od etiologii nowotworu (HPV+ vs. HPV-).

Wreszcie Autor stwierdził, że częstość występowania HPV-zależnych w stosunku do HPV-niezależnych raków gardła środkowego w centralnej Polsce wynosi około 50%. Do tego ostatniego wyniku mam zastrzeżenie. Autor dysponował jedynie wyselekcjonowanym materiałem chorych na raka gardła środkowego kierowanych do radykalnej RT. Nie było tam chorych o dużym zaawansowaniu miejscowym, czy z przerzutami odległymi, którzy RT radykalnej nie otrzymują. Nie można wykluczyć, że w tej grupie występuje przewaga chorych z nowotworem HPV(-). Być może nie zmieniłoby to tak bardzo ogólnego wyniku, ale nie dysponując całym materiałem epidemiologicznym dla danego regionu nie można formułować takich wniosków. Dodatkowo, przy celach pracy jest sformułowanie, że chodzi o ocenę w regionie łódzkim, potem wynik jest podawany dla centralnej Polski. To jest nieprecyzyjne. Uważam, że ten cel pracy był dodany niepotrzebnie. Praca przyniosła dostateczną ilość wyników i obserwacji bez tego celu.

**Dyskusja:** W Dyskusji Doktorant analitycznie przedstawia własne wyniki w świetle innych najnowszych badań. Świadczy to o dużej znajomości tematu. Wykazuje potencjalne zastosowanie praktyczne własnych wyników w przyszłości. Co też jest bardzo cenne, wyniki własnych badań stały się już dla Autora inspiracją do inicjowania nowych badań w tej dziedzinie. Wykazuje też, że niektóre jego wyniki generują hipotezy do nowych poszukiwań, jak np. rola przetrwałych po RT mikroRNA związanych z infekcją HPV.

Zabrakło mi tylko w tej Dyskusji jaśniejszego przedstawienia ograniczeń własnego badania. Każde badanie ma ograniczenia wnioskowania i powinien Doktorant je przedstawić. Dla mnie np. ocena kserostomii wyłącznie na podstawie kwestionariusza EORTC dotyczącego jakości życia jest niewystarczająca. Nie wspominam nawet o obiektywnych metodach oceny kserostomii, ale na jakość życia po radioterapii ma wpływ wiele czynników i korelowanie

tych aspektów z krążącymi mikroRNA jest na pewno ograniczeniem, które powinno być przynajmniej dyskutowane.

**Piśmiennictwo** zawiera 181 właściwie dobranych i aktualnych pozycji, bezpośrednio odnoszących się do omawianych w pracy zagadnień.

**Podsumowując**, przedstawioną mi do recenzji pracę, przeczytałam z dużym zainteresowaniem. Być może w niektórych jej aspektach, dotyczących badań laboratoryjnych zabrakło mi kompetencji do rzetelnej oceny, bo ja takich badań nie prowadzę, jednak myślę, że 2i recenzent z nawiązką zrekompensuje braki mojej recenzji. Uważam, że praca jest wartościowa również z klinicznego punktu widzenia. Co warto podkreślić, miała charakter perspektywny. Dziękuję Wysockiej Radzie za danie mi możliwości recenzowania tej ciekawej pracy. Mimo że (jak każdą pracę) można by ją w pewnych aspektach jeszcze ulepszyć i niektóre kwestie i podejścia mogły być ujęte inaczej, to uważam, że Doktorant przeprowadził bardzo ciekawe badanie, które było też podsumowaniem jego już licznych badań w tym zakresie. Mam więc zaszczyt stwierdzić, że przedstawiona mi do recenzji dysertacja spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim i zwracam się do Wysockiej Rady o dopuszczenie lek. Bartłomieja Tomasika do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. Lucyna Kępka

Radioterapeuta – onkolog

Wojskowy Instytut Medyczny

Warszawa

