

Recenzja rozprawy doktorskiej pana **Bartłomieja Tomasika** pt. „*Identyfikacja i zastosowanie krążących mikroRNA w monitorowaniu powikłań radioterapii u chorych na raka gardła środkowego*” przygotowanej pod opieką dr hab. Wojciecha Fendlera.

Przedmiotem pracy doktorskiej jest identyfikacja cząsteczek miRNA, których poziom w surowicy pacjentów leczonych z powodu raka gardła środkowego koreluje z udziałem infekcji HPV w etiologii choroby oraz ryzykiem powikłań leczenia o charakterze zespołu suchości jamy ustnej (kserostomii). Ponadto, w ramach pracy Kandydat ocenia częstość występowania raków zależnych od HPV (oraz ich genotypów) u pacjentów z Polski centralnej, a także obecność hipotetycznych związków między udziałem HPV w etiologii nowotworu i toksycznością leczenia, przede wszystkim ryzykiem pojawiania się nasilonej kserostomii. Jedną z przyczyn relatywnie niewielkiej skuteczności leczenia raka gardła środkowego jest niedostatek wiedzy na temat molekularnych czynników istotnych dla rozwoju tego bardzo heterogennego nowotworu oraz czynników determinujących odpowiedź na leczenie, w tym biomarkerów umożliwiających przewidywanie toksyczności leczenia. Dlatego należy wysoko ocenić wybór tematu projektu doktorskiego, którego wyniki mogą mieć nie tylko istotne znaczenie poznawcze ale również potencjalną wartość aplikacyjną.

Rozprawa doktorska ma charakter zwartej pracy o strukturze typowej dla tego typu prac. Praca liczy 165 numerowanych stron, zawiera 43 ryciny i 40 tabeli, a jej bibliografia odnosi się do 181 pozycji literaturowych. Ponadto, załącznikami do rozprawy są wzory kwestionariuszy, na podstawie których oceniano jakość życia pacjentów włączonych do badania (EORTC QLQ-C30 oraz EORTC QLQ-H&N35).

W rozdziale *Wstęp* Doktorant zwięźle omawia podstawowe informacje o szeregu zagadnień mających związek z przedmiotem pracy. Przedstawione zostały m.in. wybrane założenia radiobiologii klinicznej, charakterystyka modelu klinicznego oraz podstawowe informacje na temat miRNA. Treść wstępu stanowi racjonalne i logiczne uzasadnienie dla celów pracy sformułowanych w rozdziale 3.

Uwagi do tej części pracy:

- (a) Opis niektórych zagadnień jest zbyt lakoniczny i nie do końca wyjaśnia prezentowane zjawiska. Przykładowo, zdanie „W RISC jedna z nici miRNA (nić pasażerska) jest uwalniana, podczas gdy druga nić (nić prowadząca) działa jako regulator ekspresji genów” jest praktycznie jedynym odniesieniem do skomplikowanego mechanizmu regulacji ekspresji genów przez miRNA.
- (b) Poprawny termin stosowany w języku polskim w odniesieniu do klasy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych określanych w języku angielskim jako „*exosomes*” to „egzosomy” (a nie „eksosomy”), podobnie jak np. „*exonuclease*” i „egzonukleaza”.

Istotnym elementem pracy jest dobrze przygotowany rozdział *Materiały i Metody*. W pierwszej części tego rozdziału opisane są założenia i logistyka badania, do którego rekrutowano pacjentów w trzech ośrodkach onkologicznych (w Łodzi, Radomsku i Kielcach). Na uwagę zwraca przeprowadzona przez Doktoranta analiza pozwalająca na optymalizację liczebności badanej grupy. W kolejnych częściach tego rozdziału Doktorant szczegółowo opisuje stosowane przez niego metody analityczne i statystyczne. Na podkreślenie zasługuje to, że zarówno molekularne metody analityczne jak i metody statystyczne wybrane przez Doktoranta były adekwatne do celu postawionego w projekcie i w pełni umożliwiły jego uzyskanie.

Uwagi do tej części pracy:

- (c) Pacjenci włączeni do badania traktowani byli z wykorzystaniem różnych schematów radioterapii (lub radio-chemoterapii), z różnymi dawkami całkowitymi i sposobem frakcjonowania. Racjonalnym rozwiązaniem była więc decyzja o ujednoczeniu punktu pobierania drugiej próbki krwi do punktu, w którym pacjenci otrzymali dawkę biologicznie równoważną 20 Gy. Jednak opis badanych grup byłby kompletny gdyby podano bardziej szczegółową informację na temat dawek i schematów frakcjonowania.
- (d) Zgodnie z informacją zawartą w pracy, pierwsza próbka krwi pobierana była „przed rozpoczęciem radioterapii”. Czy to znaczy, że u pacjentów poddanych indukcyjnej chemioterapii (10 osób włączonych do analizy) krew pobierana była już po zakończeniu chemioterapii? Czy i w jakiś sposób uwzględniono to w analizie danych?

Rozdział *Wyniki* składa się z trzech głównych części, które dotyczyły: (i) analizy zależności między badanymi parametrami klinicznymi (w tym kserostomią i rozpoznaniem raka zależnego od HPV), a także porównania wiarygodności dwu testów na obecność HPV, (ii) analizy profilu miRNA w surowicy grupy pilotowej liczącej 20 pacjentów, (iii) analizy wybranych cząsteczek miRNA w surowicy grupy walidacyjnej liczącej 60 pacjentów.

Do badania zrekrutowano 152 chorych, z czego do analizy finalnej włączono 111 pacjentów. W pierwszej części rozdziału Wyniki Doktorant udokumentował następujące rezultaty:

- stwierdził, że czynnikami skorelowanymi ze statusem HPV były wiek, płeć oraz konsumpcja alkoholu i tytoniu (uzyskane zależności były zgodne z danymi literaturowymi);
- nie wykazał istotnych statystycznie związków między nasileniem kserostomii (obserwowanej 90 dni po zakończeniu leczenia) i pozostałymi czynnikami klinicznymi;
- nie stwierdził różnic wartości parametrów opisujących jakość życia i nasilenie toksyczności leczenia w podgrupach pacjentów różniących się statusem HPV;
- po ocenie wiarygodności stosowanego w praktyce diagnostycznej testu na obecność infekcji HPV wykorzystującego immunohistochemiczne barwienie antygenu p16 (białka ulegającego nad-ekspresji w obecności HPV) w porównaniu z referencyjnym testem molekularnym wykrywającym genom wirusa wykazał ok. 16% poziom błędów całkowitego testu IHC.
- stwierdził ok. 50% udział raków HPV-zależnych w badanej próbie raków gardła środkowego, z dominującym genotypem HPV-16 (86%).

Uwagi do tej części pracy:

- (e) Doktorant wykazał brak korelacji między statusem HPV oraz nasileniem kserostomii. Tym niemniej, opis grup badanych w dalszej części pracy (grupa pilotowa n=20 i grupa walidacyjna n=60) byłby pełniejszy, gdyby podano liczby pacjentów z określeniem łącznego statusu HPV i kserostomii (np. ile osób było jednocześnie HPV+ i kserostomia *high*).

W drugiej części Wyników Doktorant opisał analizę pełnego profilu miRNA w surowicy pacjentów włączonych do grupy pilotowej (n=20). Wyniki poprzedzone są informacją o sposobie przefiltrowania danych ekspresyjnych i wyboru cząsteczek miRNA do dalszych badań oraz sposobie korekty umożliwiającej usunięcie tzw. efektu paczki (*batch effect*). Najważniejsze wyniki udokumentowane przez Doktoranta w tej części pracy to:

- zidentyfikowanie 10 cząsteczek miRNA (m.in. miR-150-5p), których poziom ulegał istotnym zmianom w próbkach pobieranych w trakcie i po zakończeniu radioterapii (w stosunku do próbek pobieranych przed rozpoczęciem radioterapii);
- zidentyfikowanie 54 cząsteczek miRNA, których poziom w jednej z trzech analizowanych próbek surowicy był istotnie inny w grupie chorych z wysokim i niskim nasileniem kserostomii (najwięcej różnic w próbkach pobranych przed rozpoczęciem radioterapii);
- zidentyfikowanie 29 cząsteczek miRNA, których poziom w jednej z trzech analizowanych próbek surowicy był istotnie inny w grupie chorych z rakiem HPV-zależnym i HPV-niezależnym (najwięcej różnic w próbkach pobranych w trakcie radioterapii);
- stworzenie na podstawie poziomu ekspresji dwu cząstek miRNA (miR-185-5p i miR-425-5p) modelu prognostycznego umożliwiającego przewidywanie nasilonej kserostomii. Model wykorzystujący poziom ekspresji oceniany w próbkach pobieranych przed rozpoczęciem radioterapii charakteryzował się parametrem AUC=0,87 (przy 5-krotnej walidacji krzyżowej), i miał lepszą wartość prognostyczną niż proponowany w literaturze przedmiotu model oparty o parametry kliniczne;
- stworzenie na podstawie poziomu ekspresji dwu cząstek miRNA (let-7b-5p i miR-140-3p) modelu klasyfikatora umożliwiającego wykrywanie raków HPV-zależnych. Model wykorzystujący poziom ekspresji oceniany w próbkach pobieranych przed rozpoczęciem radioterapii charakteryzował się parametrem AUC=0,86 (przy 5-krotnej walidacji krzyżowej).

Uwagi do tej części pracy:

- (f) Doktorant pisze, że do badania „wybrano losowo 20 osób, dbając o to by grupa ta była zbalansowana pod kątem dwu głównych czynników ocenianych w trakcie badania” (str. 64). Chociaż zrozumiała jest intencja Badacza, to jednak samo sformułowanie jest dość niefortunne - trudno mówić o „losowym” wyborze i jednoczesnej „dbałości o zbalansowanie” grupy.
- (g) Analizując wpływ promieniowania na zmianę ekspresji miRNA Doktorant porównywał wartości średnie poziomów ekspresji danego miRNA w kolejnych próbkach surowicy. Szkoda jednak, że takie podejście nie zostało uzupełnione analizą dynamiki zmian w

materiale od poszczególnych pacjentów (tj. analizą indywidualnych różnic pomiędzy kolejnymi próbkami). Byłoby to szczególnie wskazane ze względu na niewielką liczbę pacjentów włączonych do badania i znaczną heterogenność tej grupy. Ciekawe byłoby również zbadanie hipotetycznych korelacji między indywidualnymi zmianami poziomu poszczególnych miRNA a dawką promieniowania.

- (h) Wyniki klasteryzacji hierarchicznej i analizy PCA przedstawione na Rycinach od 20 do 30 wskazują na dużą zdolność separacji porównywanych podgrup za pomocą wybranych sygnatur miRNA. Wyniki tych analiz mogą być jednak nadmiernie „optymistyczne”, gdyż wykorzystują jedynie cząsteczki miRNA wykazujące statystycznie istotne różnice między badanymi podgrupami (w związku z tym trudno taką analizę uznać za „nienadzorowaną”). Interesujący byłby wynik analogicznych analiz wykorzystujących pełny profil wykrywanych cząsteczek miRNA.

W ostatniej części Wyników Doktorant opisał analizę poziomu wybranych 22 cząsteczek miRNA w surowicy pacjentów włączonych do grupy walidacyjnej (n=60). Wyniki poprzedzone są informacją o sposobie wyboru grup walidacyjnych i selekcji miRNA do sygnatury walidacyjnej oraz sposobie normalizacji danych miRNA. Najważniejsze wyniki udokumentowane przez Doktoranta w tej części pracy to:

- potwierdzenie, że model wykorzystujący poziom ekspresji dwu cząstek miRNA (miR-185-5p i miR-425-5p) umożliwia przewidywanie nasilonej kserostomii. Model wykorzystujący poziom ekspresji w próbkach pobieranych przed rozpoczęciem radioterapii charakteryzował się parametrem AUC=0,77 (przy 5-krotnej walidacji krzyżowej);
- potwierdzenie, że model wykorzystujący poziom ekspresji dwu cząstek miRNA (let-7b-5p i miR-140-3p) umożliwia klasyfikację raków HPV-zależnych. Model wykorzystujący poziom ekspresji w próbkach pobieranych przed rozpoczęciem radioterapii charakteryzował się parametrem AUC=0,66 (przy 5-krotnej walidacji krzyżowej).

Uwagi do tej części pracy:

- (i) Szkoda, że Doktorant nie zdecydował się na weryfikację za pomocą danych ekspresyjnych uzyskanych w grupie walidacyjnej wyjściowych modeli klasyfikacji zbudowanych na podstawie danych uzyskanych w grupie pilotowej, tj. modelu opisanego na str. 95 dla przewidywania kserostomii (obok modelu „skorygowanego” opisanego na str. 109) oraz modelu opisanego na str. 99 dla klasyfikacji raków zależnych od HPV (obok modelu „skorygowanego” opisanego na str. 115).
- (j) W legendzie do Ryciny 40 (str. 110) znajduje się błąd dotyczący nazw cząsteczek miRNA stosowanych w opisywanym modelu.

W rozdziale *Dyskusja* Doktorant w syntetyczny sposób podsumowuje wyniki uzyskane w doświadczalnej części pracy oraz kompetentnie dyskutuje je w kontekście dostępnych danych literaturowych. Co istotne, dyskusja zawiera racjonalne uzasadnione dla kierunków ew. dalszych badań w temacie, którego dotyczył projekt.

Uwagi do tej części pracy:

- (k) Szkoda, że Doktorant nie zdecydował się na szersze omówienie potencjalnych funkcji analizowanych cząsteczek miRNA w kontekście genów potencjalnie regulowanych przez te miRNA. Miałoby to oczywiście charakter hipotetyczny, jednak pozwoliłoby lepiej zobrazować znaczenie funkcjonalne miRNA obecnych w proponowanych sygnaturach prognostycznych.

Rozprawa podsumowana jest klarownie sformułowanymi *Wnioskami*, które odzwierciedlają uzyskane wyniki, i uzupełniona *Streszczeniem* w języku polskim i angielskim (nie wiem jakie zasady dotyczące zawartości streszczenia przyjęte są w Jednostce Doktoranta, jednak w mojej opinii tekst streszczenia jest nadmiernie szczegółowy i rozbudowany).

#### **Podsumowanie.**

Recenzowana praca doktorska dotyczy bardzo ciekawego zagadnienia o dużej wartości poznawczej i aplikacyjnej. Praca jest poprawna formalnie, bardzo dobrze zaplanowana i kompetentnie zrealizowana. Doktorant wykazał się umiejętnościami praktycznymi pozwalającymi na uzyskanie oryginalnych wyników. Cała rozprawa napisana jest poprawnym językiem i w sposób czytelny prowadzi czytelnika przez dość złożoną materię projektu doktorskiego. Praca z całą pewnością „stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.” Niezależnie od zawartych w recenzji uwag przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską pana Bartłomieja Tomasika oceniam jednoznacznie pozytywnie. Mając na względzie wysoki poziom naukowej przedstawionej pracy proponuję rozważenie jej wyróżnienia jeśli tylko spełnione są warunki formalne obowiązujące w tym względzie w Jednostce nadającej stopień doktora.

#### **Wniosek końcowy:**

W mojej opinii przedstawiona rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, pos.595 z późn. zm.). W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o kontynuowanie postępowania o nadanie panu Bartłomiejowi Tomasikowi stopnia doktora nauk medycznych.



prof. dr hab. Piotr Widłak  
Centrum Onkologii - Instytut, Gliwice

4 października 2019

