



WYDZIAŁ BIOLOGII
I OCHRONY
ŚRODOWISKA

Uniwersytet Łódź

Prof. dr hab. Wanda Małgorzata Krajewska
Katedra Cytobiochemii UŁ

Łódź, 11 czerwca 2020 r.

Ocena

pracy doktorskiej mgr Eweliny Perdas

pt. *Analiza krążących kwasów nukleinowych w raku brodawkowatym tarczycy*

Praca doktorska mgr Eweliny Perdas wykonana została w Zakładzie Fizjologii Układu Krążenia Katedry Fizjologii Doświadczalnej i Klinicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi pod kierunkiem dr hab. n. med. prof. UM Marii Pawelskiej-Zubrzyckiej i dr n. med. Roberta Stawskiego jako promotora pomocniczego. Doktorantka skorzystała z możliwości jaką daje obecnie obowiązująca Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki i przedstawiła rozprawę w formie spójnego tematycznie zbioru czterech współautorskich artykułów, w tym dwóch oryginalnych i dwóch przeglądowych, opublikowanych w latach 2016-2020. Wszystkie prace składające się na rozprawę doktorską opublikowane zostały w uznanych, międzynarodowych czasopismach znajdujących się w aktualnie obowiązującym wykazie Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Prace oryginalne wchodzące w skład cyklu opublikowane zostały w *Scientific Reports* (2019; IF 4,011) oraz *Diagnostics* (2020; IF 2,489) natomiast prace przeglądowe w *International Journal of Molecular Sciences* (2016; IF 3,226) oraz *Current Drug Targets* (2018; IF 2,642). Łączna liczba punktów przypisana obecnie tym czasopismom przez MNiSW wynosi 420, a sumaryczny wskaźnik oddziaływania IF, zgodnie z rokiem opublikowania 12,37. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że mgr Ewelina Perdas jest pierwszym autorem wszystkich czterech prac składających się na rozprawę doktorską. Niepodważalny udział mgr Eweliny Perdas

w powstaniu tych prac potwierdza nie tylko Jej wiodąca pozycja wśród autorów. Mgr Ewelina Perdas jest autorem korespondującym w przypadku trzech prac, a jak wynika z załączonych do dokumentacji oświadczeń współautorów Jej wkład wynosi 85% w przypadku trzech prac i 45% w przypadku jednego artykułu oryginalnego, w którym udział pierwszego i drugiego autora jest równocenny. Prace stanowiące rozprawę doktorską opatrzone zostały 33-stronicowym autoreferatem zawierającym wprowadzenie, cel pracy, opis przeprowadzonych badań, dyskusję i podsumowanie uzyskanych wyników, wnioski, a także streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim oraz wybrane pozycje piśmiennictwa. Obok oświadczeń współautorów załączone zostały również zgody Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi na przeprowadzenie badań.

Celem badań przedstawionych w pracy doktorskiej mgr Eweliny Perdas było poszukiwanie nowych biomarkerów raka brodawkowatego tarczycy, który należy do najczęściej występujących postaci raka tarczycy. Rak brodawkowaty tarczycy jest często wieloogniskowy, a wyniki biopsji ze względu na technikę badania i ilość pobranego materiału mogą być niejednoznaczne. Jak wykazują wyniki badań całkowite usunięcie tarczycy, będące podstawową metodą leczenia raka tarczycy, może prowadzić do zbyt licznych tyreoidektomii i w konsekwencji narażenia pacjenta na konieczność permanentnego zażywania hormonów tarczycy. Stąd poszukiwanie nowych, specyficznych biomarkerów raka brodawkowatego tarczycy jest w pełni uzasadnione.

Cele szczegółowe pracy doktorskiej mgr Eweliny Perdas obejmowały analizę krążących we krwi kwasów nukleinowych, w tym: 1^o jądrowego i mitochondrialnego DNA (cf-nDNA i cf-mtDNA) oraz 2^o wybranych pięciu mikroRNA z rodziny miRNA let-7 (let-7a, let-7c, let-7d, let-7f i let-7i). Materiałem do badań było osocze pochodzące od pacjentów Kliniki Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi z potwierdzonym histologicznie rakiem brodawkowatym tarczycy. Badania przeprowadzono za pomocą nowoczesnych, adekwatnych do kolejnych zadań, podejść metodycznych. Wykorzystano technikę PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) oraz technologię emulsyjnego PCR (ddPCR) pozwalającą na uzyskanie informacji bez konieczności użycia krzywej standardowej oraz wzorców wewnętrznych. Czulość i specyficzność potencjalnych biomarkerów do wykorzystania w diagnostyce medycznej oceniano z wykorzystaniem analizy krzywych ROC (Receiver Operating Characteristics).

Badania zostały nie tylko szczegółowo opisane w pracach oryginalnych składających się na rozprawę doktorską, zarówno pod względem stosowanych metod, jak i prezentacji oraz merytorycznej i twórczej dyskusji uzyskanych wyników, ale także, co należy podkreślić, pozytywnie ocenione przez recenzentów i redakcje renomowanych czasopism o zasięgu międzynarodowym.

W wyniku przeprowadzonych badań raka brodawkowego tarczycy:

- potwierdzono blisko dwukrotnie podwyższony poziom pozakomórkowego jądrowego DNA (*Sci. Rep.*, 2019),

- po raz pierwszy w literaturze przedmiotu udowodniono ponad dwukrotnie obniżony poziom pozakomórkowego mitochondrialnego DNA (*Sci. Rep.*, 2019),

- wykazano wyższy, statystycznie istotny wzrost poziomu czterech z pięciu badanych izoform let-7, tj. let-7a, let-7c, let-7d i let-7f (*Diagnostiocs*, 2020),

- nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomie pozakomórkowych kwasów nukleinowych w zależności od stopnia zaawansowania nowotworu (*Sci. Rep.*, 2019, *Diagnostiocs*, 2020).

Uzyskane i prezentowane w pracach eksperymentalnych składających się na rozprawę doktorską oryginalne wyniki mają niepodważalną wartość poznawczą. Udowodniono, że krążące we krwi pozakomórkowe DNA i mikroRNA mogą być rozpatrywane jako biomarkery diagnostyczne w raku brodawkowym tarczycy, potwierdzające konieczność tyreoidektomii, gdy wyniki biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej są niejednoznaczne. W wyniku analizy ROC stwierdzono wysoką specyficzność dla pozakomórkowego jądrowego DNA i mitochondrialnego DNA, tj. odpowiednio 96% i 80% oraz czułość dla miRNA let-7a i miRNA let-7d, tj. odpowiednio 74% i 71%.

Na szczególną uwagę zasluguja wyniki odnośnie do pozakomórkowego mitochondrialnego DNA, tym bardziej, że poziom pozakomórkowego mitochondrialnego DNA w przypadku wielu nowotworów często nie wzrasta, ale maleje lub pozostaje niezmienny. Prosiłabym Doktorantkę o przybliżenie mechanizmów mogących leżeć u podstaw tego zróżnicowanego uwalniania do krwioobiegu mitochondrialnego DNA.

Ponadto w świetle danych literaturowych i wyników badań własnych dotyczących mężczyzn i kobiet prosiłabym również o próbę wyjaśnienia obserwowanych różnic lub

braku różnic w poziomie pozakomórkowych kwasów nukleinowych uwarunkowanych płcią pacjentów, abstrahując od stosunkowo małej liczby prób pochodzących od mężczyzn ze zdiagnozowanym rakiem brodawkowym tarczycy. Czy w przypadku raka brodawkowego tarczycy obserwuje się zaburzenia sygnalizacji estrogenowej?

Dwie prace poglądowe wchodzące w skład cyklu stanowią przegląd dostępnej literatury na temat udziału mikroRNA, ze szczególnym uwzględnieniem miRNA z rodziny let-7 w raku brodawkowym tarczycy. Bardzo wartościowe jest autorskie zestawienie przedstawiające dane literaturowe dotyczące poziomu ekspresji różnych miRNA i statusu genu *BRAF* uznawanego za najczęściej mutujący gen w raku brodawkowym tarczycy (Tabela 1, *Curr. Drug Targets* 2018). Na podkreślenie zasługuje fakt, że prace przeglądowe opublikowane zostały w początkowym etapie przewodu doktorskiego (*Int. J. Mol. Sci.* 2016, *Curr. Drug Targets* 2018), co świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu Doktorantki do podjęcia badań własnych.

W przedstawionym autoreferacie zwracają uwagę pewne nieścisłości terminologiczne i niezbyt fortunne określenia, na przykład: zdrowa tkanka zamiast tkanka prawidłowa (tkanka może być prawidłowa lub nieprawidłowa); tkanka nowotworowa, co zapewne wynika z bezpośredniego tłumaczenia z języka angielskiego, zamiast komórki nowotworowe (tkanka to jest zespół komórek wyspecjalizowanych w pełnieniu określonej funkcji w organizmie, czego nowotworze nie można powiedzieć); zdrowa grupa kontrolna czy zdrowa kontrola zamiast grupa kontrolna (kontrolę stanowią osoby, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej).

Wniosek końcowy

Podsumowując stwierdzam, że mgr Ewelina Perdas, na podstawie wyników logicznie zaplanowanych i precyzyjnie przeprowadzonych prac badawczych przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską. Wyniki są nowatorskie i bez wątplenia przyczyniają się do poszerzenia naszej wiedzy odnośnie do potencjalnego znaczenia diagnostycznego w raku brodawkowym tarczycy krążącego we krwi pozakomórkowego DNA i mikroRNA. Wartość naukowa rozprawy pozwala na w pełni pozytywną ocenę wiedzy i umiejętności Doktorantki. Mgr Ewelina Perdas jest beneficjentem grantu NCN uzyskanego w konkursie Preludium 15. Reasumując stwierdzam, że prezentowana rozprawa

doktorska pt. „Analiza krążących kwasów nukleinowych w raku brodawkowatym tarczycy” spełnia warunki niezbędne do uzyskania stopnia naukowego doktora określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 27 września 2017, poz. 1789, tekst jednolity). Zwracam się zatem do Wysokiej Rady Nauk Medycznych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Eweliny Perdas do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Potencjalnie aplikacyjne znaczenie przedstawionych w ramach rozprawy doktorskiej oryginalnych wyników i ich opublikowanie w międzynarodowych, uznanych czasopismach zasługują na wyróżnienie.

