

Gdańsk, 14.06.2020

Prof. dr hab. Barbara Lipińska
Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej
Wydział Biologii,
Uniwersytet Gdański,
Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk
tel. +48- 58 523 6055
tel/fax +48-58 523 6064
E-mail: barbara.lipinska@biol.ug.edu.pl

**RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ PANI MGR EWELINY PERDAS
pt. „Analiza krążących kwasów nukleinowych w raku brodawkowym tarczycy”**

promotor: dr hab. n. med. prof. UM Maria Pawelska-Zubrzycka

promotor pomocniczy: dr n. med. Robert Stawski

Praca doktorska Pan mgr Eweliny Perdas, pt. „Analiza krążących kwasów nukleinowych w raku brodawkowym tarczycy”, przedstawia wyniki oznaczania poziomu pozakomórkowego DNA (cf-DNA), w tym DNA jądrowego (cf-nDNA) i mitochondrialnego (cf-mDNA) oraz poziomu pięciu izoform let-7 mikro-RNA (miRNA) w osoczu pacjentów z rakiem brodawkowym tarczycy (PTC) w porównaniu do zdrowych osób kontrolnych.

Doktorantka przedstawiła rozprawę dokorską w formie czterech publikacji, w których jest pierwszym autorem i które ukazały się w latach 2016-20. Dwie z nich są pracami oryginalnymi, opublikowanymi w czasopismach *Scientific Reports* (IF=4,122) oraz *Diagnostics (Basel)* (IF=2,489), dwie natomiast to prace przeglądowe, które ukazały się w *Current Drug Targets* (IF=2,642) oraz *International Journal of Molecular Sciences* (IF=3,226). Rozprawa zawiera także streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp literaturowy, opis celu badań, opis materiałów i metod, wyniki, dyskusję, wnioski i spis literatury, czyli posiada typowy układ dla monografii doktorskich. Ze względów formalnych zamieszczono też zgodę komisji bioetycznej na prowadzenie badań i oświadczenia współautorów.

Uzasadnieniem dla podjęcia badań przedstawionych w rozprawie był fakt, że diagnostyka nowotworów tarczycy, polegająca na analizie biopsji cienkoigłowej, jest w ok. 25% przypadków niejednoznaczna i, w związku z tym, wykonuje się często niepotrzebnie zabiegi usunięcia tarczycy u pacjentów z łagodnymi zmianami. Tak więc, znalezienie dodatkowych metod diagnostycznych

1

PTC jest jak najbardziej wskazane. Z drugiej strony, wcześniejsze badania innych zespołów pokazały, że w różnych chorobach nowotworowych obserwuje się zmiany w poziomie cf-DNA i miRNA w osoczu, najczęściej polegające na zwiększeniu ilości cf-DNA, co tłumaczy się m. in. uwalnianiem kwasów nukleinowych przez uszkodzone komórki. Regulacja genów miRNA z rodziny let-7 była szeroko badana w wielu rodzajach nowotworów i sugeruje się przydatność diagnostyczną oznaczania poziomu tych miRNA w płynnych biopsjach. Ponadto, monitorowanie poziomów miRNA let-7 może być stosowane do prognozowania odpowiedzi na leki i nawrotów chorób. Tak więc, wykonanie analizy poziomu kwasów nukleinowych w osoczu pacjentów z PTC w porównaniu do zdrowych osób kontrolnych mogło okazać się pomocne w znalezieniu nowych markerów diagnostycznych. Tym samym uważam wybór tematu pracy doktorskiej za zasadny.

Doktorantka oznaczyła stężenie cf-nDNA, cf-mDNA oraz miRNA (let-7a, let-7c, let-7d, let-7f i let7i) w osoczu pacjentów z potwierdzonym histopatologicznie rakiem tarczycy oraz u zdrowych osób kontrolnych. W tym miejscu chciałabym zadać Doktorantce pytanie, dlaczego nie zdecydowała się zbadać poziomu kwasów nukleinowych u pacjentów z łagodnymi zmianami tarczycy, skoro problem diagnostyczny polega na trudności jednoznacznego rozróżnienia pomiędzy rakiem a guzem łagodnym?

Pani mgr Perdas oznaczyła cf-DNA stosując PCR w czasie rzeczywistym (q-PCR), u 32 pacjentów z PTC i 30 osób kontrolnych, i stwierdziła znaczący statystycznie wzrost ilości cf-nDNA, przy czym istotność statystyczną obserwowano w grupie mężczyzn, nie było jej natomiast w grupie kobiet. Należy tu odnotować, że grupa mężczyzn była bardzo nieliczna (n=5) w porównaniu do grupy kobiet, co, moim zdaniem, mogło wpłynąć na wynik analizy statystycznej. Wyniki te są zasadniczo zgodne z badaniami innych autorów, którzy także zaobserwowali wzrost poziomu cf-nDNA u pacjentów z PTC. Natomiast w przypadku cf-mDNA Doktorantka po raz pierwszy opisała obniżenie poziomu w osoczu osób z brodawkowatym rakiem tarczycy; wcześniej spadek poziomu mtDNA stwierdzono dla innych nowotworów. Dla cf-mDNA istotność statystyczną zaobserwowano jedynie w grupie kobiet. Dla obu rodzajów DNA obliczona została wartość diagnostyczna i okazało się, że specyficzność dla cf-nDNA i cf-mDNA wynosiła odpowiednio 96% and 80%, natomiast czułość - 50% and 62%. Tak niska czułość nie pozwala niestety na wiarygodne rozróżnienie między osobami z rakiem i zdrowymi. Ciekawa jestem opinii Doktorantki na ten temat. Wyniki tej części badań zostały opublikowane w pracy: Perdas E, Stawski R, Kaczka K, Nowak D, Zubrzycka M. *Altered levels of circulating nuclear and mitochondrial DNA in patients with Papillary Thyroid Cancer. Sci Rep.* 2019 Oct 8;9(1):14438. doi: 10.1038/s41598-019-51000-7. Jak widać z kolejności Autorów oraz ich oświadczeń, Doktorantka posiada znaczący (45%) udział w tej pracy oraz była autorem korespondującym, co bardzo dobrze świadczy o jej samodzielności i dojrzałości naukowej. W związku z tą publikacją

mam pytanie: jaka może być, zdaniem Doktorantki, przyczyna bardzo znacznego rozrzutu wyników w zdrowej grupie kontrolnej?

W kolejnym etapie badań Doktorantka oznaczyła poziom miRNA (let-7a, let-7c, let-7d, let-7f i let7i) u 40 pacjentów z PTC (w tym u 9 mężczyzn i 44 kobiet) oraz 21 osób zdrowych metodą emulsyjną, Droplet digital PCR (ddPCR). Metoda ta pozwala na dokładne ilościowe oznaczenie badanego DNA bez konieczności równoległego oznaczania DNA genu/genów referencyjnych.

Analiza wyników pokazała, że poziomy let-7a, let-7c, let-7d i let-7f były statystycznie istotnie wyższe u pacjentów w porównaniu do grupy zdrowej. Jest to ważne osiągnięcie pani mgr Perdas ponieważ dane odnośnie poziomu tych izoform let-7 miRNA w osoczu pacjentów z PTC nie były wcześniej dostępne w literaturze. Co istotne, dla niektórych izoform (let-7a i let-7d) czułość metody była powyżej 70%, co może sugerować, że oznaczenie ich poziomu u pacjentów może mieć wartość diagnostyczną, choć niewątpliwie należy wykonać badania na większej grupie osób z PTC i osób zdrowych. Wyniki tej części badań zostały opublikowane w pracy: Perdas E, Stawski R, Kaczka K, Zubrzycka M. *Analysis of Let-7 Family miRNA in Plasma as Potential Predictive Biomarkers of Diagnosis for Papillary Thyroid Cancer. Diagnostics (Basel)*. 2020 Feb 28;10(3):130. doi: 10.3390/diagnostics10030130 (IF=2,489). Kolejność Autorów oraz ich oświadczenia wskazują, że Doktorantka posiada zdecydowanie znaczący (85%) udział w tej pracy.

Podsumowując wszystkie wyniki eksperymentalne uzyskane w tej pracy uważam, że wnoszą one szereg nowych i istotnych informacji dotyczących ilości pozakomórkowych kwasów nukleinowych w osoczu osób z rakiem brodawkowym tarczycy. Mogą też stanowić wskazówkę dla dalszych badań mających na celu ustalenie, czy poziom kwasów nukleinowych w płynnych biopsjach może być markerem wspomagającym diagnostykę lub też czynnikiem prognostycznym.

Fakt opublikowania wyników w dobrze notowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym dodatkowo podkreśla istotność osiągnięć Doktorantki.

Na uwagę zasługują dwie prace przeglądowe stanowiące elementy rozprawy doktorskiej: 1. Perdas E, Stawski R, Nowak D, Zubrzycka M. *The Role of miRNA in Papillary Thyroid Cancer in the Context of miRNA Let-7 Family. Int J Mol Sci*. 2016 Jun 15;17(6):909. doi: 10.3390/ijms17060909 (IF=3,226); 2. Perdas E, Stawski R, Nowak D, Zubrzycka M. *Potential of Liquid Biopsy in Papillary Thyroid Carcinoma in Context of miRNA, BRAF and p53 Mutation. Curr Drug Targets*. 2018;19(14):1721-1729. doi:10.2174/1389450119666180226124349. W obu tych pracach Doktorantka była autorem korespondującym a jej udział w ich przygotowaniu zdecydowanie wiodący (85% na podstawie oświadczeń Współautorów), co dodatkowo wskazuje na jej samodzielność i naukową dojrzałość.

W pierwszej z nich przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat miRNA z rodziny let-7 z uwzględnieniem ich biologicznej roli w PTC i w rozwoju procesu nowotworowego. Wskazano na możliwość zastosowania oznaczania poziomu tych miRNA w diagnostyce i prognostyce PTC.

W drugiej z prac w skrócie przedstawiono rolę miRNA oraz mutacji w genach *BRAF* i p53 w rozwoju PTC i przedyskutowano perspektywy zastosowania defekcji mutacji *BRAF* oraz poziomu miRNA w płynnych biopsjach w diagnostyce, terapii i monitorowaniu rozwoju PTC.

Obie te prace stanowią wyczerpujące i bardzo dobre wprowadzenie do części eksperymentalnej niniejszej rozprawy.

Niezależnie od omówionych publikacji, pani mgr Perdas w sposób skrótowy lecz całkowicie wystarczający przedstawiła swoje wyniki i ich dyskusję w monografii stanowiącej element rozprawy. Rozdział Dyskusja świadczy o tym, że Doktorantka bardzo dobrze rozumie znaczenie własnych wyników w kontekście prac innych autorów. Cytowana przez Doktorantkę literatura to około 50 pozycji, przy czym większość cytacji pochodzi z ostatnich 10 lat, co pokazuje, że problematyka pracy jest bardzo aktualna. Należy też odnotować, że Doktorantka jest laureatką grantu NCN Preludium.

Od strony formalnej praca jest prawidłowa, znalazłam też stosunkowo niewiele błędów edytorskich i nie będę ich wymieniać, bo niczemu to nie służy. Niemniej muszę zaznaczyć, że nie mogę zaakceptować często używanego w rozprawie sformułowania: „ekspresja ...miRNA w osoczu” czy też „nadekspresja miRNA w osoczu”. Po pierwsze, ekspresji ulegają geny, nie miRNA a po drugie, geny nie ulegają ekspresji w osoczu. Oznaczany był poziom miRNA, podobnie jak cf-DNA. Poziom ten jest efektem uwalniania kwasów nukleinowych syntetyzowanych w komórkach, zależy ponadto od tempa ich degradacji w układzie pozakomórkowym. Ponadto błędnie podano nazwę „gen mitochondrialnej syntazy ATP 8” powinno być „gen podjednostki 8 mitochondrialnej syntazy ATP”. Razi też nazwa ”kartridż” - jest to żargon laboratoryjny ale należy go unikać w piśmie. Błędy te nie umniejszają jednak merytorycznej wartości przedstawionej rozprawy.

Uważam, że omawiana tu praca w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom doktorskim i 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. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). Zatem wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr Eweliny Perdas do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

