

Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy
02-781 Warszawa, ul. Roentgena 5 tel. 22 546-33-86
KLINIKA ENDOKRYNOLOGII ONKOLOGICZNEJ
I MEDYCYNY NUKLEARNEJ
Kierownik: Prof. Marek Dedecjus

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych
lek. Damiana Zadwornego

p.t. „Badanie ekspresji microRNA w raku brodawkowym
tarczycy w tkance nowotworowej oraz w surowicy krwi – czynnik
prognostyczny choroby“

Promotor dr hab. n. med. prof. uczelni Tomasz Stępień

Rak tarczycy jest najczęstszym nowotworem złośliwym gruczołów dokrewnych. W Polsce, podobnie jak na całym świecie, obserwuje się rosnącą liczbę zachorowań na ten typ nowotworu. Wzrost ten niejednokrotnie przypisuje się lepszej dostępności do nowoczesnych metod diagnostyki obrazowej, w szczególności ultrasonografii (USG). Rozwój technologii obrazowych oraz ich powszechna dostępność przyczyniły się do częstszego wykrywania niewielkich zmian ogniskowych tarczycy, których średnica nie przekracza 15 mm, i które nie są wykrywalne palpacyjnie. Większość tych zmian to zmiany łagodne.

W celu odróżnienia zmian łagodnych od złośliwych, niezbędne jest obecnie wykonanie biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej celowanej (BACC). Technika ta, wykonywana przez doświadczonego specjalistę i we współpracy z wykwalifikowanym patologiem, cechuje się wysoką czułością i specyficznością. Niemniej jednak, swoistość i czułość tej metody nie zawsze spełniają oczekiwania, ponieważ ryzyko uzyskania wyników fałszywie ujemnych wynosi od 1,3% do 13,6%, a fałszywie dodatnich od 0,25% do 3%. Ponadto, BACC jest metodą inwazyjną, która może powodować dyskomfort u pacjenta. Istotnym ograniczeniem tej techniki

jest również brak możliwości rozróżnienia między rakiem pęcherzykowym a gruczolakiem pęcherzykowatym tarczycy.

W ostatnich latach prowadzone są badania mające na celu poprawę czułości i swoistości BACC poprzez wprowadzenie do diagnostyki paneli badań molekularnych. Ocena molekularna bioptatu pozwala na bardziej precyzyjne określenie charakteru zmiany w przypadku wątpliwych wyników (kategoria III i IV według klasyfikacji Bethesda). Równocześnie istnieje potrzeba opracowania prostego testu, który umożliwiłby jednoznaczne rozróżnienie raka tarczycy od zmian łagodnych. Test pozwalający na rozpoznanie raka tarczycy na podstawie analizy krwi byłby istotnym i pożądanym narzędziem diagnostycznym, które mogłoby znacznie wzbogacić algorytm postępowania w przypadku nowotworów tarczycy.

Z uwagi na powyższe, temat podjęty przez Doktoranta jest nie tylko aktualny, ale także w pełni uzasadniony w kontekście potrzeb współczesnej diagnostyki nowotworowej.

Praca jest złożona z 12 rozdziałów, które ze spisem ilustracji i tabel liczą łącznie 96 stron. Na końcu pracy znajdują się: bibliografia, spis tabel i rycin oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Opracowanie zawiera 25 tabeli i 52 wykresów i rycin. Na bibliografię składa się 135 pozycji piśmiennictwa ułożonych w kolejności cytowania i obejmujące zarówno doniesienia polskie, jak i zagraniczne głównie z ostatnich kilku lat. Recenzowana praca posiada typowy układ rozprawy doktorskiej. Składa się ze wstępu, w którym Doktorant przedstawił epidemiologię, diagnostykę i leczenie raka tarczycy. W dalszej części tego rozdziału autor wprowadza czytelnika w zagadnienia dotyczące ekspresji i roli miRNA. Rozdziały te są napisane zrozumiałym językiem i wprowadzają czytelnika zarówno w szczegóły leczenia raka tarczycy, jak i obecny stan wiedzy na temat badanych miRNA.

W kolejnych rozdziałach Doktorant przedstawił cele pracy. Pracę można zdefiniować jako retrospektywną analizę materiału klinicznego dotyczącego pacjentów z rakiem brodawkowatym tarczycy i z grupy kontrolnej w odniesieniu do przedoperacyjnego stężenia miRNAw surowicy oraz ekspresji miRNA w guzie. Cele pracy są jasno sformułowane i zrozumiałe:

1. Identyfikacja miRNA uczestniczących w patogenezie raka brodawkowego tarczycy,
2. Ocena poziomu ekspresji miRNA w raku brodawkowatym tarczycy w surowicy krwi obwodowej,

3. Ocena poziomu ekspresji miRNA w raku brodawkowatym tarczycy w tkance nowotworowej,
4. Ocena wykorzystania poszczególnych miRNA jako markerów biologicznych raka brodawkowego tarczycy.

W Materiałach i Metodach Doktorant przedstawił charakterystykę grupy badanej obejmującej łącznie 84 pacjentów, w tym 64 z rozpoznaniem histopatologicznie rakiem brodawkowatym tarczycy oraz 20 pacjentów po operacji z powodu wola guzkowego nietoksycznego stanowiących grupę kontrolną. Badany materiał jest reprezentatywny i pozwala na formułowanie wniosków. Co istotne, Doktorant wykonał badanie pilotażowe, do którego zakwalifikował 10 pacjentów z RBT i 2 z grupy kontrolnej, aby dokonać selekcji miRNA, mających być oceniane w drugim etapie badania obejmującym większą liczbę pacjentów.

Grupy badane i kontrolna są dobrze dobrane pod względem wieku. Otrzymane wyniki zostały poddane analizie statystycznej, a Doktorant wykorzystał prawidłowo dobrane testy statystyczne.

W swoim badaniu Doktorant wykazał istotnie większą ekspresję miRNA 200c-3p i jednocześnie zmniejszenie ekspresji pozostałych badanych cząsteczek w surowicy krwi obwodowej pacjentów z RBT w porównaniu do pacjentów z grupy kontrolnej. W utkaniu RBT Doktorant stwierdził mniejszą ekspresję miR 25-3p i zwiększoną ekspresję miR34a-5p i miR196a-5p w porówniu z grupą kontrolną. Autor wykazuje że zmniejszenie ekspresji miR 222-3p, 25-3p, 34a-5p, 196 a-5p w surowicy krwi obwodowej i zwiększona ekspresja miR 34a-5p w materiale tkankowym może mieć znaczenie prognostyczne w wykrywaniu RBT.

Uzyskane wyniki są poddane rzetelnej analizie i odniesione do wyników innych badaczy, Doktorant zachował ostrożność w formułowaniu wniosków, które są wynikiem poddania obiektywnej ocenie uzyskanych rezultatów i odpowiadają na sformułowane cele pracy.

1. Na podstawie przeprowadzonych analiz molekularnych i bioinformatycznych miR-25-3p, miR-34a-5p, miR-196a-5p, miR-200c-3p, miR-221-3p oraz miR-222-3p zidentyfikowano jako główne miRNA uczestniczące w patogenezie raka brodawkowego tarczycy w badanej populacji.

2. Istotny wzrost ekspresji miR 200c-3p oraz istotny spadek ekspresji miR 221-3p, 222- 3p, 25-3p, 34a-5p oraz 196a-5p w surowicy krwi obwodowej wskazuje na istnienie wzorca ekspresji badanych miRNA mogącego służyć jako potencjalny nieinwazyjny test diagnostyczny w rozpoznawaniu raka brodawkowego tarczycy na podstawie badania krwi obwodowej.

3. Istotny spadek ekspresji miR 25-3p i istotny wzrost ekspresji miR34a-5p i 196a-p stwierdzony w raku brodawkowatym tarczycy może świadczyć o istnieniu wzorca ekspresji miRNA charakterystycznego dla materiału tkankowego, mogącego znaleźć zastosowanie w diagnostyce z wykorzystaniem biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej.

4. Możliwość dyskryminacji między chorymi z rakiem brodawkowatym tarczycy, a osobami zdrowymi wykorzystująca ocenę miR-222-3p, miR-25-3p, miR-34a-5p, miR-196a-5p w surowicy krwi obwodowej oraz miR-25-3p i miR-34a-5p w materiale tkankowym wskazuje na potencjalne wykorzystanie wyżej wymienionych miRNA w rutynowej praktyce klinicznej.

Pytania i uwagi:

- 1) Recenzent sugeruje, żeby nie używać w obecnej pracy sformułowań: wzrost i spadek ekspresji, gdyż mamy tylko jeden pomiar u badanego pacjenta, więc odnosimy poziom ekspresji do poziomu ekspresji w grupie kontrolnej.
- 2) Czy Doktorant jest w stanie się pokusić o określenie poziomu ekspresji poniżej lub powyżej którego można mówić o zwiększonym prawdopodobieństwie raka tarczycy i jaka jest wartość prognostyczna tego wskaźnika – czy prognozuje raka brodawkowego, przerzuty lokoregionalne, czy odległe czy też rokowanie jeśli chodzi o przeżycie?
- 3) W odniesieniu do wniosku 1, 2, 3 recenzent chciałby dopytać czy wniosek stanowi podsumowanie jednoczynnikowej czy wieloczynnikowej analizy regresji?
- 4) Wydaje się, że wniosek 4 jest zbyt optymistyczny w stosunku do uzyskanych wyników. Zdaniem recenzenta ocena miRNA byłaby pomocna w odróżnianiu RBT od zmian podejrzanych w BACC (Kat III, IV i V) lub jako uzupełnienie panelów molekularnych stosowanych w BACC tarczycy. Ale chyba nie pozwoli na wyselekcjonowanie pacjentów z rakiem brodawkowatym?
- 5) Ponadto recenzent zwraca uwagę, że wykres dotyczący korelacji rang Spearmana ekspresji miR196a-50 w surowicy krwi obwodowej i tkance nowotworowej (Rycina 40) jest niezgodny z wynikami tabeli 21 (zapewne pomyłka pisarska).

Literatura naukowa cytowana w niniejszym opracowaniu jest odpowiednio dobrana i właściwie wykorzystana w tekście rozprawy. Praca jest napisana starannie, choć autor nie ustrzegł się drobnych błędów stylistycznych i interpunkcyjnych. Uwagi te jednak nie zmniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy.

W podsumowaniu stwierdzam, że praca dowodzi umiejętności stawiania problemów badawczych, organizacji warsztatu badawczego, przedstawienia wyników badań i ich rzetelnej,

krytycznej interpretacji. Rozprawa doktorska lek. Damiana Zadwornego charakteryzuje się trafnością wyboru tematu. Praca jest cennym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego i ma potencjalną wartość kliniczną, zarówno dla lekarza specjalisty endokrynologa jaki i potencjalnie lekarza chirurga.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa lek. Damiana Zadwornego spełnia wszystkie ustawowe wymogi i kryteria, jakim powinna odpowiadać praca na stopień doktora nauk medycznych. Zwracam się do Wysokiej Rady Uniwersytetu Medycznego w Łodzi o dopuszczenie lek. Damiana Zadwornego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med.
MAREK DEBECIUS
Specjalista chirurgii
głębokiej i onkologicznej
Specjalista endokrynolog
Nr 1056424