

Kielce 05.05.2020 r.

Recenzja

rozprawy doktorskiej lek. Martynty Borowczyk

pt. „**Poszukiwanie genetycznych determinantów złośliwości zmian
pęcherzykowych tarczycy metodą screeningu genomowego**”

pod kierunkiem prof. dr hab. n. med. Eweliny Szczepanek-Parulskiej

Katedra i Klinika Endokrynologii, Przemiany Materii i Chorób Wewnętrznych

Wydział Lekarski

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi spójny tematycznie cykl czterech publikacji. Temat pracy doktorskiej jest bardzo istotny a znalezienie wykładników złośliwości zmian pęcherzykowych, innych niż wynik pooperacyjnego badania histologicznego będzie odkryciem przełomowym o dużej praktycznej wartości klinicznej. Zmiany ogniskowe w tarczycy uwidaczniane w badaniu usg są zjawiskiem bardzo częstym zależnie od wieku badanej populacji i płci mogą sięgać nawet ponad 60% badanych. Większość z nich ma charakter łagodny jednak około 5% to nowotwory złośliwe. Obecnie złotym standardem diagnostycznym zmian ogniskowych w tarczycy jest wykonana pod kontrolą usg biopsja cienkoigłowa. Metoda ta ma jednak spore ograniczenia dotyczące jednoznacznej oceny złośliwości zmian pęcherzykowych, które ostatecznie mogą okazać się guzkiem rozrostowym, gruczolakiem czy wariantem pęcherzykowym raka brodawkowego lub bardzo rzadko rakiem pęcherzykowym. W tych przypadkach niejednokrotnie endokrynolodzy sięgają po pomoc chirurga i zalecają

operacje o charakterze diagnostyczno-leczniczym. Znalezienie innych niż histologiczne, wykładników złośliwości, takich zmian jest jednym z najistotniejszych zagadnień diagnostyki endokrynologicznej. Odkrycie takie pozwoliłoby uniknąć wielu operacji tarczycy. Duże nadzieje pokłada się w poznaniu podłoża molekularnego tych zmian i znalezienie istotnych różnic, pozwalających na precyzyjne rozpoznanie. Tak więc autorka wybierając temat swoich badań bardzo trafnie włączyła się w nurt aktualnych, kluczowych badań w tyreologii. Poszukiwanie molekularnych wykładników złośliwości wymaga szerokiej analizy wielogenowej stąd wybór nowoczesnego narzędzia badawczego jakim jest sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) jest bardzo trafny. Dotychczas stosowane narzędzia diagnostyki molekularnej w ocenie zmian ogniskowych w tarczycy rozwijają się w kierunku coraz bardziej rozbudowanych testów wielogenowych co dowodzi złożoności problemu.

Rozprawa doktorska liczy 171 stron i obejmuje: wykaz publikacji, wyjaśnienia stosowanych skrótów, założenia i cel pracy, omówienie osiągnięć badawczych na tle aktualnego stanu wiedzy, podsumowanie najważniejszych wniosków, streszczenie pracy w języku polskim i angielskim oraz kopie czterech publikacji wchodzących w skład rozprawy wraz z oświadczeniami współautorów o charakterze udziału i szacunkowym określeniem ich procentowego wkładu.

Pragnę podkreślić spójność tytułu pracy doktorskiej z tematyką analizowanych publikacji. W pierwszej pracy autorka przeprowadziła metaanalizę prac oceniających przydatność 2 komercyjnych, molekularnych testów diagnostycznych opartych na analizie profilu ekspresji 167 genów-test GEC oraz na badaniu 56 mutacji i rearanzacji genomowych- ThyroSeq 2 w ocenie ryzyka złośliwości guzków kategorii III i IV w BACC. Wyniki metaanalizy wskazują na wysoką czułość testu GEC (wyższą niż ThyroSeq2) natomiast swoistość i

dokładność jest wyższa dla testu ThyroSeq ale jednak niezadowalająca z praktycznego, klinicznego punktu widzenia. Mimo wykonania testu molekularnego nadal zbyt dużo operacji jest wykonywanych z wynikiem diagnostyki „podejrzenie”, które po operacji nie zostaje potwierdzone rozpoznaniem raka. Autorka krytycznie ocenia oba testy i wyciąga wniosek o potrzebie prowadzenia dalszych badań w kierunku poszukiwania doskonalszych narzędzi diagnostycznych.

W drugiej pracy autorka podjęła próbę oceny różnic w profilu molekularnym gruczolaków i raków pęcherzykowych tarczycy. Do tego celu wykorzystwała dostępny do techniki NGS panel 50 genowy *Ion AmpliSeq Cancer Hotspot v2*. Potencjalnie patogenne mutacje stwierdziła u 69% chorych z rakiem tarczycy ale także aż u 40% chorych z gruczolakami. Wykazała, że wiele mutacji jest wspólnych dla obu typów nowotworów jednak ilość mutacji w raku jest większa. Autorka wytypowała geny *TP53* i *FLT3* jako kandydatów na markery złośliwości zmian pęcherzykowych tarczycy. A 3 mutacje *TP53*, *FLT3* i *RET* rozpatrywane łącznie jako najlepszy model diagnostyczny, aczkolwiek ciągle jeszcze daleki do idealnego (przy pomocy testu prawidłowo zaklasyfikowano 45,7% raków i 8,6% gruczolaków).

W kolejnej pracy autorka wykorzystwała stosowny uprzednio panel 50 genowy do oceny materiału genetycznego pozyskanego podczas BACC zmian kategorii III i IV wg. systemu Bethesda. Wyniki autorka porównała z ostatecznym rozpoznaniem histologicznym. W materiale histopatologicznym badanej grupy, znaleziono zaledwie 1 przypadek gruczolaka i 1 raka pęcherzykowego co praktycznie uniemożliwiło kontynuację rozważań nad zasadniczym problemem będącym przedmiotem badań doktorantki. Poczynione obserwacje pozwoliły natomiast na krytyczną ocenę przydatności 50 genowego panelu do oceny zmian w tarczycy o

niejednoznacznym wyniku badania cytologicznego i skłania do poszukiwania nowych wykładników molekularnych złośliwości, które być może nie zostały włączone do stosowanego panelu diagnostycznego.

Ostatnia praca poświęcona jest badaniu częstości występowania mutacji *FLT3* w raku pęcherzykowym tarczycy i próbie oceny jej znaczenia. W badanej grupie 35 przypadków raka pęcherzykowego tarczycy autorka wykazała szerokie spektrum i wysoką częstość występowania różnych mutacji w genie *FLT3*. Autorka wykazała, że pacjenci z mutacją w domenie kinazy tyrozynowej genu *FLT3* cechowali się wyższym stadium zaawansowania klinicznego w porównaniu do chorych bez mutacji. Należy nadmienić, że są to pierwsze doniesienia na temat znaczenia mutacji w genie *FLT3* w raku pęcherzykowym. Wyniki badań wzbogaca bardzo ciekawie poprowadzona dyskusja, w której autorka zwraca uwagę na wspólne podłoże molekularne wielu narządowo różnych nowotworów, rozważając koncepcje ukierunkowanych molekularnie terapii.

Należy podkreślić, że prace badawcze wykonano z wykorzystaniem nowoczesnych, niełatwych metod diagnostyki molekularnej. Opis stosowanych technik jest wyczerpujący i szczegółowy, podobnie jak uzyskanych wyników oraz dyskusji, co wskazuje na świetną orientację doktorantki w badanym zagadnieniu. Użycie odpowiednich metod i algorytmów postępowania, właściwa analiza bioinformatyczna zapewniają rzetelną i obiektywną ocenę wyników przeprowadzonych badań oraz wyciągnięcie poprawnych wniosków. Doktorantka równie swobodnie porusza się w obszarze badań klinicznych jak i molekularnych.

Wszystkie prace poza częścią badawczą w dyskusji zawierają obszerną analizę dostępnej literatury światowej dotyczącej przedstawianych zagadnień. Są napisane klarownym, naukowym językiem. Doktorantka wykazała się w nich umiejętnością kompleksowej analizy danych piśmiennictwa i trafnością

spostrzeżeń. Umiejętne wykorzystanie piśmiennictwa i krytyczna ocena wyników innych autorów jak i własnych, wskazuje na dużą dojrzałość naukową i świetne teoretyczne przygotowaniu doktorantki.

Łączny wskaźnik IF publikacji wchodzących w skład niniejszej rozprawy wynosi 16,101 i 380,000 punktów MNiSW. Tak wysoki sumaryczny IF wskazuje, że badania zostały właściwie zaplanowane i przeprowadzone oraz reprezentują wysoki poziom naukowy, co zostało pozytywnie ocenione przez recenzentów tych czasopism. Wszystkie te prace są opracowaniami zbiorowymi, w których Doktorantka jest pierwszym autorem. Doktorantka odegrała wiodącą rolę w zaplanowaniu pracy doświadczalnej będącej przedmiotem publikacji, w wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i analizie wyników uzyskanych w badaniach oraz przygotowaniu manuskryptów do publikacji.

W podsumowaniu stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Martyny Borowczyk charakteryzuje się trafnością wyboru tematu oraz narzędzi badawczych. W analizowanym cyklu publikacji Doktorantka wykazała się umiejętnością sformułowania celów badawczych, zaplanowania i przeprowadzenia badań naukowych oraz trafnego wnioskowania i prowadzenia dyskusji własnych wyników z osiągnięciami innych naukowców. Zawarty w rozprawie cykl publikacji jest spójny tematycznie i przyczynia się do lepszego poznania omawianej tematyki, toteż jest cennym uzupełnieniem dostępnego piśmiennictwa naukowego. Autorka w pełni zrealizowała zaplanowany cel, dobrze opanowała niełatwy warsztat badawczy i wykazała doskonałe przygotowanie merytoryczne. Rozprawa ma dużą wartość poznawczą i stanowi podstawę do kontynuowania badań naukowych w tej dziedzinie. Nie wnoszę uwag krytycznych co do zasadności podejmowanych badań, toku ich przeprowadzenia, doboru metod

badawczych, wyników oraz ich opracowania, interpretacji i dyskusji oraz wniosków końcowych.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji praca autorstwa lek. Martynty Borowczyk spełnia wszystkie ustawowe wymogi i kryteria, jakim powinna odpowiadać praca na stopień doktora nauk medycznych. Tym samym zwracam się do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu o dopuszczenie lek. Martynty Borowczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy ze względu na nowatorski charakter tematyki przeprowadzonych badań, znakomity plan doświadczeń, przejrzystość analizy uzyskanych wyników i wysoką sumaryczną wartość IF cyklu publikacji stanowiących niniejszą rozprawę.

Aldona Kowalska

dr hab. med. Aldona Kowalska prof. UJK