

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej lek. Konstantina Maksina
pt. „Zastosowanie markerów uszkodzenia DNA w ocenie podścieliska raka
brodawkowego tarczycy”**

Rak brodawkowy jest najczęstszym nowotworem tarczycy. Przeważnie przebiega bardzo łagodnie chociaż w niektórych przypadkach daje przerzuty do węzłów chłonnych lub miejsc odległych. Rola mikrośrodowiska w rozwoju nowotworów tarczycy i jego korzystny lub niekorzystny wpływ na progresję guza nie została jeszcze jednoznacznie określona.

Uszkodzenie DNA zwłaszcza o typie dwuniciowego pęknięcia należy do niebezpiecznych zjawisk mogących doprowadzić do aberracji chromosomalnych lub uruchamiających mechanizmy apoptozy. Uszkodzenia te mogą być spowodowane oddziaływaniem czynników biologicznych, fizycznych lub chemicznych. W komórkach, w których pojawia się dwuniciowe pęknięcie DNA dochodzi do fosforylacji histonu H2A i powstania formy zwanej γ H2A.X, której rolą jest uruchomienie mechanizmów naprawczych DNA. Proces fosforylacji H2A prowadzi także do pojawienia się białka 53BP1, biorącego udział w akumulacji białka p53 (aktywującego procesy naprawy DNA). Białko to hamuje także cykl komórkowy do czasu naprawy kwasu dezoksyrybonukleinowego.

Podjęcie przez lek. Konstantina Maksina zadania oceny ekspresji markerów uszkodzenia DNA w komórkach zrębu tarczycy i podścieliska raka brodawkowego tarczycy

jest bardzo interesującym celem badawczym i może stanowić istotny wkład w zrozumienie procesów wpływu mikrośrodowiska nowotworowego na rozwój złośliwych guzów tarczycy.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma typowy układ - obejmuje 147 stron i jest podzielona na 6 głównych rozdziałów i 6 rozdziałów pomocniczych. W tekście zamieszczono 34 fotografie, 25 tabel i 13 rycin, a wykorzystane w rozprawie piśmiennictwo obejmuje 174 pozycje.

We **wstępie** pracy lek. Konstantin Maksin opisuje etiologię, patogenezę i przebieg kliniczny wraz z diagnostyką i terapią raka brodawkowatego tarczycy ze szczególnym uwzględnieniem zjawisk molekularnych zachodzących w komórkach tego nowotworu. Kolejny duży podrozdział dotyczy procesów starzenia i ich znaczenia w procesie kancerogenezy i zawiera wiele interesujących informacji uzasadniających wybór tego oryginalnego tematu rozprawy przez Doktoranta.

W tekście wstępu pojawia się kilka drobnych nieścisłości - zamiast pojęcia scyntygrafia jądrowa (str. 33) powinno być raczej użyte wyrażenie „scyntygrafia radioizotopowa”. Doktorant pisze też o scyntygrafii technetowej (^{99m}Tc) jako tej, która pozwala na ocenę stopnia wychwytu jodu co w części przypadków jest prawdą. Scyntygrafia jodowa i technetowa mogą się jednak różnić stopniem wychwytu znacznika a scyntygrafia jodowa jest bardziej dokładną i specyficzną techniką obrazową od scyntygrafii technetowej. Należy jednak pamiętać, że większość przypadków raka brodawkowatego tarczycy to małe ogniska nowotworu, o wielkości poniżej rozdzielczości scyntygrafii radioizotopowej, stąd to badanie nie ma już takiego znaczenia w diagnostyce jak np. badanie USG. Tyreoglobulina staje się markerem raków zróżnicowanych tarczycy dopiero po tyreoidektomii, a zwłaszcza po następczym leczeniu jodem promieniotwórczym gdyż wcześniej wiele różnych czynników (w tym niedobór jodu w diecie czy obecność stanu zapalnego w tarczycy) może wpłynąć na wzrost jej stężenia. W podrozdziale dotyczącym leczenia raka brodawkowatego tarczycy

Doktorant użył sformułowania „dłuższe leczenie jodem promieniotwórczym” (str. 37) co powinno się raczej odnosić do częstszego leczenia tym izotopem. Na stronie 13 w odniesieniu do mutacji protoonkogenu RET użyto nazwy terminalna zamiast germinalna.

Cele badawcze pracy obejmowały porównanie ekspresji wybranych markerów uszkodzenia DNA w komórkach zrębu tarczycy i podścieliska raka brodawkowatego tarczycy a także ustalenie czy istnieją korelacje pomiędzy tą ekspresją a stopniem zaawansowania nowotworu i przebiegiem klinicznym obejmującym również określenie „rodzaju zabiegu”. O rozległości zabiegu często decyduje chirurg mając lub nie dostateczne informacje o zaawansowaniu choroby przed operacją. Analiza tego parametru nie wnosi żadnych istotnych informacji do przedstawionej pracy. Podobnie niewłaściwe jest określenie „czas obserwacji”, w tym miejscu powinien być raczej użyty czas do uzyskania remisji nowotworu. Doktorant jest jednak patologiem i tego typu obserwacje – już czysto kliniczne – mogły nie być dla niego dostępne. Pozostałe cele zostały zdefiniowane jasno metodycznie a założone analizy mają charakter oryginalny i nowatorski.

Materiał badawczy stanowiły preparaty gruczołu tarczowego pochodzące od 50 chorych (głównie kobiet) z rakiem brodawkowatym tarczycy operowanych w latach 2006-2009. Wykorzystana w pracy **metodyka** obejmowała ponowną analizę histologiczną skrawków tarczycy oraz badanie immunohistochemiczne markerów uszkodzenia DNA: 53BP1 oraz γ H2A.X a także Ki 67 - markera proliferacji komórek. W dalszej kolejności dokonywano porównania ekspresji wymienionych markerów w obrębie komórek zrębu gruczołu tarczowego jak i komórek podścieliska raka brodawkowatego tarczycy. Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu odpowiednich metod statystycznych dokonując m.in. oceny stopnia korelacji pomiędzy nasileniem ekspresji badanych markerów a stopniem zaawansowania nowotworu. Poza badaniami mikroskopowymi brano pod uwagę także wyniki badań makroskopowych guza. W metodyce opisano klasyfikację poszczególnych

podtypów raka brodawkowego tarczycy. Przy tabeli przedstawiającej stopień zaawansowania pTNM i TNM warto umieścić informację, że dotyczy to raka tarczycy i podać materiały źródłowe (odpowiednia wersja dokumentu American Joint Committee of Cancer - AJCC).

Wyniki badań poza formą opisową i fotograficzną przedstawiono również w postaci 25 tabel i 13 rycin i obejmują one analizy demograficzne badanych chorych, dane makro- i mikroskopowe guzów jak i ocenę ekspresji markerów. Badania wykazały m.in. wyższą ekspresję γ H2A.X w podścielisku zmian wielogniskowych ale nie w zrębie tarczycy poza guzem, podobne wyniki uzyskano dla ekspresji 53BP1. Ekspresja γ H2A.X zarówno w podścielisku nowotworu jak i w zrębie tarczycy poza guzem wykazywała niewielką korelację z wiekiem pacjentów czego nie potwierdzono w odniesieniu do ekspresji 53BP1. Ekspresja 53BP1 wykazywała przeważnie dodatnią korelację z ekspresją γ H2A.X. W wynikach badań histopatologicznych (Dane zbiorcze – tabela 5) zastanawia fakt osobnego podania rozpoznania przewlekłego limfocytowego zapalenia tarczycy obok wole Hashimoto, co wydaje się równoznaczne histopatologicznie, choć określenie wole może wskazywać na powiększenie tarczycy ale brak na ten temat dokładniejszych informacji w rozprawie. Niektóre parametry podane w wynikach (jak np. brak lub obecność limfadenektomii) nie mają istotnego znaczenia dla głównych celów pracy ale rozumiem, że miały stanowić informację czysto opisową w odniesieniu do grupy badanej.

Generalnie przedstawione w tabelach i na rycinach wyniki badań w przejrzysty sposób ukazują rezultaty analizy ekspresji poszczególnych markerów. Na stronie 67 w zdaniu określającym nasilenie ekspresji γ H2A.X w odniesieniu do wielogniskowości raka brodawkowego tarczycy zamiast słowa „zależna” należałoby użyć np. „towarzyszyła lub korelowała z większą liczbą ognisk RBT”, ponieważ zależność przyczynowo-skutkowa jest na tym etapie niemożliwa do określenia. Podobna uwaga dotyczy oceny ekspresji tego

markera w podścielisku różnej wielkości raków tarczycy. W wielu przypadkach przy podanej średniej np. wielkości guza przedstawiono średnią i zakres tych wyników ale brakuje odchylenia standardowego (SD).

W rozdziale „Dyskusja” Doktorant w interesujący sposób i wskazujący na szeroką znajomość tematu omawia dotychczas opublikowane wyniki badań ekspresji markerów starzenia w innych nowotworach. Co prawda na temat roli podścieliska i procesów starzenia w nowotworach tarczycy nie przedstawiono do tej pory zbyt wielu danych (głównie dotyczą one oceny ekspresji tych markerów po zastosowanym leczeniu izotopowym) lecz podkreśla to tylko oryginalny charakter przedstawionej rozprawy. Natomiast nie są potrzebne w dyskusji dywagacje na temat rodzaju stosowanego zabiegu operacyjnego, ponieważ jak już wspomniano wcześniej nie wnoszą one nic do tematu pracy.

Wyciągnięte wnioski są odpowiednio umotywowane otrzymanymi wynikami i odpowiadają założonym celom pracy.

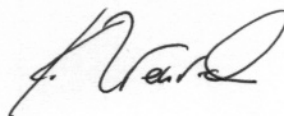
Zwyczajowo w spisie skrótów obok nazw polskich podaje się też o nazwy w języku angielskim, od których te skróty często pochodzą.

Wymienione wcześniej drobne niedociągnięcia nie umniejszają wartości naukowej tej interesującej pracy, która spełnia kryteria odpowiadające pracom na stopień doktora nauk medycznych. Niewątpliwie podjęty przez Doktoranta temat wzbogaca wiedzę dotyczącą roli podścieliska i procesów starzenia w rakach tarczycy, co może mieć istotne znaczenie dla diagnostyki tych nowotworów, prognozowania ich przebiegu jak i być może terapii w przypadkach opornych na standardowe leczenie. Warto byłoby kontynuować podjęte badania zwłaszcza u chorych z rakiem brodawkowym tarczycy o wysokim stopniu zaawansowania choroby.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska cechuje się odpowiednim doborem materiału badawczego oraz zastosowaniem właściwych i adekwatnych do celu pracy metod

badawczych. Poza umieszczeniem w pracy kilku nieistotnych parametrów zwraca uwagę wnikliwa analiza wyników, właściwy dobór metod statystycznych, krytyczny charakter prowadzonej dyskusji, oryginalność badań i prawidłowość wyciąganych wniosków co upoważnia do stwierdzenia, że Doktorant jest przygotowany do planowania i prowadzenia badań naukowych. Szczegółowe dyskusje wyników badań i odniesienia do istotnych pozycji literatury oraz szeroka dokumentacja fotograficzna pozwalają wykorzystać te prace również w celach edukacyjnych.

Podsumowując uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa stanowi wartościowy wkład do badań nad rolą mikrośrodowiska w rozwoju raka brodawkowego tarczycy. Rozprawa spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym. Zwracam się wobec tego do Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego I Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie lek. Konstantina Maksina do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Poznań, 20.03.2017

dr hab. n. med. Katarzyna Ziemnicka prof. UM